

Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção de um biomarcador associado a doenças neurodegenerativas

BIANCA SANTOS FERREIRA

Novembro de 2021

Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção de um biomarcador associado a doenças neurodegenerativas

Bianca Santos Ferreira

Engenheira Biomédica pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção
de grau de Mestre em Engenharia Biomédica”

Orientador: Felismina Moreira, Gabriela Martins e Arcelina Marques

Outubro de 2021

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

O meu profundo agradecimento à minha família que sempre me acompanhou neste percurso, em especial aos meus pais e avós, que nunca me deixaram baixar os braços perante as dificuldades.

À Doutora Felismina Moreira pela dedicação, empatia e capacidade de transmitir o conhecimento sempre serena e descomplicada. À Doutora Gabriela Martins, sem ela nada seria possível, sempre com muita simpatia e paciência, nunca deixou de me responder a uma pergunta por mais absurda que soasse. À Doutora Arcelina Marques, não poderia faltar o agradecimento no processo de escrita, tendo sempre em atenção todos os pormenores. À equipa do Biomark um grande obrigada pelo acolhimento.

A todos os meus amigos que sempre me acompanharam e vivenciaram o meu trabalho nestes últimos anos, em especial ao Hugo, ao Pedro e ao Mesquita.

E por fim, à pessoa mais importante da minha vida, que sempre me motivou e nunca escondeu o orgulho pelo meu trabalho, a ti João.

Resumo

A necessidade de desenvolver técnicas de diagnóstico rápidas e de baixo custo é de extrema importância, principalmente quando se trata de melhorar as condições de saúde global. Um fator importante para a prevenção e tratamento das doenças neurodegenerativas é o seu correto diagnóstico precoce. Os biossensores são uma ferramenta que poderão ser muito úteis na construção de testes em contexto *point-of-care*, sendo estes dispositivos de rápida resposta, de custo reduzido, minimamente invasivos e de alta sensibilidade e especificidade.

O principal objetivo deste trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico, para o rastreamento de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento. Tem como base a detecção de um biomarcador relacionado com os processos neuro-inflamatórios, a Interleucina 6 (IL-6). Para este efeito, são desenvolvidos polímeros de impressão molecular, à base de materiais naturais, para o reconhecimento desta proteína, nos quais a estrutura polimérica cresce diretamente sobre a área condutora de um eletrodo. O biossensor é avaliado do ponto de vista de sensibilidade, reprodutibilidade e seletividade, tendo em conta uma detecção eletroquímica na presença deste biomarcador.

Palavras-chave: biossensor; doença de Alzheimer; interleucina 6; sensor eletroquímico; polímero de impressão molecular.

Abstract

The need to develop rapid and cost-effective diagnostic techniques is extremely important, especially when it comes to improving global health conditions. An important factor in the prevention and treatment of neurodegenerative diseases is their correct diagnosis. Biosensors are a tool that can prove very useful in the development of point-of-care tests, as these devices are minimally invasive and highly sensitive and specific.

The main goal of this work is to develop an electrochemical biosensor for screening of neurodegenerative diseases associated with ageing. It is based on the detection of a biomarker related to neuroinflammatory processes, Interleukin 6 (IL-6). For this purpose, molecularly imprinted polymer (MIP) of natural origin is being developed to detect the protein, with the polymeric structure growing directly on the conductive area of the carbon-screen printed electrode. The biosensor is evaluated in terms of sensitivity, reproducibility, and selectivity, with regard the electrochemical detection of the presence of the biomarker.

Keywords: biosensor; Alzheimer's disease; interleukin 6; electrochemical sensor; molecularly imprinted polymer.

Índice

| | |
|--|------------|
| AGRADECIMENTOS..... | III |
| RESUMO | V |
| ABSTRACT | VII |
| ÍNDICE..... | IX |
| LISTA DE FIGURAS..... | XIII |
| LISTA DE TABELAS..... | XVII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XIX |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 3 |
| 2. DEMÊNCIA | 9 |
| 2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER..... | 10 |
| 2.1.1. Diagnóstico..... | 12 |
| 2.1.2. Biomarcadores | 13 |
| 2.1.2.1. <i>Específicos</i> | 13 |
| 2.1.2.2. <i>Neurotransmissores</i> | 14 |
| 2.1.2.3. <i>Neuro-inflamação</i> | 15 |
| 2.1.3. Métodos de monitorização da IL-6..... | 17 |
| 2.1.3.1. <i>Métodos Separativos</i> | 17 |
| 2.1.3.2. <i>Métodos Óticos</i> | 17 |
| 2.1.3.3. <i>Métodos Eletroquímicos</i> | 18 |
| 3. BIOSSENSORES..... | 23 |
| 3.1. ESTRUTURA DE UM BIOSSENSOR..... | 23 |
| 3.2. ELEMENTOS DE (BIO)RECONHECIMENTO..... | 26 |
| 3.2.1. Anticorpos Naturais | 28 |
| 3.2.2. Aptâmeros..... | 29 |
| 3.2.3. Polímeros de Impressão Molecular (MIP)..... | 30 |
| 3.2.3.1. <i>Síntese de um MIP</i> | 31 |
| 3.3. TRANSDUTORES..... | 33 |
| 3.3.1. Óticos..... | 33 |
| 3.3.2. Piezoelétricos..... | 34 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.3.3. | Eletroquímicos..... | 35 |
| 3.3.3.1. | <i>Sensores Voltamétricos</i> | 36 |
| 3.3.3.2. | <i>Sensores Potenciométricos</i> | 37 |
| 3.3.3.3. | <i>Sensores Impedimétricos</i> | 37 |
| 3.4. | PLATAFORMAS DOS SENSORES | 40 |
| 3.5. | ANÁLISE QUALITATIVA DOS MATERIAIS | 41 |
| 3.5.1. | Espetroscopia de Infravermelho | 41 |
| 3.5.2. | Espetroscopia de Fotoluminescência | 41 |
| 3.5.3. | Espetroscopia de Raman | 42 |
| 4. | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 45 |
| 4.1. | MATERIAL E EQUIPAMENTO | 45 |
| 4.1.1. | Soluções..... | 47 |
| 4.2. | PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS | 48 |
| 4.2.1. | Preparação do C-SPE | 49 |
| 4.2.2. | Condições de trabalho do NIP | 50 |
| 4.2.3. | Condições de trabalho do MIP | 51 |
| 4.2.1. | Curva de Calibração | 53 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 57 |
| 5.1. | PREPARAÇÃO DO C-SPE | 57 |
| 5.1.1. | Ativação Eletroquímica | 57 |
| 5.1.2. | Imobilização do nanomaterial (NTC/PAH/NPPt) | 60 |
| 5.2. | CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE SÍNTESE DO NIP | 65 |
| 5.2.1. | Dissolução da β -CD..... | 66 |
| 5.2.2. | Velocidade de Varrimento..... | 68 |
| 5.2.1. | Concentração de Pirrol | 70 |
| 5.2.2. | Número de Ciclos | 71 |
| 5.3. | CONDIÇÕES DE TRABALHO DO MIP | 72 |
| 5.3.1. | Polimerização | 72 |
| 5.3.1.1. | <i>Concentração da IL-6</i> | 72 |
| 5.3.1.2. | <i>pH do Tampão</i> | 73 |
| 5.3.2. | Remoção da Proteína | 74 |
| 5.4. | CURVA DE CALIBRAÇÃO | 80 |
| 5.5. | TESTE EM SORO | 81 |

| | |
|--------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO | 85 |
| REFERÊNCIAS | 87 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 – Os diferentes métodos da técnica de ELISA (8)..... | 4 |
| Figura 2.1 – Os diferentes estágios da DA (23). | 11 |
| Figura 2.2 – Processo de neurotransmissão química (39). | 15 |
| Figura 2.3 – Esquema geral da técnica de HPLC (52). | 17 |
| Figura 3.1 – As grandes áreas de aplicação dos biossensores (62). | 23 |
| Figura 3.2 – Esquema representativo de um biossensor. | 24 |
| Figura 3.3 – Tipo de elementos de (bio)reconhecimento (53). | 27 |
| Figura 3.4 – Vantagens e desvantagens dos elementos de (bio)reconhecimento (73). . | 28 |
| Figura 3.5 – Estrutura básica de um Ac (79)..... | 29 |
| Figura 3.6 – A técnica de SELEX (80)..... | 30 |
| Figura 3.7 – Processo de formação de um MIP (7)..... | 31 |
| Figura 3.8 – Sensores óticos (96). | 34 |
| Figura 3.9 - Voltamograma cíclico adquirido por CV (82)..... | 36 |
| Figura 3.10 - Representação da voltametria de onda quadrada (82). | 37 |
| Figura 3.11 - Resposta de corrente sinusoidal num sistema linear após a aplicação de uma AC..... | 39 |
| Figura 3.12 - Gráfico de <i>Nyquist</i> com os componentes reais (Z') e imaginários (Z'') da impedância em cada ω | 39 |
| Figura 3.13 – Constituição de um SPE (105). | 40 |
| Figura 3.14 – Exemplo de espectroscopia de <i>Raman</i> em três materiais distintos (108). 42 | |
| Figura 4.1 – Potencióstato/galvanostato PGSTAT204 (109)..... | 45 |
| Figura 4.2 - Representação esquemática da preparação das soluções padrão usadas para a construção da curva de calibração. | 47 |
| Figura 4.3 – Representação esquemática da construção do MIP. | 48 |
| Figura 5.1 – Voltagramas obtidos a cada etapa durante a ativação eletroquímica do biossensor, medidos com a solução <i>redox</i> de ferro. | 58 |
| Figura 5.2 – Diagramas de <i>Nyquist</i> obtidos a cada etapa durante a ativação eletroquímica do biossensor, medidos com a solução <i>redox</i> de ferro. | 59 |
| Figura 5.3 - Voltagramas obtidos após a colocação de cada camada de NTC/PAH/NPpT, medidos na solução <i>redox</i> de ferro, sendo a) a incubação feita a 75°C e b) a incubação a 60°C. | 61 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.4 - Diagramas de <i>Nyquist</i> obtidos em cada colocação das camadas de NTC/PAH/NPpt, em meio da solução <i>redox</i> de ferro, sendo a) a incubação feita a 75°C e b) a incubação a 60°C..... | 62 |
| Figura 5.5 - Voltagramas obtidos após a colocação das 3 camadas de NTC/PAH/NPpt, em meio da solução <i>redox</i> de ferro, em C-SPEs com ativação eletroquímica por CA. . | 64 |
| Figura 5.6 - Diagramas de <i>Nyquist</i> obtidos em cada colocação das camadas de NTC/PAH/NPpt, em meio da solução <i>redox</i> de ferro, em C-SPEs com ativação eletroquímica por CA. | 64 |
| Figura 5.7 - Voltagramas obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de -0,8 V a +1,3 V, a 20 ciclos, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s, medidos com a solução <i>redox</i> de ferro..... | 66 |
| Figura 5.8 - Diagramas de <i>Nyquist</i> obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de -0,8 V a +1,3 V, a 20 ciclos, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s, medidos com a solução <i>redox</i> de ferro..... | 67 |
| Figura 5.9 – Voltagramas da eletropolimerização a) aquando da utilização de β -CD e b) β -CD conjugada com pirrol. | 69 |
| Figura 5.10 - Diagramas de <i>Nyquist</i> obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de 0 V a +1,8 V, a 30 ciclos, com velocidade de varrimento de 0,025 V/s e 0,1 V/s, medidos com a solução <i>redox</i> de ferro. | 70 |
| Figura 5.11 - Diagramas de <i>Nyquist</i> obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de 0V a +1,8 V, a 30 ciclos, com velocidade de varrimento 0,1 V/s para as diferentes concentrações da proteína IL-6 e NIP de controlo, em solução <i>redox</i> de ferro. | 73 |
| Figura 5.12 - Diagramas de <i>Nyquist</i> da eletropolimerização e remoção do NIP (a) e MIP (b) obtidos para a primeira técnica de remoção estudada, em solução <i>redox</i> de ferro... | 75 |
| Figura 5.13 - Diagramas de <i>Nyquist</i> da eletropolimerização e remoção do NIP (a) e MIP (b) obtidos para a segunda técnica de remoção estudada, em solução <i>redox</i> de ferro. ... | 76 |
| Figura 5.14 - Diagramas de <i>Nyquist</i> da eletropolimerização e remoção do NIP (a) e MIP (b) obtidos para a terceira técnica de remoção estudada, em solução <i>redox</i> de ferro. ... | 77 |
| Figura 5.15 - Retas de calibração para o NIP e o MIP da primeira técnica de remoção. | 78 |
| Figura 5.16 - Retas de calibração para o NIP e o MIP da segunda técnica de remoção. | 79 |
| Figura 5.17 - Retas de calibração para o NIP e o MIP da terceira técnica de remoção. . | 79 |
| Figura 5.18 - Diagramas de <i>Nyquist</i> da calibração do MIP (a) e NIP (b) da terceira técnica de remoção, com tampão fosfato-citrato de pH 5..... | 80 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.19 – Retas de Calibração obtidas com 6 padrões de concentrações de IL-6 preparadas em tampão fosfato-citrato de pH 5 para MIP e NIP, pela técnica EIS..... | 81 |
| Figura 5.20 - Reta de Calibração obtida com 5 padrões de concentrações de IL-6 preparadas em soro para MIP, pela técnica EIS. | 82 |
| Figura 5.21 - Reta de Calibração obtida com 5 padrões de concentrações de IL-6 preparadas em soro para NIP, pela técnica EIS..... | 82 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Alguns biossensores eletroquímicos reportados na literatura (63). | 19 |
| Tabela 3.1 – Transdutores eletroquímicos associados ao tipo de medição e analito (101). | 35 |
| Tabela 4.1 - Lista de reagentes utilizados e a sua origem. | 46 |
| Tabela 4.2 – Técnicas de Ativação Eletroquímica estudadas. | 49 |
| Tabela 4.3 – Técnicas de Remoção da IL-6. | 52 |
| Tabela 4.4 – Concentração da IL-6 nas soluções padrão. | 53 |
| Tabela 5.1 – Valores médios da diferença de potencial entre os picos e R_{ct} em cada etapa da ativação eletroquímica. | 58 |
| Tabela 5.2 – Valores médios dos I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} em cada etapa da imobilização dos NTC/PAH/NPpT, para as diferentes temperaturas de incubação. | 60 |
| Tabela 5.3 – Valores médios das I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} em cada etapa da colocação dos NTC/PAH/NPpT, para C-SPEs ativados electroquimicamente por CA. | 65 |
| Tabela 5.4 – Valores médios dos I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} para os diferentes ensaios de eletropolimerização com β -CD e tampão fosfato (pH 7,4). | 67 |
| Tabela 5.5 – Valores da R_{ct} para os ensaios de eletropolimerização com β -CD+Pi e tampão fosfato de pH 6, no estudo da C_p | 70 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| A β 42 | Beta-amiloide-42 |
| ACh | Acetilcolina |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| Ac | Anticorpos |
| ASV | <i>Anodic Stripping Voltammetry</i> |
| BHE | Barreira Hemato-encefálica |
| β -C | β -Ciclodextrina |
| C-SPEs | <i>Carbon Screen-printed Electrodes</i> |
| C _p | Concentração de Pirrol |
| CV | <i>Cyclic Voltammetry</i> |
| DA | Doença de Alzheimer |
| DPV | <i>Differential Pulse Voltammetry</i> |
| ECL | <i>Electrochemiluminescence</i> |
| EIS | <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| ENFET | <i>Enzyme Field Effect Transistor</i> |
| EQM | Eléttodos Quimicamente Modificados |
| ERGO | <i>Electrochemically Reduced Graphene Oxide</i> |
| Fac | Fragmentos de Ligação de Antígeno |
| Fc | Fragmento Cristalino |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| Ig | Imunoglobina |
| IL-1 β | Interleucina-1 β |
| IL-6 | Interleucina-6 |

| | |
|---------------|---|
| ISE | <i>Ion-Selective Electrode</i> |
| ISFET | <i>Ion Sensitive Field Effect Transistor</i> |
| ITO | Óxido de Índio e Estanho |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |
| LD | Limite de Detecção |
| MIP | <i>Molecularly-Imprinted Polymer</i> |
| NPt | Nanopartículas de Platina |
| NTC/PAH/NPpT | Nanotubos de Carbono modificados com PAH e NPpT |
| NIP | <i>Non-Imprinted Polymer</i> |
| OCDE | Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PEI | <i>Photo Electrochemical Immunoassay</i> |
| I_{po} | Picos de Oxidação |
| I_{pr} | Picos de Redução |
| PAH | <i>Poly (allylamine hydrochloride)</i> |
| PET | <i>Positron Emission Tomography</i> |
| Pi | Pirrol |
| PI | Ponto Isoelétrico |
| p-Tau | Proteína Tau Fosforilada |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SPEs | <i>Screen-printed Electrodes</i> |
| SWV | <i>Square Wave Voltammetry</i> |
| R_{ct} | <i>Transferência de Carga</i> |
| TNF- α | Necrose Tumoral α |
| t-Tau | Proteína Tau |

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Introdução

A evolução tecnológica tem criado grande impacto em diversas indústrias e serviços nas últimas décadas. A inovação tendencial e pesquisa de soluções rápidas e eficazes promovem o desenvolvimento de recursos fundamentais para uma qualidade de vida cada vez mais satisfatória. Na medicina o caminho não é diferente, sendo esta uma das áreas mais beneficiadas com o progresso tecnológico. A constante reinvenção da instrumentação médica exalta a qualificação nas ações de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças.

O persistente envelhecimento da população mundial tornou-se uma preocupação para a sociedade. Em Portugal, a esperança média de vida em 2018, alcançou os 80,9 anos, contra 67,1 da década de 70 (1). O envelhecimento da população em Portugal é preocupante dado que, para além de constituir um problema económico, também representa uma crescente procura por melhores cuidados de saúde. O índice de envelhecimento em Portugal no ano de 2019 foi de 161,3% (2). O decréscimo da porção de jovens e alargamento do número de idosos instiga um declive paralelo oposto dos níveis de fertilidade e mortalidade.

O processo de envelhecimento conduz ao declive fisiológico normal e aumenta a prevalência de determinadas doenças, como é o caso das doenças neurodegenerativas. O envelhecimento é contínuo, heterogéneo, universal e irreversível (3). As doenças neurodegenerativas são responsáveis pelo défice dos domínios cognitivos, sendo incuráveis e debilitantes. Provocam degeneração progressiva dos neurónios e podem causar a morte dos mesmos. Originam problemas ataxiais ou demência. A demência surge como a mais predominante apresentada pelos idosos, com a doença de Alzheimer (DA) a dominar aproximadamente 60/70% dos casos (4,5).

A DA instiga à deterioração global, progressiva e irreversível de diversas funções como a memória, atenção, concentração, linguagem, pensamento, entre outras. O dano irreparável desta doença resulta em alterações comportamentais, com mudanças de personalidade por vezes bruscas e dificuldade na execução de tarefas que anteriormente à doença faziam parte da rotina do doente (6). Com a perda de funções primárias e consequente dependência de terceiros a qualidade de vida torna-se diminuta e conturbada.

O diagnóstico precoce auxilia no atraso do desenvolvimento e progressão da DA, sendo desta forma importante a concretização de soluções que permitam determinar se

alguma pessoa tem ou não propensão a desenvolver a doença. Atualmente só através de uma análise *post mortem* ao cérebro se consegue alcançar um diagnóstico com 100% de exatidão, sendo inviável este exame a uma pessoa viva (7). Para uma avaliação do doente, os médicos utilizam vários tipos de exames, assim como análise dos sintomas.

Como solução para um diagnóstico precoce com máxima exatidão, são diversos os estudos em torno do reconhecimento de biomarcadores de doenças neurodegenerativas nos fluidos biológicos. As monitorizações destes biomarcadores elevam o diagnóstico para um patamar mais eficaz e podem vir a auxiliar na prevenção e futuro tratamento de doenças como a DA. Um dos objetivos dos projetos relacionados com esta área é que a deteção dos biomarcadores seja possível no sangue periférico, de forma a evitar procedimentos invasivos. Atualmente, os biomarcadores da DA são monitorizados pelos métodos ELISA (do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou ensaio de imunoabsorção enzimática, teste imunoenzimático que permite a deteção de proteínas ou anticorpos. Este tipo de monitorização é morosa, cara e restritiva a uso laboratorial, exigindo muito tempo de fabrico para um resultado mais fidedigno (7). Os diferentes métodos da técnica de ELISA estão descritos na figura 1.1.

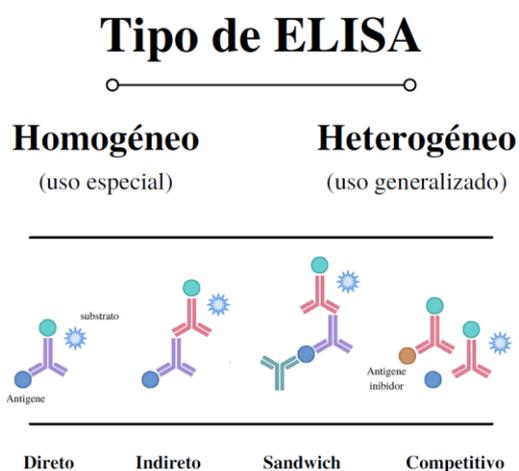


Figura 1.1 – Os diferentes métodos da técnica de ELISA (8).

O teste imunoenzimático ELISA tem sido utilizado expansivamente no diagnóstico de diversas patologias devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (9). Esta técnica assenta numa placa projetada para a deteção e

quantificação de peptídeos, proteínas, anticorpos e hormonas, sendo por isso muito útil como elemento de (bio)reconhecimento (10).

Neste método um antígeno é imobilizado numa superfície sólida e complexado com um anticorpo que está ligado a uma enzima. A deteção é realizada através da avaliação da atividade da enzima conjugada após a incubação com um substrato para a produção de um produto mensurável. A interação específica anticorpo-antígeno é o elemento mais importante na estratégia de deteção (10). Podem ser utilizadas para a técnica de ELISA diversas enzimas como a β -galactosidase, glucose oxidase, peroxidase e a fosfatase alcalina (11).

Embora os mecanismos inflamatórios sejam participativos no processo de reparação tecidual, também estão inseridos no processo de degeneração secundária em doenças neurodegenerativas (12). A geração e secreção de mediadores pró-inflamatórios podem interagir nos diferentes níveis da neurodegeneração. Desta forma, o objetivo desta dissertação passa pelo desenvolvimento e otimização de um biossensor eletroquímico com base em polímeros de impressão molecular (do inglês: *Molecularly-Imprinted Polymer*, MIP) para a deteção de um biomarcador associado aos processos neurodegenerativos, a Interleucina-6 (IL-6).

O capítulo 2 foca exclusivamente a abordagem à parte clínica do tema da dissertação, com uma interpretação da Demência. Há uma pequena referência ao que são as neuropatologias degenerativas, sendo depois aprofundada a DA, com predominância no diagnóstico, biomarcadores e métodos de monitorização da IL-6. O capítulo 3 centra-se nos Biossensores, com uma descrição dos seus componentes e dos diversos elementos de (bio)reconhecimento e transdutores disponíveis.

CAPÍTULO 2 - DEMÊNCIA

2. Demência

O envelhecimento da população mundial nas últimas décadas tornou-se num problema para a sociedade atual. O aumento da esperança média de vida, associado ao crescente aumento da qualidade de vida, gerou mais longevidade (13,14). A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que em 2050, a população idosa vai igualar o número de jovens (15). O envelhecimento envolve o aparecimento de doenças crónicas, maioritariamente de origem cardiovascular, e muitíssimo incapacitantes. Para além disso, o aparecimento de doenças neurodegenerativas torna-se mais predominante em idade avançada (14).

As doenças neurodegenerativas são patologias debilitantes, atualmente sem cura, que podem afetar pessoas de qualquer idade. Este tipo de problema circunda défices graduais em diversos domínios do cérebro. Advêm da degeneração progressiva dos neurónios, levando a défice do movimento do corpo (ataxia) e a problemas do funcionamento do cérebro (demência) (16). A demência envolve o declínio cognitivo e alterações neuropsiquiátricas, originando perda de destreza na realização das tarefas diárias.

O ser humano quando nasce possui aproximadamente 100 000 milhões de neurónios. Com o envelhecimento, estas células morrem e o corpo apenas tem a capacidade de substituir um número exíguo de neurónios. Este é um processo natural, que decorre durante a vida humana, sendo os neurónios destruídos de forma gradual e irreversível, conduzindo à perda de funções motoras, cognitivas e fisiológicas (4,5).

Quando o processo de destruição neuronal ocorre de forma mais acentuada do que o normal, surgem as doenças neurodegenerativas, pois não há capacidade de substituir as células perdidas. Para além disso, a compartimento onde os neurónios morrem ditam qual o problema neurológico que afeta o sujeito. Desta forma, é possível determinar em que zona do sistema nervoso está a ocorrer a degradação anormal dos neurónios. Em seguida estão alguns exemplos das doenças neurodegenerativas e a respetiva área degenerada (4):

- Doença de Alzheimer – córtex cerebral
- Doença de Parkinson – substância negra
- Esclerose Lateral Amiotrófica – medula espinal
- Polineuropatia Amiloidótica Familiar – sistema nervoso periférico

A grande maioria das doenças neurodegenerativas não têm cura, principalmente quando relacionadas com o envelhecimento. Os tratamentos existentes estreitam-se na farmacologia sintomática para retardar a doença e reabilitação. Nesta dissertação é abordada a DA.

2.1. Doença de Alzheimer

A DA foi descrita pela neuropatologista Alois Alzheimer em 1907. Esta doença progressiva e irreversível afeta as funções intelectuais como a memória, orientação tempo-espacial, pensamento abstrato, aprendizado, raciocínio, linguagem, capacidade de cálculo simples, comunicação e julgamento, o que acaba por impedir o paciente com DA de realizar as atividades quotidianas (17,18).

