

Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção de um biomarcador associado ao cancro da próstata

Margarida Mota Coito Carvalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biociências

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutor Felismina Moreira

Co-orientador: Prof. Doutor Luís Passarinha

outubro de 2022

Folha em branco

Declaração de Integridade

Eu, Margarida Mota Coito Carvalho, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10988 do Mestrado em Biotecnologia da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 01/10/2022

Folha em branco

Dedicatória

Dedico com todo o carinho esta dissertação aos meus pais, que me apoiaram durante todo este processo e se certificaram que teria todas as condições para assegurar o meu futuro, sem eles não teria chegado onde cheguei.

Folha em branco

Agradecimentos

Em especial, começo por agradecer à minha orientadora, a Doutora Felismina Moreira, por todo o apoio, dedicação e carinho ao longo deste trabalho.

Ao *Biomark*, *Sensor Research*, agradeço a toda a equipa que me recebeu de braços abertos e que esteve sempre pronta a ajudar.

Gostaria também de agradecer ao meu co-orientador, o Prof. Doutor Luís Passarinha, que apesar da distância se manteve sempre a par de todo o trabalho, sempre disponível a ajudar.

Agradeço também a todos os professores ao longo destes dois anos de mestrado, pois graças a eles consegui definir objetivos e metas para o meu futuro.

Por último, agradeço aos meus pais, ao meu namorado e aos meus familiares, por todo o apoio e por toda a força que me deram durante este percurso.

Folha em branco

Resumo

O cancro da próstata (PCa) define-se por ser o tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado em todo o mundo, entre pessoas do sexo masculino. De acordo com a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, em Portugal a taxa de incidência desta doença oncológica ronda em torno dos 20%, podendo aumentar esta percentagem para 22.4% em homens de idade mais avançada. A *Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1 (STEAP1)* é uma proteína integral com seis domínios transmembranares, que desempenha funções cruciais na comunicação celular, em processos de adesão celular, atuando como proteína transportadora e canal iónico, e na estimulação do crescimento das células, o que poderá contribuir para a progressão e agressividade de um tumor. Inúmeros estudos demonstraram que a expressão da STEAP1 é maioritariamente restringida à próstata, encontrando-se em níveis de expressão mais elevados em tecidos neoplásicos da próstata, comparativamente a tecidos saudáveis. Assim, a STEAP1 pode ser considerada um biomarcador altamente específico para o PCa.

Posto isto, o principal objetivo deste trabalho foca-se no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico com base em polímeros de impressão molecular (*do inglês, molecularly-imprinted polymer, MIP*) para a deteção e monitorização do PCa, através da deteção da STEAP1. Para a deteção específica e seletiva da proteína foi utilizado um material MIP obtido através da eletropolimerização da mistura da STEAP1 com um polímero (ácido pirrol-2-carboxílico). Após a eletropolimerização da mistura na superfície do elétrodo de trabalho, a proteína foi removida da matriz polimérica através de um tratamento enzimático por meio da tripsina, dando origem às cavidades molde específicas para a deteção posterior da STEAP1.

De forma a controlar as modificações realizadas à superfície do biossensor, foi utilizada a análise por espectroscopia de *Raman* e técnicas analíticas, nomeadamente impedância eletroquímica (*do inglês, electrochemical impedance spectroscopy EIS*) e voltametria cíclica (*do inglês, cyclic voltammetry CV*). Adicionalmente, recorreu-se à microscopia eletrónica de superfície (*do inglês, surface electron microscopy SEM*) para a análise morfológica da superfície do biossensor ao longo das diferentes modificações.

A análise do desempenho analítico do biossensor foi realizada recorrendo às técnicas de EIS e de voltametria de onda quadrada (*do inglês, square wave voltammetry SWV*) através da avaliação da resposta obtida com soluções padrão entre 0.00013 µg/mL

e 13 $\mu\text{g/mL}$ de STEAP1 preparadas em PBS e num meio mais complexo, o *pellet* de extratos celulares LNCaP.

De forma geral, o biossensor apresentou um bom desempenho analítico, demonstrando boa sensibilidade e linearidade de resposta, em ambos os meios. A avaliação da seletividade do biossensor foi realizada recorrendo a três possíveis espécies interferentes, através da incubação destes em mistura com uma dada concentração de STEAP1, sendo posteriormente avaliada a variação da resposta.

Face ao referido, o biossensor desenvolvido neste trabalho apresentou características essenciais como seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade para a sua aplicação em pesquisa médica e clínica na deteção da STEAP1 para um diagnóstico e prognóstico não evasivo do cancro da próstata.

Palavras-chave

Cancro da próstata; biossensor; STEAP1; polímeros de impressão molecular.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is defined as the most frequently diagnosed cancer worldwide among males. In Portugal, the incidence rate of this disease is around 20%, and this percentage may increase to 22.4% in older men. Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1 (STEAP1) is an integral protein with six transmembrane domains, which plays crucial roles in cell communication, cell adhesion processes, acting as a carrier protein and ion channel, and in stimulating cell growth, which may contribute to tumor progression and aggressiveness. Numerous studies have shown that STEAP1 expression is mostly restricted to the prostate, being found at higher expression levels in prostate neoplastic tissues compared to healthy tissues. Thus, STEAP1 can be considered a highly specific biomarker for PCa.

Therefore, the main objective of this work is focused on the development of an electrochemical biosensor based on molecularly imprinted polymer (MIP) for the detection and monitoring of PCa, through the detection of STEAP1. For the specific and selective detection of the protein was used a MIP material obtained by electropolymerization of the mixture of STEAP1 with a polymer (pyrrol-2-carboxylic acid). After electropolymerization the mixture on the working electrode surface, the protein was removed from the polymeric network by enzymatic treatment with trypsin, giving rise to the specific template cavities for further STEAP1 detection.

In order to control the modifications made to the biosensor surface, Raman spectroscopy and analytical techniques, namely electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) were used. In addition, surface electron microscopy (SEM) was used for the morphological analysis of the biosensor surface throughout the different modifications.

The analytical performance of the biosensor was analyzed using EIS and square wave voltammetry (SWV) techniques by evaluating the response obtained with standard solutions between 0.00013 $\mu\text{g/mL}$ and 13 $\mu\text{g/mL}$ of STEAP1 prepared in PBS and in a more complex medium, the pellet of LNCaP cellular extracts. Overall, the biosensor showed good analytical performance, demonstrating good sensitivity and linearity of response, in both media. The evaluation of the biosensor selectivity was performed using three possible interfering species, by incubating them in mixture with a given concentration of STEAP1, and then evaluating the response variation.

