

Produção de materiais biomiméticos para células fotovoltaicas

RICARDA DANIELA VALENTIM DA TORRE

Novembro de 2016

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Ricarda Daniela Valentim da Torre

Porto, Novembro de 2016

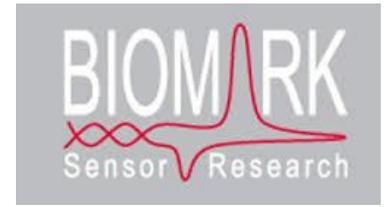
Orientação:

Doutora Goreti Sales

Doutora Felismina Moreira



INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA
RAMO OTIMIZAÇÃO ENERGÉTICA NA INDÚSTRIA
QUÍMICA



Produção de materiais biomiméticos para células fotovoltaicas



Production of biomimetic materials for photovoltaic cells

Dissertação de mestrado submetida ao Instituto de Engenharia do Porto para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizado sob a orientação científica da Doutora Felismina Moreira e da Doutora Goreti Sales, Professora Adjunta do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto.

AGRADECIMENTOS

À **Professora Doutora Goreti Sales**, pelo acolhimento no seu laboratório -*BioMark Sensor Research*, por toda a ajuda prestada, pela compreensão e incentivo, o meu muito obrigada;

À **Doutora Felismina Moreira**, investigadora da *BioMark*, também pela preciosa ajuda no arranque e desenvolvimento do presente estudo, e pela disponibilidade demonstrada;

Ao **Rui Gomes**, investigador na *BioMark*, por ter disponibilizado parte do seu tempo, para me acompanhar nos primórdios deste estudo;

A toda a **equipa BioMark**, por se mostrarem também sempre disponíveis em tudo o que precisei, principalmente no programa Autolab;

Por fim, à **minha família** pela paciência nos momentos menos confortáveis para mim.

“O azarado não tem outra medicina que não a esperança”

William Shakespeare



O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma proteína produzida pelas células que revestem o trato gastrointestinal do feto. No entanto, também pode ser produzida em adultos, mas em quantidades muito pequenas. Quando se deteta concentrações muito elevadas desta proteína no sangue, pode ser indício de algumas complicações presentes no trato gastrointestinal, como por exemplo cancro do cólon e reto. Desta forma, torna-se importante a criação de dispositivos ou formas de deteção deste biomarcador, para que a doença possa ser detetada atempadamente, criando condições para o tratamento da mesma. Além disso, a procura de novos materiais que confirmem maior seletividade e sensibilidade aos sistemas de deteção, que apresentem menores riscos para o doente quando utilizados em dispositivos e que permitam uma análise *point-of-care*, são consideradas elementos cruciais no apoio à decisão clínica.

No presente estudo, desenvolveu-se um sensor eletroquímico para a deteção do CEA, usando-se como suporte uma superfície de vidro condutor e como material sensor um polímero preparado por técnica de impressão molecular (MIP). Para avaliação do comportamento da superfície sensora perante a proteína, utilizaram-se métodos eletroquímicos, como a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância. O polímero sensor foi preparado com pirrol e por electropolimerização, tendo-se otimizadas várias variáveis, como a sua concentração em solução, gama de potencial aplicada e a velocidade de varrimento. Também foi preparado um polímero não impresso (NIP), preparação esta efetuada de forma análoga à do MIP, mas sem a presença da proteína em estudo. É de salientar, que algumas etapas na conceção do MIP e do NIP foram elaboradas, a pensar na integração final destes dois elementos numa célula solar sensibilizada com corante (DSSC).

O sensor desenvolvido foi calibrado por incubação consecutiva em concentrações crescentes de CEA. A curva de calibração apresentou um comportamento linear entre $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-1}$ $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mostraram ainda boa precisão (desvio padrão igual a 13%) e o limite de deteção obtido foi de 0,935 ng/mL . O dispositivo apresentou, porém, algumas limitações à presença de iodo em solução, pelo que a sua aplicação em DSSCs requer estudos adicionais.

Palavras-Chave: Antígeno carcinoembrionário, Eletroquímica, Polímero com impressão molecular, biomarcadores do cancro.

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein produced by cells which are in contact with the gastrointestinal tract of the foetus. CEA is also found in adults, but in small quantities. High concentrations of this protein in the blood, may therefore signal gastrointestinal tract complications, such as colorectal cancer. In this regard, it is important to create new devices or methods for tracking this biomarker, in order to, detect colorectal cancer in its early stages. Moreover, the search for new materials that confer higher selectivity and sensitivity to the detection systems are also crucial elements for sustaining clinical medical decisions.

In this study, an electrochemical CEA sensor was developed by assembling directly on a conductive transparent glass a sensing material prepared by molecular imprinting polymer (MIP) technology. The behaviour of the sensing layer in the presence of the protein was evaluated by several electrochemical techniques, such as, cyclic voltammetry and impedance spectroscopy. Several parameters regarding the polymerization of pyrrole have been optimized, namely solution concentration, potential range and scan-rate. A Non-imprinting polymer (NIP) material was also prepared as control, in the same form as MIP but in the absence of protein. Some procedures were made having in mind that the sensor would be included in a dye sensitized solar cell (DSSC).

The biosensor was calibrated by consecutive incubation in increasing concentrations of CEA. The calibration curve displayed a linear behavior from 5.0×10^{-6} a 5.0×10^{-1} $\mu\text{g/mL}$. The obtained results revealed a good precision (standard deviation of 13%) and a limit of detection of 0.935 ng/mL. The device displayed however limited behavior in the presence of iodide, for which its application to DSSCs requires additional studies.

Keys: Carcinoembryonic Antigen, Electrochemical, Molecular Imprinting, Cancer Biomarkers.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1. Cancro do Colo-retal	1
1.2. Epidemiologia da doença.....	2
1.3. Fatores de risco associados.....	5
1.4. Métodos de diagnóstico e rastreio.....	6
1.5. Biomarcadores.....	7
1.5.1. Antígeno carcino-embrionário	8
1.6. Polímeros de impressão molecular	9
1.7. Biossensores	11
1.7.1. Elemento de bioreconhecimento.....	14
1.7.2. Transdutor	15
1.8. Aplicação dos biossensores no cancro	16
1.9. Técnicas eletroquímicas.....	19
1.9.1. Voltametria Cíclica	19
1.9.2. Espectroscopia de Impedância	21
1.9.3. Sistema de três elétrodos	22
1.10. Objetivos e Organização da dissertação.....	24
2. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL.....	25
2.1. Material e equipamento utilizados	25
2.2. Reagentes e soluções.....	26
2.3. Elétrodos utilizados	27
2.4. Preparação de material biomimético	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1. Limpeza do eletrodo de trabalho (vidro FTO).....	30

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

3.2. Aaminação da superfície.....	31
3.3. Eletropolimerização.....	32
3.4. Preparação do MIP	39
3.4.1. Curva de Calibração	42
4. CONCLUSÃO e PERSPETIVAS FUTURAS.....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2D – Duas dimensões

3D – Três dimensões

CCR – Cancro Colo retal

CEA – Antigénio carcinoembrionário

DSSC – Célula solar sensibilizada com corante

FTO – Óxido de estanho dopado com flúor

HNPCC – Cancro colo retal hereditário não polipoide

MIP – Polímero molecularmente impresso

NIP – Polímero não impresso

PAF – Polipose adenomatosa Familiar

PPy – Polipirrol

Py – Pirrol

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Imagem dos vários estádios do cancro colo-retal Imagem adaptada de (Frazão, 2016)	2
Figura 2 Gráfico relativo à incidência e à mortalidade por cancro no mundo (dados GLOBOCAN 2012).	3
Figura 3 Gráfico relativo à incidência e à mortalidade por cancro em países europeus (GLOBOCAN 2012).	4
Figura 4 Gráfico relativo à incidência e à mortalidade por cancro em Portugal (dados GLOBOCAN 2012).	4
Figura 5 Mecanismo de eletropolimerização do pirrol. (Dubal, Lee, Kim, Kim, & Lokhande, 2012).....	11
Figura 6 Elementos integrantes de um biossensor	12
Figura 7 Formação de local de ligação em polímero molecularmente impresso. Remover o molde na figura.....	13
Figura 8 Elementos constituintes de um biossensor.	16
Figura 9 Esquema representativo do funcionamento de um biossensor eletroquímico com uma enzima imobilizada num eléctrodo de platina....	17
Figura 10 Representação esquemática de um imunossensor.....	18
Figura 11 Voltamograma genérico obtido em voltametria cíclica, com indicação do potencial do pico (Ep) anódico (a) ou catódico (c) e das correntes Farádicas e Capacitivas.	20
Figura 12 Diagrama típico de Nyquist com o seu circuito equivalente (RIBEIRO, SOUZA, & ABRANTES, 2015).....	Erro! Marcador não definido.
Figura 13 Sistema três eléctrodos, com ligação a fluxo de azoto para eliminar a interferência causada pelo oxigénio.....	23
Figura 14: Fotografia da balança (esquerda) e do banho de ultrassons (direita) utilizados neste trabalho.	26
Figura 15 Potencióstato/galvanostato Metrohm PGSTAT302N.....	26

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Figura 16	Montagem sistema três elétrodos, (A) Eléctrodo de referência Ag/AgCl, (B) Eléctrodo de trabalho FTO, (C) contra eléctrodo de carbono.....	28
Figura 17	Delimitação das áreas de trabalho no vidro FTO	28
Figura 18	Passos sequenciais da preparação do MIP.	29
Figura 19	Forma estrutural da cisteamina cloridrato (MerckMillipore, 2016)	31
Figura 20	Registos electroquímicos das superfícies de vidro de FTO limpo com platina, sem (FTO-Pt) e com (FTO-Pt-Cis) cisteamina, por (a) voltametria cíclica, (b) e por espectroscopia de impedância.	32
Figura 21	Registos electroquímicos de (a) voltametria cíclica e de (b) espectroscopia de impedância relativos à polimerização em superfícies de vidro de FTO-Pt-Cis com concentrações de pirrol iguais a $5,0 \times 10^{-3}$ e a $5,0 \times 10^{-2}$ mol/L.	33
Figura 22	Representação gráfica da aplicação de velocidades diferentes sobre NIP's diferentes	34
Figura 23	Registos da eletropolimerização do pirrol por voltametria cíclica desde -0,8V a (a) +0,65V; (b) +0,80V; (c) e +1,40V.	35
Figura 24	Registos electroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos eléctrodos FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +0,65V.	36
Figura 25	Registos electroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos eléctrodos FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +0,80V.	36
Figura 26	Registos electroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos eléctrodos FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +1,40V.	37
Figura 27	Registos electroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos eléctrodos FTO-Pt-Cis-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +0,80V, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 5 ciclos.	38

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Figura 28	Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +0,80V, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 10 ciclos.....	39
Figura 29	Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +0,80V, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 20 ciclos.....	39
Figura 30	Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-CEA/PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,20 e +0,90V, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 3 ciclos, relativos aos vários estágios de produção do material MIP.	40
Figura 31	Procedimento adotado para a preparação de soluções padrão envolvidos no traçado da curva de calibração.	41
Figura 32	Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b,c) por espectroscopia de impedância dos elétrodos MIP (FTO-Pt-Cis-CEA/PPy) e NIP (FTO-Pt-Cis-PPy), numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,20 e +0,90V, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 3 ciclos.....	42
Figura 33	Curva de calibração do material sensor MIP e NIP.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Indicadores de mortalidade relativos ao cancro do cólon, por sexo, em Portugal entre 2010 e 2014 (DGS, 2014).....	5
Tabela 2	Biomarcadores mais comuns utilizados na deteção de cancro	8
Tabela 3	Limites máximos fisiológico para o biomarcador CEA em indivíduos saudáveis. (Sousa, 2016)	9
Tabela 4	Áreas de aplicação de biossensores. (P.Fonseca, 2003)	17
Tabela 5	Lista de reagentes utilizados ao longo do presente trabalho e as marcas comerciais correspondentes.	27
Tabela 6	Condições utilizadas para a limpeza eletroquímica do suporte sensor de vidro com FTO	31
Tabela 7	Condições eletroquímicas em voltametria cíclica e composição da solução de iodo utilizada	32
Tabela 8	Condições de sobre-oxidação do NIP.....	33
Tabela 9	Valores fixados através de estudos efetuados.....	38
Tabela 10	Valores de limite de deteção e de intervalo linear para vários métodos de deteção de CEA (Sai Xu, 2016)	44

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. Cancro do Colo-retal

O cancro do colo-retal (CCR) caracteriza-se por apresentar um tumor maligno invasivo, com origem nas células que formam a camada epitelial da parede do intestino grosso (as células epiteliais do cólon são responsáveis pela constituição do tecido da mucosa). No seu estado normal, estas células crescem e dividem-se à medida que vão sendo necessárias, sendo este processo designado por regeneração celular. Em condições normais, as células do cólon que se encontram mais velhas ou danificadas morrem. No entanto, quando as células sofrem alterações a nível genético e perdem este mecanismo de controlo sobre a sua própria morte, tornam-se células cancerígenas; estas células, nesta condição, não morrem e multiplicam-se desgovernadamente, gerando novas células que estarão na base de uma massa tumoral e da presença de cancro (Figura 1).

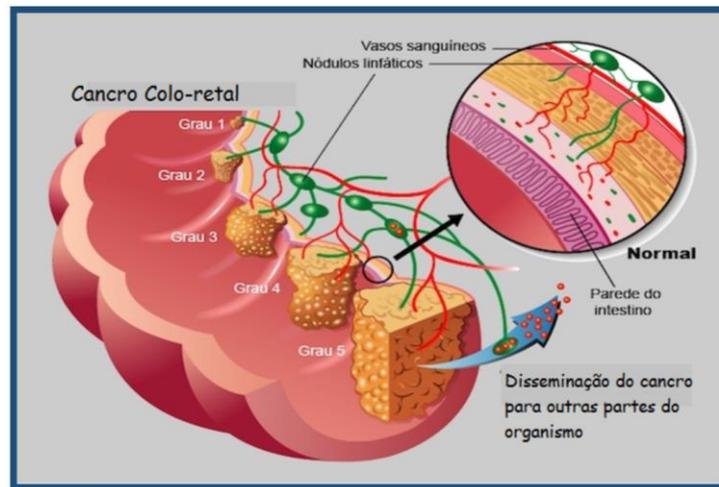


Figura 1 Imagem dos vários estádios do cancro colo-retal Imagem adaptada de (Frazão, 2016)

Além disso, a invasão celular não ocorre apenas no local de origem dessas células. Após a massa de células anormais assumir uma determinada dimensão, as células cancerígenas não se limitam às fronteiras do órgão de onde têm origem, invadindo os tecidos circundantes e dando lugar a processos de metastização, tal como indicado na figura 1. (CUF, 2016) Os processos de metastização implicam que alguma célula cancerígena conseguiu instalar-se num outro órgão e foi capaz de iniciar, aí, a formação de uma nova massa tumoral.

A denominação do CCR aplica-se quando a doença cancerígena afeta o cólon ou o reto. Segundo a *National Cancer Institute*, a denominação específica de cancro do cólon aplica-se quando a doença tem início no cólon, o segmento mais longo do intestino grosso. Por sua vez, a denominação de cancro retal aplica-se quando a doença tem início no reto. Os dados estatísticos centrados no CCR são reveladores do seu impacto social.