É a doença neurodegenerativa mais comum no mundo, com maior intensidade nas camadas mais idosas da sociedade (19). A OMS estima que existam 47,5 milhões de pessoas com demência, em todo o mundo. Os valores tendem a subir, sendo que a estimativa para 2030 é de 75,6 milhões e em 2050 é de 135,5 milhões. No relatório “Health at a Glance 2017” da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), Portugal destaca-se como o 4º país com maior prevalência de demência, com mais casos por mil habitantes (20). Desta forma é importante criar formas de prevenir e diagnosticar as doenças neurodegenerativas de uma forma rápida, precoce e exata para combater o alcance populacional que a mesma tem, assim como o declínio económico que acarreta.

A DA afeta grandes áreas do cérebro, o córtex cerebral e o hipocampo. As primeiras irregularidades encontram-se no tecido cerebral que envolve os lobos frontal e temporal, e depois lentamente avançam para outras áreas do neocórtex a velocidades que dependem do próprio paciente assim como do local onde se desenvolvem (21).

Os mecanismos responsáveis pela DA ainda não são totalmente conhecidos, porém existem diversos estudos patológicos que descrevem a presença de placas senis, gerado pela acumulação dos péptidos β -amilóide e de tranças neurofibrilares, que se caracteriza pela hiperfosforilação da proteína Tau (22). Mais de 95% dos doentes com DA desenvolvem a configuração esporádica da doença, que se determina pelo aparecimento tardio, após os 60 anos, e resulta do défice na remoção do péptido β -

amilóide do parênquima cerebral. Menos de 1% dos pacientes herdam mutações nos genes responsáveis pelo processamento do peptídeo β -amilóide, fazendo com que a DA surja precocemente, aproximadamente aos 45 anos. As formas da DA apresentam uma taxa de progressão e perfil de biomarcador semelhantes (21). Na figura 2.1 estão descritos os diferentes estágios da DA.

OS DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER

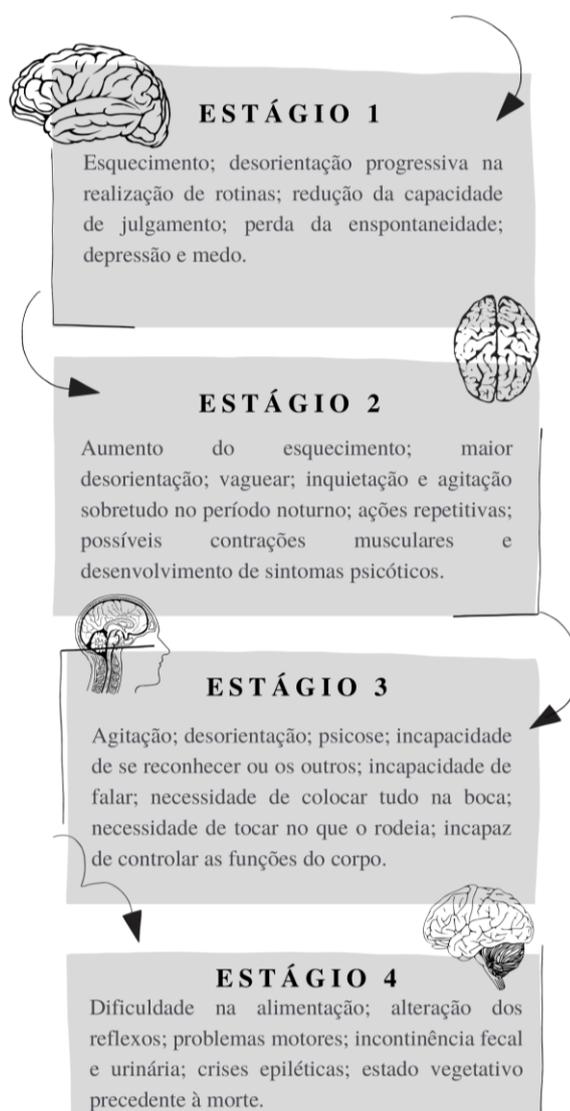


Figura 2.1 – Os diferentes estágios da DA (23).

O desenvolvimento desta neuropatologia distingue-se em três fases principais (19):

1. **Fase pré-clínica:** paciente assintomático, porém com formação de placas e tranças neurofibrilares. Neurónios menos eficientes. Aproximadamente 10 anos até haver evidência da doença.
2. **Fase Intermediária:** défice cognitivo leve, com o dano a atingir o hipocampo (memória) e diminuição da massa cerebral.
3. **Fase final da demência:** danos generalizados, tecido cerebral com diminuição significativa. Dificuldades nas atividades diárias. Morte do doente.

2.1.1. Diagnóstico

Não existe um exame único para o diagnóstico da DA. Num primeiro estágio de classificação é realizada uma exclusão de outras doenças com os mesmos sintomas, como infeções ou depressão de modo a compreender se realmente se está a lidar com demência. Após a despistagem, é feita uma avaliação por parte de um psicólogo ao raciocínio e memória. Os resultados são por fim complementados com técnicas de neuroimagem ou avaliação de biomarcadores presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) (19,24).

Segundo Forta *et al.*, existem três hipóteses de diagnóstico da DA (25):

1. **Doença de Alzheimer Provável:** doente apresenta agravamento cognitivo, défices cognitivos iniciais e mais proeminentes em camadas amnésticas e não amnésticas. Feita uma Tomografia por Emissão de Positrões (PET) ou uma ressonância magnética do crânio para exclusão de outras doenças. Declínio cognitivo progressivo, presença de mutações genéticas da DA e presença de biomarcadores patogénicos específicos.
2. **Doença de Alzheimer Possível:** doente com critérios clínicos para a DA e presença de outra doença que não seja considerada causadora de demência ou detalhes da história clínica, da inalação e evolução da doença, insuficientes.
3. **Doenças de Alzheimer Definitiva:** hipótese é definitiva quando todos os critérios clínicos e cognitivos são completados. Para além disso, são encontradas placas de amilóide e tranças neurofibrilares no cérebro.

Os exames imagiológicos, como a ressonância magnética e a PET são muito vantajosos para o diagnóstico da DA, pois permitem observar a estrutura cerebral do doente. Num entanto, devido ao custo dos dispositivos necessários para a execução da técnica e complexa execução dos mesmos, tornam-se técnicas de difícil acesso à população em geral. Para além disso, são necessários profissionais qualificados para o manuseamento das máquinas e a execução dos exames imagiológicos são na sua maioria incómodos e demorados (19). Uma alternativa para o diagnóstico da DA passa pela deteção precoce de biomarcadores associados à doença.

2.1.2. Biomarcadores

Os biomarcadores caracterizam-se como sinais clínicos, com capacidade de definir o estado médico do paciente. Estes marcadores biológicos são mensurados de forma precisa (26). Um biomarcador é essencialmente qualquer tipo de substância, estrutura ou processo capaz de ser avaliado dentro ou fora do corpo, com capacidade de influenciar mudanças e credibilizar a prevalência de uma doença no corpo (27). No caso da punção lombar para análise dos biomarcadores no LCF o processo é invasivo, daí a importância da deteção e validação no sangue ou plasma e até mesmo urina.

2.1.2.1. Específicos

Existem três biomarcadores estabelecidos internacionalmente como os marcadores biológicos da DA: o beta-amiloide-42 ($A\beta_{42}$), a proteína Tau (t-Tau) e a proteína Tau fosforilada (p-Tau) (26).

A acumulação do péptido $A\beta_{42}$ é uma característica patológica da DA, motivada por falhas nos mecanismos fisiológicos de limpeza no cérebro. Sendo assim, os doentes portadores de DA apresentam uma fagocitose deficiente relativamente a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária. Pacientes com DA revelam menores níveis deste péptido no LCR, devido à deposição das moléculas nas placas amiloides ou limpeza deficiente da $A\beta_{42}$ do parênquima cerebral (28,29). O excesso de produção, deposição e agregação de $A\beta_{42}$ leva à oxidação, disfunção neuronal, excitotoxicidade e neuroinflamação, refletidos pela apoptose (29).

A t-Tau é a principal proteína associada ao microtúbulo de um neurónio maduro normal. Até o momento, a única função estabelecida da Tau, uma fosfoproteína, é a promoção da montagem da tubulina em microtúbulos e a estabilização de sua estrutura (27). A t-Tau aumenta gradualmente com a idade, em indivíduos saudáveis, passando de <300 pg/mL (picograma por mililitro) entre os 21 e os 50 anos, para <500 pg/mL após os 71 anos, sendo estes valores retirados do LCR. Em doentes com DA, os valores aumentam exponencialmente de >450 pg/mL para >600 pg/mL, em pacientes com idades entre os 51 e 70 anos (30).

A DA revela condições para que a t-Tau seja fosforilada em quase 39 locais diferentes, sendo a posição 181 um biomarcador definitivo na DA relativamente ao grupo de controlo. O aparecimento de p-Tau resulta em falhas das funções neuronais, representando a presença das tranças neurofibrilares (31).

Existem diversos biomarcadores no LCR, específicos desta patologia, como visto anteriormente. Para além de serem marcadores biológicos com elevada sensibilidade e especificidade, estes auxiliam na exclusão de indivíduos sem possível evolução da DA (19). Num entanto, a coleta de amostras de LCR é considerada uma técnica invasiva, limitando a sua aplicabilidade. A amostragem contínua, utilizada para a monitorização da eficiência do tratamento da doença ou o seu risco, é limitada e pode afetar os níveis dos biomarcadores (32,33).

Os biomarcadores sanguíneos para o diagnóstico da DA são uma solução para a recolha de amostras de modo menos invasivo. A recolha de sangue é um procedimento simples e de baixo custo. Desta forma, os custos associados à deteção da doença são reduzidos drasticamente. O número de sujeitos testados, diagnosticados e tratados é, consequentemente, superior, assim como a monitorização dos doentes. Para além disso, os biomarcadores sanguíneos são compatíveis com outras técnicas já utilizadas para tornar o diagnóstico mais preciso (19). Existem diversos estudos relativamente ao desenvolvimento de medição de biomarcadores no plasma (34,35).

2.1.2.2. Neurotransmissores

A disfunção sináptica é uma das consequências da DA, havendo uma implicação negativa na neurotransmissão. A perda progressiva da acetilcolina (ACh) no córtex e no hipocampo são visíveis em doentes com esta patologia, uma vez que esta é um dos

neurotransmissores mais importantes nos processos de memória. As alterações neuroquímicas afetam o sistema colinérgico da base do cérebro e o sistema glutamatérgico do hipocampo. Estas alterações são os primeiros indícios de DA. A diminuição da capacidade neuronal colinérgica ocorre no núcleo basal de *Meynert*, responsável pelo envio de ACh para o córtex e ao hipocampo. Este é ponto de partida ascendente do sistema colinérgico, que atinge 90% da inervação (36).

Os biomarcadores colinérgicos (através de imagiologia) permitem assim medir a atividade da acetilcolinesterase (AChE), a sua ligação aos recetores nicotínicos e muscarínicos e o transporte vesicular de ACh. Estes marcadores tendem a ser mais sensíveis a mudanças precoces no cérebro que o metabolismo da glucose (36). O processo generalizado de neurotransmissão química está descrito na figura 2.2.

Sacramento *et. al* descreve numa abordagem inovadora para a produção de um material biomimético semelhante a um anticorpo para a triagem potenciométrica da ACh, um neurotransmissor da DA (37). Moreira *et. al* apresenta a construção de um biossensor amperométrico autoalimentando para a deteção de ACh (38).

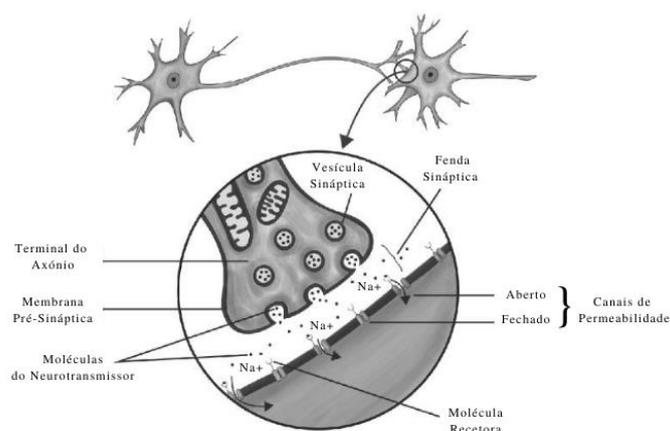


Figura 2.2 – Processo de neurotransmissão química (39).

2.1.2.3. Neuro-inflamação

Como visto até então, são diversos os processos que influenciam a DA, sendo uma das respostas do sistema imunitário o processo inflamatório, culminando em dano e destruição neuronal (40). Os integrantes inflamatórios desta patologia abrangem a

microglia, os astrócitos, o sistema do complemento e diversos mediadores inflamatórios, nos quais se compreendem as citocinas e quimiocinas (36).

A Barreira Hemato-Encefálica (BHE) é responsável pela proteção do Sistema Nervoso Central (SNC) contra as agressões tóxicas constantes causadas por variadas matérias em circulação. A BHE integra a interface entre o fluido extracelular cerebral do SNC e o conteúdo endovascular circulante, estando fisicamente reduzida ao espaço entre os terminais dos astrócitos e a superfície das células endoteliais. Esta barreira é formada por astrócitos e endotélios que contribuem, juntamente com a barreira hemato-LCR, para a manutenção da homeostase do SNC (41).

Porém, as células imunitárias periféricas conseguem atravessar a BHE e juntar-se aos neurónios e células gliais, formando enormes moléculas complexas de histocompatibilidade, perdurando reações imunológicas. Este processo tende a ser iniciado com o intuito de proteção do SNC de algum agente infeccioso, no entanto, o efeito pode se tornar tóxico e desencadear uma inflamação generalizada (7).

Neste contexto, as citocinas caracterizam-se como proteínas reguladoras da inflamação, responsáveis pela sinalização das células, assim como o seu desenvolvimento e subsistência (42). As quimiocinas são um subconjunto das citocinas que regularizam a migração celular para o local de infeção ou lesão. Fisiologicamente, as quimiocinas e citocinas operam como neuro moduladores que regulam a inflamação e o desenvolvimento. Existem diversas células no cérebro com capacidade de produção deste tipo de proteínas (citocinas e quimiocinas), tais como: as microglias, os astrócitos e as células endoteliais. As citocinas mais comuns produzidas em resposta a uma lesão cerebral são: IL-6, a qual é produzida durante a astrogliose, a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que pode induzir neurotoxicidade (7).

Nesta dissertação, o biomarcador selecionado é a IL-6. Esta citocina multifuncional tem um papel importante na defesa do hospedeiro, com elevados efeitos reguladores sobre a resposta inflamatória. Pertence à família das citocinas neuroproteicas e tem efeito neurotrófico direto e indireto nos neurónios. A IL-6 promove a astrogliose, ativa a microglia e estimula a produção de proteínas de fase aguda (43).

2.1.3. Métodos de monitorização da IL-6

Existem diversas evidências que sugerem que a resposta inflamatória pode estar envolvida na cascata neurodegenerativa da DA (43,44). Na medição dos valores do biomarcador IL-6, é preciso haver precisão e sensibilidade máxima, para que a conclusão seja precisa. No estudo de Wu *et al.* compararam-se os valores deste marcador no plasma entre doentes com DA e indivíduos saudáveis. O grupo de controlo apresentou um valor médio de 1,622 pg/mL enquanto portadores de DA compreenderam uma média 2,343 pg/mL (45). Existem diversos métodos para a deteção da IL-6, sendo os mais relevantes: métodos separativos, métodos óticos e métodos eletroquímicos.

2.1.3.1. Métodos Separativos

O método separativo mais comum utilizado na monitorização da IL-6 consiste na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (46–48). Este é um dos métodos mais poderosos de cromatografia, conseguindo facilmente separar misturas, tal como está descrito na figura 2.3. Os elementos a serem separados são repartidos entre a fase estacionária e a fase móvel e as separações dependem do movimento relativo entre as fases. A HPLC possui alta sensibilidade e é extensível a diferentes analitos (7,49). Na literatura têm sido desenvolvidos trabalhos com base na espectrometria de massa e eletroforese capilar para a monitorização da IL-6 (50,51).

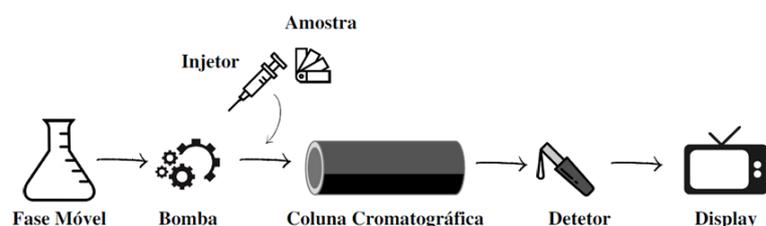


Figura 2.3 – Esquema geral da técnica de HPLC (52).

2.1.3.2. Métodos Óticos

Um método amplamente estudado e bem conhecido para a monitorização da IL-6 é o método ótico. Este método baseia-se nas propriedades de dispersão da luz nas

biomoléculas para estudar complexos antígeno-anticorpo (53). A utilização da fibra ótica como uma sonda ou um elemento no biossensor é um dos métodos utilizados, devido à capacidade de condução da luz e imunidade às interferências elétricas e magnéticas (7).

Kapoor e Wang reportaram a detecção altamente específica e sensível da IL-6 com um método baseado em fibras-ópticas, permitindo a detecção de concentrações na ordem de 0,12 ng/mL, com a presença de concentrações muito elevadas de proteínas não específicas (54). É de salientar que, como visto anteriormente, a IL-6 é um biomarcador relacionado com a inflamação. Dessa forma, são vários os estudos alusivos à monitorização da IL-6 que não se relacionam apenas com a DA, mas com outras patologias que têm ligação a processos inflamatórios, como por exemplo o Lúpus, entre outras (55). Apesar de não ser um biomarcador específico da patologia, a sua correta monitorização pode funcionar como uma nova ferramenta de auxílio no diagnóstico e tratamento.

2.1.3.3. Métodos Eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos são ferramentas de química analítica utilizados como complemento ou alternativa os métodos óticos e/ou de separação. É devido à sua elevada sensibilidade na determinação, custo moderado e portabilidade que existe uma preferência pela sua utilização (56). Para além disso, estes métodos dispõem rapidamente de informação de natureza quantitativa para porções vestigiais do analito, fornecem informação sobre a estequiometria e constantes de equilíbrio dos compostos em estudo e recorrem a processos de preparação de amostra simples e amigos do ambiente (57).

As técnicas eletroquímicas mais utilizadas no contexto da monitorização de biomoléculas são a voltametria cíclica (do inglês: *Cyclic Voltammetry*, CV), a voltametria de onda quadrada (do inglês: *Square Wave Voltammetry*, SWV) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS). Existe também a voltametria de redissolução anódica (do inglês: *Anodic Stripping Voltammetry*, ASV) e a voltametria de pulso diferencial (do inglês: *Differential Pulse Voltammetry*, DPV). Relativamente ao tipo de sensores eletroquímicos que podemos encontrar, existem os sensores Amperométricos (58,59), os Condutimétricos (60) e os Impedimétricos (61).

De forma a melhor entender a exatidão e linearidade de um biossensor, é avaliado o intervalo linear, que consiste na gama de trabalho em que o sinal analítico varia em

função da concentração do analito que se quer determinar linearmente (62). É importante que esta gama seja ampla de forma a se obter melhores resultados. Na tabela 2.1 estão descritos diversos biossensores eletroquímicos com respectivo método eletroquímico, elemento de (bio)reconhecimento, intervalo linear e tipo de amostra para a detecção da IL-6. Também aqui é apresentado o imunoenensaio foto-eletroquímico diferencial (do inglês: *Photo Electrochemical Immunoassay*, PEI) e a eletroquimioluminescência (do inglês: *Electrochemiluminescence*, ECL).

Tabela 2.1 – Alguns biossensores eletroquímicos reportados na literatura (63).

| Método Eletroquímico | Elemento de (bio)reconhecimento | Intervalo Linear (pg/mL) | Amostra | Ref. |
|-----------------------------|--|---------------------------------|----------------|-------------|
| <i>Amperométrico</i> | Anticorpo | 20-4000 | Soro | (58) |
| <i>Amperométrico</i> | Anticorpo | 4-800 | Soro | (59) |
| <i>ASV</i> | Anticorpo | 0,1-100 | Soro | (60) |
| <i>SWV</i> | Anticorpo | 0,01-0,1 | Soro | (64) |
| <i>SWV</i> | Anticorpo | 2-20 | Soro | (65) |
| <i>DPV</i> | Anticorpo | 0,5-100000 | Soro | (66) |
| <i>PEI</i> | Anticorpo | 1-100000 | Soro | (67) |
| <i>ECL</i> | Anticorpo | 0,1-1000 | Soro | (68) |
| <i>EIS</i> | Anticorpo | 0.03-22,5 | Soro | (69) |
| <i>EIS</i> | Aptassensor | 1-100000 | Soro | (70) |
| <i>Amperométrico</i> | Aptassensor | 0,021-2100 | Soro | (71) |
| <i>EIS</i> | Aptassensor | 5-100000 | Soro | (61) |
| <i>EIS/CV</i> | MIP | 0,02– 2000000 | Soro | (63) |

CAPÍTULO 3 - BIOSSENSORES

3. Biossensores

É cada vez mais perceptível a importância que os processos biológicos e bioquímicos têm em áreas como a biologia, biotecnologia e medicina. Porém, a conversão direta de dados biológicos em sinais elétricos é extremamente difícil, sendo esta uma barreira na interligação do processamento com as restantes áreas (72). Os biossensores são a solução para este problema, consistindo num dispositivo capaz de medir as reações biológicas através da geração de sinais proporcionais à concentração de um analito na solução (62).

Devido à evolução tecnológica, a utilidade destes dispositivos tem vindo a aumentar abundantemente, tendo aplicação em diversas áreas, como se pode verificar pela figura 3.1. Os biossensores são utilizados na monitorização de doenças, aplicações médicas, clínicas e de diagnóstico através de marcadores que indicam se existe alguma patologia nos fluidos de estudo como o sangue, a urina e o suor (62,72).

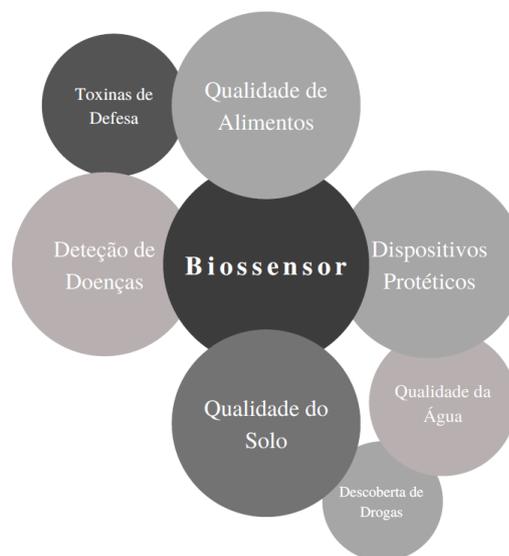


Figura 3.1 – As grandes áreas de aplicação dos biossensores (62).

3.1. Estrutura de um biossensor

Um biossensor é constituído por analito, elemento de (bio)reconhecimento, transdutor, sistema eletrónico e display. Na figura 3.2 está esquematizado o

funcionamento geral de um biossensor. Cada componente tem objetivos próprios definidos da seguinte forma (62):

- **Analito:** substância que se quer captar/detetar.
- **Elemento de (bio)reconhecimento:** molécula que identifica/reconhece o analito.
- **Transdutor:** elemento que realiza a conversão de um evento de (bio)reconhecimento num sinal mensurável. A este processo de conversão de energia dá-se o nome de sinalização. Geralmente, os transdutores produzem sinais óticos e elétricos que habitualmente são proporcionais à porção de interações entre o analito e o elemento de (bio)reconhecimento.
- **Sistema Eletrónico:** elemento que processa o sinal convertido e o prepara para o display. É um circuito eletrónico complexo que realiza o condicionamento do sinal.
- **Display:** sistema de interpretação do utilizador, sendo a combinação de hardware e software que gera resultados no biossensor. O sinal de saída do display pode ser numérico, gráfico, tabelar ou uma imagem, dependendo dos requerimentos do utilizador final.

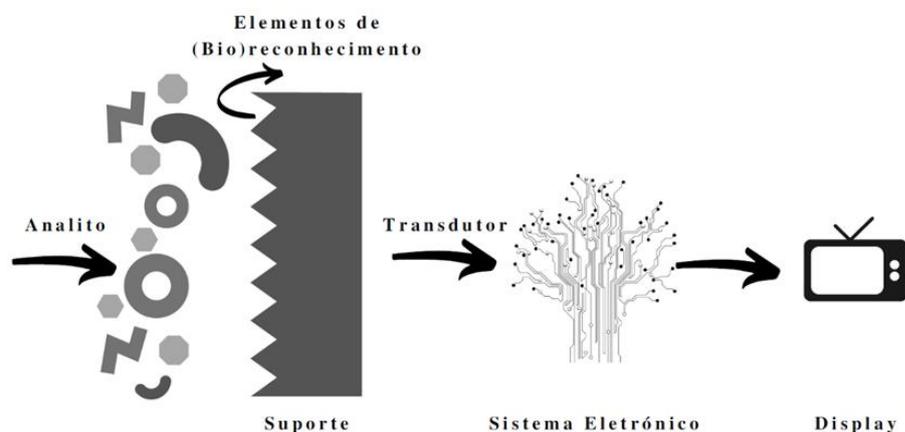


Figura 3.2 – Esquema representativo de um biossensor.