In view of the above, the biosensor developed in this work presented essential features such as selectivity, sensitivity, and reproducibility for its application in medical and clinical research in STEAP1 detection for non-evasive PCa diagnosis and prognosis.

Keywords

Prostate cancer; biosensor; STEAP1; molecularly imprinted polymers.

Índice

Capítulo 1- Fundamentação teórica	1
1.1 Cancro da próstata	1
1.1.1. Epidemiologia e Incidência	3
1.1.2. Fatores de risco	4
1.1.3. Diagnóstico	4
1.1.4. Biomarcadores associados ao cancro da próstata	7
1.1.5. Quantificação de Biomarcadores	12
1.2. Biossensores	14
1.2.1. Elementos de Biorreconhecimento	15
1.2.2. Transdutores	24
1.2.3. Análise Qualitativa dos Materiais	32
1.3. Objetivo geral da Dissertação.....	34
Capítulo 2- Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico	36
2.1. Procedimento Experimental	36
2.1.1. Materiais	36
2.2. Procedimentos Analíticos	41
2.2.1. Síntese do compósito CNTs-PAH/Ptd	42
2.2.2. Pré-tratamento eletroquímico	42
2.2.3. Fixação dos CNTs-PAH/Ptd na superfície do sensor	43
2.2.4. Síntese do MIP por eletropolimerização	44
2.2.5. Remoção da STEAP1.....	44
2.3. Análise do desempenho do biossensor	46
2.3.1. Curva de Calibração	46
2.3.2. Análise em <i>pellet</i> de extratos celulares LNCaP	47
2.3.3. Estudo da seletividade	48
2.4. Análise qualitativa dos materiais	49
2.4.1. Análise em Raman	49
2.4.2. Análise em SEM	49
Capítulo 3 – Discussão e Resultados.....	51
3.1. Construção do Biossensor	51
3.1.1. Síntese do MIP e do NIP.....	51
3.1.2. Efeito dos agentes de remoção na matriz polimérica	54

3.1.3. Otimização dos parâmetros de eletropolimerização	58
3.1.4. Estudo das condições de concentração de STEAP1	62
3.1.5. Estudo do efeito do compósito CNTs-PAH/Ptd na etapa de detecção	66
3.1.6. Avaliação da performance do biossensor na detecção de STEAP1 em <i>pellet</i> de extratos celulares LNCaP	67
3.1.7. Estudo da seletividade do biossensor	68
3.2. Caracterização dos Materiais	71
3.2.1. Caracterização físico-química em Raman	71
3.2.2. Microscopia eletrônica de superfície (SEM)	73
Capítulo 4 – Conclusão e Perspetivas Futuras	77
Referências Bibliográficas.....	80

Lista de Figuras

Figura 1.1: Localização da próstata. Imagem adaptada de [5].	1
Figura 1.2: Esquema relativo à constituição geral de um biossensor. Imagem adaptada de [46].	14
Figura 1.3: Componentes que caracterizam um biossensor. Figura adaptada de “Biosensors Classification and Applications”, por BioRender.com (2022).	15
Figura 1.4: Esquema ilustrativo de um biossensor enzimático.	16
Figura 1.5: Esquema ilustrativo de um genossensor.	17
Figura 1.6: Esquema ilustrativo de um imunossensor.	17
Figura 1.7: Esquema ilustrativo de um biossensor que utiliza aptâmeros como elementos de biorreconhecimento.	18
Figura 1.8: Esquema ilustrativo de um biossensor que utiliza polímeros de impressão molecular como elemento de biorreconhecimento. Em (A) tanto a molécula molde como os monómeros encontram-se livres em solução e, após um processo de polimerização ocorre a formação de uma matriz polimérica que envolve a molécula através de interações não covalentes (B). Seguidamente, é realizada a remoção da molécula molde ficando apenas a sua cavidade específica na matriz polimérica (C). Por fim, aquando do contacto do biossensor com uma solução que contém o analito, ocorre uma ligação altamente específica e seletiva deste às cavidades da molécula molde, ao qual é denominado de processo de religação (D).	20
Figura 1.9: Exemplo de voltamograma [81].	27
Figura 1.10: Exemplo de gráfico obtido através da técnica de SWV. Imagem adaptada de [83].	28
Figura 1.11: Gráfico de Bode [95].	30
Figura 1.12: Gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de [97].	31
Figura 1.13: Imagem ilustrativa de um sensor impedimétrico. Em (A) está presente apenas a superfície do WE modificada com o elemento de biorreconhecimento e em (B) a ligação/interação do analito ao elemento de biorreconhecimento, com os respetivos gráficos de EIS. É de notar que, neste caso exemplar, a ligação do analito provocou um aumento da resistência na superfície do WE, dados observados através do gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de [97].	32
Figura 1.14: Exemplo de espectro de <i>Raman</i> específico para a grafite. Imagem adaptada de [101].	33