1.2. Epidemiologia da doença

Segundo o relatório da Globocan 2012, o CCR é a terceira doença cancerígena mais diagnosticada no mundo (Figura 2), sendo ultrapassada apenas pelo cancro da próstata e pelo da mama. (Europacolón) O CCR apresenta uma elevada incidência na Europa, sendo responsável por 471000 novos casos e por 228000 mortes em 2012.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

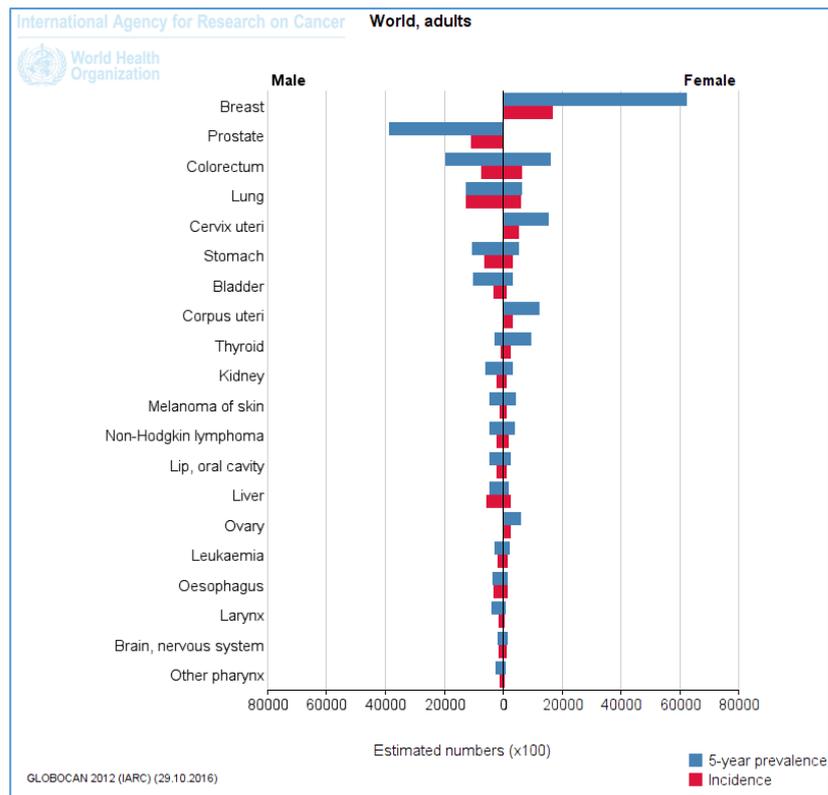


Figura 2 Gráfico relativo à incidência e à mortalidade por cancro no mundo (dados GLOBOCAN 2012).

De uma forma geral, as taxas de incidência de CCR são mais elevadas nos países ditos desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, na sequência do estilo de vida adotado nestes países. Os pontos mais relevantes no contexto do estilo de vida incluem uma alimentação pouco equilibrada (consumo excessivo de açúcar, de carne vermelha e de carne processada, associada a uma diminuição do consumo de fibras) e a prática reduzida de exercício físico. (Bernd, 2015)

Do ponto de vista europeu, existem diferenças significativas entre os vários países que a integram, tal como indicado na Figura 3, onde se representam a incidência a 5 anos e a mortalidade dos 20 países europeus com valores superiores. Portugal assume aqui a 14ª posição.

Em Portugal, foram identificados 7129 casos de CCR, com o registo de 3797 mortes pela doença (Figura 4). De uma forma geral, a incidência e a mortalidade associadas ao CCR é superior em elementos do sexo masculino (Europacolón) Cerca de 15% dos casos detetado são de origem hereditária, como a polipose adenomatosa familiar (PAF) ou o CCR não polipoide (HNPCC). (Pinto, 2009/2010) De uma forma geral, os anos potenciais de vida perdidos, por neoplasia maligna, continuam a ser muito significativos, tendo-se verificado, no entanto, uma diminuição gradual da mortalidade precoce.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

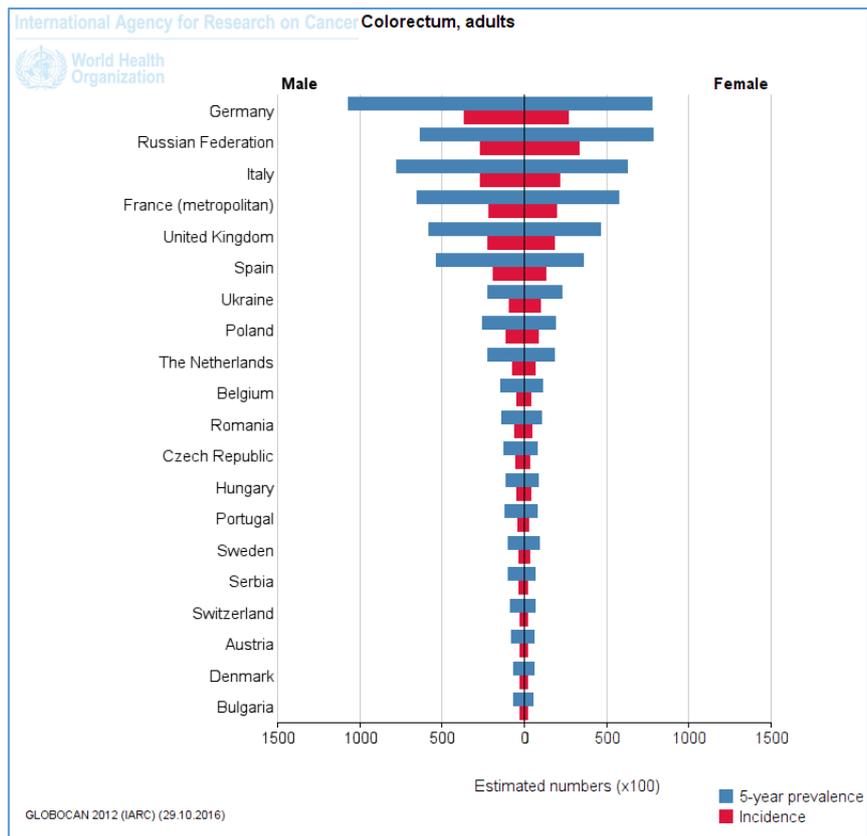


Figura 3 Gráfico relativo à incidência e à mortalidade por cancro em países europeus (GLOBOCAN 2012).

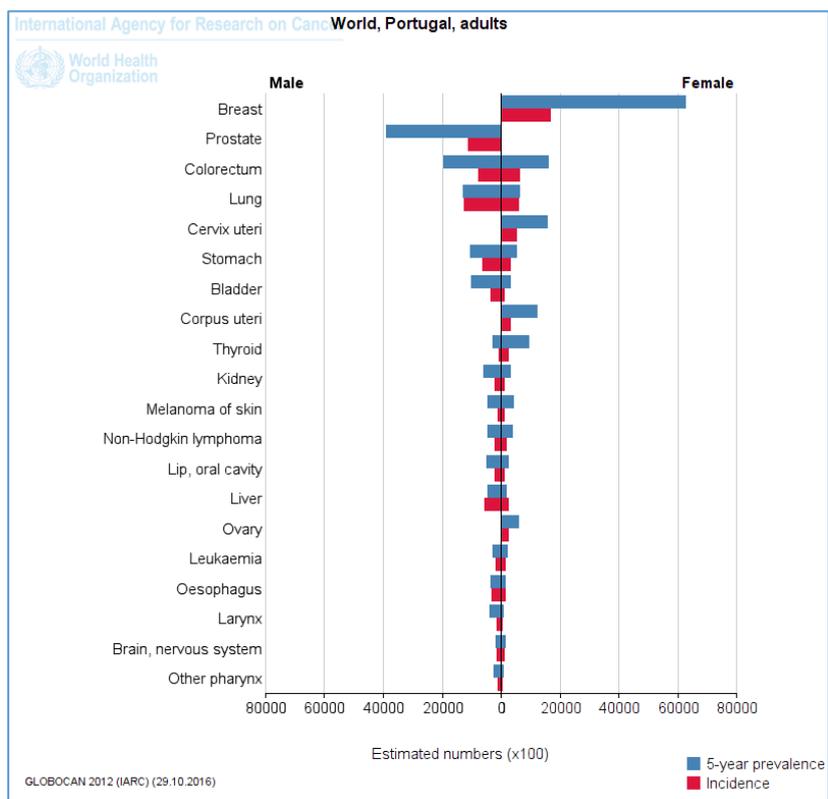


Figura 4 Gráfico relativo à incidência e à mortalidade por cancro em Portugal (dados GLOBOCAN 2012).

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Como se pode verificar na tabela 1, a mortalidade associada ao cancro do cólon mantém valores mais ou menos constantes entre 2010 e 2014, segundo dados da direção geral de saúde. Tal como referido anteriormente, as taxas de mortalidade são mais elevadas no sexo masculino do que o sexo feminino.

1.3. Fatores de risco associados

O conceito de fator de risco é algo que afeta a probabilidade de contrair uma doença como o cancro. Todos os tumores malignos têm fatores de risco diferentes. Alguns destes podem ser alterados, como por exemplo, deixar de fumar, ter uma alimentação mais equilibrada, praticar exercício físico, entre outros. Em contrapartida, existem outros fatores que não dependem do paciente, tais como a idade e histórico familiar ou antecedentes.

Tabela 1 Indicadores de mortalidade relativos ao cancro do cólon, por sexo, em Portugal entre 2010 e 2014 (DGS, 2014)

	2010	2011	2012	2013	2014
AMBOS OS SEXOS					
Nº de óbitos	2647	2740	2686	2724	2687
Taxa de mortalidade	25,0	26,0	25,6	26,1	25,8
SEXO MASCULINO					
Nº de óbitos	1511	1500	1533	1560	1526
Taxa de mortalidade	29,9	29,8	30,6	31,4	30,9
SEXO FEMININO					
Nº de óbitos	1136	1240	1153	1164	1161
Taxa de mortalidade	20,6	22,5	21,0	21,2	21,3

Alguns estudos patentes na Internet já demonstraram que existem vários fatores de risco que aumentam a probabilidade de desenvolvimento de pólipos ou cancro colo-retal. Estes podem ser de dois tipos: modificáveis ou não modificáveis.

Os *fatores de risco modificáveis* incluem (a) a obesidade ou o excesso de peso; (b) a falta de exercício físico regular; (c) alguns tipos de alimentação (como uma alimentação rica em carnes vermelhas, como a carne de bovino, carne de porco, cordeiro ou fígado) e em carnes processadas (pelo contrário, o consumo de dietas ricas em vegetais, frutas e grãos integrais diminuem o risco); (d) o tratamento de carnes a

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

temperaturas elevadas (como fritar ou grelhar, podendo produzir substâncias químicas tóxicas e associadas ao CCR); (e) o tabaco (pessoas que fumaram por um período de tempo longo são mais propensas a desenvolver CCR do que pessoas não fumadoras); (f) e a ingestão excessiva de álcool. (American Cancer, 2016)

Os fatores de risco não modificáveis incluem (a) a idade, na qual a probabilidade para se desenvolver este tipo de cancro é mais acentuada a partir dos 50 anos; (b) a incidência de pólipos adenomatosos (adenomas), que originam um risco agravado de desenvolver cancro; (c) a doença inflamatória intestinal, incluindo a colite ulcerosa ou doença de Crohn; (d) o histórico familiar de cancro colo-retal ou pólipos adenomatosos (pessoas com parentes de primeiro grau, pais e irmãos, com incidência de cancro colo-retal estão em maior risco); (e) ter diabetes tipo II. (American Cancer, 2016)

Independentemente do risco e da epidemiologia associada ao CCR, o diagnóstico precoce constitui uma das ferramentas primordiais no combate à doença.

1.4. Métodos de diagnóstico e rastreio

Alguns sintomas da instalação da doença são a alteração persistente dos hábitos intestinais, como o aparecimento de prisão de ventre, diarreia ou fezes muito escuras sem motivo aparente, perda de sangue pelo reto/ânus ou misturado nas fezes sem irritação, dor ou prurido, sensação que o intestino não esvazia completamente e dor forte ou desconforto abdominal, podem ajudar na deteção precoce deste tipo de cancro.

De uma forma geral, os tumores originam a invasão de tecidos locais, com subsequente sangramento e aparecimento de sangue nas fezes. Neste sentido, a primeira linha de rastreio do CCR consiste na realização do teste de sangue oculto nas fezes. Este teste origina, porém, muitos falsos positivos, impedindo tomadas de decisão clínicas com base na sua informação e orientando para a necessidade de exames complementares.

Os exames imagiológicos, como a colonoscopia, a tomografia axial computadorizada (TAC) ou a ressonância magnética (RMN), associados ou não a material de contraste, são hoje em dia complementares aos testes de sangue oculto. Relativamente à colonoscopia, os procedimentos associados são dispendiosos, invasivos e causam desconforto e dor local, motivo pelo qual quase todas as pessoas observadas requerem sedação antes da realização do exame. A colonoscopia pode, porém, apresentar a vantagem de permitir a retirada de massa local, contribuindo já ao

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

tratamento do paciente. A TAC ou a RMN são realizadas mais no contexto da confirmação inequívoca da presença de CCR.

Uma vez identificada a doença, o seu acompanhamento é realizado com base em exames de sangue, que incidem essencialmente no hemograma, em testes da função hepática e na deteção de marcadores tumorais. O hemograma pretende quantificar os diferentes tipos de células no sangue e detetar a possível presença de anemia, face à presença esperada de hemorragias constantes. Os testes da função hepática visam despistar a possível presença de metástases no fígado, uma situação muito frequentemente associada ao CCR. A deteção da presença de marcadores tumorais pretende identificar a presença de biomoléculas produzidas por células cancerígenas e que se encontram distribuídas pelos fluídos biológicos. Os marcadores tumorais mais comuns no contexto do CCR são o antigénio carcinoembrionário (CEA) e CA 19-9. (American Cancer, 2016) Estes marcadores são glicoproteínas que circulam pelo soro e cuja concentração se pode associar ao estágio do CCR (James K. Alexander & al, 2016). Atualmente, a concentração do CEA na corrente sanguínea é determinada em estados pré- e pós-operatórios de portadores de CCR, para o acompanhamento da evolução da doença. (Polycarpo, et al., 2003) Quando acompanhado de informação complementar, a monitorização de CEA pode também contribuir para a deteção precoce da doença.

De uma forma geral, a presença de marcadores tumorais no sangue tem-se revelado uma ferramenta crucial na deteção e no acompanhamento da evolução da doença.

1.5. Biomarcadores

Os marcadores tumorais são biomoléculas que facilitam o diagnóstico ou a monitorização da evolução da doença, uma vez que sinalizam a sua presença e a sua intensidade. Estes marcadores podem ser encontrados em tecidos removidos do tumor (por biópsia), sangue, urina ou outro tipo de fluido corporal. (Sharma, et al., 2015)

Do ponto de vista molecular, os biomarcadores podem ter várias origens. Incluem-se aqui o ADN (via alguma mutação específica, translocação, amplificação, entre outros), o RNA (sobretudo microRNA circulante) ou proteínas (hormonas, anticorpos, supressores tumorais, etc.), ou até a próxima célula tumoral circulante.

Os biomarcadores além de terem uma enorme importância na deteção precoce do cancro, são também considerados uma das ferramentas mais valiosas para a

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

determinação do estágio de evolução da doença e da resposta ao tratamento de quimioterapia.

Tabela 2 Biomarcadores mais comuns utilizados na detecção de cancro

<i>Tipo de cancro</i>	<i>Biomarcador</i>
Mama	BRCA1, BRCA2, CA 15-3, CA 125, CA27.29, CEA, NY-BR-1, HER2/NEU, ER/PR
Cólon	CEA, EGF, p53
Esófago	SCC
Fígado	AFP, CEA
Pulmão	CEA, CA 19-9, SCC, NSE, NY-ESO-1
Próstata	PSA

1.5.1. Antígeno carcino-embriónico

O CEA é uma glicoproteína que atua como um indicador em várias doenças cancerígenas, como CCR, cancro do pâncreas, cancro da mama, adenocarcinoma pulmonar, entre outros. Este biomarcador é produzido, na maioria dos casos, por células de cancerígenas do cólon e entra na corrente sanguínea. (Minden, 2016)

Mas a identificação da quantidade limite a partir da qual se encontra instalada a doença cancerígena não é fácil. Por um lado, o CEA é uma biomolécula endógena, existindo em níveis baixos em todos os indivíduos. Por outro lado, há condições fisiológicas que condicionam os valores normais esperados para o CEA. Por exemplo, os fumadores sem doença cancerígena apresentam níveis de CEA mais elevados do que indivíduos saudáveis não fumadores e os homens apresentam valores superiores ao das mulheres (tabela 3). O mesmo acontece em pessoas que sofrem de cirrose hepática ou de colite ulcerosa. Independentemente do valor de referência clínico, a presença de uma grande quantidade deste biomarcador é sem dúvida revelador da presença de cancro.