A categorização dos biossensores advém dos princípios básicos da transdução do sinal e dos elementos de (bio)reconhecimento. De acordo com os elementos de transdução, os biossensores podem ser classificados como sensores eletroquímicos,

óticos, piezoelétricos e térmicos. Dentro da designação de sensor eletroquímico existem os sensores potenciométricos, amperométricos e condutométricos (72).

Os biossensores contêm várias vantagens, sendo algumas (72):

- Capacidade de medição de molécula apolares que não respondem à maioria dos dispositivos de medição;
- São específicos devido ao seu sistema de (bio)reconhecimento;
- Permite leituras rápidas e forma contínua;
- Os biossensores enzimáticos permitem resposta num curto período de tempo, normalmente entre os 15 e os 30 minutos;
- Praticidade/simplicidade.

No entanto, também existem desvantagens sobre este tipo de sensores, como (69):

- Esterilização por calor não é possível devido à desnaturação do material biológico, no caso de o elemento de reconhecimento ser uma enzima ou um Ac, o mesmo não acontece em MIP;
- A estabilidade do material biológico depende das propriedades naturais da molécula que pode desnaturar sob as condições ambientais, o mesmo que no parâmetro anterior, esta desvantagem apenas se aplica para enzimas ou Ac como elemento de reconhecimento.

Os biossensores possuem determinados atributos estáticos e dinâmicos. A maximização destas propriedades é refletida no desempenho do biossensor. A seletividade é uma das características mais importantes do sensor biológico, uma vez que consiste na capacidade do elemento de (bio)reconhecimento detetar o analítico específico numa amostra que contém outros contaminantes (62).

A reprodutibilidade compreende a capacidade do biossensor de gerar respostas idênticas numa configuração experimental duplicada. É caracterizada pela precisão e exatidão do transdutor e dos elementos eletrónicos. A precisão deriva da capacidade do biossensor para fornecer resultados diferentes sempre que a amostra é medida e a exatidão indica a capacidade que o sensor tem de fornecer valores próximos do valor real quando a amostra é medida mais do que uma vez. Sinais reprodutíveis surtem maior confiabilidade e robustez na resposta do biossensor (62).

A estabilidade é o grau de suscetibilidade dos distúrbios ambientais dentro e fora do sistema. Os distúrbios podem causar derivações na saída dos sinais de um biossensor em medição, podendo causar erros na concentração mensurada, afetando a precisão e exatidão do biossensor. A estabilidade é a característica mais decisiva nas aplicações em que o biossensor requer longos passos de incubação ou monitorização contínua pois a resposta do transdutor ou dos elementos eletrónicos pode ser sensível à temperatura, influenciando assim a estabilidade do sensor. Desta forma, a afinação dos elementos eletrónicos deve ser apropriada para se assegurar a estabilidade na resposta dada pelo sensor. Outro factor que pode influenciar a estabilidade é a afinidade do elemento de (bio)reconhecimento, que é o grau no qual o analito faz ligação ao mesmo. Elementos de (bio)reconhecimento com elevada afinidade estimulam outras ligações eletroelásticas fortes ou ligações covalentes do analito que fortificam a estabilidade do biossensor. Para além disso, a degradação do elemento de (bio)reconhecimento naturais ao longo do tempo pode afetar a estabilidade. A quantidade mínima de analito que pode ser detetado pelo biossensor é definido como limite de deteção (LD). Na aplicação dos biossensores para monitorização médica e ambiental, é altamente recomendado que a deteção das concentrações de analito sejam feitas abaixo dos ng/mL ou mesmo fg/mL (62). No entanto, a resolução de um biossensor define-se como a mudança mais pequena na concentração de um analito que é necessária para se obter uma mudança na resposta do sensor.

Na análise do comportamento de um biossensor é usual definir-se a sua linearidade. A linearidade é especificada pela sensibilidade do biossensor e pela dependência linear entre a variável dependente e a variável independente (concentração do analito) que pode ser observada só por um certo intervalo linear, ou seja, o intervalo de concentrações de analito para as quais a resposta do biossensor muda linearmente com a concentração (62).

3.2.Elementos de (bio)reconhecimento

Como referido anteriormente, um biossensor é um dispositivo utilizado para a medição da concentração de analito numa determinada amostra, decomposto em 5 elementos, sendo um deles os elementos de (bio)reconhecimento.

O principal propósito do elemento de (bio)reconhecimento é fornecer especificidade analítica ao biossensor. A especificidade requer uma afinidade forte e seletiva entre o elemento de (bio)reconhecimento e a analito alvo. Existem diversos elementos de (bio)reconhecimento, tais como, anticorpos, enzimas, péptidos, aptâmeros, fagos e MIPs, como se pode verificar na figura 3.3, dando origem a estruturas distintas, que de formas díspares influenciam a performance das características do biossensor. Para além disso, é fundamental primeiro entender as características inerentes de cada elemento de (bio)reconhecimento antes de uma análise detalhada do desempenho do biossensor (73).

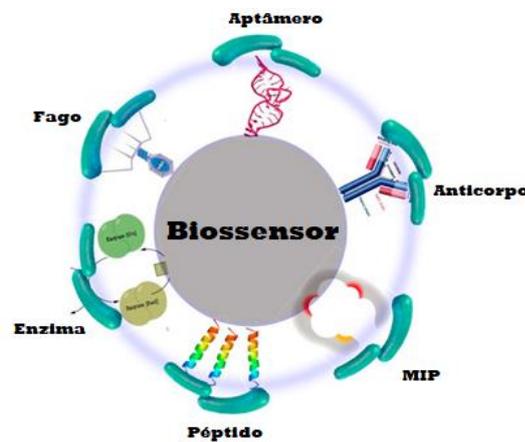


Figura 3.3 – Tipo de elementos de (bio)reconhecimento (53).

São inúmeros os elementos de (bio)reconhecimento existentes com variação de estruturas naturais e sintéticas, como demonstra figura 3.4, havendo vantagens e desvantagens em cada uma das entidades. Os elementos naturais, como enzimas e anticorpos (Ac), são estruturas biológicas com vantagem devido às interações fisiológicas naturalmente evoluídas para atingir a especificidade do analito. Os elementos sintéticos são estruturas de engenharia feitas artificialmente, desenvolvidas para imitar as interações fisiológicas dos elementos naturais. Os mais conhecidos são os aptâmeros e materiais biomiméticos. Os materiais biomiméticos têm características similares aos Ac naturais, mas de origem polimérica, produzidos em laboratório, conhecidos por polímeros de impressão molecular (MIP) (73).

ELEMENTOS DE (BIO)RECONHECIMENTO

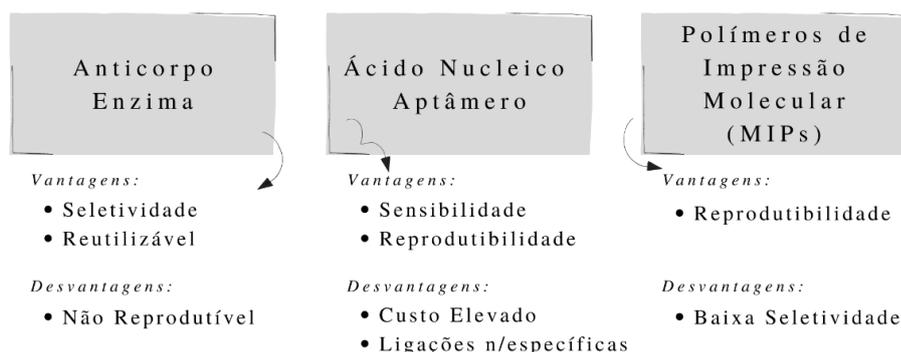


Figura 3.4 – Vantagens e desvantagens dos elementos de (bio)reconhecimento (73).

3.2.1. Anticorpos Naturais

Um Ac define-se como: “uma imunoglobulina (Ig) com capacidade de combinação específica com um antígeno que cause a sua produção num animal suscetível”. Os Ac produzem uma resposta à invasão de moléculas forasteiras no corpo. As Ig humanas têm função e estrutura semelhante às glicoproteínas, que conferem imunidade humoral (74).

Os Ac tendem a ter uma estrutura 3-D em forma de “Y”, composto por quatro cadeias de polipéptidos. Cada “Y” contém duas cópias idênticas de uma cadeia pesada e duas cópias idênticas de uma cadeia leve. As extremidades dos braços do “Y” são fragmentos de ligação de antígeno (Fab), responsáveis pela ligação do anticorpo com o antígeno específico. O pé do “Y” é o fragmento cristalino (Fc), responsável por se ligar aos recetores das células imunes e também serve como identificador, útil para manipular o Ac durante a maioria dos procedimentos imunoquímicos. Na figura 3.5 está representada a estrutura geral de um Ac (74).

Os Ac como elementos de (bio)reconhecimento nos biossensores são denominados imunossensores, podendo ser classificados como sensores de afinidade, no qual o sinal do biossensor depende do evento de ligação para formar um imunocomplexo anticorpo-antígeno. Este evento é normalmente monitorizado através de métodos de transdução colorimétricos, ou eletroquímicos ou piezoelétricos.(73).

Na literatura existem diversos trabalhos focados no desenvolvimento de imunossensores para a deteção da IL-6 (75,76), como descrito na tabela 2.1. Aydın *et al.*

desenvolveu um imunossensor ultrasensível com base num eletrodo de óxido de índio e estanho (ITO) descartável, revestido por negro de acetileno/polímero de polipirrol substituído com epóxi, com um LD de aproximadamente 3,2 fg/mL (77). Um outro trabalho propõe um imunossensor eletroquímico competitivo com a combinação da plataforma de óxido de grafeno reduzido electroquimicamente (do inglês: *electrochemically reduced graphene oxide*, ERGO) e nanopartículas de prata (AgNPs). Este sensor apresentou um LD de 0,059 pg/mL (78).

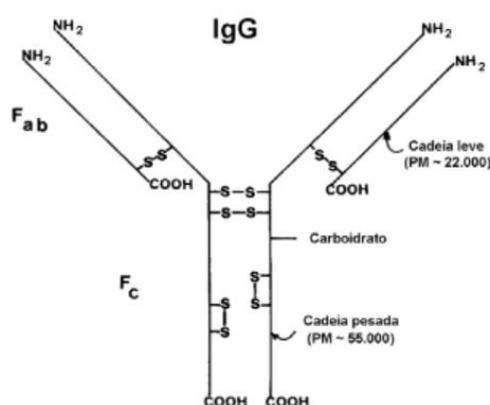


Figura 3.5 – Estrutura básica de um Ac (79).

3.2.2. Aptâmeros

Os aptâmeros são ácidos nucleicos de fita simples que se interligam de forma seletiva às moléculas alvo. A grande maioria dos aptâmeros são obtidos por uma técnica biológica combinatória denominada SELEX, representada na figura 3.6. Esta técnica está decomposta em quatro grandes etapas, a incubação, a seleção, a amplificação e por fim a clonagem e sequenciação (80). Os aptâmeros têm capacidade de isolamento para se interligarem a quase todas as moléculas, suportam estruturas secundárias previsíveis e podem ser prontamente modificados em posições arbitrárias (81).

Os biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de reconhecimento são intitulados de aptassensores (82). Têm várias vantagens pois possuem elevada especificidade e afinidade, podendo ser selecionados *in vitro* para qualquer alvo, desde moléculas pequenas até proteínas largas e até mesmo células, sendo assim possível desenvolver uma elevada variedade de aptassensores. Uma vez selecionado o aptâmero, é

possível sintetizá-lo com elevada reprodutibilidade e pureza. Para além disso são biossensores quimicamente mais estáveis. Os aptâmeros tendem a sofrer transformações conformacionais significativas após a junção ao alvo. Isso oferece grande flexibilidade no desenvolvimento de novos biossensores com alta sensibilidade e seletividade de deteção. Porém, têm sensibilidade ao pH (83).

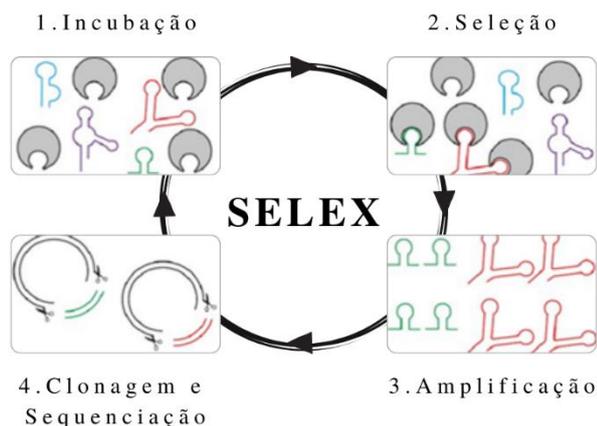


Figura 3.6 – A técnica de SELEX (80).

A utilização deste tipo de elemento de biorreconhecimento na monitorização da IL-6 é ainda muito recente. Um exemplo, advém do trabalho de Tertis *et. al*, onde foi desenvolvido um aptassensor com elevada sensibilidade e seletividade para a deteção quantitativa das IL-6 no sangue, através de um eléctrodo de carbono vítreo modificado com ácido p-aminobenzoico, p-aminotiofenol e nanopartículas de ouro. Este biossensor permitiu um LD de 1,6 pg/mL (61).

3.2.3. Polímeros de Impressão Molecular (MIP)

A técnica de Impressão Molecular é um método de fabrico de locais de ligação seletiva em polímeros sintéticos através de modelos moleculares (84). O MIP é preparado através da reação composta de uma molécula molde/alvo, um monómero funcional, um monómero de reticulação e um iniciador de polimerização num solvente. O processo de polimerização, descrito na figura 3.7 compreende a formação de um complexo entre o molde e o monómero funcional (85). De modo que o complexo formado seja estável, é importante que os monómeros funcionais apresentem grupos funcionais em posições

complementares para a interação com a molécula molde. Após esta interação, inicia-se a polimerização em cadeia, através da adição de um agente de reticulação e um iniciador, originando uma matriz polimérica rígida. Subsequentemente, através de um processo de clivagem química ou de um solvente, a molécula molde é removida da matriz polimérica (82). Após a remoção da molécula molde surgem cavidades estáveis com as funcionalidades, forma e dimensão iguais à mesma (63).

A utilização de MIP tem como maior vantagem o preço, a robustez sobre severas condições de temperatura e pH, a capacidade de reutilização e a estabilidade (63). As estratégias para a síntese de MIP para proteínas são variadas, tais como se encontra na literatura. Os métodos incluem a polimerização radicalar (86), polimerização radicalar via transferência de átomo (87), fotopolimerização (88) e eletropolimerização (89). Em particular, a eletropolimerização permite um grande controlo da espessura do filme e da porosidade, o que apresenta benefícios em relação às outras técnicas, pois estes podem ser ajustados através da alteração dos parâmetros eletroquímicos. Além disso, é uma abordagem simples, rápida e barata (63).

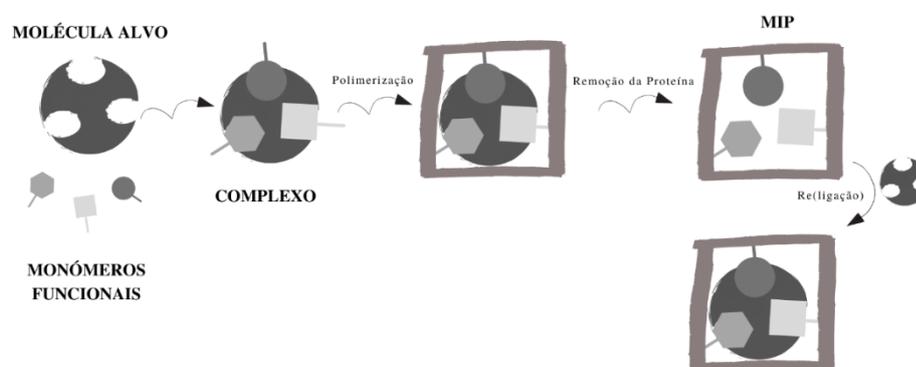


Figura 3.7 – Processo de formação de um MIP (7).

3.2.3.1. Síntese de um MIP

A síntese de um MIP aborda diferentes protocolos sintéticos, podendo ser considerada a impressão total da proteína ou de apenas uma parte dela (7). Os métodos que apresentam maior eficácia para o desenvolvimento destes materiais em contexto de impressão molecular de proteínas são a polimerização em *Bulk* e a polimerização em superfície (82,90).

A impressão molecular de (bio)macromoléculas, como proteínas, tem recebido especial interesse por parte da comunidade científica nos últimos anos devido às suas propriedades biológicas. A ligação seletiva de proteínas tornou-se uma constante nas práticas laboratoriais atuais, havendo a dependência de Ac para se alcançar o aprisionamento das proteínas específicas. Porém, os sistemas são caros e apenas para uso único devido à natureza frágil e instável do elemento de (bio)reconhecimento da proteína envolvida. Dessa forma, é imperativo alcançar alternativas mais sustentáveis e robustas para que se proporcionem níveis de seletividade e especificidade semelhantes aos das moléculas biológicas (91).

Apesar das vantagens adjacentes a este tipo de técnica, ainda existem algumas limitações a solucionar na impressão molecular de proteínas. O tamanho molecular é das primeiras limitações encontradas. Os blocos de polímeros são relativamente densos, dificultando a movimentação do molde macromolecular no local de ligação formado. Consequentemente, as propriedades de reconhecimento podem tornar-se inadequadas (91).

As condições de polimerização também podem ser um desafio quando aplicadas a processos tradicionais de impressão em proteínas, pois podem levar à desnaturação das mesmas ou mesmo a conformações ou agregações que não são suscetíveis para impressão. Esta flexibilidade pode afetar a seletividade (91). Por essa razão, a polimerização é efetuada preferencialmente em condições fisiológicas, pH e temperatura de modo a não ocorrer desnaturação de proteínas.

A escolha do solvente também carece de otimização, uma vez que a maioria das impressões moleculares sucede com solventes orgânicos apolares com o propósito de maximizar as interações electrostáticas. Porém, como as proteínas retratam baixa estabilidade e solubilidade em solventes apolares, o seu uso é limitado (82,91). Neste contexto, privilegia-se a síntese do MIP com monómeros naturais e biocompatíveis, pH fisiológico e temperatura ambiente.

A polimerização em *Bulk* é um dos métodos mais utilizados na síntese de MIP (92). Consiste na adição consecutiva do analito, do monómero, do solvente, do agente reticulante e no final do iniciador. Os monómeros funcionais interagem com o analito, havendo uma posição e composição dos grupos funcionais vantajosa para a sua confluência com a molécula molde. A polimerização em *Bulk* pode ser iniciada por estímulo elétrico ou de temperatura de forma a rentabilizar a reação através da formação

de radicais livres. Uma das vantagens deste método consiste na obtenção de grande quantidade de material sensor. Para além disso é uma técnica simples e de baixo custo, permitindo a produção de matrizes poliméricas estáveis em grande escala (7,82).

No entanto, também a polimerização em *Bulk* apresenta desvantagens. Existe a destruição de alguns locais de ligação durante o processo de moagem, reduzindo o material obtido. Para além disso o tamanho das partículas produzidas é de difícil controlo, havendo muitas vezes a ocorrência de tamanhos e formas irregulares. Na utilização de proteínas, a escolha do solvente é limitada devido à possibilidade de desnaturação das mesmas com solventes orgânicos (93).

A polimerização em superfície caracteriza-se pela formação de locais de ligação na superfície do polímero. Uma das maiores vantagens desta técnica passa pela fácil difusão de macromoléculas na rede polimérica, não havendo preocupações relativamente ao tamanho do molde. Também a eficiência que apresenta na (re)ocupação dos locais de ligação do analito é uma mais-valia, havendo assim uma preferência pela utilização da polimerização em superfície quando se utiliza proteínas de grandes dimensões (94).

3.3. Transdutores

O transdutor é outro elemento constituinte do biossensor, responsável pela conversão de um evento de (bio)reconhecimento num sinal mensurável. Normalmente os transdutores produzem sinais óticos e elétricos proporcionais à porção de interações entre o analito e o elemento de (bio)reconhecimento (62). Os transdutores abordados nesta dissertação são os: óticos, piezoelétricos e eletroquímicos.

3.3.1. Óticos

Os transdutores óticos, também denominados de transdutores fotoelétricos, fazem a conversão de sinais luminosos em sinais elétricos. Dependendo do tipo de aplicação para o qual se utiliza o transdutor, pode variar o sinal luminoso, desde o infravermelho (IV) até ao ultravioleta (UV). Pode ser classificado como foto-emissivo, fotocondutivo e fotovoltaico. O transdutor foto-emissivo gera uma irradiação de eletrões sempre que as suas superfícies são iluminadas, no transdutor fotocondutivo ocorre a redução na

resistência sempre que o material é iluminado e o transdutor fotovoltaico produz uma diferença de potencial entre dois elétrodos sempre que estes são iluminados (95).

Este tipo de transdutor constitui os biossensores óticos, representados na figura 3.8 A detecção ótica é realizada através da interação do campo ótico com o elemento de (bio)reconhecimento. Esta detecção pode ser dividida em dois modos gerais: *label-free* e *label-based*. No modo *label-free* o sinal detetado é gerado diretamente através da interação do material analisado com o transdutor. O modo *label-based* é gerado por um método colorimétrico, fluorescente ou luminescente (96).

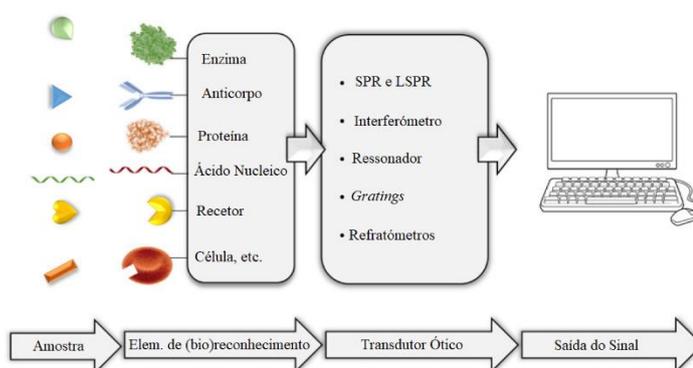


Figura 3.8 – Sensores óticos (96).

Existem vários biossensores óticos para a monitorização da IL-6 (53,97). Um dos trabalhos desenvolvidos para a deteção desta proteína descreve um biossensor de fibra ótica, com um LD de 0,12 ng/ml na presença de uma elevada concentração de proteínas não específicas. Foi utilizado o modo *label-based* através da técnica de fluorescência (54).

3.3.2. Piezoelétricos

Piezoelasticidade consiste na capacidade que determinados materiais têm para executar a conversão de energia cinética em energia elétrica, e vice-versa. Contudo, é de salientar que estas duas formas de operação se baseiam em efeitos semelhantes, mas distintos: o efeito piezoelétrico e o efeito piezoelétrico inverso, respetivamente. Desta forma, através da deformação mecânica de um material com características piezoelétricas é possível obter uma diferença de potencial elétrico proporcional à ação mecânica observada (98). Assim, a piezoelasticidade pode ser aplicada na construção de

biossensores, permitindo registar de forma simples as interações sem a necessidade de utilizar qualquer reagente específico (99). Os biossensores piezoelétricos dividem-se em dois modos: a microbalança de cristal de quartzo (QCM) e o dispositivo de onda acústica de superfície (SAW). Este tipo de biossensores baseia-se na medição das mudanças na frequência da ressonância de um cristal piezoelétrico devido a mudanças de massa na estrutura cristalina (100). É de referir que não existe na literatura nenhum biossensor com uma transdução piezoelétrica para a monitorização da IL-6.

3.3.3. Eletroquímicos

Um biossensor eletroquímico consiste num biossensor com um transdutor eletroquímico (101). Na secção 2.1.3 foram referidos os conceitos gerais associados à técnica eletroquímica. Sucintamente, os métodos eletroquímicos têm por base a geração e/ou consumo de uma espécie eletroativa aquando de uma interação química, no qual o transdutor tem como função a medição do sinal eletroquímico resultante da interação (82). A elevada sensibilidade, custo moderado e portabilidade são importantes vantagens dos biossensores eletroquímicos, dando assim preferência à utilização deste método (56).

Tabela 3.1 – Transdutores eletroquímicos associados ao tipo de medição e analito (101).

| Tipo de Medição | Transdutor Eletroquímico | Analito |
|---|--|---|
| 1. Potenciométrico | EIS | K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , F^- |
| | elétrodo de vidro | H^+ , Na^+ , ... |
| | elétrodo de gás | CO_2 , NH_3 |
| | elétrodo de metal | espécie <i>redox</i> |
| 2. Amperométrico | elétrodo de metal ou carbono | O_2 , açúcar, álcool, ... |
| | EQM | açúcar, álcool, ... |
| 3. Condutométrico, Impedimétrico | Eléttodos interdigitados, eléttodos de metal | Ureia, espécie carregada, oligonucleótidos, ... |
| 4. Ião carregado | ISFET e ENFET | H^+ , K^+ , ... |

Os transdutores utilizados nos biossensores estão diretamente relacionados com o tipo de medição como a potenciométrica, impedimétrica e condutométrica. Dentro dos transdutores eletroquímicos está o eletrodo seletivo de iões (do inglês: *Ion-Selective Electrode*, ISE), o eletrodo de vidro, eletrodos quimicamente modificados (EQM), o *Ion Sensitive Field Effect Transistor* (ISFET) e o *Enzyme Field Effect Transistor* (ENFET) (101).