Figura 2.1: Potenciostáto/galvanostato Metrohm Autolab.	37
Figura 2.2: (A) Caixa conectora DropSens (DRP-DSC). (B) Chips C-SPE DropSens (DRP-C110).....	37
Figura 2.3: Thermo Scientific DXR Raman.....	37
Figura 2.4: Esquema ilustrativo referente à preparação de diferentes padrões através de diluições consecutivas da solução mãe concentrada de STEAP1 (130 µg/mL). .	39
Figura 2.5: Esquema que ilustra as diferentes etapas na construção de um biossensor eletroquímico com base num MIP para a detecção da proteína STEAP1.	41
Figura 3.1: Resultados da leitura em solução redox de ferro após a fixação de CNTs-PAH/Ptd. (A) representa o gráfico de EIS antes e depois da fixação do compósito. (B) representa o gráfico de CV antes e após a fixação do compósito.	52
Figura 3.2: Resultados relativos às leituras com a solução redox de ferro para (i) C-SPE após pré-tratamento eletroquímico, (ii) após a fixação à superfície do compósito CNTs-PAH/Ptd e (iii) após eletropolimerização para MIP (A) e NIP (B).	53
Figura 3.3: Resultados de leituras com solução redox de ferro referentes à técnica EIS (A1 e B1) e CV (A2 e B2) após incubação de quatro diferentes agentes de remoção em MIP (A) para: (i) MIP + proteinase K; (ii) MIP + proteinase K + ácido oxálico; (iii) MIP + tripsina a pH 6; (iv) MIP + tripsina a pH fisiológico e em NIP (B) para: (i) NIP + proteinase K; (ii) NIP + proteinase K + ácido oxálico; (iii) NIP + tripsina a pH 6; (iv) NIP + tripsina a pH fisiológico.	56
Figura 3.4: Resultados relativos à calibração com os diferentes padrões, utilizando a tripsina a pH fisiológico como agente de remoção. Em (A) está presente o gráfico relativo à SWV correspondente à calibração em PBS de um MIP. Em (B) estão presentes as retas de calibração com as respectivas barras de erro de triplicados de MIP e NIP.	58
Figura 3.5: Resultados relativos às leituras com solução redox de ferro para diferentes velocidades de varrimento (0.02 e 0.05 V/s). Em (A1) e (A2) estão presentes os gráficos de EIS e CV, respetivamente, para a velocidade de varrimento de 0.02 V/s. Em (B1) e (B2) estão presentes os gráficos de EIS e CV, respetivamente, para a velocidade de varrimento de 0.05 V/s.	60
Figura 3.6: Retas de calibração correspondentes ao MIP com 0.02 V/s e ao MIP com 0.05 V/s de velocidades de varrimento.	62
Figura 3.7: Resultados relativos às leituras com solução redox de ferro para diferentes concentrações de proteína (0.1 e 1 µg/mL). Em (A1) e (A2) representam-se os gráficos de EIS e CV, respetivamente, para a concentração de STEAP1 de 0.1 µg/mL. Em (B1) e (B2) estão presentes os gráficos de EIS e CV, respetivamente, para a concentração de STEAP1 de 1 µg/mL.	64

- Figura 3.8:** Retas de calibração com as médias de triplicados, juntamente com as respectivas barras de erro. (A) corresponde às retas de calibração de MIP com 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de STEAP1 e de NIP. (B) corresponde às retas de calibração de MIP com 1 $\mu\text{g/mL}$ de STEAP1 e de NIP.....65
- Figura 3.9:** Retas de calibração correspondentes a triplicados de MIP e NIP sem (A) e com (B) CNTs-PAH/Ptd.66
- Figura 3.10:** Reta de calibração correspondente aos triplicados de calibração em *pellet* de extratos celulares LNCaP de MIP. 68
- Figura 3.11:** Gráfico que representa os resultados do teste de seletividade realizado para diferentes espécies interferentes.69
- Figura 3.12:** Gráficos resultantes da análise em Raman para diferentes materiais sensores.72
- Figura 3.13:** Resultados relativos à análise por SEM de diferentes materiais sensores a diferentes ampliações (20 000, 50 000 e 100 000x). Em A) e B), respetivamente, estão apresentados os resultados relativos aos materiais sem o compósito CNTs-PAH/Ptd e os materiais funcionalizados com o compósito CNTs-PAH/Ptd.74

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Breve resumo das diferentes patologias que possam estar associadas à próstata e o seu papel no aparecimento e desenvolvimento do PCa [4], [10], [11].....	3
Tabela 1.2: Novo Sistema de Classificação de acordo com a escala de <i>Gleason</i> [23], [24].....	6
Tabela 1.3: Biomarcadores associados ao PCa [27]–[34].	8
Tabela 1.4: Proteínas pertencentes à família das STEAPs [38]–[42].....	10
Tabela 1.5: Componentes que constituem um biossensor [61].....	21
Tabela 1.6: Descrição das diferentes técnicas de polimerização [66]–[69]	23
Tabela 2.1: Lista de materiais e reagentes utilizados.....	38
Tabela 2.2: Lista de agentes de remoção utilizados e respetivo procedimento prático.	45
Tabela 2.3: Conjunto de soluções padrão de STEAP1 diluída em PBS e respetiva concentração.	47
Tabela 2.4: Conjunto de padrões preparados através da solução mãe de STEAP1 em <i>pellet</i> de extratos celulares LNCaP.	47
Tabela 2.5: Lista de parâmetros e respetiva configuração para a obtenção dos espectros em <i>Raman</i>	49
Tabela 3.1: Resultados dos valores de bandas e índice ID/IG resultantes da análise em <i>Raman</i>	72

Lista de Acrônimos

Ácido pirrol-2-carboxílico	PY-COOH
Antigénio carcinoembrionário	CEA
Antigénio de células estaminais da próstata	PSCA
Antigénio de membrana específico da próstata	PSMA
Antigénio específico da próstata	PSA
Biópsia guiada por um ultrassom transretal	TRUS
Caixa conectora DropSens	DRP-DSC
Cancro da próstata.....	PCa
Cromatografia líquida de alta eficiência	HPLC
Eléctrodo de trabalho	WE
Ensaio de imunoabsorção enzimática	ELISA
Espectroscopia de impedância eletroquímica	EIS
Exame retal digital	DRE
Food and Drug Administration	FDA
Fosfatase ácido prostática	PAP
Gene do cancro da próstata 3	PCA3
Hiperplasia prostática benigna	BPH
International Agency for Research on Cancer	IARC
Limite de deteção.....	LOD
Microscópio electrónico de superfície.....	SEM
Nanopartículas de platina dendríticas aminadas com nanotubos de carbono	CNTs-PAH/Ptd
Neoplasia intraepitelial prostática	PIN
Polímero de impressão molecular	MIP
Polímero sem impressão molecular	NIP
Prostate Conditions Education Council	PCEC
Seis antigénios epiteliais transmembranosos da próstata 1	STEAP1

Seis antigénios epiteliais transmembranosos da próstata 2	STEAP2
Seis antigénios epiteliais transmembranosos da próstata 3	STEAP3
Seis antigénios epiteliais transmembranosos da próstata 4	STEAP4
Voltametria cíclica	CV
Voltametria de onda quadrada	SWV
Tampão fosfato salino.....	PBS

Capítulo 1- Fundamentação teórica

1.1 Cancro da próstata

O cancro da próstata (PCa) é considerado o tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado em todo o mundo em pessoas do sexo masculino. De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o PCa apresenta uma incidência de 7.3% em todo o mundo e de 20% em Portugal [1]. De entre vários fatores que podem aumentar o risco de desenvolvimento desta doença, os mais comuns são a idade avançada, a ancestralidade e o histórico familiar. Num estágio inicial de PCa, o paciente, em regra geral, não apresenta sintomas. No entanto, o maior desafio associado a esta doença oncológica foca-se na gestão do diagnóstico e respetivo tratamento de modo a alcançar o controlo da patologia, o que pode ser limitante para a sobrevivência e qualidade de vida do paciente [2], [3].