A implementação de um método capaz de monitorizar o CEA em contexto clínico torna-se assim fundamental para a prevenção da doença e para minimizar os seus impactos. Os métodos de monitorização de biomarcadores cancerígenos, incluindo o CEA, são baseados em técnicas ELISA, as quais exigem condições laboratoriais para

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

a sua implementação, isto é, não é possível a sua realização em contexto clínico, sendo necessário realizar as análises em ambiente laboratorial. Este constrangimento impede a implementação mais alargada de métodos de rastreio, que são na realidade os vetores principais da deteção precoce.

Tabela 3 Limites máximos fisiológico para o biomarcador CEA em indivíduos saudáveis. (Sousa, 2016)

CEA (ng/mL)			
Sexo masculino		Sexo feminino	
Não-Fumadores	Fumadores	Não-Fumadores	Fumadores
3,4	6,2	2,5	4,9

No contexto da implementação de novas metodologias para a monitorização do CEA em contexto clínico têm surgido na literatura novos dispositivos promissores, denominados biossensores. Os dispositivos mais relevantes no contexto da portabilidade são os eletroquímicos. Por outro lado, os mais adequados do ponto de vista de custo e de estabilidade são aqueles que utilizam materiais biomiméticos como materiais sensores (materiais sintéticos e, portanto, mais estáveis ao longo do tempo do que material biológico). Neste sentido, abordam-se de seguida os temas ligados à preparação de materiais biomiméticos com base em polímeros de impressão molecular e de biossensores.

1.6. Polímeros de impressão molecular

A polimerização de impressão molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) é uma técnica utilizada para criar recetores artificiais através da formação de uma rede polimérica em torno de uma molécula que serve de molde. Antes da polimerização ocorrer, ocorrem várias interações entre a molécula molde e os monómeros que irão dar origem ao polímero (tais como interações hidrofóbicas, ligações através de pontes de hidrogénio, Forças de Van Der Waals e interações eletrostáticas), que determinam o arranjo espacial dos monómeros em torno do molde. O arranjo espacial final do molde é fixado por um processo de polimerização que permita a formação de um polímero com elevado grau de reticulação. Após o processo de polimerização, o molde é removido do polímero deixando locais de reconhecimento

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

específico complementares com a forma, o tamanho e a funcionalidade da molécula molde. (Ellen Verheyen, 2010)

Do ponto de vista técnico, a impressão molecular pode ser conseguida por um processo em *bulk* ou em *superfície*, sendo estes também designados como impressão 3D e 2D, respetivamente. Na polimerização em *bulk* a molécula é distribuída aleatoriamente na matriz polimérica 3D formada, enquanto que na polimerização em *superfície* a proteína é colocada numa determinada superfície e o polímero cresce ao seu redor, formando uma estrutura polimérica 2D.

A polimerização mais adequada à impressão de biomoléculas de grande dimensão, como o CEA, é a de *superfície*. A grande dimensão da molécula molde dificulta a sua remoção da cavidade impressa e origina dificuldades na transferência de massa ao longo do material polimérico. Por outro lado, a polimerização de *superfície* permite obter uma elevada densidade de locais de ligação (para uma rápida transferência de massa), diminuindo ainda a quantidade de molécula molde necessária para levar a cabo o processo de impressão. A eficácia destes locais de ligação depende, porém, de vários fatores, incluindo a forma como a molécula alvo se liga à superfície recetora e se expõe para a superfície externa, e a capacidade de controlar a espessura da camada de polímero formada. (Wang, et al., 2010)

Do ponto de vista da reação química, as moléculas impressas são maioritariamente preparadas por polimerização química radicalar. Neste tipo de polimerização, a reação é desencadeada por espécies radicalares. Estas espécies podem ter origem num estímulo químico ou físico. Quando o estímulo é químico, o processo mais comum baseia-se na utilização de compostos geradores de radicais em meio aquoso, como por exemplo os peróxidos. Quando o estímulo é físico, pode basear-se em radiação eletromagnética ou na aplicação de um potencial elétrico adequado com base em técnicas eletroquímicas (também chamada de eletropolimerização). Esta última é muito útil quando o biossensor em desenvolvimento é eletroquímico, uma vez que com um só equipamento é possível montar o material sensor e avaliá-lo. Além disso, a eletropolimerização requer uma baixa quantidade de solução de polimerização e permite uma elevada repetibilidade do processo. Do ponto de vista técnico, a eletropolimerização pode também ser feita em *bulk* ou em *superfície*, sendo que em *bulk* o consumo da biomolécula molde é superior. (Sharma P. e., 2012)

No contexto da polimerização eletroquímica, um dos polímeros mais utilizados é o polipirrol (PPy). Este polímero é um promissor no contexto dos elétrodos redox supercapacitores, devido à sua cinética rápida de carga/descarga, ao seu baixo custo,

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

à sua síntese fácil e à sua alta densidade energética. Na figura 5, encontra-se representado o mecanismo associado à eletropolimerização do pirrol.

As propriedades eletroquímicas dos elétrodos à base de polipirrol dependem do material com que é preparado o elétrodo e do método de preparação do material polimérico, bem como da sua área superficial ativa. É de salientar, que vários estudos se têm focado principalmente na preparação e modificação de materiais à base de polipirrol, otimizando para este efeito as condições de obtenção do PPy, como a gama de potencial aplicado, o valor de pH, a temperatura e as concentrações de pirrol (monómero) mais adequadas. No contexto da eletropolimerização, existem várias variáveis críticas que requerem otimização, para que no final se obtenha o polímero desejado, com as características desejadas. (Sun, Zheng, & Chen, 2010)

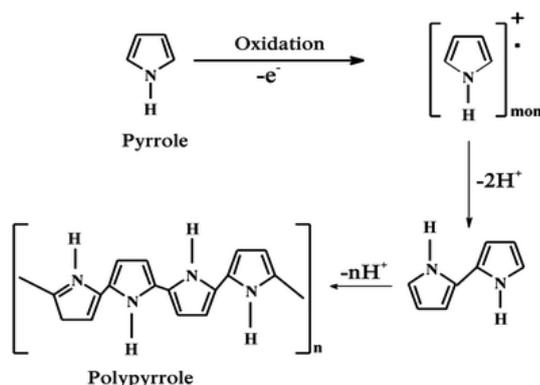


Figura 5 Mecanismo de eletropolimerização do pirrol. (Dubal, Lee, Kim, Kim, & Lokhande, 2012)

1.7. Biossensores

Durante a última década, a investigação na área dos biossensores cresceu exponencialmente na área da saúde, dirigida sobretudo ao diagnóstico ou ao acompanhamento de doenças cancerígenas, cardiovasculares ou diabetes. A investigação em biossensores foca-se principalmente no aumento da sensibilidade e na especificidade dos métodos analíticos de quantificação de biomarcadores, tendo em vista a obtenção de plataformas mais estáveis e sensíveis. De uma forma geral, os estudos mais recentes têm conduzido a um maior controlo na modificação de superfícies, com envolvimento de nanomateriais como nanoestruturas de carbono ou nanopartículas metálicas, com subsequentes ganhos em termos de quantidade mínima detetada e de sensibilidade analítica. (Altintas & Tothill, 2013)

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Ainda assim, há ainda poucos biossensores desenvolvidos com sucesso comercial. Uma das principais razões para este cenário reside na instabilidade dos elementos sensores (tipicamente de natureza biológica) fora do seu ambiente natural, o que condiciona fortemente a estabilidade e o tempo de vida dos dispositivos comerciais. Neste sentido, um dos grandes focos do desenvolvimento de novos dispositivos biossensores prende-se com a produção de biossensores com longos tempos de vida e poucas restrições às condições de armazenagem.

Um biossensor é um dispositivo analítico que incorpora um elemento sensor, responsável pelo bioreconhecimento e pela quantificação de um determinado composto. Este elemento funciona como sensor porque interage de forma seletiva com o composto que se pretende determinar. A medida desta interação é realizada através de um transdutor e de um detetor (Figura 6). (P.Fonseca, 2003)

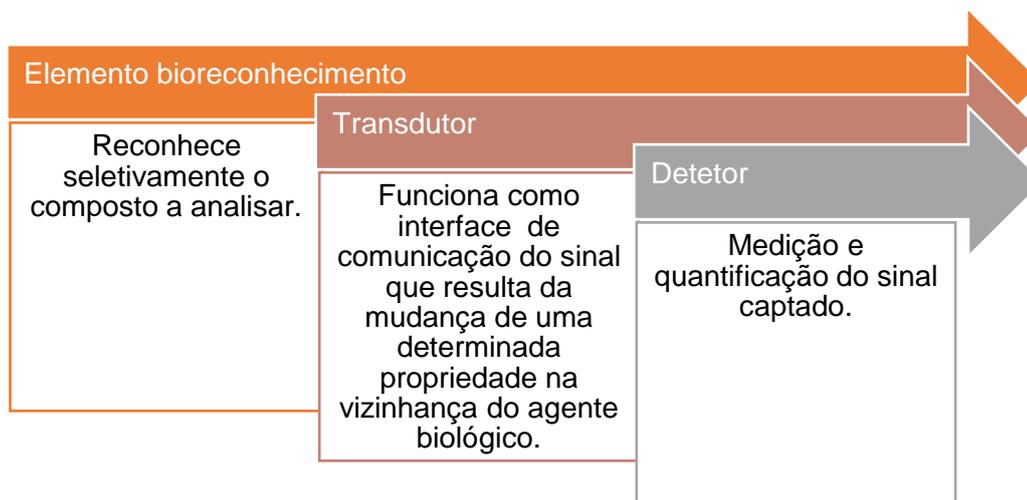


Figura 6 Elementos integrantes de um biossensor

De uma forma geral, o bioreconhecimento de um composto pelo elemento sensor é realizado por um processo de afinidade (quando o elemento sensor apresenta uma afinidade dirigida ao composto a detetar; fazem parte deste grupo, p.e., os anticorpos) ou por um processo catalítico (quando o elemento sensor atua como catalisador de alguma reação; as enzimas são os principais elementos deste grupo).

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

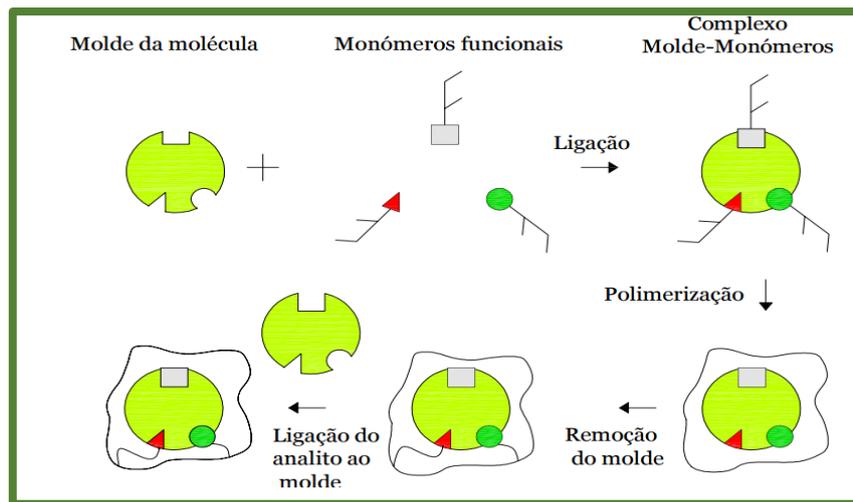


Figura 7 Formação de local de ligação em polímero molecularmente impresso.

A transdução desse reconhecimento pode ser efetuada por vários processos físicos. Incluem-se aqui vários métodos que medem alterações em propriedades elétricas (métodos eletroquímicos), propriedades relacionadas com a radiação eletromagnética (métodos óticos), ou propriedades térmicas (métodos térmicos) (D'Orazio, 2003), sendo estes os mais usados na literatura.

É de ressaltar que estes dispositivos analíticos são baratos, pouco complexos e eventualmente utilizados em plataformas portáteis ou em equipamentos com elementos descartáveis. Os biossensores também possuem capacidade para efetuar medições *in vivo* ou *in vitro*.

De uma forma geral, um biossensor “ideal” deve possuir várias características relevantes: (a) *seletividade*, que indica a capacidade de discriminar o composto a analisar no meio de outros compostos diferentes e resulta de elevada afinidade/atividade do elemento sensor para com a molécula alvo; (b) *proporcionalidade*, que resulta da variação de sinal que é proporcional à quantidade de composto a analisar, permitindo assim uma aplicação do dispositivo em análises quantitativas; (c) *rapidez*, que diz respeito a um curto tempo de resposta perante o composto a medir e que permite que a leitura seja realizada em tempo útil, favorecendo a possibilidade de uma deteção em tempo real; (d) *sensibilidade*, na qual a variação do sinal por unidade de concentração do composto a analisar é suficientemente elevada para permitir obter resultados exatos e para permitir que a razão entre o sinal analítico e o ruído seja elevada, reduzindo assim o limite de deteção do biossensor; (e) e *estabilidade*, que diz respeito à constância do sinal analítico ao longo do tempo, tanto em período analítico como em período de armazenagem, permitindo assim obter dispositivos com tempos de vida adequados e sinais precisos. (P.Fonseca, 2003)

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

A obtenção de um sensor ideal é quase irrealista, mas é possível trabalhar os materiais e os dispositivos para que os biossensores se aproximem dessa realidade. Neste contexto, o elemento de bioreconhecimento ou a unidade de transdução constituem os elementos críticos neste rumo à idealidade.

1.7.1. Elemento de bioreconhecimento

Como referido anteriormente, os elementos de bioreconhecimento são aqueles que interagem com o biomarcador e geram por via dessa interação um sinal analítico. Normalmente, os elementos de bioreconhecimento são elementos de natureza biológica, como enzimas, recetores celulares, ácidos nucleicos, microrganismos ou anticorpos, mas podem ser também elementos de natureza sintética e que mimetizam os elementos biológicos anteriores, chamando-se por isso materiais biomiméticos. (Mittal, Kaur, Gautam, & K.Mantha, 2016) Hoje em dia, os elementos de bioreconhecimento mais utilizados são as enzimas e os anticorpos.

As enzimas são os materiais biológicos que estiveram na origem do primeiro biossensor comercial, dedicado à monitorização de glucose pelos diabéticos. De uma forma geral, é possível recorrer a enzimas diversas no contexto dos elemento de bioreconhecimento; são utilizadas amidases, descarboxilases, esterases, fosfatases, nucleases, ou oxido-redutases. Os reagentes consumidos ou os produtos formados podem ser detetados ou quantificados através de transdutores apropriados. A classe de enzimas que tem tido maior relevância é a das oxido-redutases; este grupo catalisa reações redox que envolvem processos de transferência de eletrões na conversão enzimática do reagente em produto. (P.Fonseca, 2003)

Os anticorpos são hoje em dia elementos de bioreconhecimento muito utilizados em biossensores. Estas biomoléculas de natureza proteica constituem as ferramentas efetoras de defesa imunitária do organismo, porque se ligam ao composto invasor de forma muito seletiva e com grande afinidade. Hoje em dia, é possível produzir um anticorpo de origem biológica para qualquer molécula alvo de interesse, recorrendo a experiências com animais. Neste sentido, os anticorpos tornaram-se compostos versáteis e que permitem obter um biossensor de sucesso com passos muito simples. No entanto, como se pode depreender, a sua produção (pelo menos numa fase inicial) constitui ainda hoje um processo controverso por envolver experimentação animal, além de ser um processo lento e dispendioso.

No contexto atual, o mercado de imunodiagnóstico tem um enorme potencial comercial. Os biossensores preparados neste contexto são de simples construção,

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

podendo assumir várias configurações. O processo mais simples de construção de imunossensores baseia-se na ligação direta do anticorpo imobilizado à superfície transdutora. No entanto, os imunossensores apresentam também limitações. De uma forma geral, os anticorpos são materiais de origem biológica e apresentam uma baixa estabilidade. Por outro lado, a sua afinidade para o antigénio é de tal forma elevada que as respostas do dispositivo acabam por ser irreversíveis, não permitindo a reutilização.

A tentativa de obter materiais análogos aos anticorpos mas de natureza sintética (e por isso, com maior estabilidade), levou à aplicação da tecnologia MIP na produção de moldes moleculares e na sua aplicação enquanto elemento de bioreconhecimento em biossensores. O uso de materiais MIP em biossensores é hoje em dia uma prática sólida e alargada.