3.3.3.1. Sensores Voltamétricos

a) Voltametria Cíclica (CV)

A CV é provavelmente a técnica eletroquímica mais versátil para o estudo de espécies eletroativas, na figura 3.9 está descrito o voltagrama cíclico adquirido por esta técnica. A sua versatilidade, combinada com o fácil manuseamento trazem vantagens para a utilização desta técnica no campo da eletroquímica, química orgânica, química inorgânica e bioquímica. A eficácia da CV advém da sua capacidade de observação rápida do comportamento *redox* numa ampla faixa de potencial, verificação da reversibilidade dos sistemas, na deteção da frequência de ocorrências químicas relacionadas à transferência de carga e na verificação da ocorrência de absorção dos produtos no eletrodo (102,103).

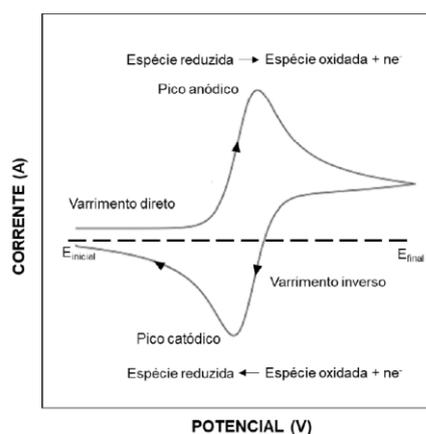


Figura 3.9 - Voltamograma cíclico adquirido por CV (82).

b) Voltametria de onda quadrada (SWV)

A SWV permite a análise através da curva de corrente-potencial, como se pode verificar na figura 3.10. A mensuração da corrente elétrica é realizada após os impulsos positivos e negativos, sendo o sinal obtido como uma intensidade de corrente resultante de forma diferencial, com alta rejeição a correntes capacitivas e distinta sensibilidade. As curvas de corrente-potencial exibem uma forma bem definido e normalmente são simétricas. A altura dos picos gerados é proporcional à concentração da espécie eletroativa (7).

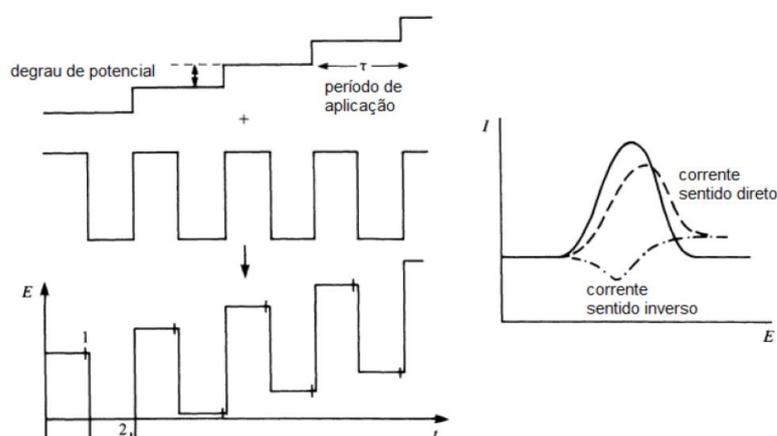


Figura 3.10 - Representação da voltametria de onda quadrada (82).

3.3.3.2. Sensores Potenciométricos

As medições dos biossensores potenciométricos envolvem a determinação da diferença de potencial entre um indicador e o eléctrodo de referência, ou entre dois eléctrodos separados por uma membrana semipermeável, quando não há corrente significativa entre eles. O transdutor pode ser um ISE. Uma característica importante deste, consiste na grande dependência que a sua resposta tem da capacidade tampão da amostra e sua força iônica (101).

3.3.3.3. Sensores Impedimétricos

A técnica EIS fornece uma perspetiva detalhada das diferentes constantes dos processos eletroquímicos e características elétricas da interface eléctrodo/solução. É um

método de caracterização elétrica, onde se aplica uma pequena perturbação ao elétrodo, e se obtém os fatores importantes para o estudo do comportamento geral de um sistema com um número elevado de processos intercorrelacionados com velocidades dispersas. A perturbação baseia-se num sinal alternado, sendo aplicado um potencial e medida a corrente resultante. A técnica EIS mede a impedância de um sistema numa determinada faixa de frequências e, portanto, a resposta em frequência do sistema eletroquímico, estando esta relacionada com a resistência elétrica. Este método tem como vantagem o facto de a perturbação ser próxima do equilíbrio, coisa que não acontece com os antecessores, que são perturbados longe do equilíbrio (7,104).

A resistência elétrica é um conceito bastante conhecido, correspondendo à capacidade de um elemento de circuito resistir ao fluxo de corrente elétrica. A lei de Ohm (Equação 3.1) define a resistência (R) em termos de razão entre a tensão ou força eletromotriz (*fem*-E) e a corrente (I), como segue:

$$R = \frac{E}{I} \quad e \quad \bar{Z} = \frac{\bar{v}}{\bar{i}} = Z' + jZ'' = R + jX$$

Esta equação é aplicada unicamente a uma resistência ideal, cujo valor é independente da frequência, pois está relacionada com a tensão e corrente quando ambos os sinais estão em fase.

A impedância é a medida da capacidade que um circuito tem para resistir ao fluxo de corrente elétrica, porém não se limita com as condições descritas da resistência ideal (R). A impedância é uma grandeza complexa, cuja parte imaginária é a reatância (X), responsável pela capacidade do armazenamento de energia pela amostra. Esta componente da impedância, podendo ser indutiva ou capacitiva, é dependente da frequência, condicionando assim a resposta em frequência da amostra em estudo. A abordagem impedimétrica consiste na aplicação de um pequeno sinal de excitação sinusoidal ao sistema eletroquímico e medir a resposta subsequente do sistema em regime permanente, fazendo um varrimento em frequência.

Na técnica EIS, o sinal pode ser analisado através da soma de funções sinusoidais. A figura 3.11 mostra um gráfico típico que ilustra a relação entre dois sinais sinusoidais relacionados, com a mesma frequência angular (ω).

O gráfico de *Nyquist* obtém-se através da representação da parte real no eixo X – a resistência R, e a parte imaginária no eixo Y– a reatância X, como na figura 3.12. Neste gráfico, o eixo Y é negativo e cada ponto representa a impedância na frequência angular específica (ω).

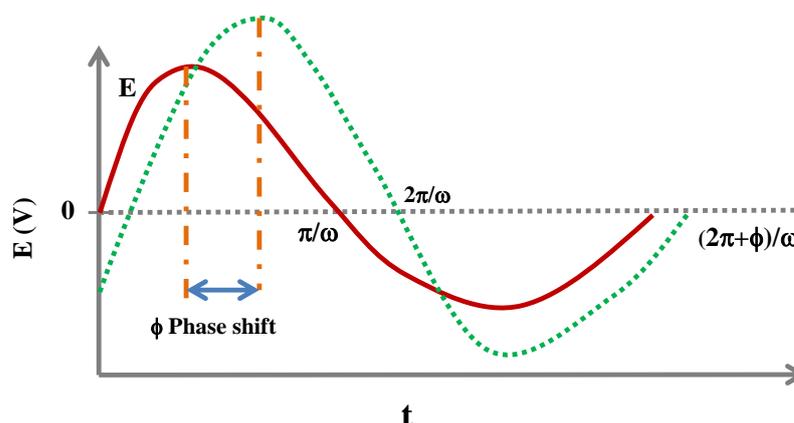


Figura 3.11 - Resposta de corrente sinusoidal num sistema linear após a aplicação de uma AC.

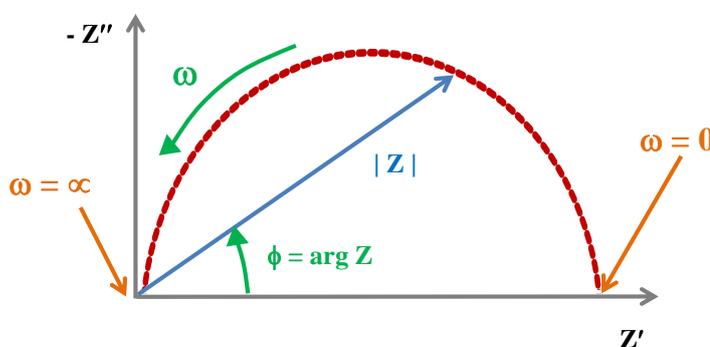


Figura 3.12 - Gráfico de *Nyquist* com os componentes reais (Z') e imaginários (Z'') da impedância em cada ω .

O gráfico de *Nyquist* fornece uma visão geral rápida dos dados EIS, permitindo fazer algumas interpretações qualitativas. O semicírculo apresentado na figura 3.12 é característico de um circuito elétrico simples com uma única constante de tempo, embora os gráficos de impedância eletroquímica frequentemente contenham vários semicírculos. De uma forma geral, um espectro de impedância inclui uma componente semicircular a

altas frequências e uma componente linear a baixas frequências, que correspondem à resistência de transferência de carga e à difusão, respectivamente.

3.4. Plataformas dos Sensores

O design de um sensor eletroquímico é um importante fator para o alcance dos objetivos a que são propostos, tais como a eficácia, sensibilidade, seletividade, fiabilidade, baixo custo, fácil fabrico e manuseamento (7). Uma célula eletroquímica convencional é composta por três elétrodos, o de trabalho, o auxiliar e o de referência, tomando como exemplo os *screen-printed electrodes* (SPEs), ilustrado na figura 3.13. O elétrodo de trabalho é onde ocorre a reação num sistema eletroquímico. Existem diversos tipos de elétrodos de trabalho como elétrodos de carbono vítreo, elétrodo de ouro, etc. O aparecimento da tecnologia SPEs tem proporcionado novas oportunidades na aplicação das técnicas eletroquímicas para a análise fora de um laboratório específico. São feitos em substratos de vidro, plástico ou cerâmica onde são impressos os três elétrodos (72).

As vantagens dos SPE são inúmeras relativamente aos elétrodos convencionais. Para além de possibilitarem produção em larga escala, a preço baixo, têm um tamanho muito reduzido que auxilia no seu transporte e são sensores descartáveis, diminuindo a hipótese de contaminação e prevenindo a sensibilidade. É também importante referir a que para além da sua manipulação fácil são também sensores confiáveis (7,72).



Figura 3.13 – Constituição de um SPE (105).

3.5. Análise Qualitativa dos Materiais

As técnicas espectroscópicas têm uma função muito importante na análise qualitativa dos materiais que antes apenas poderiam ser estudados de forma teórica. Devido à versatilidade, rapidez e caráter não destrutivo, podem ser destacadas três técnicas espectroscópicas: a espectroscopia de infravermelho, a espectroscopia de *Raman* e a espectroscopia de fotoluminescência (106).

3.5.1. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho refere-se ao estudo da interação da radiação infravermelha com a matéria, sendo representada num gráfico da intensidade da radiação absorvida pela matéria em função do comprimento de onda da radiação. É através do espectrómetro de infravermelho que se consegue obter a resposta espectral (107).

Esta técnica conjuga diversas vantagens (107):

- Técnica universal;
- A informação obtida é diversificada;
- Rápida e de execução simples;
- Alta sensibilidade;
- Instrumentos com preços acessíveis.

Porém também tem algumas desvantagens (107):

- Falha a caracterização de misturas complexas;
- Dificuldade na análise de soluções aquosas;
- Não deteta substâncias monoatómicas;
- Não deteta moléculas diatómicas homonucleares.

3.5.2. Espectroscopia de Fotoluminescência

A foto-excitação é um efeito produzido quando a luz incide sobre um meio, onde é absorvida, gerando um excesso de energia no material. Este fenómeno produz transições nos eletrões do material para estados excitados com energias superiores às do estado de equilíbrio. A passagem dos eletrões ao estado de equilíbrio resulta na expulsão do excesso

de energia do material, que pode incluir a emissão de luz ou não, sendo isto um processo radiativo (transições ressonantes) ou um processo não radiativo, respectivamente (106).

3.5.3. Espectroscopia de *Raman*

Este método analítico fornece informações específicas e detalhadas a nível molecular do material em estudo. Esta técnica permite que a identificação dos materiais seja rápida e oferece informações mais detalhadas comparativamente com outros métodos espectroscópicos. São fornecidas informações sobre a estrutura e o arranjo espacial das moléculas, para além disso é possível analisar a estrutura. É também importante referir que cada substância apresenta características únicas no espectro de *Raman*. O espectro de *Raman* apresenta diversos picos que indicam a intensidade e a posição do comprimento de onda da luz dispersa. Cada pico corresponde a uma vibração específica de uma ligação molecular (82).

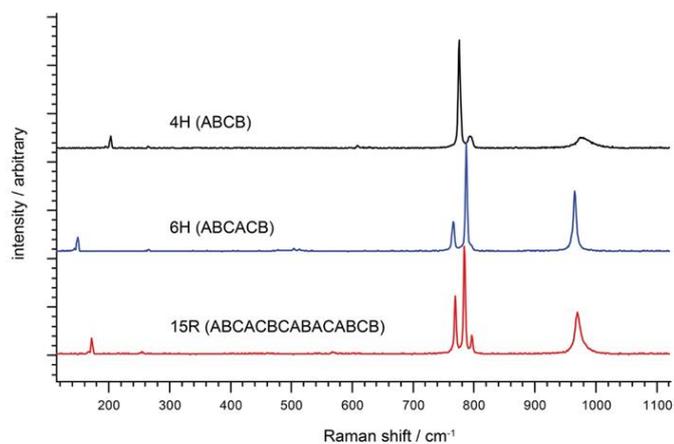


Figura 3.14 – Exemplo de espectroscopia de *Raman* em três materiais distintos (108)

CAPÍTULO 4 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4. Procedimento Experimental

No presente capítulo está encontra-se descrito, de forma pormenorizada, todos os equipamentos, materiais, reagentes e procedimentos experimentais envolvidos na construção do biossensor eletroquímico sensível à proteína IL-6, assim como a avaliação do comportamento analítico dos dispositivos obtidos.

4.1. Material e Equipamento

O principal equipamento utilizado no estudo e preparação do biossensor foi um potencióstato/galvanostato da Metrohm Autolab, mais especificamente o modelo PGSTAT204, um instrumento modular e compacto, ilustrado na figura 4.1. Controlou-se este equipamento através do software NOVA 2.1.4. A conexão com o elétrodo de carbono impresso (do inglês: *Carbon Screen-printed Electrodes*, C-SPEs) foi realizada através de uma caixa PCON da BioTid, que permitiu a interface com o Autolab.



Figura 4.1 – Potencióstato/galvanostato PGSTAT204 (109)

No decorrer da preparação e deposição das várias camadas dos nanotubos de carbono (NTC) modificados com um polímero aminado (do inglês: *Poly (allylamine hydrochloride*, PAH) e nanopartículas de platina (NPpt), recorreu-se à Mufla L5/11 da Nabertherm. O medidor de pH utilizado durante o projeto foi o modelo GLP 21 da CRISON e o ultrassom da SELECTA foi manuseado para a homogeneização de várias soluções. Todas as pesagens foram efetuadas com uma balança Mettler Toledo, modelo MS105DU com precisão de $\pm 0,0001\text{g}$.

Os C-SPE utilizados no projeto foram adquiridos à Metrohm Dropsens e têm as seguintes características:

- Substrato em cerâmica
- Dimensões: 30x10x0,5 mm
- Contactos Elétricos: eletrodo de trabalho de carbono com 4 mm de diâmetros; eletrodo auxiliar de carbono e eletrodo de referência de prata.

As medições de volumes com máximo de 5 mL foram feitas através das pipetas automáticas VWR de volume regulável (2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL e de 1000-5000 µL). As soluções foram preparadas com o auxílio de balões volumétricos classe A, com capacidades de 50 mL e 100 mL.

Todos os reagentes utilizados estão descritos na tabela 4.1, assim como a sua origem comercial. Todos os reagentes foram utilizados conforme a disponibilidade do mercado, com qualidade analítica e sem purificação adicional.

Tabela 4.1 - Lista de reagentes utilizados e a sua origem.

| Reagente | Origem |
|---|-----------------|
| <i>Ácido Cítrico (C₆H₈O₇)</i> | Sigma Aldrich |
| <i>Ácido Oxálico di-hidratado (C₂H₂O₄·2H₂O)</i> | Merck |
| <i>Ácido Sulfúrico (H₂SO₄)</i> | Sigma Aldrich |
| <i>β-Ciclodextrina</i> | Sigma Aldrich |
| <i>Cloreto de Potássio (KCl)</i> | Normapur |
| <i>Dimetilformamida (C₃H₇NO)</i> | Carlo Erba |
| <i>Dimetilsulfóxido (C₂H₆OS)</i> | Sigma Aldrich |
| <i>Fosfato Dissódico di-hidratado (Na₂HPO₄·2H₂O)</i> | Carlo Erba |
| <i>Fosfato Dipotássico (K₂HPO₄)</i> | Fisher Chemical |
| <i>Fosfato Monopotássico (KH₂PO₄)</i> | Panreac |
| <i>Hexacianoferrato (II) de potássio (K₄[Fe(CN)₆])</i> | Riedel-de-Haën |
| <i>Hexacianoferrato (III) de potássio (K₃[Fe(CN)₆])</i> | Riedel-de-Haën |
| <i>Hidróxido de Sódio (NaOH)</i> | EKA |
| <i>Pirrol (C₄H₅N)</i> | Alfa Aesar |
| <i>Proteína IL-6 Recombinante</i> | Sigma Aldrich |
| <i>Proteinase K</i> | Sigma Aldrich |

4.1.1. Soluções

Na generalidade, as soluções foram preparadas usando água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q. Para o processo de medição eletroquímica recorreu-se a uma solução padrão *redox*, constituída por hexacianoferrato (II) de potássio e hexacianoferrato (III) de potássio, com uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ M, cada um, preparada numa solução tampão. O tampão variou no decorrer do estudo, iniciando-se com tampão fosfato a 0,1 M, de pH igual a 7,4. De seguida passou a utilizar-se tampão fosfato 0,1 M, de pH igual a 6. A solução de tampão fosfato foi preparada em água ultrapura, constituído por fosfato dipotássico e fosfato monopotássico. O último tampão utilizado foi o tampão fosfato-citrato, a 0,15 M de pH 5,3. Este tampão foi preparado em água ultrapura, constituído por fosfato dissódico di-hidratado e ácido cítrico.

As soluções de ácido sulfúrico e cloreto de potássio foram preparadas em água ultrapura, com concentração de 0,5 M e 0,1 M, respetivamente. A solução de ácido oxálico di-hidratado foi preparada em água desionizada, numa concentração de 0,5 M. As soluções de β -ciclodextrina (β -C) ($1,0 \times 10^{-3}$ M) e pirrol (Pi) ($2,5 \times 10^{-3}$ M) foram preparadas em tampão. A proteína IL-6 foi diluída em tampão, com concentração de $4,78 \times 10^{-9}$ M (0,1 μ g/mL). A proteinase K preparou-se em tampão.

Para se proceder à realização da curva de calibração foram utilizadas soluções padrão a partir da solução mãe de IL-6 com concentração de $4,78 \times 10^{-8}$ M (1 μ g/mL), diluída em tampão, procedendo-se à realização de 7 soluções padrão. Este procedimento está ilustrado na figura 4.2.

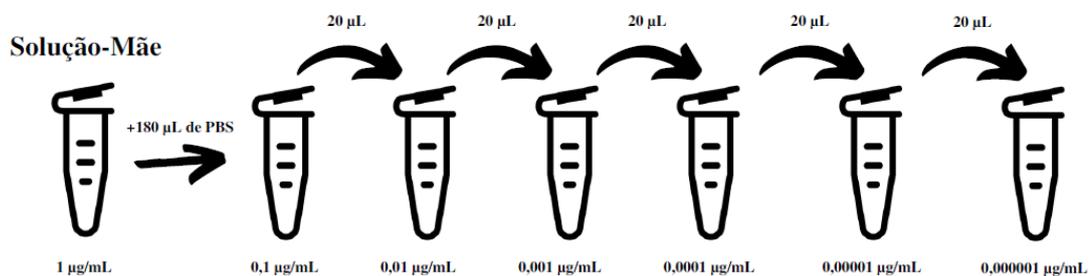


Figura 4.2 - Representação esquemática da preparação das soluções padrão usadas para a construção da curva de calibração.

4.2.Procedimentos Analíticos

Sendo um dos propósitos na concepção do biossensor a verificação da presença de impressão molecular da molécula molde, a proteína IL-6, sintetizou-se na superfície do eletrodo de trabalho um polímero sem impressão molecular (do inglês: *Non-Imprinted Polymers*, NIP) e em paralelo um polímero com a proteína molecularmente impressa, um MIP. Desta forma, a preparação e construção do biossensor consistiu em quatro etapas fundamentais: (i) ativação ou tratamento eletroquímico, (ii) imobilização/ deposição do nanomaterial (NTC/PAH/NPpt), (iii) eletropolimerização e (iv) remoção da proteína. Na figura 4.3 está esquematizada a construção do MIP deste trabalho.

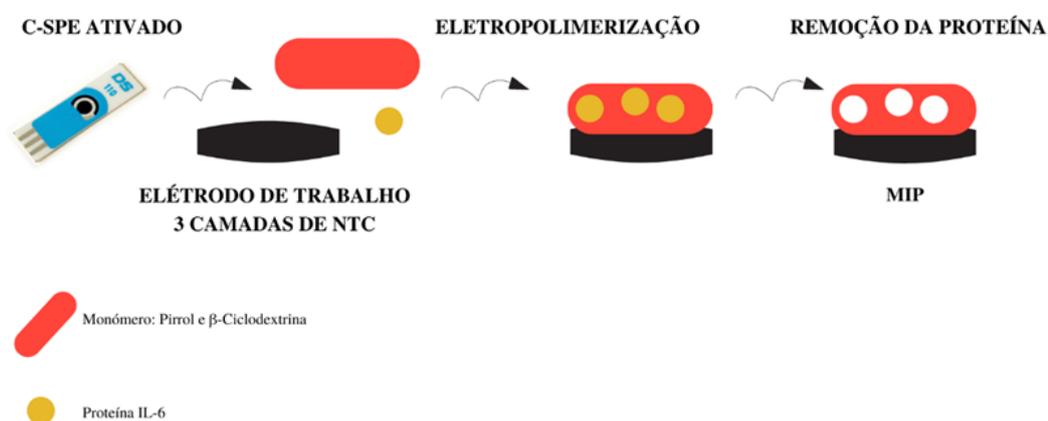


Figura 4.3 – Representação esquemática da construção do MIP.

Após cada etapa, as modificações efetuadas nos eletrodos foram avaliadas com a solução *redox* de ferro (80 μ L), através das técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV) e impedância (EIS). A leitura de CV ocorreu num intervalo de potencial de -0,5 V a +0,7 V, durante 6 ciclos, numa velocidade de varrimento de 0,05 V/s. Os registos de EIS foram obtidos para um OCP a 60 segundos, ao longo de uma gama de 0,1 a 100 kHz, para 10 valores de frequência e uma amplitude de 0,01 V. Após a síntese do polímero de impressão molecular pela técnica de eletropolimerização, as medições com a solução *redox* de ferro passaram a ser efetuadas apenas através da técnica EIS, devido à estabilidade do Pi.

4.2.1. Preparação do C-SPE

Os chips utilizados, adquiridos à Metrohm Dropsens, foram sujeitos a um pré-tratamento eletroquímico com o objetivo de remover possíveis contaminantes na superfície do eletrodo e fomentar o aparecimento de grupos funcionais através da oxidação (ativação eletroquímica). Após a ativação, procedeu-se à modificação do eletrodo de trabalho adicionando 5 μ L de NTC modificados com PAH e NPpT. O objetivo da imobilização deste nanomaterial superfície do eletrodo, consiste no aumento a área superficial do eletrodo de forma a aumentar o número de moléculas na superfície do eletrodo e adicionalmente, aumentar o sinal analítico através das NPpT.

Estudo da Ativação Eletroquímica

Durante este passo de ativação eletroquímica, foram testadas duas técnicas distintas, a Cronoamperometria (CA) e a CV, estando as condições de cada método descritas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Técnicas de Ativação Eletroquímica estudadas.

| Técnica | CA | CV |
|-------------------|---------------------|-------------------------------------|
| <i>Eletrólito</i> | KCl 0,1M | H ₂ SO ₄ 0,5M |
| <i>Condições</i> | 1,7 V durante 400 s | [-0,3;1,5] V, 10 ciclos, 0,5 V/s |

Estudo da imobilização do nanomaterial (NTC/PAH/NPpT)

Os eletrodos de trabalho foram modificados com 3 camadas do nanomaterial (NTC/PAH/NPpT), a diferentes temperaturas de incubação e diferentes ativações eletroquímicas. Cerca de 5 μ L de nanomaterial foi depositado na superfície do eletrodo e incubado durante 30 minutos numa Muffla, com a temperatura de 60°C ou 75°C. O nanomaterial (NTC/PAH/NPpT) foi desenvolvido pelo grupo Nanomateriales, TeamNanoTech, liderado por Miguel A. Correa-Duarte, diretor do CINBIO, da Universidade de Vigo.

4.2.2. Condições de trabalho do NIP

A eletropolimerização é o método responsável pela síntese de MIPs no decorrer deste trabalho. De forma a otimizar a resposta do biossensor, é necessário avaliar e testar algumas condições de polimerização, tais como, o pH, o eletrólito, a gama de potencial escolhida, o número de ciclos, a velocidade de varrimento e os grupos funcionais do monómero (82).

A seleção do monómero é essencial, uma vez que os seus grupos funcionais vão interagir com locais específicos da proteína, promovendo assim uma impressão molecular mais idônea. A β -CD é um oligossacarídeo cíclico composto por sete unidades de glicose que se apresenta em forma toroidal com cavidade hidrofóbica interna e uma concha hidrofílica externa. Como resultado, a estrutura deste monómero permite a incorporação de moléculas com o tamanho adequado para a cavidade, deslocando assim a água para formar complexos *host-guest* estáveis. Estes complexos formam-se transversalmente pelas interações das ligações não covalentes da β -CD e da IL-6 (110). De forma a transferir o processo de reconhecimento da β -CD para a superfície do sensor foi utilizado o Pi, através da conjugação β -CD+Pi, pois este consegue manter a estabilidade do açúcar no ar e na água (111).