A próstata é considerada um órgão glandular, que pertence ao sistema genital masculino. Em termos anatómicos, esta está inserida abaixo na bexiga, à frente do ânus, envolvendo o início da uretra (Figura 1.1). A sua principal função incide na secreção de um fluido alcalino que auxilia a mobilidade e conteúdo nutricional do esperma, sendo um fator importante na ejaculação. Em termos de constituição, a próstata divide-se em quatro zonas, com arquitetura e compartimentalização distintas: zona periférica, central, de transição e quatro zonas fibromusculares, sendo que a maioria dos casos relatados de PCa têm origem na zona periférica [4].

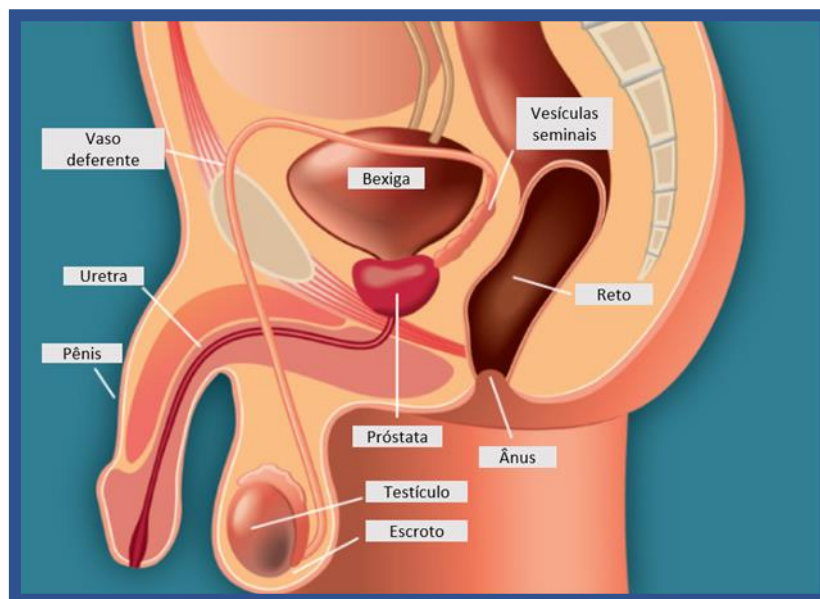


Figura 1.1: Localização da próstata. Imagem adaptada de [5].

O PCa apresenta elevada heterogeneidade, podendo variar desde tumores de baixo grau e tamanho, para tumores de dimensões elevadas, agressivos, colocando a vida do paciente em causa [6]. Neste sentido, é essencial compreender a origem e a função fisiológica das células que constituem a próstata, de modo a identificar os mecanismos celulares associados a esta patologia. Histologicamente, a próstata é constituída por dois tecidos diferentes, que originam diferentes compartimentos separados por uma membrana basal: o tecido estromal e epitelial, que contém um vasto número de diferentes tipos de células. O epitélio (tecido epitelial) é constituído por duas camadas de células, uma camada formada por células luminais e outra adicional que contém células basais [7]. Especificamente, estas células produzem diferentes tipos de proteínas associadas a diferentes patologias da próstata, algumas das quais referidas na Tabela 1. Relativamente ao compartimento de células estromais (tecido estromal), este é constituído por uma vasta gama de diferentes tipos de células, destacando-se em maior percentagem as células estromais e as células musculares lisas [8].

Existem várias hipóteses que explicam a origem celular do cancro da próstata. Uma das abordagens é que as células luminais terminalmente diferenciadas, ao sofrerem uma transformação, originam células parcialmente diferenciadas, que adquirem imortalidade. Outra possibilidade refere que a transformação oncogénica ocorre nas células estromais da próstata e não nas células luminais. Tal transformação, devido à diferenciação incompleta das células filhas, leva ao aparecimento de células proliferativas com um fenótipo luminal que, conseqüentemente, leva à geração do tumor [9].

De modo geral, o PCa é uma doença oncológica que, na maioria dos casos, tem início nas células glandulares secretoras do esperma e é denominado de adenocarcinoma (ou cancro glandular) que resulta, tal como outros tipos de cancro, de células que, ao sofrerem mutações, perdem a capacidade de controlar a sua proliferação e que, conseqüentemente, originam um tumor [4].

Existem diversas patologias associadas à próstata, que podem ou não ser consideradas precursoras do PCa, tal como pode ser observado na Tabela 1.1:

Tabela 1.1: Breve resumo das diferentes patologias que possam estar associadas à próstata e o seu papel no aparecimento e desenvolvimento do PCa [4], [10], [11].

Patologia	Descrição
Neoplasia intraepitelial prostática (PIN)	É considerado um carcinoma <i>in situ</i> , pode ser de elevado grau (precursor do PCa) ou de baixo grau (não precursor). Normalmente incide na zona periférica da próstata.
Adenocarcinoma da próstata	Patologia normalmente resultante de uma transição da neoplasia, na qual ocorreram alterações histológicas a nível das células epiteliais invasivas. A maioria dos casos de PCa são considerados adenocarcinomas.
Hiperplasia prostática benigna (BPH)	Patologia resultante do aumento do tamanho da glândula da próstata em homens de idade mais avançada. A BPH não é considerada uma precursora do PCa.

1.1.1. Epidemiologia e Incidência

Atualmente e de acordo com os dados apresentados pela IARC em 2022, em ambos os sexos e considerando todas as faixas etárias, o PCa apresenta uma taxa de incidência de 7.3% em todo o mundo, em relação a outros tipos de cancro. Especificamente e considerando apenas o sexo masculino, o PCa apresenta uma taxa de incidência de 14.1%. É também de salientar que, com a limitação da faixa etária, a taxa de incidência vai aumentando cada vez mais, podendo alcançar a percentagem de 17.6% em indivíduos do sexo masculino com idade compreendida entre os 65 e os +85, já que a idade avançada representa um dos fatores de risco do PCa [12]. Dados estatísticos preveem que, de 2020 a 2030, existirá um aumento percentual de 28.3% de doentes com PCa sem faixa etária definida [13].