1.7.2. Transdutor

É designado por transdutor o elemento físico que comunica um sinal ao detetor. Exemplos comuns de transdutores são os medidores de temperatura (termopares, fios de platina, entre outros) os transdutores de pressão, os fluxímetros, os sensores de humidade, os sensores de densidade luminosa (fotodíodos, dispositivos de carga acoplada, fotomultiplicadores, fotorrestores) e os transdutores de movimento linear ou rotacional. Porém, existem outro tipo de transdutores para o caso dos biossensores, que convertem a variação ou mudanças físico-químicas que provêm do elemento de bioreconhecimento num sinal. Os transdutores mais usados em biossensores podem ser eletroquímicos ou óticos. Os eletroquímicos incluem os biossensores potenciométricos baseados em eléctrodos ou transístores seletivos a iões específicos e que medem o potencial criado pelos gradientes de concentração desses iões sem ocorrer fluxo de corrente eléctrica. Incluem também os biossensores amperométricos, que envolvem a medição da corrente eléctrica que flui numa célula eletroquímica em função do potencial eléctrico aplicado. Os transdutores óticos estão relacionados com a medição de uma variação de radiação eletromagnética, como o caso da absorvância, do índice de reflexão, da refletância, da fluorescência ou da luminescência. (P.Fonseca, 2003)

De acordo com o já referido, representa-se na Figura 8 os elementos principais que integram um biossensor e a forma como o elemento de bioreceptor (no elemento de bioreconhecimento) pode ser imobilizado na superfície transdutora.

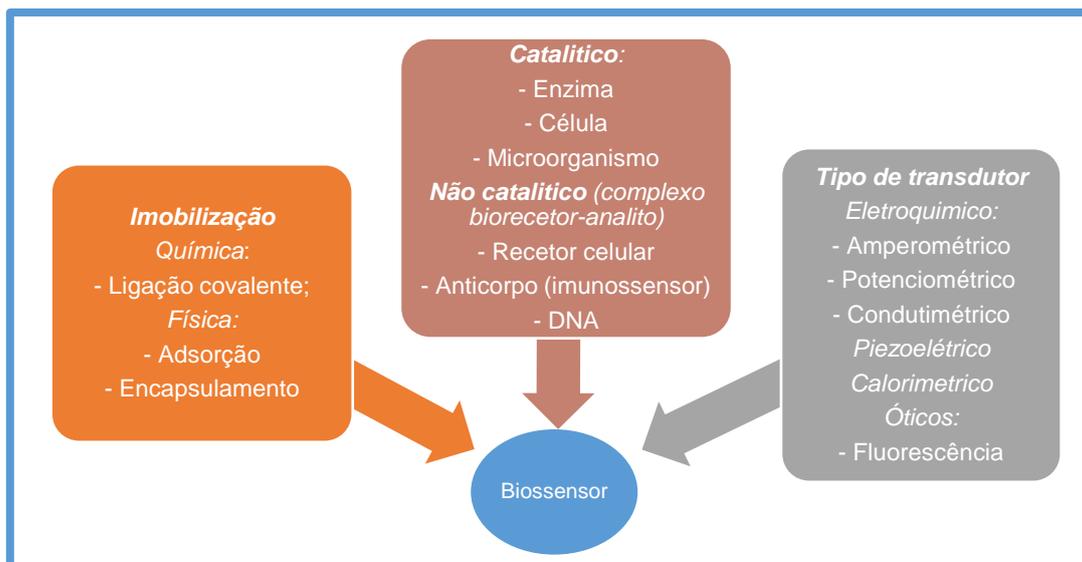


Figura 8 Elementos constituintes de um biossensor.

1.8. Aplicação dos biossensores no cancro

Dado que os biossensores combinam um elemento de bioreconhecimento com uma unidade de conversão de sinal (transdutor), estes dispositivos podem ser utilizados em diversas aplicações (tabela 4), que apresentam perspectivas de crescimento económico interessantes e que motivam o investimento industrial nesta área. O exemplo mais comum desta aplicação é a medição eletroquímica de concentrações de glucose no sangue, desde há várias décadas com aplicação de âmbito comercial. Hoje em dia, aparecem outras aplicações, ainda limitadas ao domínio da investigação, que incidem sobretudo na monitorização de biomoléculas associadas a várias doenças como o cancro.

A utilização de biossensores no domínio do cancro tem inúmeras vantagens sobre outros métodos de análise. O tempo de resposta curto e a possibilidade de aplicação em contexto clínico permitem reduzir o tempo envolvido em todo o processo analítico, contribuindo para a rapidez de diagnóstico e para a redução de custos associados à saúde. (Rasooly & Jacobson, 2006)

Os biossensores mais relevantes do ponto de vista comercial apresentam transdutores eletroquímicos. Tal como referido anteriormente, estes dispositivos baseiam-se na medição da corrente elétrica associada aos eletrões envolvidos num processo de oxidação-redução.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Tabela 4 Áreas de aplicação de biossensores. (P.Fonseca, 2003)

Área de aplicação	Mercado (%)	Crescimento anual (%)
Diagnóstico clínico	53	25
Controlo de processos	11	50
Instrumentos médicos	11	30
Agricultura/veterinária	8	60
Ambiente	5	35
Investigação	3	50
Outros	9	30

Na Figura 9 é possível visualizar-se um esquema representativo da caracterização de um biossensor eletroquímico. O exemplo ilustrado recorre a um elemento de bioreconhecimento enzimático. A enzima imobilizada no eléctrodo de trabalho, reage com um composto específico presente na amostra. Por sua vez, a concentração deste composto é determinada através da variação dos electrões gerada pela reacção redox envolvida. (P.Fonseca, 2003)

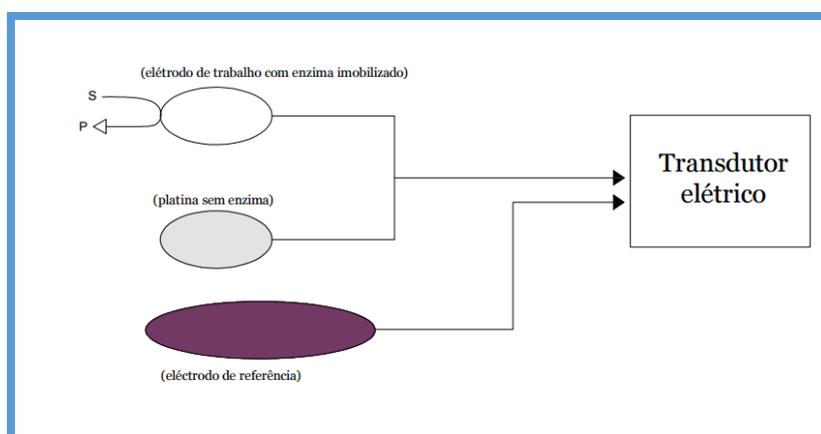


Figura 9 Esquema representativo do funcionamento de um biossensor eletroquímico com uma enzima imobilizada num eléctrodo de platina.

A resposta de um biossensor eletroquímico enzimático depende de vários fatores, nomeadamente a cinética da reacção, a construção do biossensor, e o modo de operação analítico. De uma forma geral, o tipo de resposta pode ser controlada por difusão ou pela cinética da reacção. Quando a quantidade de enzima ativa é muito baixa acontece o controlo cinético, dando origem a limitações analíticas pois as respostas máximas ocorrem para concentrações do composto a analisar muito baixas. Por outro

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

lado, o controlo difusional do elétrodo enzimático caracteriza-se por elevadas quantidades de enzima imobilizada no elétrodo, sendo a corrente elétrica gerada independente de pequenas variações da concentração da enzima e da sua atividade biológica, pelo que a resposta é uma função da concentração e da difusão do analito a detetar. Os biossensores eletroquímicos mais relevantes apresentam transdutores classificados potenciométricos, amperométricos e condutimétricos, apresentando de uma forma geral anticorpos com elementos de bioreconhecimento (Figura 10).

Os *biossensores potenciométricos* envolvem a medição da diferença de potencial, entre um elétrodo de referência e um elétrodo indicador, a uma corrente quase nula. Portanto, nos dispositivos potenciométricos, a informação analítica é obtida por conversão do processo de bioreconhecimento num sinal elétrico em conjunto com a utilização de elétrodos de iões seletivos. Este tipo de transdutor é constituído por membranas de permeabilidade seletiva e sensíveis a espécies iónicas cuja concentração é variável num processo biológico.

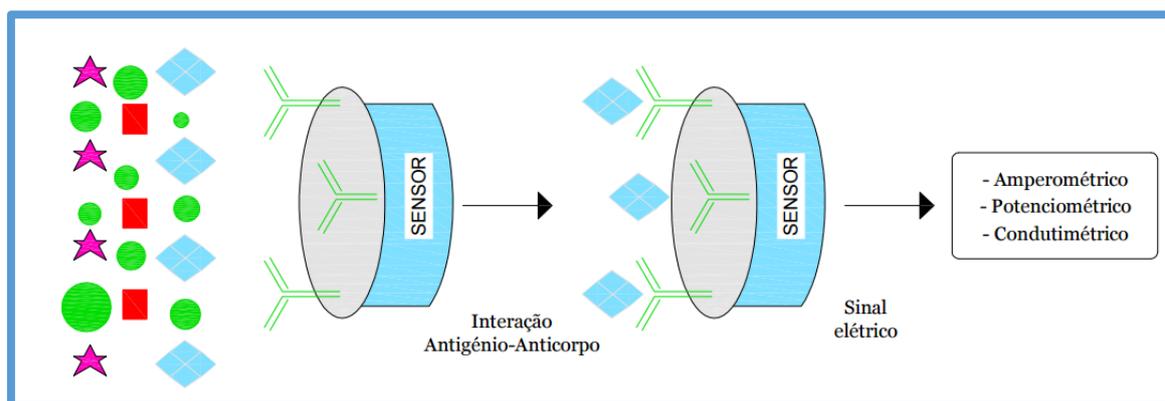


Figura 10 Representação esquemática de um imunossensor

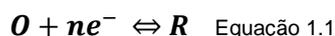
Os *biossensores amperométricos* operam pela aplicação de um potencial constante e um controlo de corrente associado à redução ou oxidação de espécies electroativas envolvidas no processo de reconhecimento. Este tipo de biossensor consegue ser mais atraente dada a sua alta sensibilidade, simplicidade e miniaturização. (Wang J. , 2006)

Os *biossensores condutimétricos* baseiam-se numa técnica na qual se mede a alteração da condutância na solução, a um potencial constante, resultante da produção ou consumo de espécies iónicas, como sucede em certas atividades metabólicas de microrganismos. Embora esta técnica permita miniaturização, resposta rápida, sensível, apresenta, no entanto, uma baixa seletividade. Além disso, a sensibilidade deste tipo de medições é muitas vezes prejudicada pela condutância da matriz da amostra. (R.Eggins, 2002)

1.9. Técnicas eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas são uma poderosa ferramenta analítica. Apresentam algumas características vantajosas, como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade. Contudo, a versatilidade desta técnica merece algum destaque dado que é possível controlar as reações nos elétrodos modificando a interface eletrodo-solução e selecionando o potencial aplicado à célula. (Lowinsohn & Bertotti, 2006)

Os processos de oxidação-redução que ocorrem nos elétrodos são efetuados através da troca de elétrons na interface solução-elétrodo, quer estejam em equilíbrio na interface ou sob o controle cinético total ou parcial. Salienta-se que na maior parte dos processos de transferência de carga ocorre troca de elétrons, podendo as reações no caso mais simples ser representadas pela equação 1.1, na qual (O) é a espécie oxidada e (R) a espécie reduzida.



Assim, para que o processo de redução ocorra, os elétrons no eletrodo devem ter uma energia mínima para que possam ser transferidos do eletrodo para a orbital receptora de elétrons da espécie oxidada. Por outro lado, para que o processo de oxidação ocorra, a energia dos elétrons da espécie reduzida tem de ser igual ou superior à energia dos elétrons no nível de Fermi (os elétrons podem ser recebidos ou fornecidos apenas à volta deste nível de energia) do eletrodo. (G.Zoski, 2007)

Por entre as várias técnicas eletroquímicas, as mais utilizadas com fins analíticos são a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância, que se passam a detalhar em seguida.

1.9.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica corresponde à medida da corrente do eletrodo de trabalho em função do potencial aplicado, uma condição que favorece a polarização do eletrodo de trabalho. O registo gráfico de corrente-potencial, designado por voltamograma (Figura 11), permite a interpretação quantitativa em aspetos termodinâmicos (potencial

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

redox) e cinéticos (transferência de carga, reações químicas) em curso à superfície do eletrodo. (G.Zoski, 2007) De uma forma geral, para um sistema redox reversível o varrimento para valores de potencial superiores origina a oxidação de uma espécie e a inversão do sentido do varrimento do potencial promove a reação inversa. Em alternativa, o sistema redox avaliado pode ser irreversível (sem pico da direção inversa) ou *quasi-reversível* (situação intermédia).

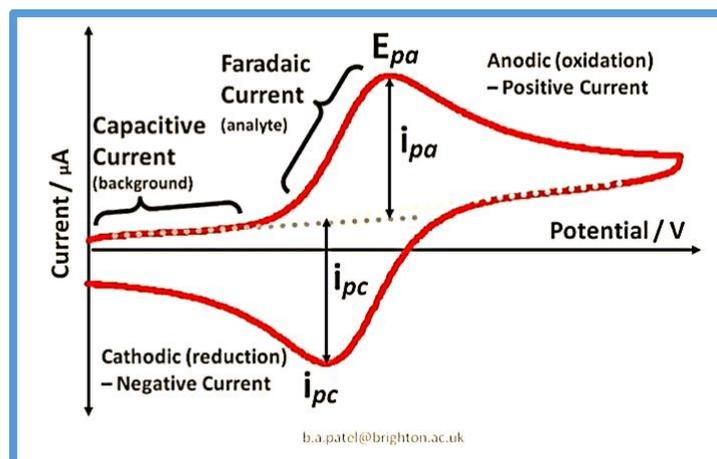


Figura 11 Voltamograma genérico obtido em voltametria cíclica, com indicação do potencial do pico (E_p) anódico (a) ou catódico (c) e das correntes Farádicas e Capacitivas.

De uma forma geral, os fenómenos que acontecem na interface, entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície, fornecem informações sobre o analito. Essas informações são obtidas através da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho (ao ser aplicada uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar), sob condições de completa polarização do eletrodo de trabalho.

A corrente resultante da aplicação de um potencial é constituída por: (i) *Corrente Farádica*, baseada na transferência eletrónica na interface eletrodo/solução e que corresponde maioritariamente à corrente gerada pela reação redox da espécie em estudo (e minoritariamente à presença de impurezas nos reagentes usados ou pela presença de oxigénio dissolvido no meio); (ii) e *Corrente Capacitativa*, onde não ocorre transferência eletrónica e que provém da separação de cargas na dupla camada entre o eletrodo e a solução. A interferência promovida pela presença do oxigénio pode ser facilmente eliminada através do arejamento da solução com um gás inerte, como é o caso do azoto. (A.Skoog, M.West, Holler, & R.Crouch, 2005)

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

A voltametria cíclica é uma técnica muito útil do ponto de vista da avaliação qualitativa do sistema em estudo. Ela apresenta a capacidade de fornecer rapidamente a informação termodinâmica relativa a processos redox, à cinética das reações químicas acopladas ou a processos de adsorção. A voltametria cíclica permite, ainda, uma rápida detecção dos potenciais de oxidação/redução das espécies envolvidas e uma avaliação do efeito das alterações do meio nos processos redox.

1.9.2. Espectroscopia de Impedância

A espectroscopia de impedância eletroquímica consiste na aplicação de um potencial de corrente alternada com diferentes valores de frequência. Este método apresenta diversas vantagens relativamente às técnicas que utilizam corrente contínua, nomeadamente a utilização de sinais muito pequenos, evitando a perturbação nas propriedades do eletrodo, a resistência de polarização e a capacitância da dupla camada podem ser determinadas numa mesma medida.