Desta forma, sendo o processo de polimerização eleito o de *Bulk*, foram estudados vários parâmetros:

- Dissolução da β -Ciclodextrina;
- Velocidade de varrimento durante a eletropolimerização;
- Concentração do monómero pirrol;
- Número de ciclos durante a eletropolimerização.

Estudo da Dissolução da β -Ciclodextrina

Inicialmente, a otimização do protocolo para o presente estudo, tinha como objetivo a utilização da β -CD como o monómero para a polimerização, sem a adição de outros compostos. No entanto, devido à baixa solubilidade da β -CD em solventes não-orgânicos, optou-se pela introdução do monómero Pi.

Estudo da Velocidade de Varrimento

Uma das condições experimentais avaliadas neste estudo consistiu na velocidade de varrimento durante o passo de eletropolimerização, sendo que este parâmetro afeta o modo como o polímero "cresce" na superfície do eletrodo, podendo originar malhas poliméricas mais densas ou mais porosas. Para o estudo da velocidade de varrimento utilizou-se uma solução de β -CD+Pi a $1,0 \times 10^{-3}$ M, em pH 6. Colocou-se 80 μ L da mesma nos eletrodos e polimerizou-se em CV, numa gama de potencial de 0 V a +1,8 V, em 30 ciclos. Foram testadas duas velocidades de varrimento: 0,025 V/s e 0,1 V/s.

Estudo da Concentração de Pirrol

De seguida, foi averiguada a concentração do pirrol que melhor se adapta para a formação do polímero. A eletropolimerização foi realizada em CV, numa gama de potencial de 0 V a +1,8 V, em 30 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s. A β -CD manteve sempre uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M, num entanto o Pi foi analisado com uma concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M, $2,5 \times 10^{-3}$ M e $5,0 \times 10^{-3}$ M.

Estudo do Número de Ciclos de Eletropolimerização

Como a impressão da proteína foi realizada em solução (*Bulk*) para a eletropolimerização foi definida uma solução de β -CD, a $1,0 \times 10^{-3}$ M e Pi, a $2,5 \times 10^{-3}$ M. Desta solução, 80 μ L foram colocados nos eletrodos e polimerizados por CV, numa gama de potencial de 0 V a +1,8 V e velocidade de varrimento de 0,1 V/s. Finalmente, foi avaliado o impacto de diferentes ciclos de polimerização, onde se estudou 10, 20 e 30 ciclos, respetivamente.

4.2.3. Condições de trabalho do MIP

Semelhante à preparação do NIP, o MIP é desenvolvido pela técnica de eletropolimerização em *Bulk*, com a conjugação β -CD+Pi, com uma concentração de Pi de $2,5 \times 10^{-3}$ M e uma concentração de β -CD de $1,0 \times 10^{-3}$ M. No entanto, neste processo é necessário adicionar a proteína que se quer imprimir no C-SPE, a IL-6. A

eletropolimerização é feita em CV, num intervalo de potencial 0 V a 1,8 V, em 30 ciclos e uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s.

Estudo da Concentração de IL-6

A concentração de IL-6 durante a preparação do MIP é um dos fatores principais que irá afetar a resposta do biossensor, pois será responsável pela maior ou menor presença de pontos de (bio)reconhecimento. Em quantidades elevadas pode dificultar a polimerização dos monómeros, e em porções muito baixas pode não ser suficiente para produzir as cavidades necessárias para o evento de reconhecimento. Posto isto, foram estudadas duas concentrações no processo de polimerização, $4,78 \times 10^{-8}$ M (1,0 µg/mL) e $4,78 \times 10^{-9}$ M (0,1 µg/mL).

Estudo do pH do Tampão

De forma a otimizar o desempenho do biossensor, estudou-se a resposta do C-SPE modificado com os materiais NIP/MIP utilizando soluções de polimerização preparadas a diferentes pH. Foi utilizado tampão fosfato a pH 6 e tampão fosfato-citrato a pH 5.

Estudo do Processo de Remoção da IL-6

Após a polimerização, é necessário remover a proteína impressa para que as cavidades específicas para a IL-6 sejam criadas. Desta forma, foram utilizadas três técnicas de remoção, como se pode ver na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Técnicas de Remoção da IL-6.

| Técnica | Descrição |
|----------------|--|
| 1 | Incubação em proteinase k durante a noite, seguida de incubação por 1 hora em ácido oxálico e 1 hora em tampão fosfato-citrato (pH 5). |
| 2 | Incubação em proteinase k por 2 horas, seguida de 1 hora em ácido oxálico e 1 hora em tampão fosfato-citrato (pH 5). |
| 3 | Incubação e ácido oxálico por 3 horas, seguida de 1 hora em tampão fosfato-citrato (pH 5). |

4.2.1. Curva de Calibração

Posteriormente à síntese do MIP atestou-se a capacidade do mesmo para reconhecer a proteína IL-6 nas cavidades criadas, através de incubações sucessivas do analito. As curvas de calibração expressam a relação entre o sinal medido e a concentração do analito. Desta forma, este foi o método de cálculo utilizado para caracterizar, de forma adequada, a relação entre a concentração da proteína IL-6 e a resposta do biossensor desenvolvido no projeto. Para isso, recorreu-se ao uso de sete soluções padrão (figura 4.2), procurando abranger todas as gamas das concentrações esperadas. Na tabela 4.4 estão descritas as concentrações da proteína em cada uma das soluções padrão.

Tabela 4.4 – Concentração da IL-6 nas soluções padrão.

| Padrão | Concentração Ω |
|---------------|---------------------------------|
| 1 | 1,0 pg/mL |
| 2 | 10 pg/mL |
| 3 | 100 pg/mL |
| 4 | 1,0 ng/mL |
| 5 | 10 ng/mL |
| 6 | 100 ng/mL |
| 7 | 1,0 μ g/mL |

Inicialmente, foram efetuadas incubações sucessivas das soluções padrão da IL-6 preparadas em tampão fosfato-citrato (pH 5) colocando um volume de 5 μ L de solução padrão de IL-6 na área de trabalho durante 30 minutos. Em seguida, procedeu-se à lavagem com água ultrapura e posterior medição EIS, com a solução padrão *redox* de ferro,

Os ensaios foram repetidos com soluções padrão da IL-6 preparadas em soro humano (*Cormay Serum HN*), na mesma gama de concentração, diluído em tampão fosfato-citrato de pH 5, de forma a poder-se estudar o comportamento do biossensor numa matriz biológica. Assim, as curvas de calibração para a IL-6 foram obtidas através das

medições de EIS. Este soro é liofilizado de origem humana, desenvolvido para o controlo da qualidade do constituintes inorgânicos, orgânicos e enzimáticos (112).

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

O presente capítulo tem como objetivo a análise dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do biossensor eletroquímico para a detecção da IL-6. Os resultados estão organizados pela ordem de realização, começando pela preparação dos C-SPEs, passando pelo estudo das condições de síntese do NIP, seguindo para as condições de síntese do MIP e terminando com a avaliação do desempenho do biossensor para a detecção da proteína IL-6.

5.1. Preparação do C-SPE

A primeira etapa consistiu na ativação eletroquímica dos elétrodos, de forma a uniformizar a superfície de carbono, preparando-a para a colocação do nanomaterial (NTC/PAH/NPpt). Através da identificação dos picos de oxidação e redução das espécies de ferro, assim como das respectivas intensidades, obtidas com a técnica de CV, é possível efetuar um estudo comparativo das modificações efetuadas.

5.1.1. Ativação Eletroquímica

De modo a assegurar a reprodutibilidade no desenvolvimento dos sensores, foi importante avaliar diferentes abordagens relativamente à ativação eletroquímica do C-SPE. Para isso, utilizaram-se as técnicas de CA e CV, tendo sido realizados três ensaios para cada experiência. Na figura 5.1 estão ilustrados os resultados obtidos pelas medições, com a solução padrão *redox* de ferro, em cada passo da ativação, com a utilização da técnica de CV. Na figura 5.2 estão discriminados os resultados obtidos através da técnica de EIS.

Como regra geral, observa-se um comportamento *quasi*-reversível para o processo *redox*, obtido através da análise em CV, tanto no sensor não modificado, como no sensor ativado por ambas as técnicas, como se verifica na figura 5.1.

Por sua vez, os diagramas de *Nyquist* facultam o semicírculo característico na região de frequências mais elevadas, estando isto relacionado diretamente com a resistência à transferência de carga (R_{ct}) na interface do elétrodo com a solução. Ademais,

a porção linear do diagrama encontra-se nas frequências mais baixas, devido ao processo de difusão das espécies eletroativas na solução, como se confirma na figura 5.2.

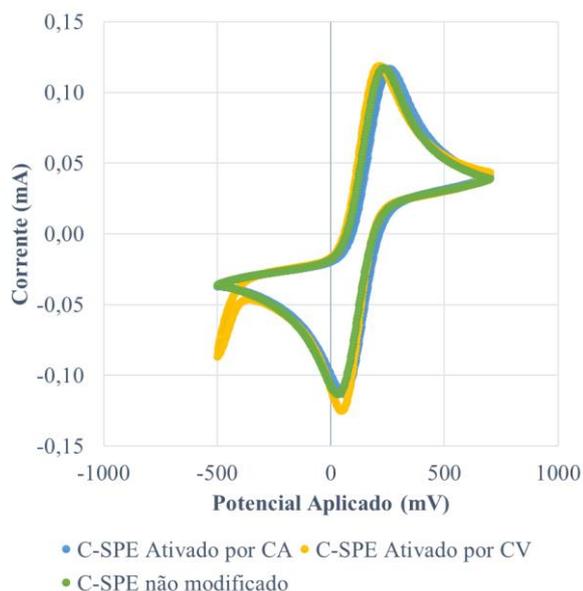


Figura 5.1 – Voltagramas obtidos a cada etapa durante a ativação eletroquímica do biossensor, medidos com a solução *redox* de ferro.

Na tabela 5.1 estão expressos os valores da diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução e os valores das resistências à R_{ct} .

Tabela 5.1 – Valores médios da diferença de potencial entre os picos e R_{ct} em cada etapa da ativação eletroquímica.

| C-SPE | Diferença de Potencial entre os Picos (mV) | R_{ct} Ω |
|-----------------------|---|----------------------|
| <i>Não Modificado</i> | 194 | 485 |
| <i>Ativado por CA</i> | 195 | 452 |
| <i>Ativado por CV</i> | 157 | 299 |

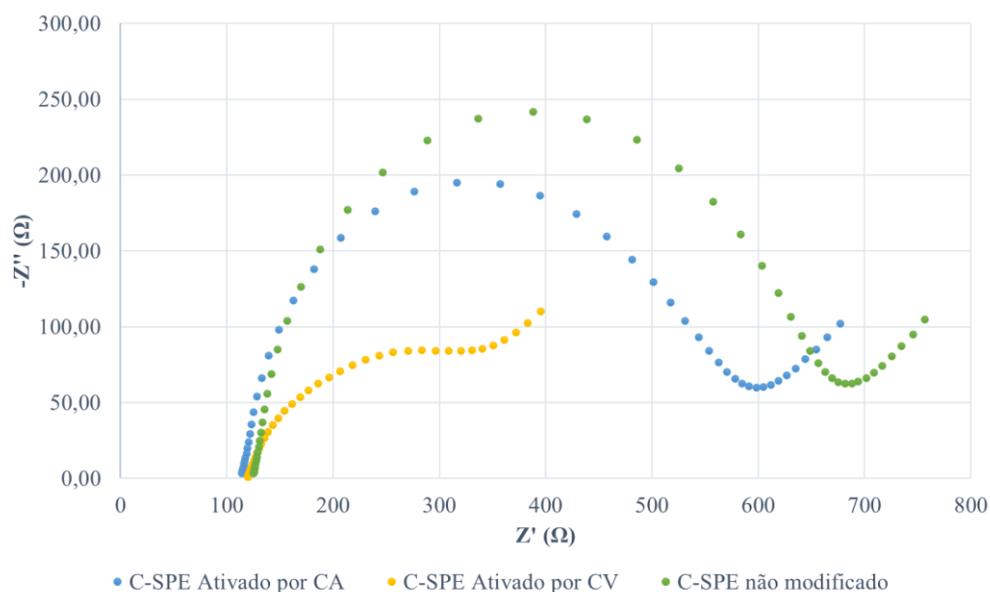


Figura 5.2 – Diagramas de *Nyquist* obtidos a cada etapa durante a ativação eletroquímica do biossensor, medidos com a solução *redox* de ferro.

Empiricamente, observou-se que, após a etapa de ativação eletroquímica por CA, o valor da diferença de potencial entre os picos não sofreu alterações significativas, com apenas um aumento de 0,5%, e o valor da R_{ct} desceu ligeiramente, numa percentagem de menos 7%. Isto dá-se devido à remoção e oxidação dos compostos orgânicos presentes e à introdução de iões na superfície do eléctrodo.

Relativamente aos da corrente nos picos de oxidação (I_{po}) e redução (I_{pr}), em todas as etapas mantiveram-se constantes, respetivamente -0,12 mA e +0,12 mA. Do ponto de vista da corrente produzida, o sistema comportou-se de forma *quasi*-reversível, uma vez que as correntes dos picos de oxidação e de redução apresentaram valores semelhantes.

Em contrapartida, após a ativação eletroquímica por CV, o valor da diferença de potencial entre os picos diminuiu 19%, e o valor da R_{ct} desceu 38%. No processo de escolha entre as duas ativações eletroquímicas, verificou-se que a ativação eletroquímica por CV apresenta uma variação na diferença de potencial entre os picos de 24% e resulta em valores de R_{ct} 51% mais baixos. Posto isto, a técnica de CV é a mais favorável para a ativação eletroquímica dos C-SPEs, pois indica uma melhoria significativa, após a sua utilização, no processo de transferência de eletrões entre a superfície do eléctrodo e o eletrólito.

5.1.2. Imobilização do nanomaterial (NTC/PAH/NPPt)

A otimização dos eletrodos passou pela colocação de camadas de NTC/PAH/NPPt, sendo importante avaliar a temperatura de incubação da solução no eletrodo de trabalho. Em paralelo, C-SPEs ativados com a técnica de CA foram também testados, de forma a confirmar a escolha efetuada no ponto 5.1.1.

Temperatura de Incubação

Realizou-se então o estudo da temperatura de incubação (60°C ou 75°C) dos chips ativados electroquimicamente por CV com ácido sulfúrico. Os resultados obtidos nas medições com a solução *redox* de ferro, após a imobilização de cada camada de NTC/PAH/NPPt, com a utilização da técnica de CV e EIS, estão apresentados na figura 5.3 e 5,4, respetivamente, onde se pode observar a incubação do nanomaterial a 75°C (a) a 60°C (b).

Tal como se observou, através da análise em CV, denota-se um comportamento *quasi-reversível* nos três processos de colocação do nanomaterial para ambas as temperaturas de incubação. No que diz respeito aos diagramas de *Nyquist*, os mesmo facultam novamente o semicírculo característico na região de frequências mais elevadas, e a porção linear do diagrama encontra-se nas frequências mais baixas. Na tabela 5.3 estão expressos os valores da I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução e da R_{ct} .

Tabela 5.2 – Valores médios dos I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} em cada etapa da imobilização dos NTC/PAH/NPPt, para as diferentes temperaturas de incubação.

| Temperatura | Camada | I_{po} (mA) | I_{pr} (mA) | Diferença de Potencial entre os Picos (mV) | ΔR_{ct} Ω |
|-------------|--------|------------------|------------------|---|-----------------------------|
| 75°C | 1 | -0,11 | 0,12 | 156 | 287 |
| | 2 | -0,11 | 0,13 | 146 | 280 |
| | 3 | -0,11 | 0,13 | 256 | 303 |
| 60°C | 1 | -0,12 | 0,14 | 136 | 286 |
| | 2 | -0,12 | 0,13 | 134 | 256 |
| | 3 | -0,12 | 0,13 | 133 | 240 |

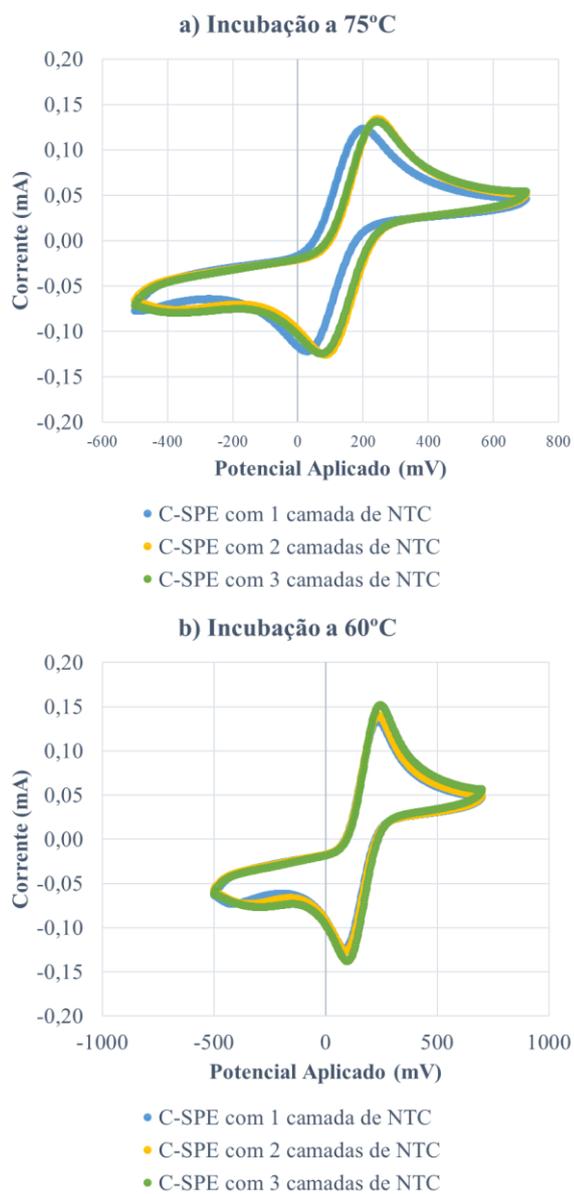


Figura 5.3 - Voltagramas obtidos após a colocação de cada camada de NTC/PAH/NPpt, medidos na solução *redox* de ferro, sendo **a)** a incubação feita a 75°C e **b)** a incubação a 60°C.

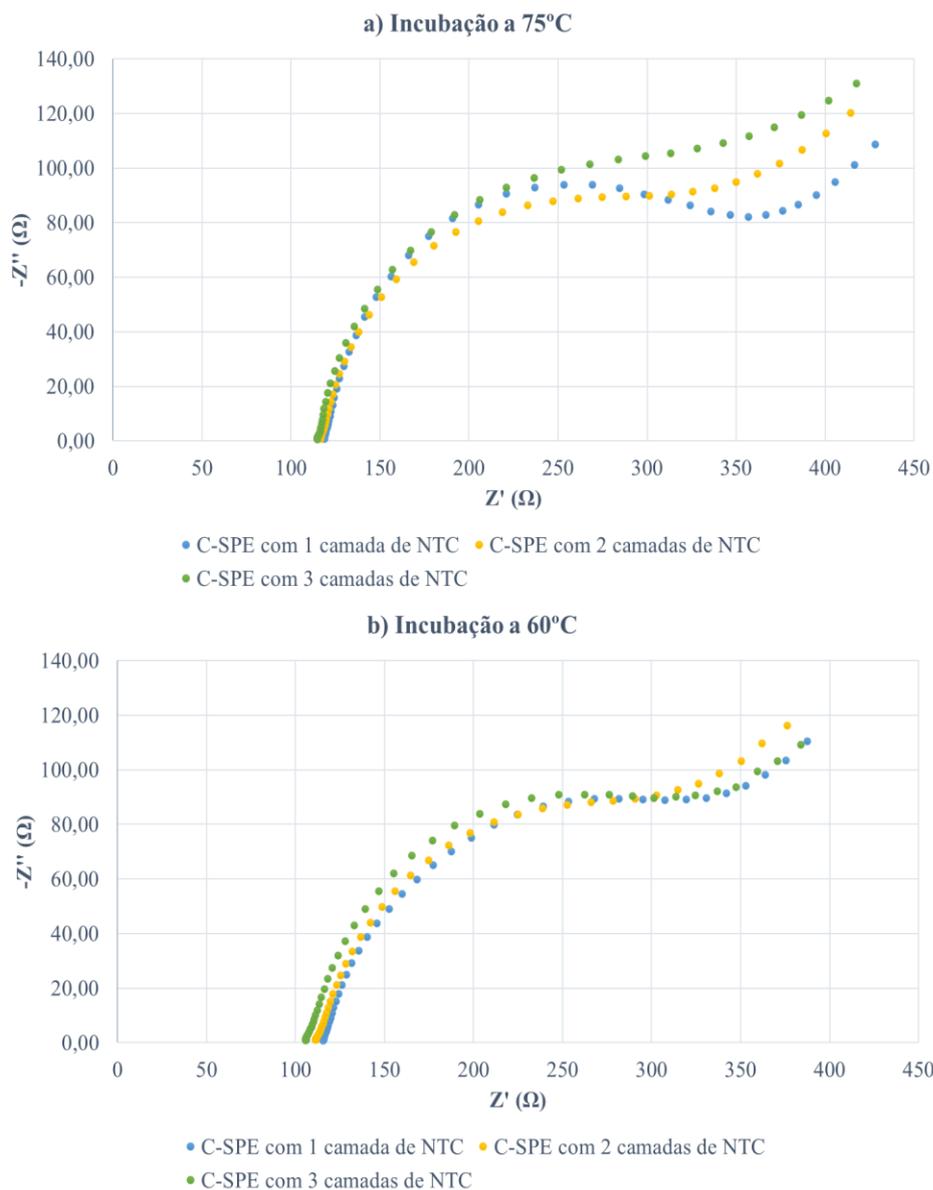


Figura 5.4 - Diagramas de *Nyquist* obtidos em cada colocação das camadas de NTC/PAH/NPpt, em meio da solução *redox* de ferro, sendo **a)** a incubação feita a 75°C e **b)** a incubação a 60°C.

Experimentalmente, observou-se que, ao longo da colocação das camadas de NTC/PAH/NPpt, o valor da I_{po} sofreu uma ligeira diminuição de 0,01 mA, à temperatura de incubação de 75°C, passando de -0,12 mA para -0,11 mA. Quando a temperatura de incubação foi de 60°C, este valor manteve-se constante. O valor médio da I_{pr} sofreu um aumento de 0,01 mA a partir da segunda camada de NTC, para a temperatura de 75°C, enquanto, para a temperatura de 60°C este valor subiu 0,02 mA, passando de 0,12 mA para 0,14 mA, descendo de seguida para 0,13 mA nas duas últimas camadas. No geral,

verificou-se que à medida que se iam depositando mais camadas de nanomaterial, as intensidades dos picos de oxidação e redução aumentavam.

À temperatura de incubação de 75°C, o valor da diferença de potencial entre os picos sofre uma diminuição de 11% após a colocação da primeira camada, descendo, posteriormente, 6% na colocação da segunda camada, mas sofrendo um aumento de 7% na terceira camada de NTC modificados. Em contrapartida, à temperatura de incubação de 60°C, o valor da diferença de potencial entre os picos tem uma diminuição mais notável, de 23%, acompanhada por uma segunda descida de 1% e mantendo-se estável na terceira camada. Para além de ter uma descida constante nos valores da diferença de potencial entre os picos, os C-SPEs incubados a 60°C, conseguem, em cada colocação de uma nova camada de NTC/PAH/NPpt, apresentar valores mais baixos, tendo uma diferença de menos 17% entre a primeira e a última camada de NTC/PAH/NPpt.

Relativamente à R_{ct} , os C-SPEs incubados a 60°C, conseguem para a 1ª, 2ª e 3ª camada de NTC/PAH/NPpt valores mais baixos 1%, 9% e 23%, respetivamente. Posto isto, a técnica de incubação a 60°C é mais vantajosa para a otimização dos C-SPEs, pois indica uma melhoria significativa após a colocação das três camadas de nanomaterial.

Ativação Eletroquímica

Após a avaliação da influência da temperatura de incubação do nanomaterial nos C-SPEs, foi realizado um estudo adicional à resposta que o elétrodo modificado com o NTC modificados teria utilizando uma ativação eletroquímica diferente, no caso da temperatura 60°C. Os resultados obtidos nas medições com a solução padrão *redox* de ferro, em cada imobilização dos NTC na superfície dos C-SPEs ativados por CA, com a utilização da técnica de CV, estão apresentados na figura 5.5. Na figura 5.6 estão ilustrados os resultados obtidos através da técnica de EIS, para C-SPEs ativados por CA. A temperatura de incubação utilizada foi a de 60°C para ambas as técnicas. Na tabela 5.3 estão expressos os valores médios das I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} .

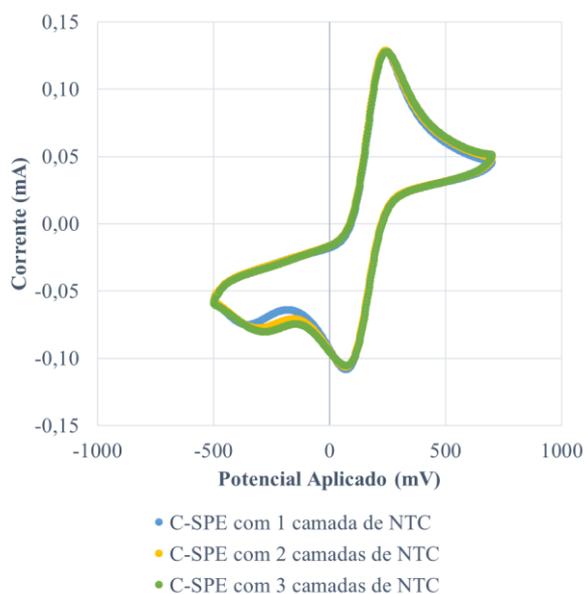


Figura 5.5 - Voltagramas obtidos após a colocação das 3 camadas de NTC/PAH/NPPt, em meio da solução *redox* de ferro, em C-SPEs com ativação eletroquímica por CA.