Especificamente para Portugal, a IARC apresenta dados estatísticos atualizados que referem que o PCa apresenta uma taxa de incidência (em relação a outros tipos de cancro) de 20% em indivíduos do sexo masculino, compreendendo todas as idades. Neste caso, a maior taxa percentual (22.4%) enquadra-se em indivíduos com idade compreendida entre os 60 e +85 anos [1]. A IARC apresenta dados estatísticos que apontam para um aumento percentual de 16.1% em casos de PCa nos próximos anos (de 2020 até 2030) em indivíduos do sem faixa etária definida [14].

1.1.2. Fatores de risco

Diversos estudos têm sido realizados em torno dos possíveis fatores que possam influenciar o aparecimento e desenvolvimento de doenças oncológicas. No que diz respeito ao PCa, os fatores de risco com maior predominância são a idade avançada, a etnia, os fatores genéticos e o histórico familiar [3].

Segundo *Prashanth Rawla* e colaboradores, o risco de incidência de PCa, em casos em que não existe histórico familiar, aumenta aos 50 anos em homens brancos e aos 40 anos em homens de raça negra [15]. A etnia e os diferentes grupos raciais representam um fator de risco, o que poderá ser explicado tanto por fatores socioeconômicos como por fatores biológicos. Do ponto de vista socioeconômico, alguns grupos raciais recebem menos cuidados de saúde e, desta forma, existe uma menor frequência de diagnóstico (devido aos baixos cuidados de saúde). Por outro lado, fatores biológicos como a predisposição genética, levam a uma maior probabilidade de diagnóstico de PCa [16].

Um exemplo de fator biológico é abordado por *Prashanth Rawla* e colaboradores, que refere que homens Afro-Americanos possuem variantes mais comuns do cromossoma 8q24, que está associado a um risco acrescido de desenvolvimento de PCa. Além disso, também foi comprovado que homens Afro-Americanos contraem uma forma mais agressiva da doença, o que poderá estar associado a diferenças genéticas e biológicas [15].

No que diz respeito ao histórico familiar, este representa um fator de risco bem definido de PCa, segundo *Gayathri* e colaboradores, homens com histórico familiar, especialmente em casos de primeiro grau de parentesco, apresentam um risco acrescido de contrair PCa [17]. Posto isto, é necessário que exista um maior controlo e vigilância no caso de indivíduos com casos de PCa na família, de modo que haja um diagnóstico antecipado, para que o tratamento a efetuar apresente uma eficácia elevada [18].

Outros fatores como a dieta (nomeadamente o consumo de gordura animal, carnes vermelhas, vegetais, entre outros), o consumo de suplementos de vitaminas e minerais, a obesidade e a atividade física constituem outros fatores de risco que podem de alguma forma estar relacionados com o PCa [15].

1.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico do PCa num estágio inicial é fundamental para a sobrevivência e qualidade de vida do paciente, o que nem sempre acontece, uma vez que muitas vezes a doença só é diagnosticada numa fase mais avançada.

Este facto tem sido mais recorrente desde o início da pandemia relativa ao Coronavírus (que teve início no ano de 2020), na qual o foco médico foi deslocado no sentido de tratamento de pacientes infetados com o vírus, adiando o diagnóstico prévio de vários tipos de cancro, incluindo o PCa [5], [17].

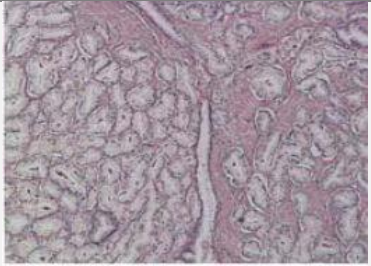
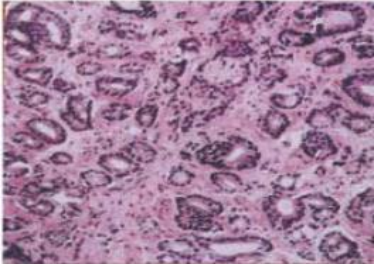
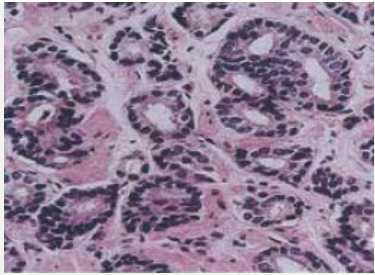
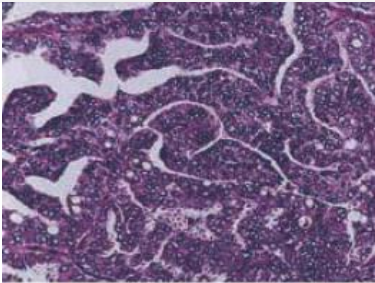
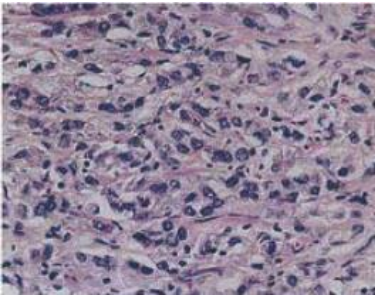
Em relação aos métodos de diagnóstico de PCa, os mais comuns são o exame retal digital (DRE), o *screening* do antígeno específico da próstata (PSA) na matriz biológica e a biópsia guiada por um ultrassom transretal (TRUS) [19], [20]. No entanto, segundo *Jean-Luc Descotes* e a equipa de investigação, a maioria dos pacientes diagnosticados são assintomáticos, apresentando um DRE normal e uma elevada concentração de PSA no sangue. É de salientar que, quando existe um elevado nível de PSA no sangue, é muito provável que este esteja associado a um maior risco de PCa. No entanto, é relevante referir que a PSA é uma proteína específica para os órgãos (próstata) e não do PCa e, desta forma, os níveis elevados desta proteína poderão estar associados a patologias benignas (como a BPH) e não especificamente relacionados com o PCa [6]. Assim, torna-se fundamental realizar uma biópsia (TRUS) para analisar o nível de PSA no contexto do estado clínico do paciente, relacionando também outros fatores de risco como o histórico familiar, a idade, entre outros já mencionamos anteriormente.