A Lei de Ohm (equação 1.2) é utilizada neste contexto para estabelecer a relação entre o potencial e a corrente aplicada, na qual (E) é o potencial em Volt que atravessa uma resistência (R) em Ohm, resultando numa corrente designada por (I) em Ampere.

$$E = I \times R \quad \text{Equação 1.2}$$

Caso o sinal seja de corrente alternada, a resposta de um circuito para um regime sinusoidal forçado pode ser descrita pela Lei de Ohm generalizada, como se pode observar na equação 1.3, na qual (Z) é a impedância do circuito em Ohm.

$$E(t) = Z \times I(t) \quad \text{Equação 1.3}$$

Por outro lado, a análise de resultados experimentais também pode ser feita através de representações gráficas, para melhor visualização e análise. Na representação de *Nyquist*, também denominada como representação de *Argand* ou *Cole-Cole*, os valores experimentais da parte real $Z'(w)$ e da parte imaginária $Z''(w)$, que representam o módulo do número complexo de Z , são dispostos num gráfico de $-Z'$ versus Z'' . Trata-se de uma representação de um semicírculo de raio $0,5R_p$ e centro em

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

$R_c + 0,5R_p$. É de referir, que valores baixos de frequência angular (ω) encontram-se no lado direito do semicírculo, sendo que o ponto correspondente a $\omega=0$ está sobre o eixo Z' e é igual a R_c+R_p (em que R_c é a resistência do capacitor e R_p é a resistência de polarização). Portanto, à medida que a frequência angular aumenta, os pontos deslocam-se para a esquerda, passando pelo ponto indicado por $\omega_{máx}$ e, para valores que tendem para infinito voltam a aproximar-se do eixo Z' , no ponto indicado por R_c . (Wolyneq, 2003)

Na figura 12 encontra-se representado um diagrama típico de *Nyquist* e o seu circuito equivalente.

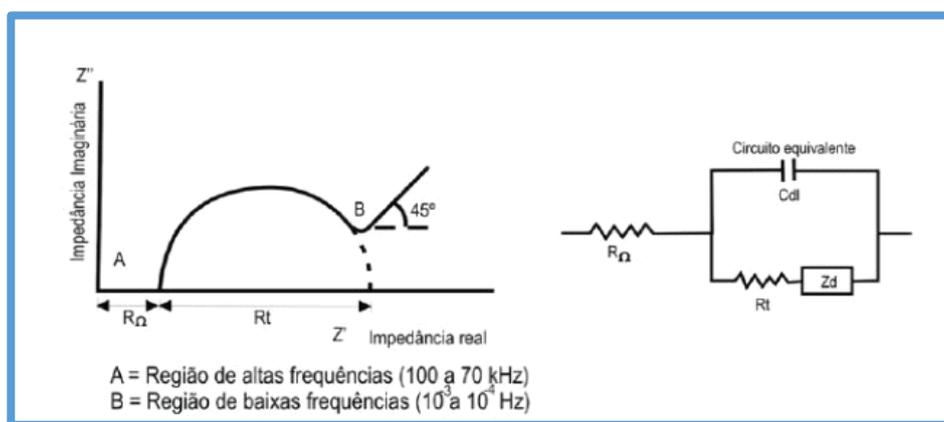


Figura 12 Diagrama típico de Nyquist com o seu circuito equivalente

1.9.3. Sistema de três elétrodos

Um sistema eletroquímico com três elétrodos contém três elétrodos diferentes (de trabalho, de referência e auxiliar), imersos numa mesma solução. O eletrodo de trabalho serve de suporte à reação de interesse e pode conter vários materiais condutores, inertes ou reativos. O eletrodo de referência (tipicamente de $Ag/AgCl$) tem como função fornecer um potencial estável, com o qual é feita uma comparação com o potencial do eletrodo de trabalho. O eletrodo auxiliar, ou contra-eletrodo, consiste num material condutor e quimicamente inerte (por exemplo platina ou carbono vítreo) e tem como função principal reduzir os erros causados pela resistência da célula no controlo do potencial do eletrodo de trabalho; este eletrodo deve ficar o mais próximo possível do eletrodo de trabalho e a corrente resultante (entre este eletrodo e o eletrodo de trabalho) é a corrente registada no equipamento analítico.

Num sistema de três elétrodos, os elétrodos são conectados ao potenciostato, que detém dois circuitos principais e, tipicamente, um amplificador operacional. Dos dois

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

circuitos principais, um aplica o potencial na célula eletroquímica (entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência) e o outro mede a corrente na célula (entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar). O amplificador operacional serve para corrigir o potencial do eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar diminua sempre que necessário. Desta forma, a corrente circula entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando distúrbios como por exemplo a eletrólise no eletrodo de referência. Por outro lado, ajuda a manter o potencial do eletrodo de referência constante durante as medidas.

Este tipo de sistema apresenta algumas vantagens, entre as quais, ser mais adequado para soluções diluídas; poder ser utilizado para soluções de elevada resistência (solventes orgânicos, mistura água-solvente orgânico); e poder ser usado com eletrólitos de suporte mais diluídos. A interferência de oxigênio é tipicamente minimizada pela introdução de um gás inerte em solução (Figura 13), com subsequente remoção do oxigênio dissolvido.

Tipicamente, a solução onde os eletrodos se encontram mergulhados deve conter um eletrólito de suporte dissolvido, numa concentração mínima de 110^{-3} mol/L, para assegurar uma condutividade média da solução requerida nas medidas eletroquímicas. Este eletrólito deve ser escolhido, tendo em conta que não pode interferir nas reações eletroquímicas das espécies electroativas analisadas numa determinada gama de potencial de interesse. (Aleixo, 2016)

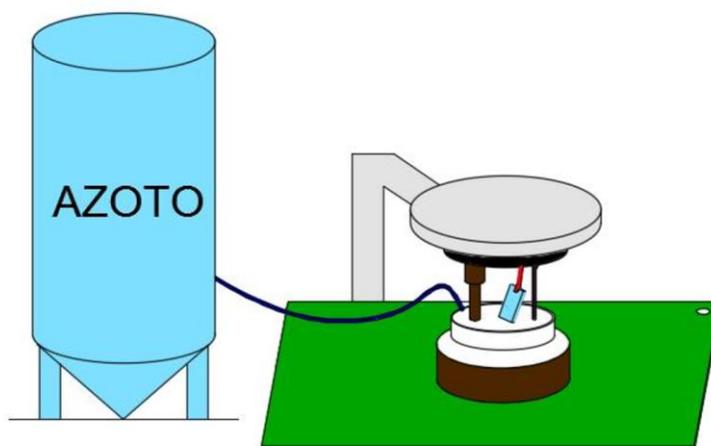


Figura 12 Sistema três eletrodos, com ligação a fluxo de azoto para eliminar a interferência causada pelo oxigênio.

1.10. Objetivos e Organização da dissertação

O presente trabalho tem como objetivo principal desenvolver um material sensor que é capaz de gerar informação quantitativa relativamente à CEA. O material deve ser preparado em suporte de vidro, tendo em vista a sua integração posterior em células fotovoltaicas, para o seu enquadramento (para além desta tese) em sistemas geradores de corrente elétrica.

A presente dissertação está dividida em quatro partes distintas:

- Capítulo 1 – Contêm a Introdução, tal como uma abordagem mais teórica com o intuito de contextualizar o trabalho desenvolvido.
- Capítulo 2 – São descritos os materiais e métodos desenvolvidos no presente estudo, desde a preparação de soluções, preparação de MIP e NIP como à construção do biossensor.
- Capítulo 3 – São apresentados todos os resultados obtidos, tal como é feita uma pequena discussão sobre estes.
- Capítulo 4 – Descrevem-se as principais conclusões que se retiraram do trabalho desenvolvido.

2. DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo descrevem-se de modo detalhado todos os aspectos de natureza experimental associados à preparação do sensor biomimético/potenciométrico para o biomarcador CEA. São descritos também materiais e equipamentos envolvidos, bem como reagentes e procedimentos específicos necessários.

2.1. Material e equipamento utilizados

As soluções de concentração rigorosa foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com um volume variável entre 10,00 e 250,00 mL. A medição rigorosa de volumes inferiores a 25,00 mL foi efetuada em pipetas automáticas de volume regulável (2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L e de 1000-5000 μ L, marca VWR).

Os sólidos foram pesados na balança Metler Toledo (Figura 14), com precisão de $\pm 0,00001$ g. Utilizaram-se gobelés com capacidades entre 10 e 50 mL. O banho de ultrassons termostatizado, BANDELIN Sonorex DigiTec (Figura 14), foi utilizado algumas vezes de forma a reduzir o tempo envolvido na dissolução de substâncias sólidas.

Os ensaios de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância (controlada pelo Software FRA) foram efetuados num potencióstato/galvanostato Autolab Metrohm PGSTAT302N (figura 15).



Figura 13 Fotografia da balança (esquerda) e do banho de ultrassons (direita) utilizados neste trabalho.



Figura 14 Potencióstato/galvanostato Metrohm PGSTAT302N

Também foram utilizados vidros condutores que continham um filme de óxido de estanho dopado com flúor (FTO, com resistência à volta de $13,0 \Omega/\text{sq}$). Estes vidros foram usados como elétrodo de trabalho no qual o suporte condutor era FTO.

2.2. Reagentes e soluções

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi desionizada e apresentava uma condutividade inferior a $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$. As soluções aquosas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

No presente trabalho utilizaram-se reagentes que se encontram descritos na tabela 6.

Tabela 5 Lista de reagentes utilizados ao longo do presente trabalho e as marcas comerciais correspondentes.

Nome	Marca
Iodo	Riedel-DeHaen
Iodeto de Lítio	Riedel-DeHaen
Ácido Sulfúrico	AnalaR Normapur
CEA (antigénio carcinoembrionário)	Fluka
Pirrol	Aldrich chemistry
Pastilhas tampão Fosfato-salino (PBS)	Amresco
Etanol	AnalaR Normapur
Ácido Oxálico	Merck
Cisteamina	Merck
Ácido hexacloroplatinico (IV) hexahidrato (~40% Pt)	Merck

As soluções padrão de CEA, necessárias à realização deste trabalho, tinham uma concentração de 200 ug/mL. Utilizou-se como solução-tampão as pastilhas de fosfato-salino (PBS), de concentração 0,1 mol/L e com um pH de $7,4 \pm 0,1$.

2.3. Eléttodos utilizados

Para a análise voltamétrica e impedimétrica foi necessária a montagem de um sistema de três eléctrodos. Como eléctrodo de referência utilizou-se um eléctrodo comercial de Ag/AgCl (adquirido à Metrohm), um contra-eléttrodo de carbono (adquirido à Metrohm) e um eléctrodo de trabalho de vidro condutor com FTO (óxido de estanho dopado com flúor), com uma área de imobilização que rondava cerca de 4 cm². Na figura 16 é possível observar a montagem deste sistema de eléctrodos e a cuba utilizada para as medições eletroquímicas.

2.4. Preparação de material biomimético

Neste ponto de trabalho passou-se à preparação de dois tipos de sensores: (i) um foi o material impresso, identificado por (MIP – do inglês *molecularly-imprinted polymer*);

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

(ii) e outro foi não impresso, denominado por NIP (do inglês *non-imprinted polymer*) e que serviu como controlo da impressão presente no material MIP.

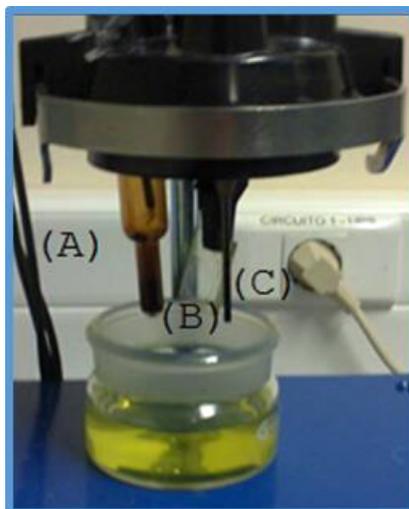


Figura 15 Montagem sistema três eletrodos, (A) Eletrodo de referência Ag/AgCl, (B) Eletrodo de trabalho FTO, (C) contra eletrodo de carbono

Antes de preparar o material sensor, foi necessário preparar o vidro com FTO para receber este material. A primeira fase deste preparação consistiu na limpeza da superfície condutora do eletrodo. Para este efeito, foram inicialmente efetuadas várias lavagens em água desionizada e Extran; de seguida, os vidros foram colocados em banho de ultrassons, durante 10 minutos. Numa fase seguinte, foram depositados 10L de platina sobre o FTO, com a ajuda do *Spin-Coater*, que utiliza a força centrífuga e altas velocidades (2000 rpm) para espalhar o material de revestimento e produzir um filme fino. Após este passo, foram delimitadas as áreas (Figura 17) para posterior introdução do material sensor.



Figura 16 Delimitação das áreas de trabalho no vidro FTO

O material sensor MIP foi preparado pela incubação do FTO/Pt em cisteamina durante 2 horas. Posteriormente, incubou-se a proteína CEA sobre a superfície do vidro

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

FTO/Pt/Cys, ao longo de 3 horas. O polímero foi obtido posteriormente por eletropolimerização de pirrol sobre a superfície anterior. A eletropolimerização foi conduzida por voltametria cíclica, de uma solução de pirrol ($5,0 \times 10^{-2}$ mol/L) preparada em solução tampão de PBS pH $7,4 (\pm 0,1)$, aplicando-se a gama de potencial entre $-0,8$ e $+0,8$ V, por 10 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s. O CEA foi removido da matriz polimérica por incubação em ácido oxálico, durante 3 horas; o material sensor foi posteriormente lavado e incubado em PBS e seco em fluxo de azoto.

O material NIP foi preparado de modo análogo ao descrito para o MIP, tendo-se retirado a etapa da incubação com o biomarcador CEA. Este material serviu de controlo ao processo de impressão realizado no MIP. Resumem-se na Figura 18, os passos principais para a obtenção do material sensor MIP e NIP.

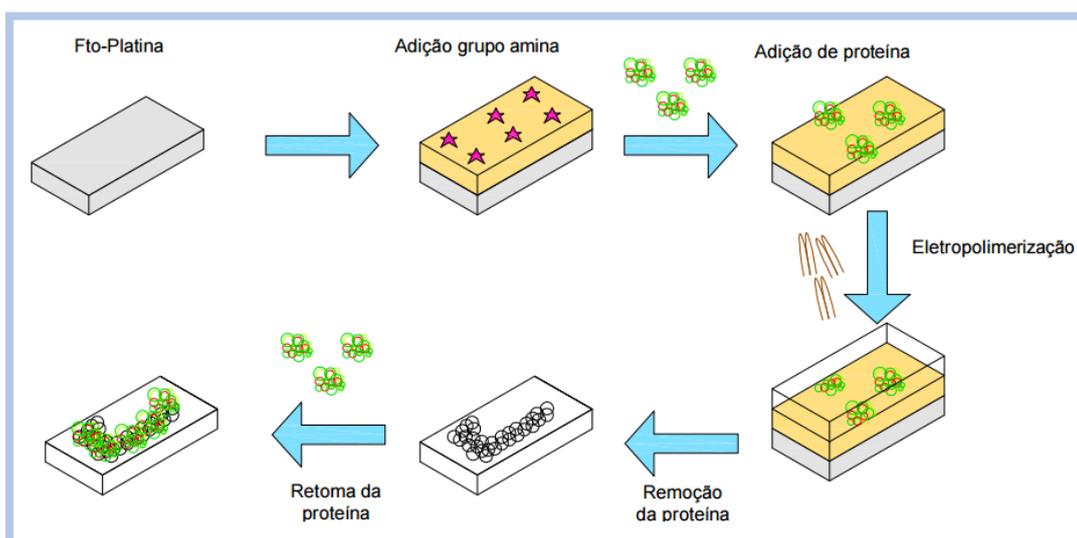


Figura 17 Passos sequenciais da preparação do MIP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos, tal como todas as etapas de otimização até obtenção dos polímeros molecularmente impressos e não impressos.

3.1. Limpeza do eletrodo de trabalho (vidro FTO)

De forma a garantir a reprodutibilidade entre os vários materiais sensores, foi necessário efetuar-se um processo de limpeza preliminar do vidro condutor. Além de permitir resultados mais reprodutíveis para vidros diferentes, este procedimento contribuiu ainda para a uniformização da superfície condutora dentro da mesma unidade sensora.

Num fase inicial, os vidros de FTO foram sujeitos a uma limpeza superficial de dois períodos em banho de ultrassons, o primeiro com água desionizada e Extran e o segundo com etanol. Este processo de limpeza foi importante e contribuiu para a eficiência da adesão uniforme do hexacloroplatinico (IV) hexahidrato (~40% Pt) à superfície condutora do vidro FTO. Por sua vez, a adição da platina foi efetuada com a finalidade de baixar a resistência e de aumentar a condutividade da superfície condutora.