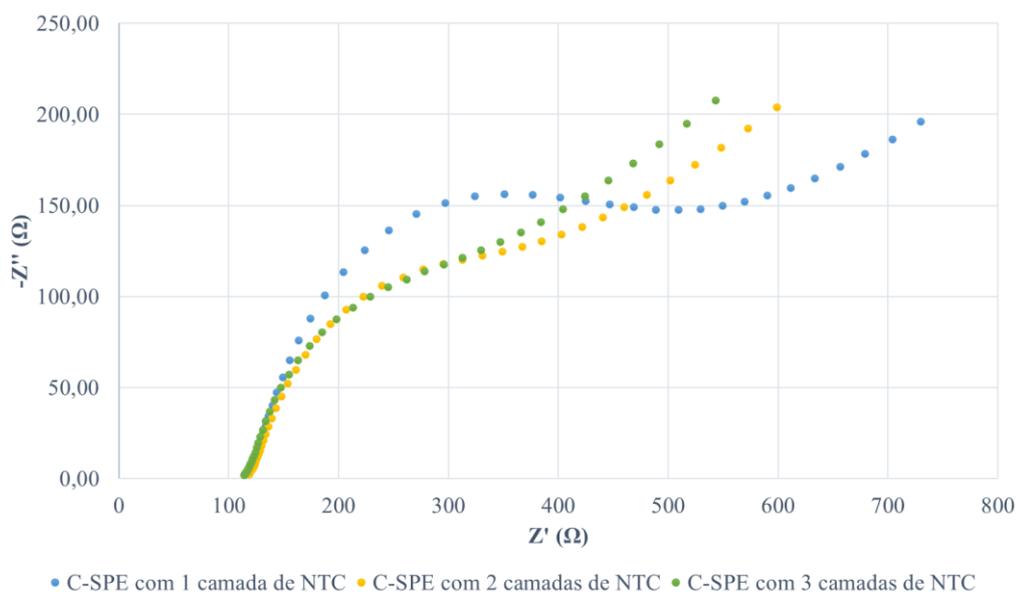


Figura 5.6 - Diagramas de *Nyquist* obtidos em cada colocação das camadas de NTC/PAH/NPPt, em meio da solução *redox* de ferro, em C-SPEs com ativação eletroquímica por CA.

Tabela 5.3 – Valores médios das I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} em cada etapa da colocação dos NTC/PAH/NPPT, para C-SPEs ativados electroquimicamente por CA.

| Ativação Eletroquímica | Camada | ΔI_{po} (mA) | ΔI_{pr} (mA) | Diferença de Potencial entre os Picos (mV) | ΔR_{ct} Ω |
|------------------------|--------|-------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|
| CA | 1 | -0,09 | 0,12 | 148 | 435 |
| | 2 | -0,10 | 0,13 | 145 | 405 |
| | 3 | -0,10 | 0,13 | 149 | 367 |

De uma forma geral, observou-se que o valor da I_{po} teve alterações de -0,03 mA, na imobilização da primeira camada de NTC modificados para os chips ativados por CA, uma diferença de -20% relativamente aos C-SPEs ativados pela técnica de CV, aumentando ligeiramente 0,01 mA nas restantes camadas, mas continuando com valores mais baixos do que os C-SPEs ativados por CV. Em relação a I_{pr} , não existe diferenças entre as duas técnicas.

Com a técnica de ativação CA, os C-SPEs apresentaram valores médios da E_p superiores relativamente aos valores resultantes da técnica de ativação CV, tendo para cada camada uma diferença de 9%, 8% e 12% respetivamente. Em contrapartida, a R_{ct} dos C-SPEs ativados por CA, demonstraram valores muito mais elevados que os C-SPEs ativados por CV, com aproximadamente 50% de diferença em cada camada de NTC/PAH/NPPT.

Desta forma, demonstra-se novamente que a ativação eletroquímica por CV apresenta mais vantagens para a otimização dos C-SPEs.

5.2. Condições experimentais de síntese do NIP

O objetivo nesta etapa do projeto diz respeito à síntese de um NIP para avaliar o comportamento do polímero formado pela conjugação β -CD+Pi, no C-SPE sem a presença da proteína IL-6. Projetou-se condições estáveis, de forma a serem controladas e monitorizadas, para o processo seguinte, a formação do MIP.

5.2.1. Dissolução da β -CD

Numa fase inicial do estudo da utilização da β -CD como monómero para o desenvolvimento do biossensor, foram efetuadas duas tentativas de polimerização, em tampão fosfato a pH 7,4. A seleção deste monómero teve como base este ser um carboidrato composto de unidades de glicose. Para evitar a impressão inadequada da proteína, os materiais biomiméticos devem ser projetados em condições muito próximas do ambiente nativo do modelo de proteína. Quando a matriz polimérica é constituída por compostos nativos na natureza (aminoácidos, açúcares, lipídios ou ácidos nucleicos), mudanças conformacionais da proteína durante a síntese do polímero podem ser evitadas ou limitadas. Deste modo o filme polimérico ao redor da proteína é formado por biomoléculas que coexistem com a proteína na natureza, neste caso a β -CD.

No primeiro ensaio a eletropolimerização realizou-se pela técnica de CV, num intervalo de -0,8 V a +1,3 V, em 20 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s, utilizando para isso uma solução de β -CD com concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ M. Em paralelo, foi realizado um ensaio controlo em que o eléctrodo era sujeito às mesmas condições, mas utilizando apenas o tampão. Este ensaio permite comprovar a eficácia de polimerização. Os resultados obtidos nas medições com a solução *redox* de ferro estão apresentados na figura 5.7. Na figura 5.8 estão ilustrados os resultados obtidos através da técnica de EIS.

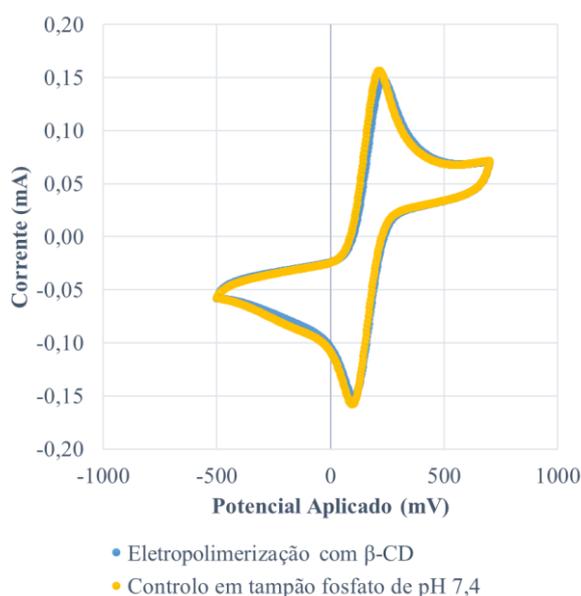


Figura 5.7 - Voltagramas obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de -0,8 V a +1,3 V, a 20 ciclos, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s, medidos com a solução *redox* de ferro.

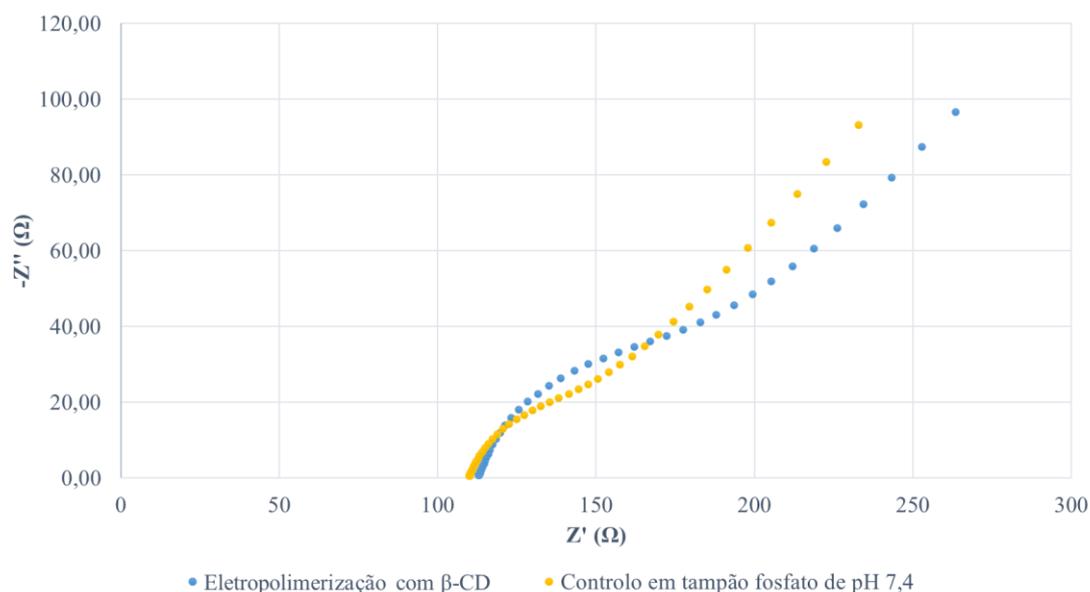


Figura 5.8 - Diagramas de *Nyquist* obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de -0,8 V a +1,3 V, a 20 ciclos, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s, medidos com a solução *redox* de ferro.

Pela observação das figuras 5.7 e 5.8 é possível concluir que não ocorre eletropolimerização, nas condições escolhidas, pois tanto os voltagramas cíclicos como os diagramas de *Nyquist* apresentam comportamentos muito semelhantes.

O segundo ensaio também utilizou a técnica de CV para polimerizar, apenas mudando o intervalo de potencial, passando a ser de -1,0 a +1,6 V. Na tabela 5.4 estão apresentados os valores médios dos I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} para ambos os ensaios.

Tabela 5.4 – Valores médios dos I_{po} e I_{pr} , da diferença de potencial entre os picos e da R_{ct} para os diferentes ensaios de eletropolimerização com β -CD e tampão fosfato (pH 7,4).

| Ensaio | Monómero | ΔI_{po} (mA) | ΔI_{pr} (mA) | Diferença de Potencial entre os Picos (mV) | ΔR_{ct} Ω |
|--------|----------------|-------------------------|-------------------------|---|-----------------------------|
| 1 | β -CD | -0,16 | 0,15 | 114 | 117 |
| | Tampão Fosfato | -0,16 | 0,15 | 112 | 101 |
| 2 | β -CD | -0,15 | 0,15 | 112 | 53 |
| | Tampão Fosfato | -0,16 | 0,15 | 110 | 47 |

Através da análise dos dados fornecidos pela tabela 5.4 é possível afirmar que não está a ocorrer eletropolimerização pois os valores são muito semelhantes entre os C-SPEs eletropolimerizados com β -CD e os C-SPEs modificados com tampão fosfato. Uma das possíveis explicações por não ter sido possível eletropolimerizar a β -CD nestas condições pode ser devido à dificuldade de dissolução da mesma. Verificou-se também que alguns estudos científicos encontrados na literatura demonstraram que a polimerização eletroquímica deste monómero natural necessitava da aplicação de potenciais bastante elevados (113). Assim, optou-se por utilizar uma mistura de monómeros, adicionando o Pi, de forma a ultrapassar este obstáculo.

5.2.2. Velocidade de Varrimento

A partir daqui, foi utilizada sempre uma mistura de monómeros constituída pela β -CD e o Pi. No estudo da velocidade de varrimento é utilizada a mesma gama de potencial, de 0 V a +1,8 V, o mesmo número de ciclos (30), sendo testada a velocidade de varrimento 0,025 V/s no primeiro ensaio e a velocidade 0,1 V/s no segundo, na figura 5.9 está ilustrado o voltograma da polimerização da β -CD (a) e da β -CD conjugada com Pi (b). Devido ao carácter eletroativo do Pi, optou-se por se fazer apenas medições EIS, com a solução *redox* de ferro. Na figura 5.10 encontra-se ilustrado o estudo à velocidade de varrimento da eletropolimerização.

É possível afirmar, pela interpretação dos dados da obtidos na figura 5.10, que aparentemente, com uma velocidade de varrimento de 0,025 V/s não ocorre eletropolimerização pois os diagramas de *Nyquist* da β -CD+Pi e do tampão fosfato com pH 6 quase que se sobrepõem. Por outro lado, nota-se uma grande diferença, na velocidade de varrimento de 0,1 V/s, entre o C-SPE polimerizado com β -CD+Pi e polimerizado com tampão fosfato de pH 6. O valor da R_{ct} é maior para o C-SPE polimerizado com β -CD+Pi. Desta forma, pode-se confirmar que a eletropolimerização à velocidade de varrimento de 0,1 V/s é bastante mais favorável.

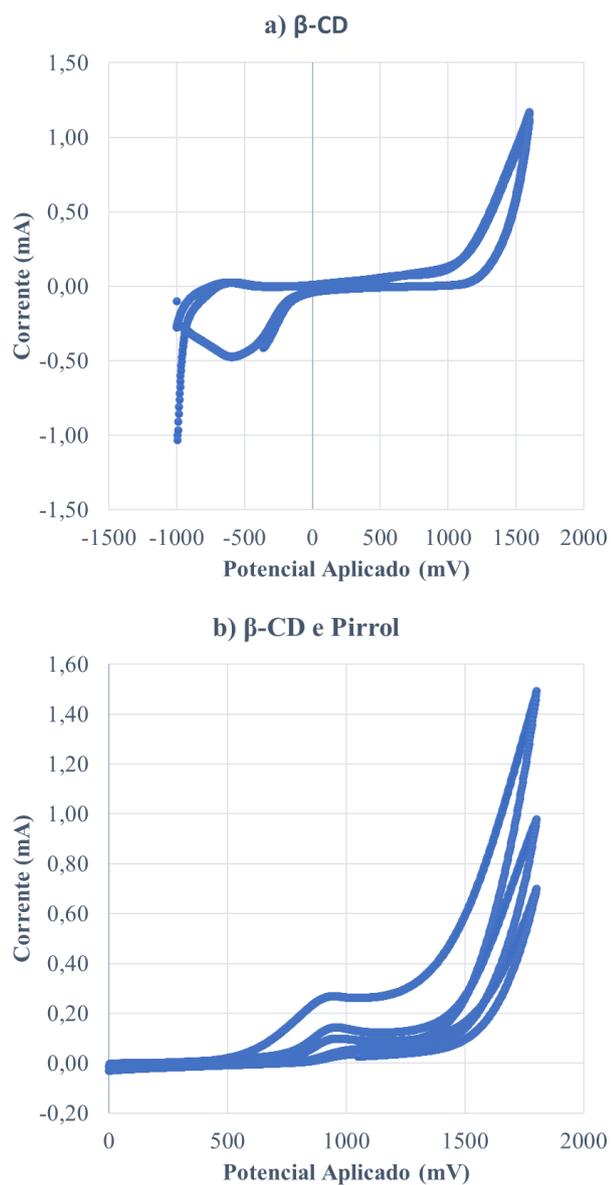


Figura 5.9 – Voltagramas da eletropolimerização a) aquando da utilização de β -CD e b) β -CD conjugada com pirrol.

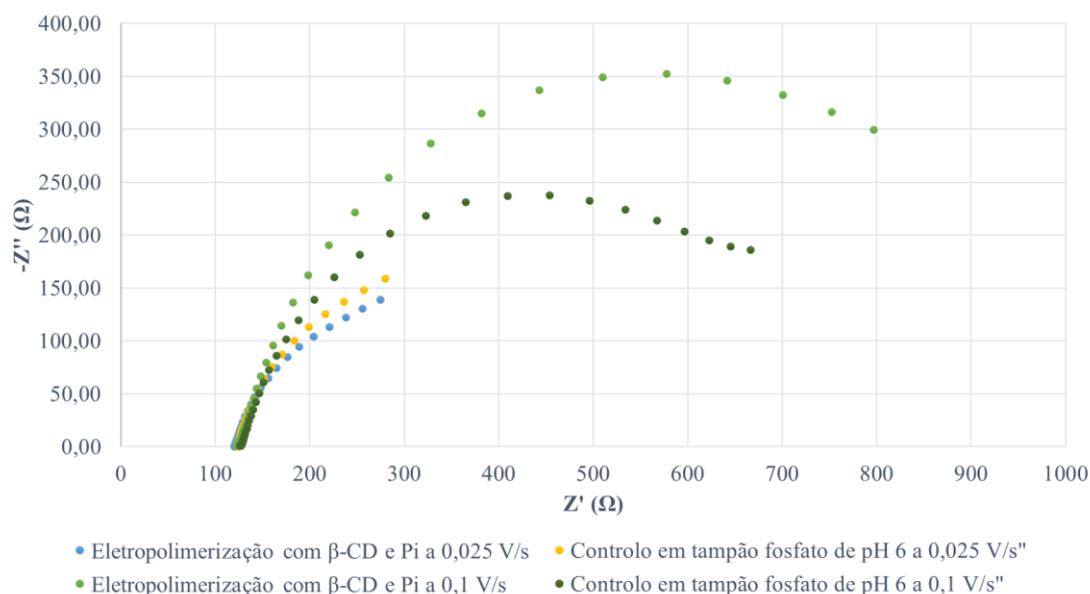


Figura 5.10 - Diagramas de *Nyquist* obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de 0 V a +1,8 V, a 30 ciclos, com velocidade de varrimento de 0,025 V/s e 0,1 V/s, medidos com a solução *redox* de ferro.

5.2.1. Concentração de Pirrol

No estudo da concentração de Pi utilizou-se a mesma gama de potencial, de 0 V a +1,8 V, o mesmo número de ciclos (30), a velocidade de varrimento de 0,1 V/s. Na tabela 5.5 encontram-se os valores da R_{ct} para os diferentes ensaios de eletropolimerização, com as várias concentrações de pirrol (C_p).

Tabela 5.5 – Valores da R_{ct} para os ensaios de eletropolimerização com β -CD+Pi e tampão fosfato de pH 6, no estudo da C_p .

| Monómero | C_p (M) | <i>Primeira Medição</i> <i>Última Medição</i> | |
|-----------------------|----------------------|---|----------------------|
| | | R_{ct} Ω | R_{ct} Ω |
| β -CD + Pi | $1,0 \times 10^{-3}$ | 926 | 914 |
| | $2,5 \times 10^{-3}$ | 6393 | 6445 |
| | $5,0 \times 10^{-3}$ | 38180 | 23946 |
| <i>Tampão Fosfato</i> | - | 656 | |

É de referir que para a concentração de 5×10^{-3} M, foram feitas 4 medições para estabilizar o NIP, enquanto para as outras concentrações apenas se efetuaram 2 medições.

Para a seleção da concentração de Pi na solução do monómero, foram tidos em conta dois critérios, o número de medições EIS até o valor da R_{ct} estabilizar e o valor final obtido. Desta forma, optou-se pela concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ M, uma vez que apresenta um valor da R_{ct} bastante diferente do valor controle em tampão fosfato, apenas necessitando de 2 medição até estabilizar.

5.2.2. Número de Ciclos

No estudo do número de ciclos para o processo de eletropolimerização utilizou-se a mesma gama de potencial, de 0 V a +1,8 V, uma velocidade de varrimento de 0,1 V/s e testou-se três valores diferentes para os ciclos, sendo estes 10, 20 e 30. Como referido anteriormente, optou-se por se fazer todas as medições a partir da eletropolimerização apenas com EIS, através da solução *redox* de ferro. Na tabela 5.6 estão os valores da R_{ct} para os diferentes ensaios de eletropolimerização, com os vários ciclos estudados.

Tabela 5.6 – Valores da R_{ct} para os ensaios de eletropolimerização com β -CD+Pi e tampão fosfato de pH 6, no estudo do número de ciclos.

| Monómero | Ciclos | Primeira Medição | Última Medição |
|------------------|--------|----------------------|----------------------|
| | | R_{ct} Ω | R_{ct} Ω |
| β -CD + Pi | 10 | 14988 | 9118 |
| | 20 | 19307 | 15470 |
| | 30 | 6393 | 6446 |

Para estabilizar o valor do R_{ct} em cada chip, foram realizadas algumas medições. Para o C-SPE eletropolimerizado com 10 ciclos foram realizadas 5 medições, não ocorrendo estabilização. O C-SPE eletropolimerizado com 20 ciclos necessitou de 4 medições para estabilizar, enquanto o chip que fez o processo de polimerização com 30 ciclos apenas necessitou de 2 medições para se estabilizar o valor do R_{ct} . Desta forma, optou-se por utilizar a eletropolimerização a 30 ciclos, uma vez que com 2 medições o polímero foi estabilizado.

5.3. Condições de Trabalho do MIP

Após investigar algumas das principais condições experimentais relativamente ao processo de construção do sensor, foram estudadas as condições de construção do MIP. No decorrer destes trabalhos, foi tido em conta parâmetros como a concentração da proteína, IL-6, o pH do tampão utilizado nas soluções e o método de remoção. Após o estudo das condições de trabalho do NIP foram seleccionadas as condições ideais de polimerização eletroquímica. A gama de potencial escolhida foi a de 0 V a +1,8 V, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s, em 30 ciclos, com uma concentração de pirrol $2,5 \times 10^{-3}$ M e uma concentração de β -CD $1,0 \times 10^{-3}$ M.

5.3.1. Polimerização

5.3.1.1. Concentração da IL-6

Para a solução de eletropolimerização do MIP foram escolhidas duas concentrações distintas da proteína IL-6 para discutir os resultados mais plausíveis para o desenvolvimento do biossensor. Desta forma, foram estudadas as concentrações de $4,78 \times 10^{-9}$ e $4,78 \times 10^{-8}$ M, os diagramas de *Nyquist* respetivos estão descritos na figura 5.11. Na tabela 5.7 estão descritos os valores médios do R_{ct} para os MIPs e NIPs eletropolimerizado nas mesmas condições.

Tabela 5.7 – Valores médios da R_{ct} para os ensaios de eletropolimerização MIP/NIP, com tampão fosfato de pH 6, no estudo da concentração da proteína IL-6.

| Tipo C-SPE | Concentração IL-6 | ΔR_{ct} |
|------------|-----------------------|-----------------|
| | M | Ω |
| <i>MIP</i> | $4,78 \times 10^{-8}$ | 525 |
| | $4,78 \times 10^{-9}$ | 7697 |
| <i>NIP</i> | - | 48481 |

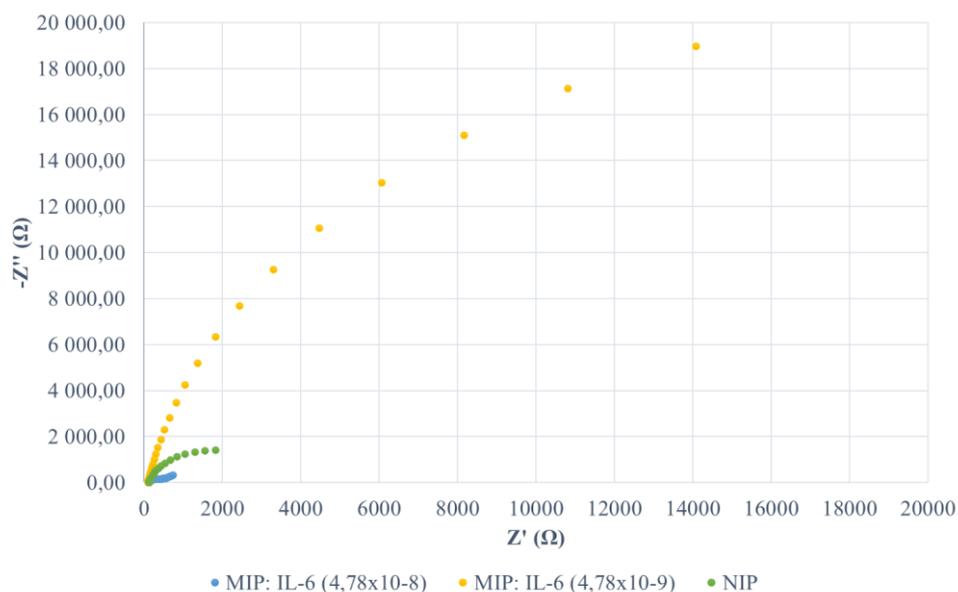


Figura 5.11 - Diagramas de *Nyquist* obtidos após polimerização, por CV, num intervalo de 0V a +1,8 V, a 30 ciclos, com velocidade de varrimento 0,1 V/s para as diferentes concentrações da proteína IL-6 e NIP de controlo, em solução *redox* de ferro.

Verificou-se que os valores de R_{ct} dos NIPs são sempre muito mais elevados que os valores R_{ct} dos MIPs, o que pode ser uma forte indicação de que a presença da proteína IL-6 produz algum tipo de impedimento à polimerização.

Para a concentração mais elevada de proteína na polimerização ($4,78 \times 10^{-8}$ M) observou-se um valor de resistência (525Ω) muito mais baixo que o valor do NIP de referência (48481Ω). O MIP eletropolimerizado numa concentração de $4,78 \times 10^{-9}$ M, com resistência de 7697Ω teve também o valor de R_{ct} mais baixo que o NIP de referência.

Os valores da R_{ct} antes da eletropolimerização eram de aproximadamente 240Ω . Desta forma, é de notar que a eletropolimerização ocorreu de forma mais significativa no MIP com uma concentração de IL-6 inferior, uma vez que a R_{ct} é muito maior após polimerizar e inferior ao NIP de referência.