Por outro lado, devido à heterogeneidade do PCa, é fundamental avaliar o tamanho, localização e agressividade do tumor para que se consiga um melhor prognóstico e, conseqüentemente, um tratamento mais eficaz. Desta forma, o TRUS é realmente o método eleito para confirmar o diagnóstico do PCa [6]. No entanto, durante o procedimento clínico via TRUS, a agulha é posicionada de forma aleatória para colher a amostra de tecido, havendo alguma probabilidade de ocorrerem falsos negativos. Além disso, foram também relatados casos nos quais tumores de baixo grau foram confundidos com tumores agressivos, o que resultou num tratamento desnecessário e excessivo ao paciente, levando a efeitos colaterais indesejáveis [21].

Em termos de diagnóstico, é importante introduzir o conceito de escala de *Gleason*. Segundo o *Prostate Conditions Education Council* (PCEC) este conceito define-se por ser uma escala numérica fundamental para a classificação histológica da agressividade do cancro, podendo variar de 1 a 5, sendo atribuída a pontuação mais baixa em casos em que a biópsia mais se assemelha ao tecido saudável e, por contraste, a pontuação mais alta quando a biópsia se assemelha mais a tecido não saudável. No caso do PCa, uma vez que este é constituído por uma elevada heterogeneidade de células com diferentes graus de divisão celular, são atribuídos dois graus da escala de *Gleason*, o primeiro representa o grau das células que cobrem a maior área do tumor e o segundo das células que cobrem a restante área, sendo que a pontuação final resulta da soma das duas [21], [22].

Atualmente, o Novo Sistema de Classificação de PCa surgiu como uma extensão à escala de *Gleason* para que fosse possível determinar o estágio da patologia de forma mais simples e precisa. O novo sistema de classificação divide o PCa em cinco categorias, baseando-se em características patológicas e na escala de *Gleason* [23], tal como pode ser observado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Novo Sistema de Classificação de acordo com a escala de *Gleason* [23], [24].

Escala de <i>Gleason</i>	Descrição	Novo Sistema de Classificação	Exemplo
3+3=6	Estão apenas presentes glândulas bem desenvolvidas.	Escala 1	
3+4=7	A presença de glândulas bem desenvolvidas é maioritária, mas estão presentes algumas glândulas com má formação.	Escala 2	
4+3=7	As glândulas com má formação predominam relativamente às glândulas bem desenvolvidas.	Escala 3	
4+4=8	Apenas glândulas com má formação.	Escala 4	
9-10	Sem formação de glândulas e com/sem glândulas com má formação.	Escala 5	

De forma a definir a escala de *Gleason* para um tumor, sendo esta baseada numa avaliação histológica, é fundamental proceder a técnicas como a imunohistoquímica e a imunocitoquímica. A imunohistoquímica é uma técnica que, tal como o nome indica, utiliza anticorpos que reconhecem e se ligam especificamente a certos constituintes do tecido alvo funcionando como antígenos, o que permite a identificação de certas substâncias tanto no próprio tecido como nas células constituintes. Por outro lado, a imunocitoquímica é uma metodologia que recorre à utilização de imuno-ensaios de especificidade elevada para localizar o epítipo de um antígeno de interesse em esfregaços citológicos. A principal diferença entre as duas técnicas é que a imunohistoquímica utiliza amostras de tecidos, ao passo que a imunocitoquímica realiza a análise *in situ*, ou seja, diretamente num conjunto de células, o que é denominado de esfregaço citológico. No entanto, apesar de semelhantes, a imunocitoquímica tem a desvantagem de não se conseguir obter o nível de sucesso que se obtém com a imunohistoquímica, tendo esta igualmente desvantagens associadas, como é o caso do elevado tempo do processo, a sua complexidade e o elevado custo, principalmente associado ao uso de anticorpos [24].

1.1.4. Biomarcadores associados ao cancro da próstata

A identificação e desenvolvimento de biomarcadores específicos é essencial para que seja possível diagnosticar a doença oncológica antes que haja a sua progressão para um estado mais avançado, que poderá reduzir tanto a eficácia do tratamento como a qualidade de vida do paciente. Até ao momento já foram descritos diversos biomarcadores associados ao PCa, destacando-se o seu papel na avaliação do risco de desenvolvimento da patologia, obtenção de um diagnóstico fidedigno e subsequente prognóstico [25].

Na Tabela 1.3, estão descritos alguns dos biomarcadores que têm sido alvos de estudo, bem como a sua correlação com o PCa.

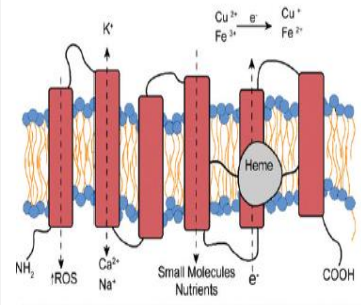
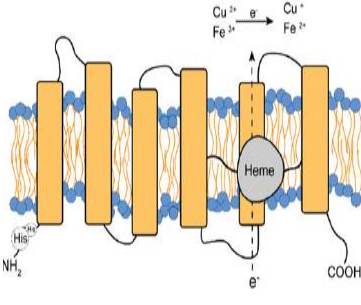
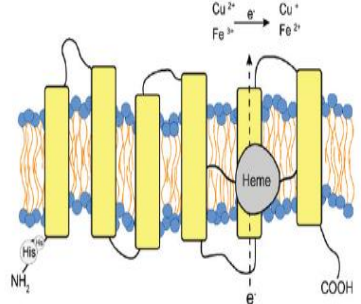
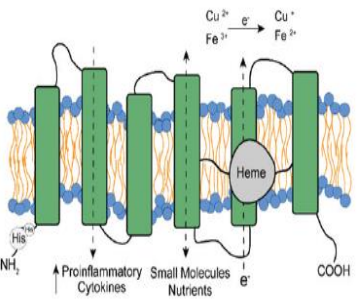
Tabela 1.3: Biomarcadores associados ao PCa [27]–[34].