Após a deposição da platina (FTO-Pt), foi efetuada uma limpeza eletroquímica em ácido sulfúrico (0,5M). Esta limpeza consistiu na imposição de uma série de varrimentos cíclicos na solução de ácido sulfúrico, até se obter uma voltamograma estável. Este procedimento visou, novamente, garantir a limpeza e a uniformização da

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

superfície de platina, de forma a garantir o sucesso das modificações a implementar posteriormente. A verificação do sucesso do processo de limpeza foi efetuada pelo traçado de voltamogramas consecutivos, nos quais não se identificou a presença de espécies estranhas ou comportamentos elétricos anómalos.

Tabela 6 Condições utilizadas para a limpeza eletroquímica do suporte sensor de vidro com FTO

Velocidade de varrimento (V/s)	0,050
Número de ciclos	4
Potencial máximo (V)	1,50
Potencial mínimo (V)	-0,10

3.2. Aaminação da superfície

Este passo consistiu na conversão da superfície de platina em superfície aminada, de modo a facilitar a ligação subsequente da proteína. A introdução do grupo amina na superfície do eletrodo de trabalho limpo foi conseguida por incubação deste eletrodo numa solução aquosa de 25mM em cloridrato de cisteamina, durante 2 horas.

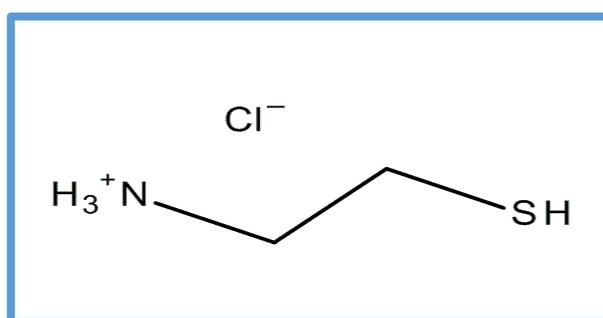


Figura 18 Forma estrutural da cisteamina cloridrato (MerckMillipore, 2016)

De seguida, a superfície aminada obtida (FTO-Pt-Cis) foi analisada e comparada com a anterior (FTO-Pt), por voltametria cíclica e por espectroscopia de impedância, tendo em vista confirmar a modificação efetuada e analisar as alterações elétricas da superfície decorrentes dessa modificação. Esta análise foi efetuada em solução de iodo, cujas concentrações se encontram indicadas na tabela 7, tal como as condições de voltametria cíclica.

Tabela 7 Condições eletroquímicas em voltametria cíclica e composição da solução de iodo utilizada

Potencial mínimo aplicado (V)	-0,20	
Potencial máximo aplicado (V)	0,90	
Velocidade de varrimento (V/s)	0,050	
Número de ciclos	3	
Concentração Iodo (I₂) mol/L	1,00x10 ⁻³	em PBS pH 7,4±0,1
Concentração Iodeto de Lítio (LiI) mol/L	1,00x10 ⁻³	

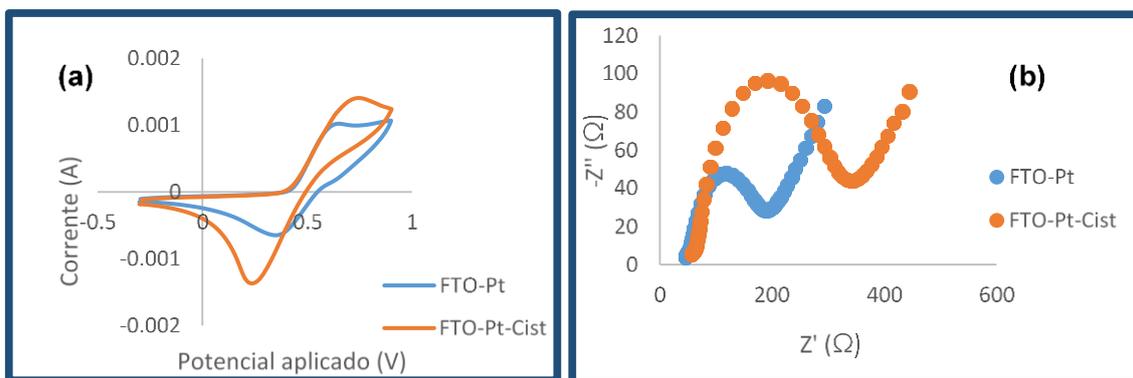


Figura 19 Registos eletroquímicos das superfícies de vidro de FTO limpo com platina, sem (FTO-Pt) e com (FTO-Pt-Cis) cisteamina, por (a) voltametria cíclica, (b) e por espectroscopia de impedância.

Os dados obtidos em voltametria cíclica (Figura 20a) revelaram que a presença de cisteamina aumentou a intensidade de corrente elétrica registada pelo elétrodo de trabalho, sendo este aumento de corrente acompanhado por um aumento da separação de potencial de pico. De uma forma geral, o voltamograma apresentou um pico de oxidação por volta dos +0,6 V, que possivelmente indicou a oxidação do iodeto a iodo (I₂), e um pico de redução na zona de +0,3 V, que possivelmente traduziu a reação inversa, de redução do iodo a iodeto (I⁻).

3.3. Eletropolimerização

A eletropolimerização de Pirrol foi sempre realizada em elétrodos FTO-Pt-Cys. Numa fase inicial, a polimerização foi estudada e otimizada em elétrodos sem a proteína, ou seja, em material de polímero não impresso (NIP). Este estudo foi iniciado com uma solução de pirrol de concentração igual a 5,0x10⁻² mol/L, para uma janela de

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

potencial entre $-0,2$ e $+0,9V$, com uma velocidade de varrimento de $0,025 V/s$, ao longo 15 ciclos.

Uma vez concluída a eletropolimerização, foi ainda necessário aplicar condições que permitissem a sobre-oxidação do polímero formado. Este procedimento consistiu em mergulhar o NIP numa solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol/L}$, $\text{pH } 7,4 \pm 0,1$. As condições impostas a esta sobre-oxidação encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 Condições de sobre-oxidação do NIP

Potencial mínimo aplicado (V)	-0,20
Potencial máximo aplicado (V)	0,40
Velocidade de varrimento (V/s)	0,050
Número de ciclos	20

Dado que se obtiveram valores de resistência elétrica muito elevadas, na ordem dos $2,0 \times 10^5 \Omega$, decidiu-se diminuir a concentração da solução de pirrol. O polímero formado na superfície adquiriu uma resistência elevada; quanto maior a concentração de pirrol maior a quantidade de polímero formado, pelo que maior será a resistência esperada.

Neste sentido, os estudos seguintes prenderam-se com o efeito da concentração de pirrol no polímero formado. Para este efeito, procedeu-se à produção de polímero nas mesmas condições eletroquímica mas com uma solução $10 \times$ menos concentrada, igual a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$. Os resultados aqui obtidos encontram-se indicados na figura 21.

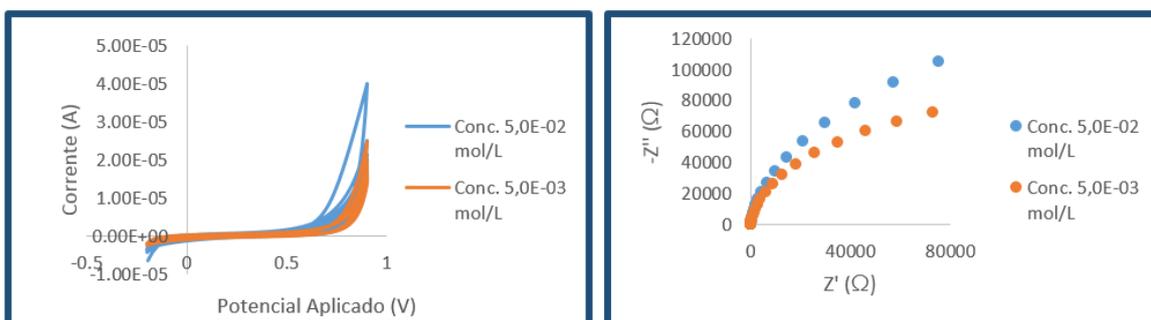


Figura 20 Registos eletroquímicos de (a) voltametria cíclica e de (b) espectroscopia de impedância relativos à polimerização em superfícies de vidro de FTO-Pt-Cis com concentrações de pirrol iguais a $5,0 \times 10^{-3}$ e a $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$.

Através da análise da figura 21, confirmou-se que a variação da concentração de pirrol influenciou os valores da corrente e da resistência elétrica observados, com a

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

solução de pirrol mais diluída a gerar resistências ligeiramente inferiores, pela presença de uma menor quantidade de polímero na superfície do eletrodo. No entanto, os valores associados à resistência continuaram muito elevados, na ordem dos $10^4 \Omega$, mesmo para a solução mais diluída.

De uma forma geral, espera-se que a proteína promova um aumento de resistência na superfície quando presente, pelo que o sistema analítico irá beneficiar em ter como sinal de base um valor de resistência baixo. Neste sentido, foi necessário proceder com uma otimização mais detalhada das condições de eletropolimerização do pirrol. Os parâmetros aqui considerados aqui foram: a velocidade de varrimento, a gama de potenciais e o número de ciclos.

3.3.1. Efeito da velocidade de varrimento

A velocidade de varrimento foi avaliada para 50, 100 e 200 mV/s, tendo como meio de eletropolimerização uma solução de pirrol com uma concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L, mantendo-se o número de ciclos igual a 15, e a gama de potencial a variar entre $-0,2$ e $+0,9$ V.

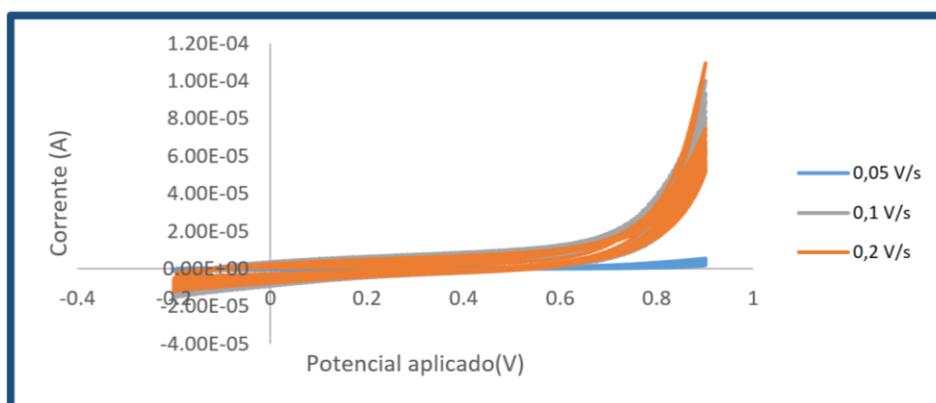


Figura 21 Representação gráfica da aplicação de velocidades diferentes sobre NIP's diferentes

A figura 22 indica, que à medida que se aumentou a velocidade de varrimento aplicada à eletropolimerização, mais unidades de pirrol contribuíram para formar polímero NIP à superfície do eletrodo, pois a corrente elétrica aumentou substancialmente entre 0,050 e 0,20 V/s. Apesar da ocorrência de uma boa eletropolimerização ser crucial para a impressão da proteína em estudo, um excesso de polímero à volta da proteína poderá, no entanto, aprisionar a proteína na matriz

polimérica, impedindo assim a criação do molde do CEA. Neste sentido, os estudos posteriores foram realizados para uma velocidade de varrimento igual a 50 mV/s.

3.3.2. Efeito da gama de potencial

Considerando que a eletropolimerização está a ser conduzida por CV, e que a oxidação do pirrol (que está na origem da formação do polímero) acontece entre cerca de +0,6 e 1,2 V, o estudo seguinte consistiu na avaliação do efeito da janela de potencial usada para este efeito, com início a -0,8 e término a +0,65, +0,80 V ou +1,40 V. Este estudo foi realizado tendo como base uma concentração de pirrol igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L, uma velocidade de varrimento igual a 0,05 V/s e um número de ciclos igual a 15. Neste estudo foi ainda avaliado o efeito da cisteamina no eletropolimerização subsequente, uma vez que a sua presença afetou as propriedades elétricas da superfície do eletrodo de trabalho, afetando subsequentemente as características com que a eletropolimerização decorreu.

Os resultados de eletropolimerização relativos aos materiais FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy obtidos neste estudo encontram-se indicados na Figura 23. De uma forma geral, o aumento do potencial de +0,65 V para +0,80 V originou um aumento da corrente registada em CV, o que se relacionou com o facto de haver mais moléculas de pirrol a serem oxidadas e contribuir para a formação de polímero. Por sua vez, o aumento do valor máximo de potencial para +1,40 V originou um decréscimo de corrente, sugerindo que a espécie de pirrol oxidada sofre alteração química a potenciais mais elevados, com implicação direta na quantidade de polímero formada (e que poderá eventualmente nem corresponder à mesma estrutura química).

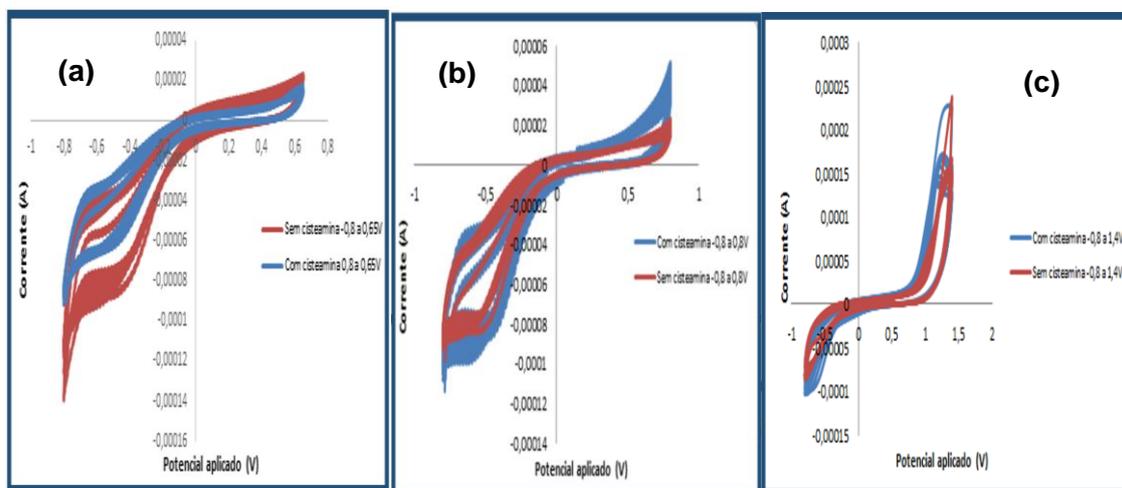


Figura 22 Registos da eletropolimerização do pirrol por voltametria cíclica desde -0,8V a (a) +0,65V; (b) +0,80V; (c) e +1,40V.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

O comportamento de cada um dos materiais FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy obtidos com potenciais diferentes face ao padrão redox de iodo foi avaliada por voltametria cíclica e por espectroscopia de impedância. Os gráficos relativos aos dados obtidos nos últimos três ensaios encontram-se indicados nas figuras 24 a 26.

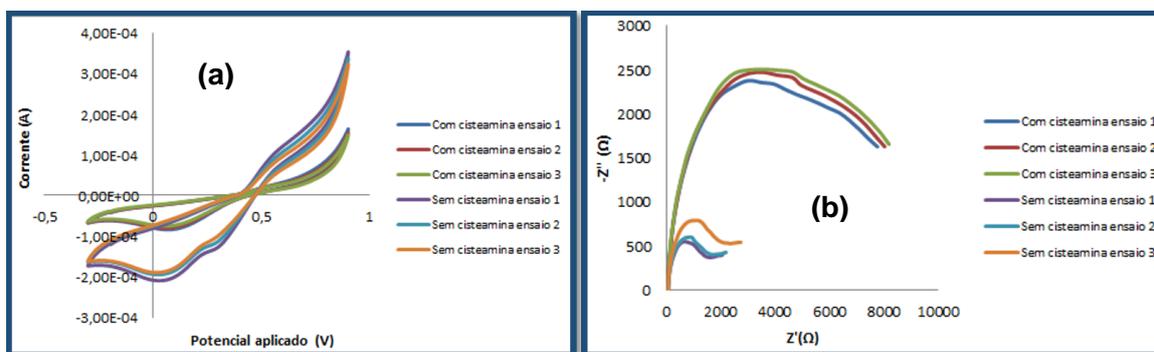


Figura 23 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre $-0,80$ e $+0,65$ V.