5.3.1.2. pH do Tampão

Tendo em conta as condições escolhidas para a eletropolimerização, foram produzidos C-SPEs em condições de diferentes valores de pH. A seleção do pH teve em conta o ponto isoelétrico (PI) da proteína (6.96) (114). Na tabela 5.8 estão descritos os valores médios da R_{ct} para os MIPs e NIPs.

Tabela 5.8 – Valores da R_{ct} para os ensaios de eletropolimerização MIP/NIP no estudo do pH do tampão.

| Tipo C-SPE | Tampão | ΔR_{ct} Ω |
|------------|----------------------|-----------------------------|
| <i>MIP</i> | Fosfato pH 6 | 7697 |
| | Fosfato-citrato pH 5 | 15876 |
| <i>NIP</i> | Fosfato pH 6 | 48481 |
| | Fosfato-citrato pH 5 | 27419 |

Com a mudança de pH, nota-se uma maior resposta dos MIPs à eletropolimerização, havendo um aumento da R_{ct} de 7697 Ω para 15876 Ω . Também os NIPs sofrem alterações, passando a ter valores de R_{ct} ligeiramente mais baixos.

Seria expectável que a resistência do MIP fosse superior à do NIP dado que a proteína se encontra presente na matriz polimérica. Sendo a proteína uma biomolécula de alto peso molecular, seria suposto dificultar a passagem dos iões provenientes da solução *redox* ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) entre a solução e a superfície do eléctrodo. No entanto, é importante considerar dois fatores:

- (i) O PI da proteína (6.96). A proteína encontra-se a pH (5/6), inferior ao seu PI (6.96), e conseqüentemente, está maioritariamente protonada, o que facilita a passagem dos electrões, uma vez que a *redox* probe é um complexo negativo de ferro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$).
- (ii) E a inibição da polimerização dos monómeros (β -CD+Pi) devido à presença da proteína na solução, uma vez que esta é uma polimerização em *Bulk*.

5.3.2. Remoção da Proteína

Neste ponto já se tem definidas todas as condições de polimerização. A gama de potencial foi de 0 V a +1,8 V, com velocidade de varrimento de 0,1 V/s, em 30 ciclos, com uma solução de β -CD+Pi com concentração de 1.0×10^{-3} M e $2,5 \times 10^{-3}$ M, respetivamente. A proteína IL-6 foi utilizada numa concentração de $4,78 \times 10^{-9}$ M. O tampão escolhido para as soluções foi o tampão fosfato-citrato de pH igual a 5.

No processo de remoção da Il-6 foram testadas 3 abordagens diferentes. A primeira, com incubação de proteinase k, durante a noite e incubação por 1 hora em ácido oxálico, no dia seguinte. A segunda utilizou também proteinase k, desta vez por 2 horas e seguida de 1 hora em ácido oxálico. A última técnica constou na incubação em ácido oxálico por 3 horas. Em todos os ensaios, após a incubação nos diferentes reagentes, os chips foram incubados por 1 hora em tampão fosfato-citrato de pH igual a 5, de forma a estabilizar o polímero. Na figura 5.12, 5.13 e 5.14 estão representados os diagramas de *Nyquist* para as três técnicas de remoção, com os respectivos NIPs (a) e MIPs (b).

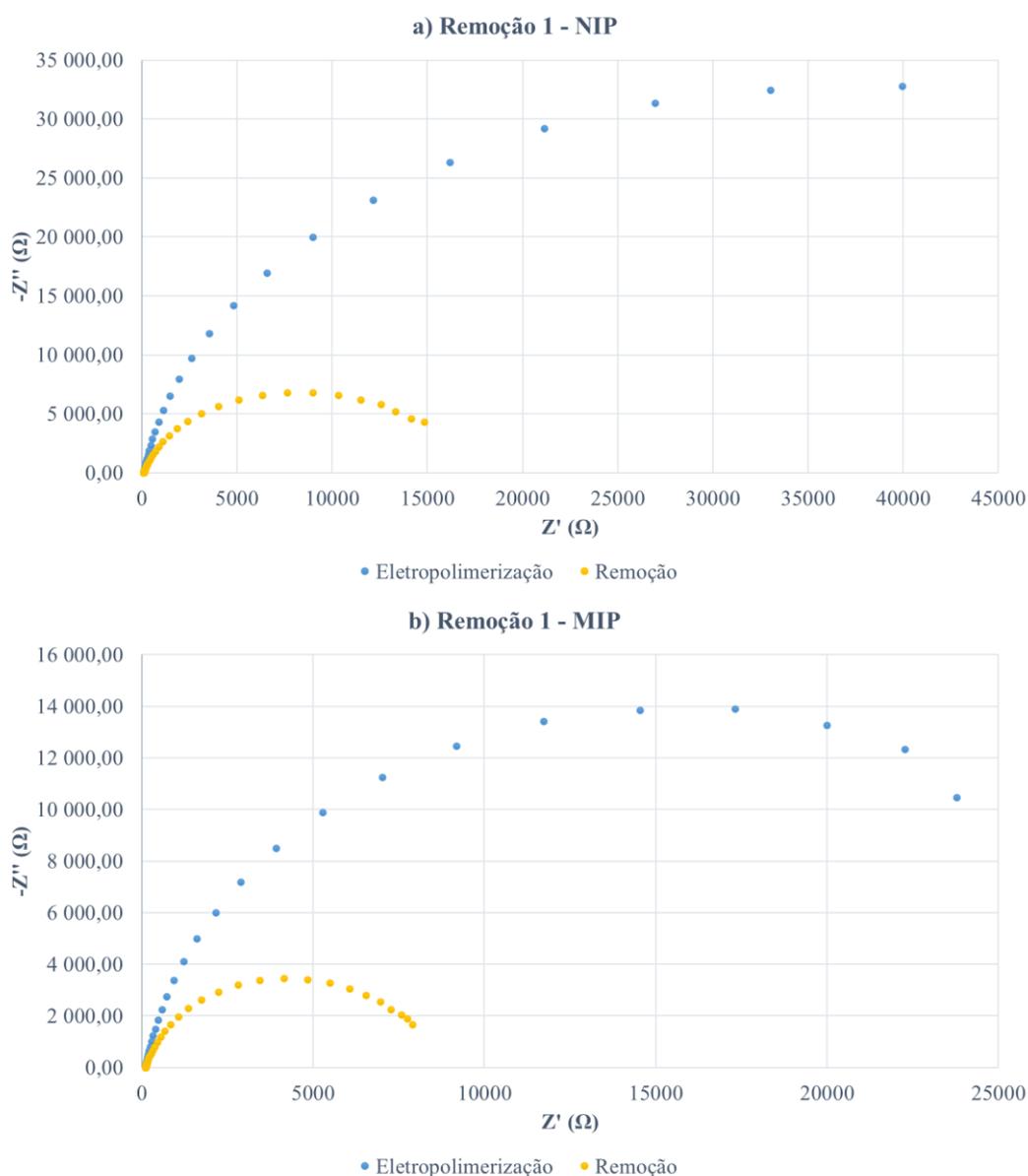


Figura 5.12 - Diagramas de *Nyquist* da eletropolimerização e remoção do NIP (a) e MIP (b) obtidos para a primeira técnica de remoção estudada, em solução *redox* de ferro.

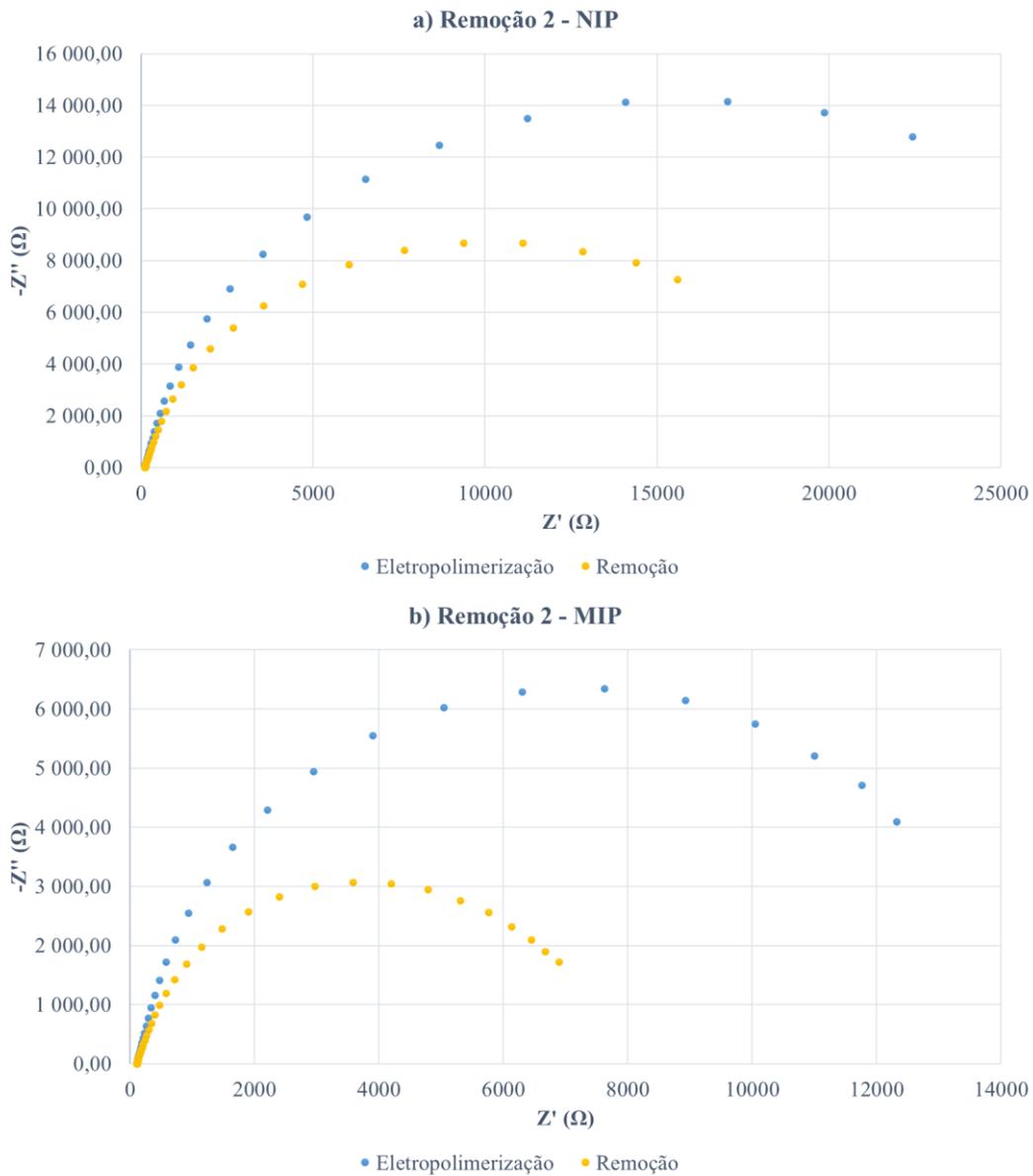


Figura 5.13 - Diagramas de *Nyquist* da eletropolimerização e remoção do NIP (a) e MIP (b) obtidos para a segunda técnica de remoção estudada, em solução *redox* de ferro.



Figura 5.14 - Diagramas de *Nyquist* da eletropolimerização e remoção do NIP (a) e MIP (b) obtidos para a terceira técnica de remoção estudada, em solução *redox* de ferro.

É de notar que existe uma diferença no valor da R_{ct} dos MIPs e NIPs em todas as técnicas de remoção, sendo que na remoção 1 existe uma diferença de 49%, seguida de uma diferença de 63% e por fim uma diferença de 40%. A segunda remoção é a que mostra maior diferença entre os NIPs e os MIPs. No entanto, para comprovar os dados, decidiu-se fazer a reta de calibração dos sensores, para todas as técnicas de remoção. Nesta calibração utilizaram-se 5 padrões (1 $\mu\text{g/mL}$ – 100 pg/mL). As retas de calibração são feitas com o logaritmo da concentração da IL-6 na solução padrão, em $\mu\text{g/mL}$ e a R_{ct} relativa.

Desta forma foram obtidos os gráficos de calibração da figura 5.15, que revela a reta de calibração para o NIP e o MIP da primeira técnica de remoção. Pela análise das retas, sabe-se que o valor do declive é igual a 0,0322 para o NIP e 0,0182 para o MIP. Estes resultados revelam que o MIP tem um comportamento menos variável ao longo do aumento da concentração da IL-6, demonstrando uma pior resposta à proteína que o NIP. O R^2 do NIP é de 0,9736 e do MIP é de 0,9807, ambos têm valores superiores a 0,97, o que é favorável. Neste caso o MIP tem uma melhor resposta.

Na figura 5.16 estão as reta de calibração para o NIP e o MIP da segunda técnica de remoção. O valor do declive é igual a 0,0368 para o NIP e 0,0383 para o MIP. Estes resultados revelam que o MIP tem maior resposta à proteína que o NIP. O R^2 do NIP é de 0,9168 e do MIP é de 0,8692. Ambos os valores revelam comportamentos muito dispersos, o que não mostra resultados favoráveis para a deteção da IL-6.

Na figura 5.17 estão as reta de calibração para o NIP e o MIP da terceira técnica de remoção. O valor do declive é igual a 0,0351 para o NIP e 0,0367 para o MIP. Estes resultados revelam que o MIP tem maior resposta à proteína que o NIP. O R^2 do NIP é de 0,8540 e do MIP é de 0,9856. Nesta remoção temos um MIP com respostas constantes ao aumento da concentração da IL-6, e um NIP com valores dispersos, o que prova que existe um biossensor com capacidade de detetar a proteína. Desta forma, a técnica de remoção escolhida foi a terceira. Na figura 5.18 encontram-se os diagramas de *Nyquist* para a melhor técnica de remoção, ilustrando o processo de calibração, tanto para o MIP (a) como para o NIP (b).

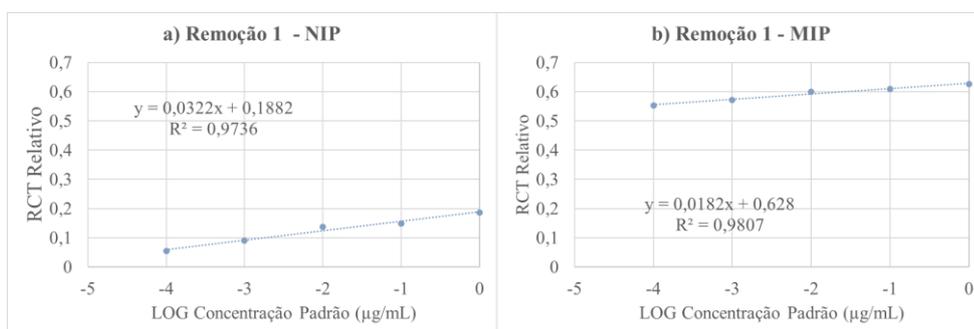


Figura 5.15 - Reta de calibração para o NIP e o MIP da primeira técnica de remoção.

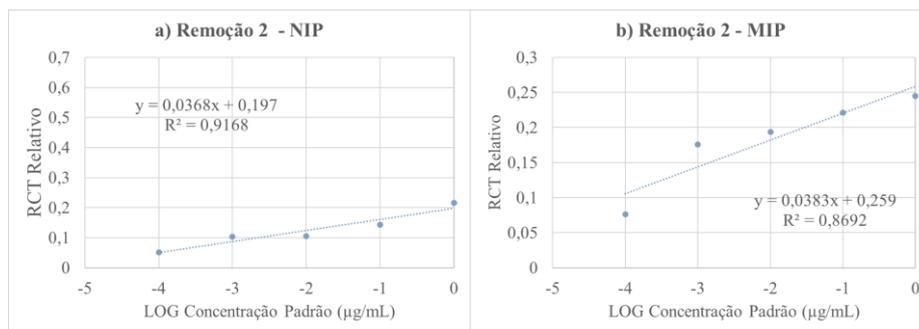


Figura 5.16 - Retas de calibração para o NIP e o MIP da segunda técnica de remoção.

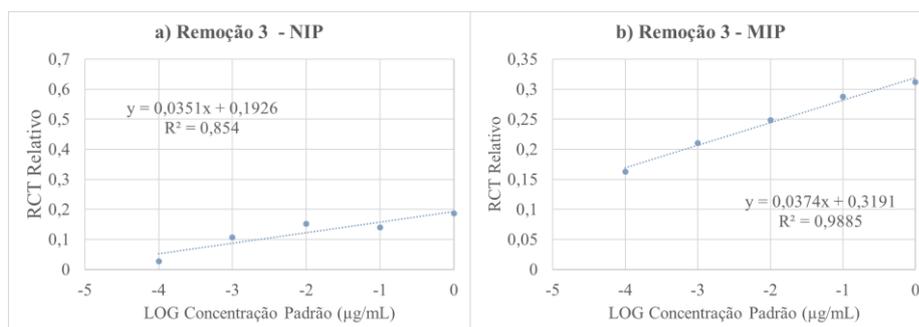


Figura 5.17 - Retas de calibração para o NIP e o MIP da terceira técnica de remoção.

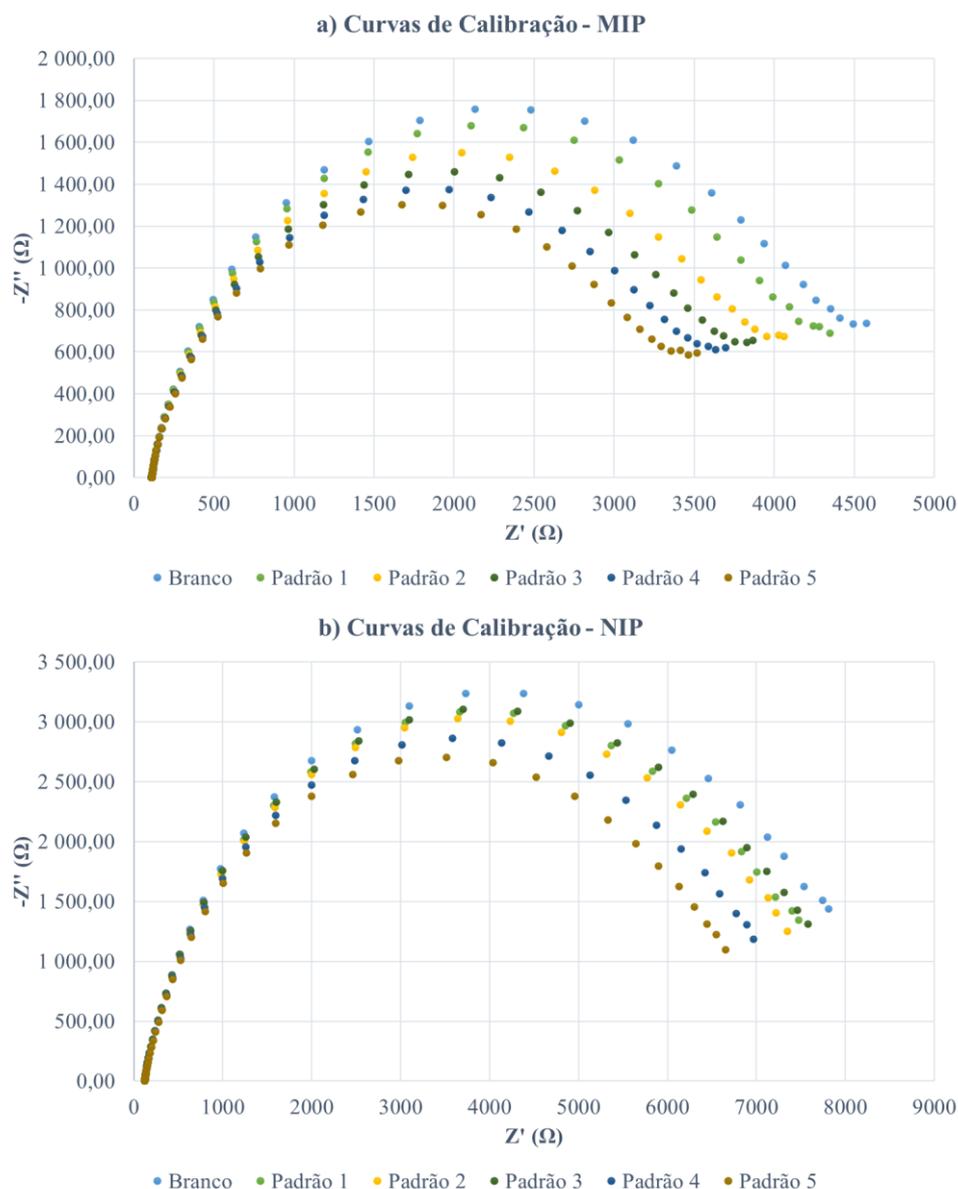


Figura 5.18 - Diagramas de *Nyquist* da calibração do MIP (a) e NIP (b) da terceira técnica de remoção, com tampão fosfato-citrato de pH 5.

5.4. Curva de Calibração

A classificação do comportamento analítico do biossensor fez-se por intermédio da construção de uma curva de calibração, que expressa a relação entre o sinal medido e a concentração do analito, analisando-se a capacidade que o sensor tem de interagir novamente com a proteína nas cavidades formadas após a sua remoção. Este processo consistiu na incubação de 5 μL de várias concentrações da proteína no eléctrodo de trabalho durante 30 minutos, para que fosse possível a interação da proteína com o monómero formado. Após a incubação o eléctrodo foi lavado com água ultrapura e

procedeu-se à medição pela técnica EIS, com a solução padrão *redox* de ferro, para observar a resposta do sensor às diferentes concentrações da proteína, após a formação das cavidades.

Para a construção das curvas de calibração foram efetuadas 2 calibrações para o MIP em paralelo com o NIP, tendo sido calculada a média e o desvio-padrão. Foram efetuadas curvas de calibração para 6 padrões (1 µg/mL – 1 pg/mL). Neste sentido, as figuras 5.19 representa os resultados obtidos.

Relativamente à R_{ct} , tanto o NIP como o MIP apresentam resistências à transferência de cargas crescentes à medida que a concentração da proteína aumenta, o que confirma a existência da ligação da proteína à superfície do sensor. No entanto, esta é mais significativa no MIP, uma vez que o R^2 no MIP é superior ao R^2 no NIP. Para além disso o declive das retas é superior no MIP.

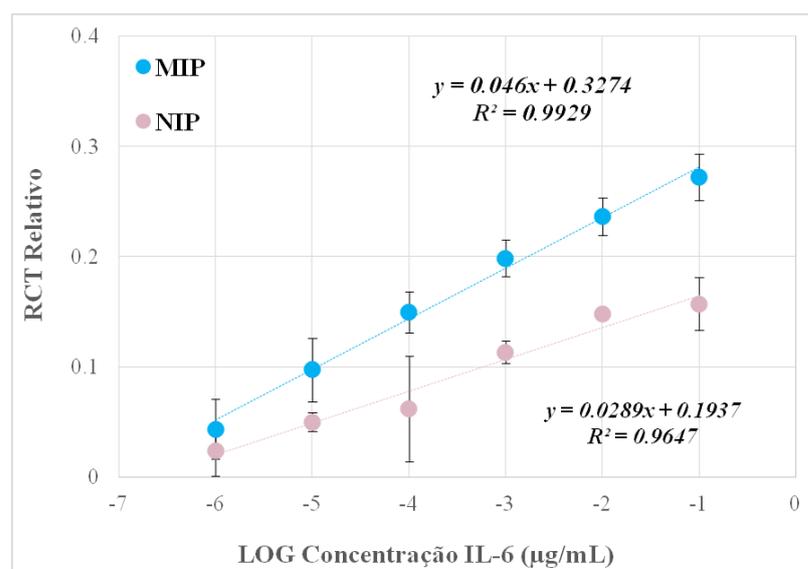


Figura 5.19 – Retas de Calibração obtidas com 6 padrões de concentrações de IL-6 preparadas em tampão fosfato-citrato de pH 5 para MIP e NIP, pela técnica EIS.

5.5. Teste em Soro

Com o objetivo de avaliar o comportamento do biossensor no contexto realista, foram realizados ensaios com a preparação de soluções padrão da IL-6 em soro humano. Na figura 5.20 podemos observar os resultados obtidos da calibração após incubação com

as várias concentrações de proteína preparadas em soro humano, no MIP e na figura 5.24 está a representação do mesmo estudo para o NIP.

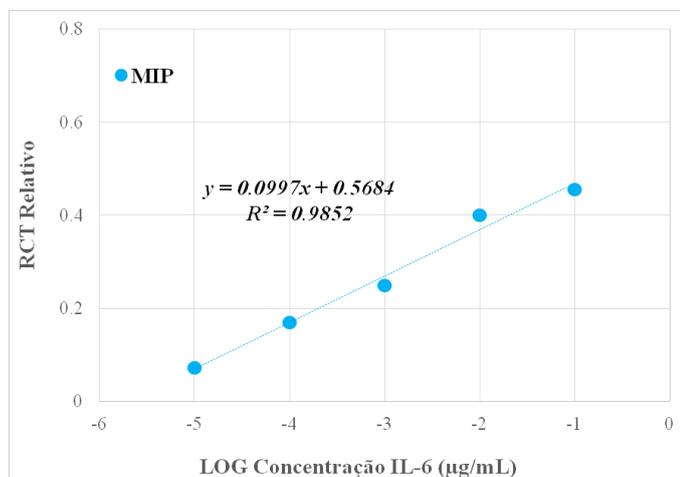


Figura 5.20 - Reta de Calibração obtida com 5 padrões de concentrações de IL-6 preparadas em soro para MIP, pela técnica EIS.