Biomarcador	Definição	Correlação
Fosfatase ácido prostática (PAP)	Glicoproteína secretada pelo epitélio da próstata que está envolvido na liquidificação do esperma.	Progressão; Extensão das metástases; Prognóstico na diferenciação entre PCa intermédio e PCa de alto risco.
Antigénio de membrana específico da próstata (PSMA)	Metaloprotease de zinco de ligação à membrana, expressa pelas células epiteliais da próstata.	Progressão; Extensão das metástases; Tempo de recaída; Deteção em estágio inicial.
Antigénio de células estaminais da próstata (PSCA)	Proteína de superfície envolvida na sobrevivência das células estaminais.	Diagnóstico; Prognóstico; Biomarcador terapêutico.
Gene do cancro da próstata 3 (PCA3)	RNA não codificante exclusivamente sobreexpresso em neoplasias próstata.	Diagnóstico; Monitorização.
SCHLAP1	RNA longo não codificante, expresso em alguns casos de PCa.	Recorrência; Progressão e extensão das metástases; Discriminação entre formas agressivas e formas indolentes.
DLX1	Membro da família genética DLX <i>homeobox</i> , que pode atuar como oncogene de vários tipos de cancro.	Diagnóstico em estado precoce; <i>Target</i> terapêutico.
Seis antigénios epiteliais transmembranares da próstata (STEAP)	Família de proteínas com função de metaloredutases e de canais de iões em junções célula-célula, facilitando a comunicação celular.	Rastreio; Monitorização; Prognóstico.
Antigénio específico da próstata (PSA)	Protease de serina segregada por células epiteliais da próstata.	Deteção precoce; Progressão.

Em 1986, a PSA foi o primeiro biomarcador do PCa a ser aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), o que teve um enorme impacto em termos do diagnóstico do PCa em estágios mais precoces, em relação a outras técnicas de deteção utilizadas que apenas permitiam detetar a doença oncológica em estágios de metástases mais avançadas [26]. No entanto, é importante salientar que a PSA, que é secretada pelo epitélio da próstata, é específica de um órgão, não do cancro, o que significa que outros tipos de patologias que possam ocorrer na próstata também poderão alterar os níveis de PSA, como é o caso da BPH, os níveis de androgénios (aumentam os níveis séricos de PSA), a retenção urinária, entre outros fatores descritos [27]. Assim, podemos constatar que a PSA não apresenta muita especificidade no que diz respeito à sua utilização como um biomarcador do PCa [28]. Desta forma, a procura de outros biomarcadores associados ao PCa é fundamental.

Os seis antigénios epiteliais transmembranares da próstata (STEAP) são uma família de proteínas que são diferencialmente expressas em células do PCa. A família STEAP é constituída por 4 tipos de proteínas diferentes (STEAP1-4), que estão envolvidas em vários processos biológicos, como é o caso do controlo da proliferação celular, stresse oxidativo, entre outros [29].

Tabela 1.4: Proteínas pertencentes à família das STEAPs [38]–[42].

Proteína	Contribuição para o PCa	Expressão	Estrutura
STEAP1	Expressa no tecido prostático e em outros órgãos a baixos níveis. A sua superexpressão nas células cancerígenas inibe a apoptose, aumenta a proliferação celular e a invasão de células, induzindo também a transição de células epiteliais para mesenquimais, o que contribui para a progressão e agressividade do tumor.	Aumentada. Elevados níveis de STEAP1 estão relacionados com um mau prognóstico de PCa.	
STEAP2	Expressa principalmente no tecido prostático, podendo ser igualmente encontrada em outros órgãos (ovário, cérebro e pâncreas). Em condições de baixa regulação suprime a proliferação celular, a invasão das células e o potencial de metástase. Contrariamente, a sua superexpressão incrementa a capacidade de migração e invasão das células do PCa, podendo então ser uma proteína associada ao estado avançado do cancro.	Aumentada. Presente em níveis superiores no carcinoma do que em caso de hiperplasia, podendo ser correlacionada com a escala de <i>Gleason</i> .	
STEAP3	Expressa em níveis baixos em diferentes tipos de tecidos, estando em níveis de expressão mais elevados na medula óssea, no fígado e nos gânglios da raiz dorsal. Contém um elemento p53 que é ativado em resposta ao stress, o que sugere o seu papel na supressão dos tumores. Por outro lado, a sua elevada expressão está relacionada com a progressão do PCa em estágios mais avançados da doença, o que contribui para a metástase.	Aumentada. Elevados níveis de STEAP3 estão inversamente relacionados com a sobrevivência global do paciente.	
STEAP4	Altamente expressa no tecido adiposo, na medula óssea, no coração, na placenta, no pulmão e na próstata. A sua elevada expressão aumenta o stress oxidativo, o que incrementa a proliferação e a progressão do PCa.	Aumentada. O silenciamento na sua produção leva a um aumento de apoptose e inibição da proliferação celular.	

A STEAP1 foi a primeira proteína da família STEAP a ser descoberta. Relativamente à sua localização e estrutura, a biomolécula contém 6 domínios transmembranares ligados por dois *loops* intramembranares e três *loops* transmembranares, encontrando-se presente na membrana plasmática das células epiteliais, mais especificamente nas junções célula-célula, o que permite a comunicação celular [30]. A sua principal função foca-se na comunicação celular e na adesão das células, atuando como proteína transportadora e igualmente como canal de iões. Adicionalmente, a STEAP1 está igualmente envolvida no crescimento das células, através do aumento da concentração celular de espécies reativas de oxigénio [31]. A STEAP1 é principalmente expressa no epitélio da próstata, estando presente em níveis significativamente mais baixos em outros órgãos (rim, fígado, pâncreas e músculo esquelético). Altos níveis de expressão desta biomolécula estão relacionados com diferentes tipos de cancro, incluindo o PCa, o carcinoma pancreático, cancro da cabeça e do pescoço, entre outros [32].

No PCa, os níveis de expressão da STEAP1 são altamente elevados quando comparados aos níveis de expressão em tecidos saudáveis. Além disso, os níveis desta biomolécula também podem ser correlacionados com a progressão do tumor, o que sugere que esta poderá fornecer informações não só ao nível da presença do tumor, mas também do nível da sua agressividade. Adicionalmente, a STEAP1 encontra-se sobreexpressa antes do desenvolvimento do PCa, em doenças precursoras como as lesões interepiteliais da próstata, o que permite associar os seus níveis fisiológicos a um diagnóstico precoce de PCa. Já no caso de BPH (doença não precursora do PCa), a STEAP1 é expressa em níveis baixos, o que reduz a possibilidade de resultados falsos positivos e indução de tratamento excessivo e desnecessário ao paciente [28]. Finalmente, segundo *Sandra M.Rocha* e colaboradores, os níveis de expressão da STEAP1 podem também ser relacionados com a sobrevivência global do paciente, ou seja, níveis elevados da biomolécula poderão ser associados a uma menor probabilidade de sobrevivência do paciente [33], [34].