No caso da gama de potencial mais estreita, os elétrodos com cisteamina apresentaram uma menor corrente relativa à reação redox do iodo por voltametria cíclica (figura 24a) e, tal como esperado, uma resistência mais elevada por espectroscopia de impedância (figura 24b). Este resultado é consistente com a presença de um filme de polímero mais espesso no caso dos elétrodos com cisteamina. Note-se ainda que foi difícil obter sinais estáveis entre as várias leituras consecutivas, com uma variação mais intensa para os elétrodos preparados sem cisteamina.

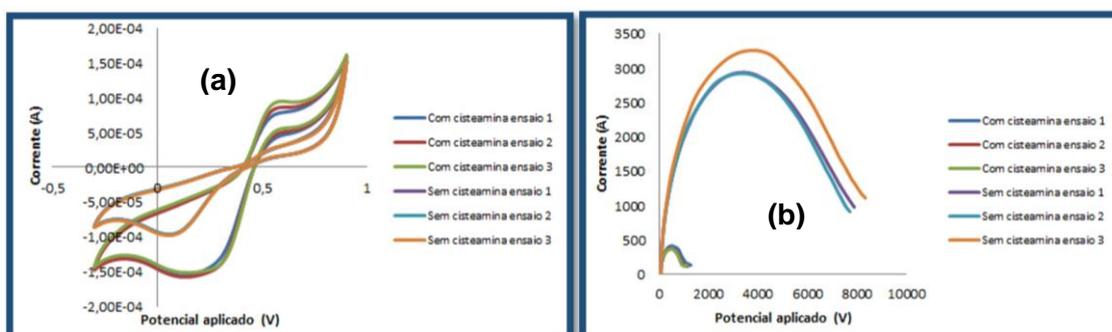


Figura 24 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre $-0,80$ e $+0,80$ V.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Para uma eletropolimerização até +0,80V, os resultados obtidos em termos de corrente foram o contrário do ensaio com a gama mais estreita de potencial. Os sinais de corrente foram genericamente inferiores para os elétrodos sem cisteamina (figura 25a), sugerindo que nesta superfície o polímero foi formado com maior intensidade. Os resultados de espectroscopia de impedância (figura 25b) foram coerentes com este registo, originando valores de resistência superiores para os elétrodos preparados sem cisteamina. Do ponto de vista de estabilidade, mais uma vez os elétrodos sem cisteamina foram mais instáveis, fornecendo sinais consecutivos com uma maior variabilidade. Em contrapartida, os registos para os elétrodos com cisteamina foram mais estáveis.

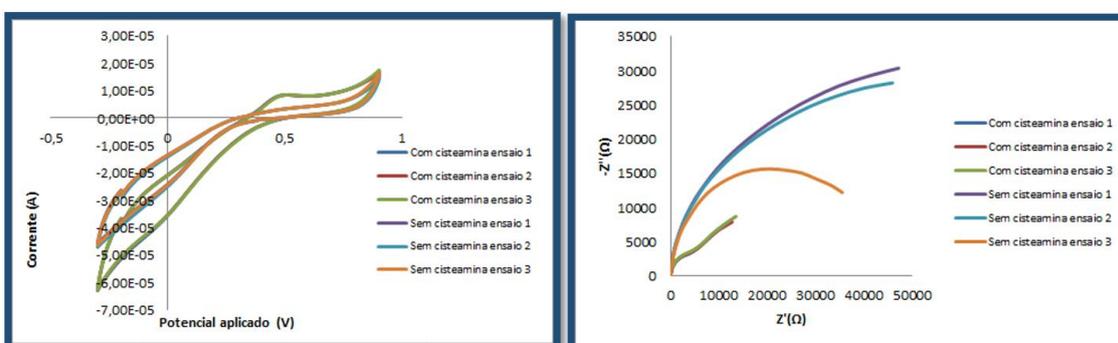


Figura 25 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy e FTO-Pt-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +1,40V.

Para uma eletropolimerização até +1,40V (figura 26), os resultados relativos entre os dois tipos de elétrodos (com e sem cisteamina) foram semelhantes aos obtidos até +0,80V. A intensidade de corrente absoluta foi porém muito inferior, sugerindo a presença de um filme de polímero muito mais espesso (figura 26a). Este registo é coerente com o facto de que até +1,40V é fornecida energia suficiente para oxidar todas as moléculas de pirrol em interação com a superfície, promovendo assim a formação de uma maior quantidade de polímero. Mais uma vez, os resultados de espectroscopia de impedância foram coerentes com este registo (figura 26b), com valores de resistência superiores para os elétrodos preparados sem cisteamina, sendo estes sinais também os mais instáveis. Os sinais para os elétrodos com cisteamina foram mais estáveis, mas corresponderam a valores de resistência muito elevados.

De uma forma geral, o estudo anterior permitiu identificar a melhor gama de potencial para produção do filme polimérico não impresso, de forma a obter um polímero estável e com uma gama de valores de resistência adequada à realização de ensaios de calibração. O intervalo de potencial escolhido para os ensaios posteriores foi de

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

-0,8V a +0,8V. Resumem-se na tabela 9 os valores das condições eletroquímicas selecionadas até esta fase do trabalho.

Tabela 9 Valores fixados através de estudos efetuados

Concentração Pirrol (mol/L)	5,0×10 ⁻³
Velocidade de varrimento (V/s)	0,050
Gama de potencial (V)	-0,8V a +0,8V
Cisteamina	Presente

3.3.3. Efeito do número de ciclos

A avaliação do efeito do número de ciclos teve como objetivo encontrar a espessura do polímero mais adequada à obtenção de um filme estável, de baixo valor de resistência e também adequado à impressão da proteína (evitando que a proteína usada como molde ficasse aprisionada na matriz polimérica). Neste estudo, o número de ciclos utilizado foi igual a 5, 10 ou 20 ciclos. Os resultados obtidos encontram-se patentes nas figuras 27 a 29.

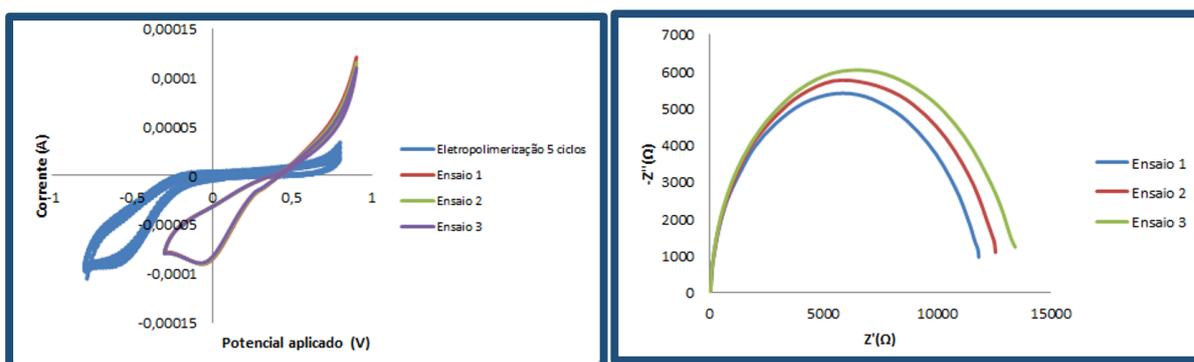


Figura 26 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre -0,80 e +0,80V, numa solução de pirrol de concentração igual a 5,0×10⁻³ mol/L e com 5 ciclos.

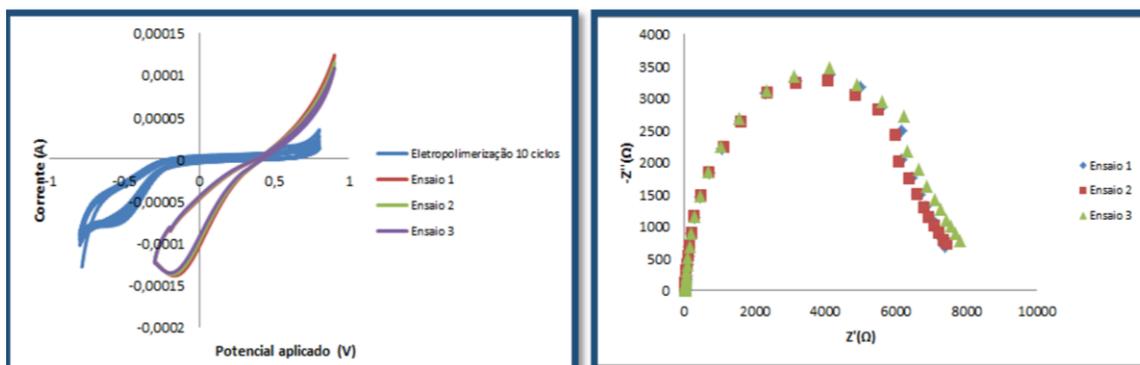


Figura 27 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre $-0,80$ e $+0,80V$, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 10 ciclos.

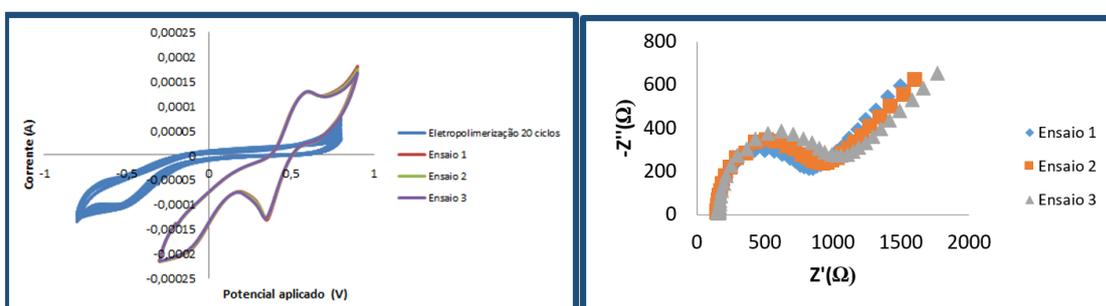


Figura 28 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre $-0,80$ e $+0,80V$, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 20 ciclos.

De uma forma geral, seria expectável que com a diminuição do número de ciclos, a resistência também diminuísse, visto que haveria menos polímero a ser formado na superfície do elétrodo. No entanto verificou-se precisamente o contrário. Curiosamente, os sinais mais estáveis foram aqueles obtidos na condição intermédia deste estudo: 5 ciclos.

Sem muita explicação para este registo, os polímeros subsequentes foram obtidos para 10 ciclos consecutivos num procedimento de voltametria cíclica, com uma concentração de pirrol igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L, a uma velocidade de varrimento igual a $0,050$ V/s e numa gama potencial entre $-0,80V$ a $+0,80V$. Reunidas as condições que pareceram mais adequadas à produção de um material sensor para o CEA, foram testadas de seguida várias as formulações MIP.

3.4. Preparação do MIP

A preparação do MIP foi iniciada pela incubação da proteína no material FTO-Pt-Cys. Para este efeito, foram colocados $60\mu L$ de uma solução de CEA com uma

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

concentração igual a $5 \mu\text{g/mL}$ em cima da superfície sensora. Esta solução permaneceu aí por 3 horas, tendo-se lavado a superfície com tampão após este período.

Concluída a incubação da proteína na superfície aminada, teve lugar a eletropolimerização do pirrol. Neste caso, recorreu-se às condições identificadas anteriormente, tendo-se porém ajustado o intervalo de polimerização para $-0,20$ a $+0,90\text{V}$. Este ajuste de gama de potencial permitiu eliminar o efeito da interferência do CO_2 dissolvido, dado que a sua redução ocorreria a cerca de $-0,5$ a $-0,6\text{V}$. De forma semelhante ao NIP, após eletropolimerização também se deu lugar à sobreoxidação, recorrendo às mesmas condições identificadas anteriormente. Esta sobreoxidação conferiu uma maior estabilidade ao polímero.

Terminados os ensaios de estabilização do polímero molecularmente impresso, procedeu-se à remoção da proteína, por incubação do MIP numa solução de ácido oxálico $0,10 \text{ mol/L}$, durante 3 horas. Após este tempo de espera, lavou-se com solução tampão para retirar possíveis restos de proteína na superfície e incubou-se durante 30 minutos com solução tampão de PBS ($\text{pH } 7,4 \pm 0,1$) para ajustar o pH na superfície sensora. Os resultados obtidos encontram-se indicados na figura 30.

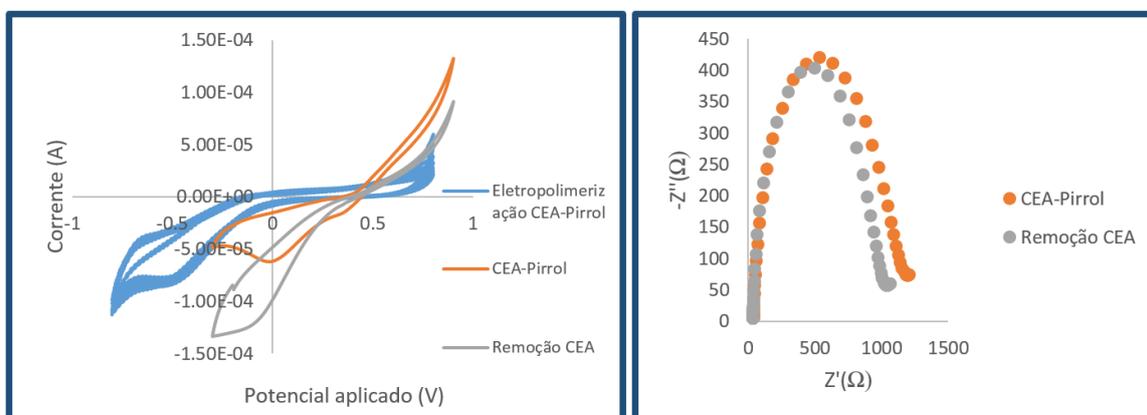


Figura 29 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b) por espectroscopia de impedância dos elétrodos FTO-Pt-Cis-CEA/PPy, numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre $-0,20$ e $+0,90\text{V}$, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e com 3 ciclos, relativos aos vários estágios de produção do material MIP.

Apesar de, na figura 30(a) se evidenciar um ligeiro decréscimo na intensidade da corrente elétrica gerada com a remoção da proteína relativamente à sua eletropolimerização com o pirrol, a figura 30(b) mostra que poucas alterações aconteceram. Estes resultados sugerem a possível formação de polímero em torno da proteína, rodeando-a e impedindo a sua remoção. Outras hipóteses podem também ser consideradas, como o tempo de incubação não ser o mais adequado, ou até mesmo a

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

quantidade de proteína incubada ser relativamente baixa, ou a solução de remoção não ser a mais apropriada. Perante este cenário, e na impossibilidade de aumentar a concentração de proteína a “moldar”, optou-se por diminuir a concentração de pirrol para $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L, ou seja, diluir 10 vezes a concentração utilizada anteriormente e avaliar novamente o comportamento do sistema sensor.

Ao mesmo tempo, foram preparadas soluções-padrão de CEA compreendidas entre $5,0 \times 10^{-1}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g/mL}$, como se pode observar na figura 31, para se poder traçar a curva de calibração. Cada solução-padrão foi incubada durante 30 minutos, efetuando-se de seguida a leitura voltamétrica e de impedância (Figura 32).