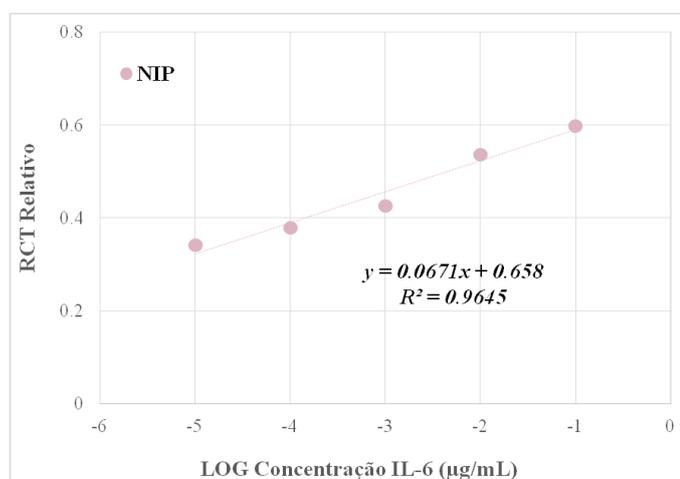


Figura 5.21 - Reta de Calibração obtida com 5 padrões de concentrações de IL-6 preparadas em soro para NIP, pela técnica EIS.

Neste sentido, podemos observar que tanto o NIP como o MIP apresentam resultados semelhantes aos obtidos com a utilização de soluções padrão preparadas em tampão fosfato-citrato na mesma gama de concentrações, o que demonstra um bom comportamento do sensor num contexto prático.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

6. Conclusão

Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico, sendo este um dispositivo analítico, que integra técnicas eletroquímicas e impressão molecular de proteínas. A proteína IL-6, o analito em estudo, é um biomarcador associado à neuroinflamação, importante para a detecção de doenças neurodegenerativas, como a DA.

Para remover possíveis contaminantes na superfície do eletrodo do C-SPE comercial e fomentar o aparecimento de grupos funcionais através da oxidação, fez-se uma ativação eletroquímica com o auxílio da técnica de CV, em ácido sulfúrico a 0,5 M, num intervalo de potencial de -0,13 V a +1,5 V, durante 10 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 0,5 V/s. Observou-se, que após esta ativação através da técnica selecionada, todos os chips passaram a ter uma diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução menor e uma R_{ct} também mais baixa, o que significa que a velocidade de transferência de elétrons aumentou o que demonstra eficácia no tratamento. Após a ativação, procedeu-se à modificação do eletrodo de trabalho, através da imobilização de um nanomaterial à base de NTC modificados com PAH e platina, num total de 3 camadas, com temperatura de cura de 60 °C. Verificou-se também uma maior estabilidade do eletrodo após a imobilização dos NTC.

A seleção do monómero é essencial, uma vez que os seus grupos funcionais vão interagir com locais específicos da proteína, promovendo assim uma impressão molecular mais idônea. A β -CD, juntamente com o Pi foram os monómeros escolhidos para proceder à eletropolimerização, apresentando grande capacidade de interação com a proteína IL-6, pois tanto o MIP como os NIP mostraram diferenças significativas após a polimerização. Este processo foi realizado em *Bulk* (proteína misturada com os compostos reacionais), com uma solução de β -CD, a 1×10^{-3} M, Pi a $2,5 \times 10^{-3}$ M e IL-6 $4,78 \times 10^{-9}$ M (0,1 μ g/mL). Foi utilizada a técnica CV, numa gama de potencial de 0 V a +1,8 V, velocidade de varrimento de 0,1 V/s, durante 30 ciclos. Para este processo foram feitos estudos à velocidade de varrimento, concentração do Pi e número de ciclos. Também a concentração da proteína, e o tampão a utilizar foram estudados. Para que os resultados fossem mais precisos, mais ensaios teriam de ser feitos para cada um dos procedimentos. Genericamente, o biossensor apresentou resultados favoráveis relativamente ao limite de detecção, apresentando resposta à proteína de 1 pg/mL.

Estes sensores são mais robustos e apresentam mais sensibilidade do que os imunossensores e métodos ELISA. Para além disso, a sua conceção é mais simples, o tempo de medição é mais curto, têm alta precisão e baixo limite de deteção. Desta forma, a abordagem no presente estudo é muito importante para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico de doenças, através da deteção de biomarcadores associados. Para além das doenças neurodegenerativas, esta forma de detetar doenças pode ser generalizada para todos os campos da medicina moderna.

Como perspetiva futura, seria importante fazer um estudo da seletividade do biossensor desenvolvido, efetuar mais ensaios para cada processo e efetuar uma comparação deste método com outro método validado.

Referências

1. Pordata. Esperança de vida à nascença: total e por sexo [Internet]. Fundação Francisco Manuel dos Santos. 2018 [citado 28 de Dezembro de 2020]. p. 1–4. Disponível em: [https://www.pordata.pt/Portugal/Esperança+de+vida+à+nascença+total+e+por+sexo+\(base+trienio+a+partir+de+2001\)-418](https://www.pordata.pt/Portugal/Esperança+de+vida+à+nascença+total+e+por+sexo+(base+trienio+a+partir+de+2001)-418)
2. Pordata. Indicadores de Envelhecimento [Internet]. Fundação Francisco Manuel dos Santos. 2020 [citado 28 de Dezembro de 2020]. p. 1–4. Disponível em: <https://www.pordata.pt/Portugal/Indicadores+de+envelhecimento-526>
3. Nogueira, Lauro José Marques; Pire, Allison José; Napolini, Ana Paula; Heluany, Cláudia Cipriano Vidal; D’Agostin, Juliana; Recco KCC. Doenças Neurodegenerativas e Oncologia. *Aprendiz Baseada em Probl.* 2018;18(6).
4. Ferreira JABL. Desenvolvimento de Rede Neuronal Artificial para o Diagnóstico de Doenças Neurodegenerativas [Internet]. Universidade do Minho; 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1822/39464>
5. JPND research. O que é uma doença neurodegenerativa? [Internet]. 2019 [citado 28 de Dezembro de 2020]. Disponível em: <https://www.neurodegenerationresearch.eu/pt-pt/o-que-e-uma-doenca-neurodegenerativa/>
6. Associação Alzheimer Portugal. A Doença de Alzheimer [Internet]. [citado 2 de Janeiro de 2021]. Disponível em: <https://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-30-14-a-doenca-de-alzheimer>
7. Golçalves M. Desenvolvimento de um biossensor para rápido diagnóstico da doença de Alzheimer. Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2016.
8. Labster Theory. Types of ELISA [Internet]. [citado 7 de Julho de 2021]. Disponível em: <https://theory.labster.com/types-elisa/>
9. Costa JM. O teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. *Arq Neuro-psiquiatria.* 1986;44(1):15–31.
10. Booster Bio. ELISA Principle [Internet]. [citado 23 de Março de 2021]. Disponível em: <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/elisa-principle>
11. Aydin S. A short history , principles , and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides [Internet].* 2015;72:4–15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
12. Lima RR, Costa AMR, Souza RD de, Gomes-Leal W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. *Rev Para Med.* 2007;21(2):29–34.
13. Etman A, Wijnhuizen GJ, van heuvelen MJG, Chorus A, Hopman-Rock M. Falls incidence underestimates the risk of fall-related injuries in older age groups: A comparison with the FARE (Falls risk by exposure). *Age Ageing.* 2012;41(2):190–5.
14. Felipe LA, de Oliveira RT, Garcia M, da Silva TCDH, Santos SMS, Christofolletti G. Funções executivas, atividades da vida diária e habilidade motora de idosos com

- doenças neurodegenerativas. *J Bras Psiquiatr.* 2014;63(1):39–47.
15. World Population Ageing. New York; 2015.
 16. Gulbenkian Descobrir; Fundação Calouste. O cérebro e as doenças neurodegenerativas [Internet]. *Ciência em Cena.* 2020. Disponível em: https://content.gulbenkian.pt/wp-content/uploads/sites/16/2018/04/24100926/Dossie_2015_Neurodegenerativas.pdf
 17. Smith M de AC. A doença de Alzheimer. *Rev Bras Psiquiatr.* 1999;21.
 18. Barrosl AC, Lucatelli JF, Maluf SW, De Andrade FM. Genetic influence on late onset Alzheimer’s disease. *Rev Psiquiatr Clin.* 2009;36(1):16–24.
 19. Brazaca LC. Desenvolvimento de biossensores para o auxílio do diagnóstico do mal de Alzheimer, para a quantificação rápida de melatonina e para determinação simples do traço genético de anemia falciforme. Universidade de São Paulo; 2019.
 20. Associação Alzheimer Portugal. Prevalência da Demência [Internet]. [citado 10 de Janeiro de 2021]. Disponível em: <https://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-106-349-prevalencia-da-demencia>
 21. Alberto AS. A BACE1 como alvo terapêutico na Doença de Alzheimer. Universidade de Coimbra; 2016.
 22. Silva JR da C. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo de doenças neurodegenerativas: de análises transcricionais à avaliação comportamental. Universidade Federal de Uberlândia; 2019.
 23. Viver de Medicina. Doença de Alzheimer: causas, sintomas e como envolver a família no cuidado ao paciente [Internet]. [citado 25 de Março de 2021]. Disponível em: <https://ipemed.com.br/blog/doenca-de-alzheimer-cuidados-familia/>
 24. Alzheimer’s Society. Alzheimer’s disease [Internet]. [citado 13 de Fevereiro de 2021]. Disponível em: <https://www.alzheimers.org.uk/about-dementia/types-dementia/alzheimers-disease?documentID=100>
 25. Magaldi NAFFRNBPDOFED-TAB da SEHJRM. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. *Dement Neuropsychol.* 2011;5(Suppl 1):5–10.
 26. Singh2 NSANS. Exploring Biomarkers for Alzheimer’s Disease. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10(7):1–6.
 27. Strimbu K, Tavel JA. What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463–6.
 28. Veerhuis MFR. Biomarkers of inflammation and amyloid- β phagocytosis in patients at risk of Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 2010;45(1):57–63.
 29. Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee S, Dence CS, Shah AR, et al. Inverse Relation between In Vivo Amyloid Imaging Load and Cerebrospinal Fluid A β 42 in Humans. *Ann Neurol.* 2006;59(3):512–9.
 30. Portelius E, Dean RA, Gustavsson MK, Andreasson U, Zetterberg H, Siemers E, et al. A novel A β isoform pattern in CSF reflects γ -secretase inhibition in

- Alzheimer disease. *Alzheimer's Res Ther.* 2010;(2):7.
31. Virginia P, Mart P. Several Direct and Calculated Biomarkers from the Amyloid- β Pool in Blood are Associated with an Increased Likelihood of Suffering from Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimer's Dis.* 2013;36:211–9.
 32. Almeida SM De, Shumaker SD, Shannon K, Delaney P, Marquie-beck J, Ueland S, et al. Incidence of post-dural puncture headache in research volunteers. *Headache.* 2011;51(10):1503–10.
 33. Schneider P, Hampel H, Buerger K. Biological Marker Candidates of Alzheimer's Disease in Blood, Plasma, and Serum. *CNS Neurosci Ther.* 2009;15:358–74.
 34. Zetterberg H, Burnham SC. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2019;12(26):1–7.
 35. Morillas-Ruiz JMR-PJM. A Review on MS-Based Blood Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Neurol Ther [Internet].* 2019;8(2):113–27. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40120-019-00165-4>
 36. Alexandre M, Gomes C. O Papel Dos Biomarcadores na Doença de Alzheimer na Doença de Alzheimer. Universidade do Algarve; 2015.
 37. Sacramento AS, Moreira FTC, Guerreiro JL, Tavares AP, Sales MGF. Novel biomimetic composite material for potentiometric screening of acetylcholine, a neurotransmitter in Alzheimer's disease. *Mater Sci Eng C [Internet].* 2017;79:541–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.098>
 38. Moreira FTC, Sale MGF, Di Lorenzo M. Towards timely Alzheimer diagnosis: A self-powered amperometric biosensor for the neurotransmitter acetylcholine. *Biosens Bioelectron [Internet].* 2017;87:607–14. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.104>
 39. Freitas RHA de, Hofmann PRP, Parise AG, Winter BB, Geisler E de F, Marconi PB. *Sporum: dispersando curiosidades biológicas.* Florianópolis; 2017.
 40. Chintamaneni M, Bhaskar M. Biomarkers in Alzheimer's Disease: A Review. *ISRN Pharmacol.* 2012;
 41. Cabral HM. *Disrupção da barreira hemato-encefálica no tratamento de neoplasias cerebrais.* Universidade de Coimbra; 2013.
 42. Ramesh G, Maclean AG, Philipp MT. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators Inflamm [Internet].* 2013; Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/480739>
 43. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *Sci World J.* 2012;
 44. Wyss-coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.* 2006;12(9):1005–15.
 45. Wu, Ya-Ying; Hsu, Jung-Lung; Wang, Han-Cheng; Wu, Shyh-Jong; Hong, Chen-Jee; Cheng IH-J. Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 2015;5(3):424–34.

46. Frye RF, Schneider VM, Frye CS, Feldman AM. Plasma Levels of TNF- α and IL-6 are Inversely Related to Cytochrome P450-dependent Drug Metabolism in Patients With Congestive Heart Failure. *J Card Fail.* 2002;8(5):315–9.
47. Rubinstein DN, Hedwim. Soluble Cytokine Receptors are Present in Normal Human Urine. *J Exp Med.* 1989;170:1409–14.
48. Wang S, Jing H, Yang H, Liu Z, Guo H. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.01.042>
49. Shockcor JP. HPLC – NMR , Pharmaceutical Applications. *Encycl Spectrosc Spectrom* [Internet]. 3.^a ed. 2017;141–51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00377-0>
50. Kalish H, Phillips TM. Application of immunoaffinity capillary electrophoresis to the measurements of secreted cytokines by cultured astrocytes. *J Sep Sci.* 2009;32(10):1605–12.
51. Liu Y, Qing H, Deng Y. Biomarkers in Alzheimer's Disease Analysis by Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Int J Mol Sci.* 2014;15:7865–82.
52. Photonics I. Focus on UV detectors for HPLC [Internet]. [citado 25 de Março de 2021]. Disponível em: <https://ibsen.com/focus-uv-detectors-hplc/>
53. Mujahid MAK. Recent Advances in Electrochemical and Optical Biosensors Designed for Detection of Interleukin 6. *Sensors.* 2020;20(646):1–27.
54. Kapoor R, Wang C. Highly specific detection of interleukin-6 (IL-6) protein using combination tapered fiber-optic biosensor dip-probe. *Biosens Bioelectron.* 2009;24:2696–701.
55. Wang CW, Manne U, Reddy VB, Kapoor R. Quantitative Estimation of IL-6 in Serum / Plasma Samples Using a Rapid and Cost-Effective Fiber-Optic dip-probe. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2010;7559(75590).
56. Lowinsohn D, Bertotti M. Sensores Eletroquímicos: Considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Quim Nov.* 2006;29(6):1318–25.
57. Ozkan SA. Principles and Techniques of Electroanalytical Stripping Methods for Pharmaceutically Active Compounds in Dosage Forms and Biological Samples. *Curr Pharm Anal.* 2009;5(2):127–43.
58. Munge BS, Krause CE, Malhotra R, Patel V, Gutkind JS, Rusling JF. Electrochemical Immunosensors for Interleukin-6. Comparison of Carbon Nanotube Forest and Gold Nanoparticle platforms. *Electrochem commun.* 2009;11(5):1009–12.
59. Wang G, Huang H, Zhang G, Zhang X, Fang B, Wang L. Dual Amplification Strategy for the Fabrication of Highly Sensitive Interleukin-6 Amperometric Immunosensor Based on Poly-Dopamine. *Langmuir* 2011,. 2011;27(3):1224–31.
60. Zhang J-J, Liu Y, Hu L-H, Jiang L-P, Zhu J-J. “Proof-of-principle” concept for

- ultrasensitive detection of cytokines based on the electrically heated carbon paste electrode. *Chem Commun.* 2011;47:6551–3.
61. Tertis M, Ionut P, Bogdan D, Suciú M, Graur F, Cristea C. Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2019;137:123–32. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.05.012>
 62. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60:1–8.
 63. Gonçalves MDL, Truta LAN, Sales MGF, Moreira FTC. Electrochemical Point-of-Care (PoC) Determination of Interleukin-6 (IL-6) Using a Pyrrole (Py) Molecularly Imprinted Polymer (MIP) on a Carbon- Screen Printed Electrode (C-SPE). *Anal Lett* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1879108>
 64. Shi J-J, He T-T, Jiang F, Abdel-halim ES, Zhu J-J. Ultrasensitive multi-analyte electrochemical immunoassay based on GNR-modified heated screen-printed carbon electrodes and PS@PDA-metal labels for rapid detection of MMP-9 and IL-6. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2014;55:51–6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.11.056>
 65. Li T, Yang M. Electrochemical sensor utilizing ferrocene loaded porous polyelectrolyte nanoparticles as label for the detection of protein biomarker IL-6. *Sensors Actuators B* [Internet]. 2011;158:361–5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2011.06.035>
 66. Peng J, Feng L-N, Ren Z-J, Jiang L-P, Zhu J-J. Synthesis of Silver Nanoparticle – Hollow Titanium Phosphate Sphere Hybrid as a Label for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Human Interleukin-6. *small.* 2011;7(2):2921–8.
 67. Fan G-C, Ren X-L, Zhu C, Zhang J-R, Zhu J-J. A new signal amplification strategy of photoelectrochemical immunoassay for highly sensitive interleukin-6 detection based on TiO₂/CdS/CdSe dual co-sensitized structure. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2014;59:45–53. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.011>
 68. Sardesai NP, Barron JC, Rusling JF. Carbon Nanotube Microwell Array for Sensitive Electrochemiluminescent Detection of Cancer Biomarker Proteins. *Anal Chem.* 2011;83:6698–703.
 69. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. Development of an ultra-sensitive electrochemical immunosensor using PPyr-NHS functionalized disposable ITO sheet for detection of interleukin 6 in real human serums. *New J Chem.* 2020;
 70. Tertis M, Melinte G, Ciui B, Imon IS, Stiuftuc R, Sandulescu R, et al. A Novel Label Free Electrochemical Magnetoimmunosensor for Human Interleukin-6 Quantification in Serum. *Electroanalysis.* 2018;30:1–12.
 71. Chen N, Yang H, Li Q, Song L, Gopinath SCB, Wu D. An Interdigitated Aptasensor to Detect Interleukin-6 for Diagnosing Rheumatoid Arthritis in Serum. *Biotechnol Appl Biochem.* 2021;
 72. Koyun A, Ahlatcıođlu E, İpek YK. Biosensors and Their Principles. A Roadmap

- Biomed Eng Milestones [Internet]. 2012;115–42. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/a-roadmap-of-biomedical-engineers-and-milestones/biosensor-and-their-principles>
73. Morales MA, Halpern JM. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconj Chem*. 2018;29(10):3231–9.
 74. Mutneja M, Mohan C, Long KD, Das C. An introduction to Antibodies and their applications. 3.^a ed. Mutneja M, editor. EMD Millipore; 2014.
 75. Yang T, Wang S, Jin H, Bao W, Huang S, Wang J. An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. *Sensors Actuators B* [Internet]. 2013;178:310–5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.107>
 76. Liang K, Mu W, Huang M, Yu Z, Lai Q. Interdigitated Conductometric Immunosensor for Determination of Interleukin-6 in Humans Based on Dendrimer G4 and Colloidal Gold Modified Composite Film. *Electroanal* 18., 2006;18:1505–10.
 77. Aydın EB, Aydın M, Sezgintürk MK. A novel electrochemical immunosensor based on acetylene black/epoxy-substituted-polypyrrole polymer composite for the highly sensitive and selective detection of interleukin 6. *Talanta* [Internet]. 2021;222. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121596>
 78. Lou Y, He T, Jiang F, Shi J-J, Zhu J-J. A competitive electrochemical immunosensor for the detection of human interleukin-6 based on the electrically heated carbon electrode and silver nanoparticles functionalized labels. *Talanta* [Internet]. 2014;122:135–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.016>
 79. Nunes GS. MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS PARA ANÁLISE DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS: CONCEITOS, ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS. *Quim Nov*. 2005;28(3):462–71.
 80. Ospina JD. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomédica*. 2020;40(1):148–65.
 81. Zhou W, Huang PJ, Ding J, Liu J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst*. 2014;139:2627–40.
 82. Cerqueira SMV. Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para monitorização da radioterapia no melanoma. Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2019.
 83. Song S, Wang L, Li J, Zhao J, Fan C. Aptamer-based biosensors. *Trends Anal Chem*. 2008;27(2):108–17.
 84. Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ. Biosensor Recognition Elements. *Curr Issues Mol Biol*. 2008;10:1–12.
 85. Jo WC, Yang SH, Ali F. Molecular imprinted polymers for separation science : A review of reviews. *J Sep Sci*. 2013;36(3):609–28.
 86. Cabral-miranda G, Gidlund M, Sales MGF. Backside-surface imprinting as a new strategy to generate specific plastic antibody materials. *J Mater Chem B*.

- 2014;2(20):3087–95.
87. Li Q, Yang K, Liang Y, Jiang B, Liu J, Zhang L, et al. Surface Protein Imprinted Core – Shell Particles for High Selective Lysozyme Recognition Prepared by Reversible Addition – Fragmentation Chain Transfer Strategy. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(24)::21954-60.
 88. Chen W, Pan J, Meng Z, Pan G, Sellergren B. Molecularly Imprinted Polymers with Stimuli-Responsive Affinity: Progress and Perspectives. *Polymers (Basel)*. 2015;7:1689–715.
 89. Ribeiro JA, Pereira CM, Silva AF, Sales MGF. Disposable electrochemical detection of breast cancer tumour marker CA 15-3 using poly(Toluidine Blue) as imprinted polymer receptor. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2018; Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.03.011>
 90. Hillberg AL, Tabrizian M. Biomolecule imprinting : Developments in mimicking dynamic natural recognition systems. *ITBM-RBM*. 2008;29:89–104.
 91. Turner NW, Jeans CW, Brain KR, Allender CJ, Hlady V, Britt DW. From 3D to 2D : A Review of the Molecular Imprinting of Proteins. *Biotechnol Prog*. 2006;22(6):1474–89.
 92. Merkok A, Alegret S. New materials for electrochemical sensing IV . Molecular imprinted polymers. *Trends Anal Chem*. 2002;21(11):717–25.
 93. Moreira FTC, Dutra RAF, Noronha JPC, Cunha AL, Sales MGF. Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2011;28:243–50. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.026>
 94. Wang Y, Zhang Z, Jain V, Yi J, Mueller S, Sokolov J, et al. Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting : Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sensors Actuators B B* [Internet]. 2010;146:381–7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2010.02.032>
 95. Dally S. Transdutores Ópticos para Testes Veiculares. 1993;23–34.
 96. Damborsk P, Svitel J, Katri J. Optical biosensors. *Essays Biochem*. 2016;60:91–100.
 97. Liu G, Zhang K, Nadort A, Hutchinson MR, Goldys EM. Sensitive Cytokine Assay Based on Optical Fiber Allowing Localized and Spatially Resolved Detection of Interleukin-6. *ACS Sens*. 2017;2(2):218–226.
 98. Lima CGM. Transdutores Piezoelétricos na Recolha da Energia Cinética das Vibrações. Universidade da Beira Interior; 2018.
 99. Pohanka M. Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials (Basel)*. 2018;11(3).
 100. Mehrotra P. Biosensors and their applications – A review. *J Oral Biol Craniofac Res* [Internet]. 2015; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
 101. The DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*. 2001;16:121–

31.

102. Caridade CIMGB. Eléttodos de Filme de Carbono: caracterização e aplicação em sensores e biossensores eletroquímicos. Universidade de Coimbra; 2008.
103. Kissinger PT, Heineman WR. Cyclic Voltammetry. *J Chem Educ.* :702–6.
104. Carvalho LA de, Andrade AR de. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. *Quim Nov.* 2006;29(4):796–804.
105. Stefano JS. Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de ciprofloxacina Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para. Universidade Federal de Uberlândia; 2016.
106. Rodrigues ADG, Galzerani JC, Departamento. Espectroscopias de infravermelho , Raman e de fotoluminescência : potencialidades e complementaridades. *Rev Bras Ensino Física.* 2012;34(4):4309–18.
107. Monteiro GMM. Análise de Revestimentos Orgânicos por Espectroscopia de Infravermelho. Universidade Técnica de Lisboa; 2007.
108. Renishaw. What Raman spectroscopy can tell you [Internet]. [citado 25 de Março de 2021]. Disponível em: <https://www.renishaw.com.br/pt/what-raman-spectroscopy-can-tell-you--25800>
109. Metrohm Brasil. Autolab PGSTAT204 [Internet]. [citado 20 de Maio de 2021]. Disponível em: <https://www.metrohm.com/pt-br/products-overview/electrochemistry/autolab-compact-line/AUT204S>
110. Qin Q, Bai X, Hua Z. Electropolymerization of a conductive β -cyclodextrin polymer on reduced graphene oxide modified screen-printed electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *J Electroanal Chem* [Internet]. 2016;782:50–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.10.004>
111. Shishkanova T V., Habanová N, Řezanka M, Broncová G, Fitl P, Vršata M, et al. Molecular Recognition of Phenylalanine Enantiomers onto a Solid Surface Modified with Electropolymerized Pyrrole- β -Cyclodextrin Conjugate. *Electroanalysis.* 2020;32(4):767–74.
112. PZ CORMAY S.A. CORMAY SERUM HN CORMAY SERUM HP. 2015.
113. Pereira AC, Oliveira AEF, Bettio GB. β -Cyclodextrin electropolymerization: mechanism, electrochemical behavior, and optimization. *Chem Pap* [Internet]. 2019;73(7):1795–804. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00732-x>
114. UCSD Molecule Pages. Interleukin 6 [Internet]. [citado 30 de Outubro de 2021]. Disponível em: <http://www.signaling-gateway.org/molecule/query;jsessionid=84f9144b229c7ae7181555084f08b9ddc19060c09b13?afcsid=A004204>