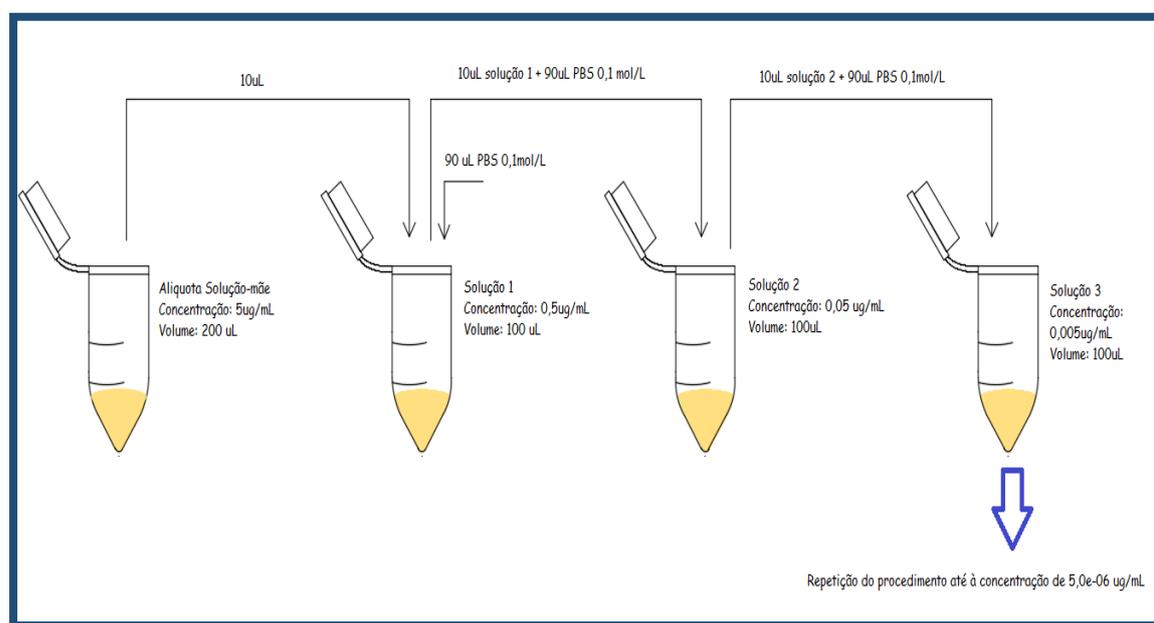


Figura 30 Procedimento adotado para a preparação de soluções padrão envolvidos no traçado da curva de calibração.

Analisando a figura 32a, verifica-se uma diferença acentuada entre o material NIP e o MIP. O MIP apresenta um pico de corrente em torno de $6,0 \times 10^{-4}$ amperes, enquanto o NIP se encontra na década 10^{-6} . Relativamente à figura 31(b), denota-se que após a remoção da proteína, houve um aumento de resistência elevado, mais especificamente de 200 para 550 Ω . Com a adição sucessiva de soluções padrão, ou seja, da solução mais diluída para a menos diluída, observou-se que os valores de impedância iam diminuindo à medida que a solução padrão ia ficando mais cada vez mais concentrada.

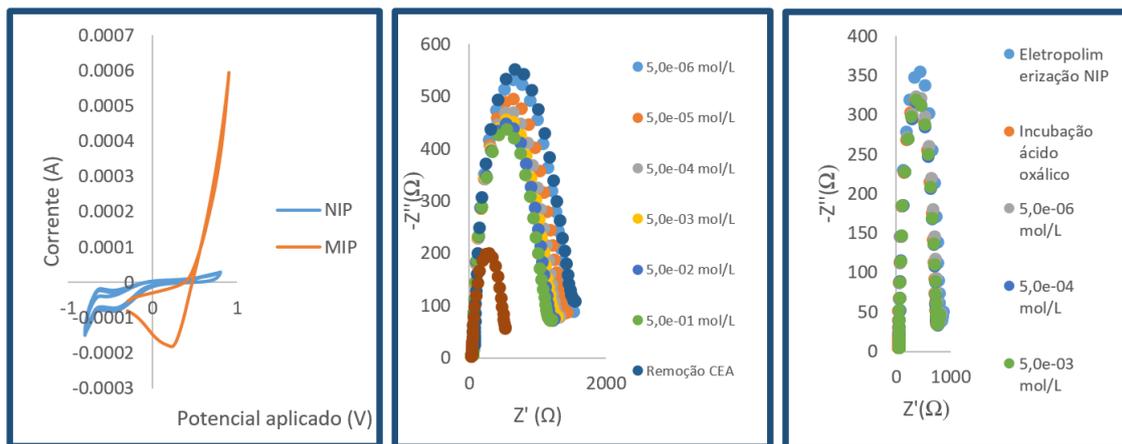


Figura 31 Registos eletroquímicos (a) por voltametria cíclica e (b,c) por espectroscopia de impedância dos elétrodos MIP (b; FTO-Pt-Cis-CEA/PPy) e NIP (c; FTO-Pt-Cis-PPy), numa solução padrão redox de iodo, com polímero produzido entre $-0,20$ e $+0,90V$, numa solução de pirrol de concentração igual a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L e com 3 ciclos.

Em resumo, a curva de calibração apresentou a tendência oposta à que seria esperada. Note-se também que a espectroscopia de impedância mede a resistência à transferência de carga e que esta resistência depende também do grau de protonação da superfície, que por sua vez depende também da carga geral da proteína presente em solução. Ou seja, havendo a possibilidade da proteína se encontrar carregada positivamente, um padrão redox de carga negativa (como o iodo) poderá sentir-se atraído para a superfície sensora, diminuindo assim a resistência observada.

Comparativamente ao MIP, o NIP apresentou uma variação de sinal sem significado, como é possível observar na figura 32c. Note-se que a construção do NIP passou pelas fases de eletropolimerização e de incubação com ácido oxálico, mesmo na ausência de proteína.

3.4.1. Curva de Calibração

Através de uma ferramenta integrante do módulo *FRA measurement potentiostatic*, denominada por *Electrochemical fit*, no programa Autolab, foi possível retirar o valor das resistências de polarização (R_p) referentes a cada semicírculo obtidos através da análise de espetrometria de impedância associada a cada adição-padrão. Inicialmente traçou-se uma curva de calibração entre a resistência de polarização e a concentração de CEA para a gama de concentrações estudadas, mas verificou-se que não havia uma relação linear entre estes dois parâmetros.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Desta forma, verificou-se uma tendência linear entre os valores da resistência de polarização e o logaritmo das concentrações padrão da proteína CEA. A equação de regressão linear encontra-se representada na figura 33.

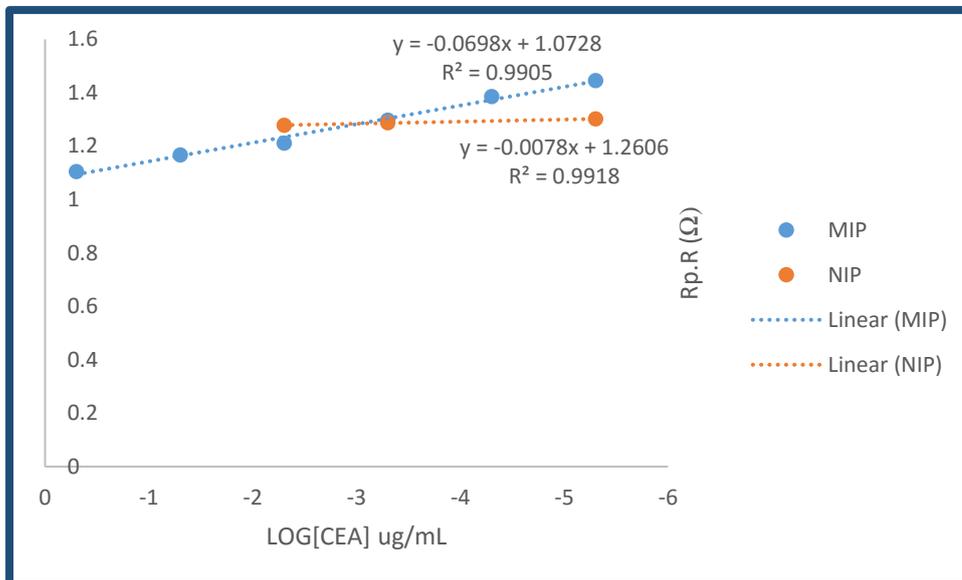


Figura 32 Curva de calibração do material sensor MIP e NIP.

Através da análise da figura 33, verificou-se que os materiais MIP e NIP apresentaram comportamentos muito distintos em termos de resposta linear. O sensor FTO-Pt-Cis-CEA/PPy forneceu uma resposta sensível e linear, enquanto que o material de controlo não evidenciou resposta linear (a sensibilidade foi quase nula, indicando que o sinal permaneceu quase constante ao longo das várias incubações em solução padrão). O limite de deteção estimado para a calibração obtida foi igual a 0,935 ng/mL.

Por motivos de comparação com o estado-da-arte, apresentam-se na tabela 10 as características de desempenho analítico de outros sensores para o CEA publicados na literatura. Tal como se pode observar, o método que aqui se descreve apresenta características analíticas comparáveis aos demais já publicados e oferece vantagens do ponto de vista de simplicidade e custo. Nesta fase, é ainda expectável que as características de desempenho dos elétrodos venham a melhorar, uma vez que ainda é possível implementar alguns ajustes em termos de algumas variáveis experimentais.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

Tabela 10 Valores de limite de detecção e de intervalo linear para vários métodos de detecção de CEA (Sai Xu, 2016)

Método de detecção	Sistema	Intervalo Linear (ng/mL)	Limite de Detecção (ng/mL)
Colorimétrico	Nano partículas	10-120	3
Foto-Eletroquímico	FTO/QDS	0,5-500	0,017
Ressonância <i>Plasmon</i> Superficial	Chip sensor CM5	5-80	2,5
Quimioluminescência	vidro coloidal de sílica	0,5-100	0,12
Espectrofluorimetria	Nano partículas magnéticas	1-1000	0,5

4. CONCLUSÃO e PERSPETIVAS FUTURAS

Neste estudo foi desenvolvido um sensor eletroquímico para a deteção do biomarcador antigénio CEA. Este biomarcador está associado ao cancro do colón retal e visto que este tipo de cancro está entre os cinco primeiros cancros com maior taxa de mortalidade, é importante a criação de formas de monitorização com elevada sensibilidade, de resposta rápida, de baixo custo, de pequenas dimensões e portáteis.

O biossensor aqui proposto foi baseado na produção de um material sensor em vidro condutos, baseado na técnica de impressão molecular e tendo-se utilizado polímeros não impressos (NIP) como controlo. O polímero utilizado para a impressão foi baseado em monómeros de pirrol e obtido por eletropolimerização, sendo esta uma técnica simples e de fácil implementação experimental. Verificou-se ainda que a escolha das condições experimentais mais adequadas associadas à eletropolimerização (como a concentração de monómero, velocidade de varrimento, gama de potencial e número de ciclos) se revelou crucial para a obtenção de um polímero estável.

De uma forma geral, o desempenho analítico do material sensor desenvolvido pareceu adequado à sua implementação na análise de amostras. Esta fase carece, porém, de ensaios adicionais, para validação destas características em amostras controlo e aplicação prática subsequente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.Skoog, D., M.West, D., Holler, F., & R.Crouch, S. (2005). *Fundamentos de Química*. Estados Unidos: Thomson.
- Aleixo, L. M. (2016). *SlideShare*. Obtido de <http://pt.slideshare.net/brunolafaetisantosesilva/voltametria-e-polarografia>
- Altintas, Z., & Tothill, I. (2 de Agosto de 2013). *Biomarkers and biosensors for the early diagnosis of lung cancer*. Obtido de ScienceDirect.
- American Cancer, S. (1 de Janeiro de 2016). *Colorectal cancer risk factors*. Obtido de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf>
- Bernd, e. a. (2015). On-going improvement and persistent differences in the survival for patients with colon and rectum cancer across Europe 1999–2007 – Results from the EURO CARE-5 study. *European Journal of Cancer*, 51, 2158– 2168.
- CUF, O. (3 de Junho de 2016). *Cancro do cólon e reto*. Obtido de Saúde Cuf: <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-colon-e-reto>
- DGS. (2014). *Portugal Doenças Oncológicas em numeros*. Lisboa: Direção Geral de Saude.
- D'Orazio, P. (7 de Janeiro de 2003). *Biosensors in clinical chemistry*. Obtido de ScienceDirect.
- Dubal, D. P., Lee, S. H., Kim, J. G., Kim, W. B., & Lokhande, C. D. (2012). Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor. *Journal of Materials Chemistry*, 3044-3052.

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

- E.Tothill, I. (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell & developmental Biology*, 55-62.
- Ellen Verheyen, J. P.-A. (2010). Challenges for the effective molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 3008-3020.
- Europacolon. (s.d.). Europa Colon Portugal, apoio ao doente com cancro digestivo. <http://www.europacolon.pt/pagina/325-dados-doenca>, acessado em Outubro de 2016.
- Frazão, D. A. (Maio de 2016). *Tratamento para câncer de intestino*. Obtido de Tua Saúde: <https://www.tuasaude.com/tratamento-para-cancer-de-intestino/>
- G.Zoski, C. (2007). Handbook of Electrochemistry. *Elsevier*, 4 a 6.
- James K. Alexander, M., & al, e. (2016). ANTIGÉNIOS TUMORAIS. *Manual MSD - Edição de saúde para a família*, <http://www.manuaismsd.pt/?id=189&cn=1597>.
- Lowinsohn, D., & Bertotti, M. (2006). Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova*, 1678-7064.
- Mark H. Beers, M., Peter C. Brazy, M., Chloe G. Alexson, M., George R. Brown, M., & Richard W. Besdine, M. (2016). ANTIGÉNIOS TUMORAIS. Obtido de EDIÇÃO DE SAÚDE PARA A FAMÍLIA: <http://www.manuaismsd.pt/?id=189&cn=1597>
- MerckMillipore. (2016). *Cysteaminium chloride*. Obtido de merckmillipore: http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Cysteaminium-chloride,MDA_CHEM-802835?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.pt%2F
- Minden, N. V. (2016). <http://www.nal-vonminden.com/pt/testes-rapidos/cat/antigenio-carcino-embionario-cea.html>. Obtido de Nal Von Minden.
- Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N., & K.Mantha, A. (2016). Biosensors for breast cancer diagnosis: a review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosensors and Bioeletronic*, 12.
- P.Fonseca, L. (2003). *Biossensores e Diagnósticos Clínicos Enzimáticos*. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Pinto, G. C. (2009/2010). *Carcinoma colo-rectal: diagnóstico e tratamento*. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto: Mestrado Integrado em Medicina.
- Polycarpo, A., Topciu, F. R., Neto, J. Z., Lopes, L. S., Catelani, L. G., Zerwes, M. H., Waisberg, J. (2003). Carcinoembryonic antigen (CEA) determination in detection

PRODUÇÃO DE MATERIAIS BIOMIMÉTICOS PARA CÉLULAS FOTOVOLTAICAS

- of hepatic metastasis from colorectal carcinoma. *Acta Cirurgica Brasileira*, 1678-2674.
- R.Eggins, B. (2002). *Chemical sensors and biosensors*. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
- Rasooly, A., & Jacobson, J. (2006). Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 1851–1858.
- RIBEIRO, D., SOUZA, C., & ABRANTES, J. (2015). Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. *Revista IBRACON de Estruturas e Materiais*, 1983-4195.
- Sai Xu, B. D. (2016). Paper-based upconversion fluorescence resonance energy transfer biosensor for sensitive detection of multiple cancer biomarkers. *Scientific Reports* 6, <http://www.nature.com/articles/srep23406>. Obtido de nature: <http://www.nature.com/articles/srep23406/figures/5>
- Sharma, J. B., Sharma, S., Usha, B., Gupta, A., Kumar, S., & Mukhopadhyay, A. K. (2015). A cross-sectional study of tumor markers during normal and. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 203-206.
- Sharma, P. e. (2012). Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. *analytical & bioanalytical chemistry*, 3177-3204.
- Sousa, G. d. (2016). O ANTIGÊNIO CARCINO-EMBRIONÁRIO NO DESPISTE DO CARCINOMA COLORRETAL. *Saúde e Medicina*.
- Sun, W., Zheng, R., & Chen, X. (2010). Symmetric redox supercapacitor based on micro-fabrication with. *Journal of Power Sources* 195, 7120-7125.
- Wang, J. (2006). Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 1887–1892.
- Wang, Y., Zhang, Z., Jain, V., Yi, J., Mueller, S., Sokolov, J., . . . Rafailovich, M. H. (2010). Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sensors and Actuators B: Chemical, Volume 146*, 381-387.
- Wolyneç, S. (2003). *Técnicas Eletroquímicas em Corrosão*. São Paulo, Brasil: Camara Brasileira do Livro.