No entanto, apesar da STEAP1 apresentar características fundamentais como biomarcador do PCa, ainda não existem evidências concretas acerca da sua excreção pelas células, pelo que ainda não foram definidos os seus limites fisiológicos. Apesar desta questão, existem algumas evidências acerca da sua presença tanto no plasma como no soro humano [34], [35].

Desta forma, pode-se constatar que a STEAP1 como biomarcador do PCa apresenta inúmeras vantagens, como a sua alta especificidade, possibilidade de diagnóstico precoce, progressão da neoplasia e possível associação com a probabilidade de sobrevivência do paciente.

1.1.5. Quantificação de Biomarcadores

Atualmente, é essencial submeter potenciais biomarcadores a um método de análise, de modo que se obtenham informações essenciais acerca da sua função biológica, estrutura química e até dos níveis em que se encontram expressas num organismo. No caso de doenças oncológicas, como é o caso do PCa, a maioria dos casos de mortalidade deve-se ao diagnóstico da doença numa fase tardia. Assim, a deteção de biomarcadores e dos seus níveis de expressão é essencial para a identificação precoce de diversas patologias, assegurando assim um tratamento eficaz e melhorando a qualidade de vida dos pacientes [36], [37].

Na literatura, encontram-se descritos diferentes métodos utilizados para a quantificação e identificação de biomarcadores associados ao PCa, como é o caso de métodos óticos, métodos separativos e métodos bioquímicos [38]–[40]. No entanto, cada técnica apresenta limitações que as destacam das restantes, como é o caso do elevado custo e tempo associado, a necessidade de constantes otimizações e também a baixa eficiência e reprodutibilidade.

Os métodos óticos baseiam-se tanto em medidas de absorvância como de fluorescência, mais especificamente em fenómenos de emissão, difração, absorção refração, dispersão e polarização que ocorrem no espectro eletromagnético. Um dos métodos óticos mais utilizados é a espectroscopia, cujo princípio de funcionamento se foca na análise de radiação eletromagnética que pode ser absorvida ou emitida pelas substâncias, pelo que além de ser um método qualitativo também pode ser considerado quantitativo, uma vez que a luz que é absorvida pela amostra pode ser relacionada com a concentração de analito em solução. No entanto, aos métodos óticos estão associados a algumas desvantagens tais como a baixa sensibilidade, a complexidade no manuseio e o elevado custo associado a cada técnica [38].

Relativamente aos métodos separativos, nomeadamente os processos cromatográficos, estes constituem uma técnica de separação que se baseia na distribuição dos componentes de uma certa mistura (que contém o produto de interesse) entre duas fases, uma fase móvel e uma fase estacionária. No caso específico das proteínas, a cromatografia é principalmente aplicada como uma técnica de purificação, podendo também ser utilizada com o objetivo de quantificar a proteína de interesse. Dos inúmeros processos cromatográficos descritos na literatura, o mais usualmente aplicado a proteínas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). No entanto, podem ser associadas imensas limitações a este método, nomeadamente o elevado custo e tempo associado, a constante necessidade de otimizações e dificuldade no manuseio, a necessidade de um pré-tratamento da amostra e o facto de não permitir a portabilidade e a análise *in loco* [39].

Até ao momento, os imunoensaios, mais especificamente o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), tem sido o método de eleição para a análise de biomarcadores associados a uma variedade de doenças, como é o caso do PCa.

O seu princípio de funcionamento foca-se na utilização de anticorpos específicos para um dado antigénio (o biomarcador), de forma que haja uma identificação e quantificação tendo por base a ligação altamente específica anticorpo/biomarcador. No entanto, tais ensaios requerem um elevado custo, devido à utilização de enzimas e anticorpos naturais, um elevado tempo de manipulação associado, por ser uma técnica que exige vários procedimentos, um elevado cuidado nas condições de armazenamento, devido a utilização de elementos de reconhecimento naturais que poderão tornar-se instáveis caso os kits de teste não sejam armazenados em condições específicas de temperatura, o que leva à impossibilidade de análise *in loco*. Os fatores referidos têm vindo a limitar e a colocar em causa a utilização de imunoensaios como técnicas de deteção [37], [41].

Na literatura estão relatados trabalhos de imunoensaios com a STEAP1, como exemplo o trabalho desenvolvido por *Mallory R. Gordon* e colaboradores, que recorre ao método ELISA para detetar o anticorpo anti-STEAP1 com o objetivo de estudar o efeito de um fármaco conjugado de anticorpo como uma terapia emergente no tratamento do PCa [42].

Como alternativa, os biossensores surgem como uma tecnologia emergente com a capacidade de detetar e mensurar de forma rápida e precisa um biomarcador, fornecendo a capacidade de monitorização tanto da angiogénese como da metástase do tumor, de forma a que além da deteção da doença, possa ser determinada a eficácia de um agente terapêutico ao longo do tratamento da oncologia [43]. Ao longo deste trabalho será abordada uma revisão acerca da vasta área dos biossensores, sendo esse o foco do trabalho.

1.2. Biossensores

Os biossensores constituem uma ferramenta inovadora que surgiu como uma alternativa aos métodos convencionais de análise anteriormente referidos, de forma a colmatar as limitações associadas a estes [44].

De forma geral, um biossensor é um aparelho constituído por 3 componentes principais: (i) biorreceptor (ou elemento de biorreconhecimento); (ii) transdutor e (iii) sistema de componentes eletrónicos. A combinação destes componentes resulta na possibilidade de detetar e/ou quantificar analitos de elevada importância biológica, tais como biomarcadores associados a diversas doenças, como o PCa. A interação entre o biorreceptor e o analito de interesse resulta numa alteração das propriedades físico-químicas, sendo estas posteriormente detetadas pelo transdutor, que tem como principal função transformar um sinal biológico (interação biorreceptor/analito) num sinal que possa ser mensurável (resposta eletrónica) [44], [45].

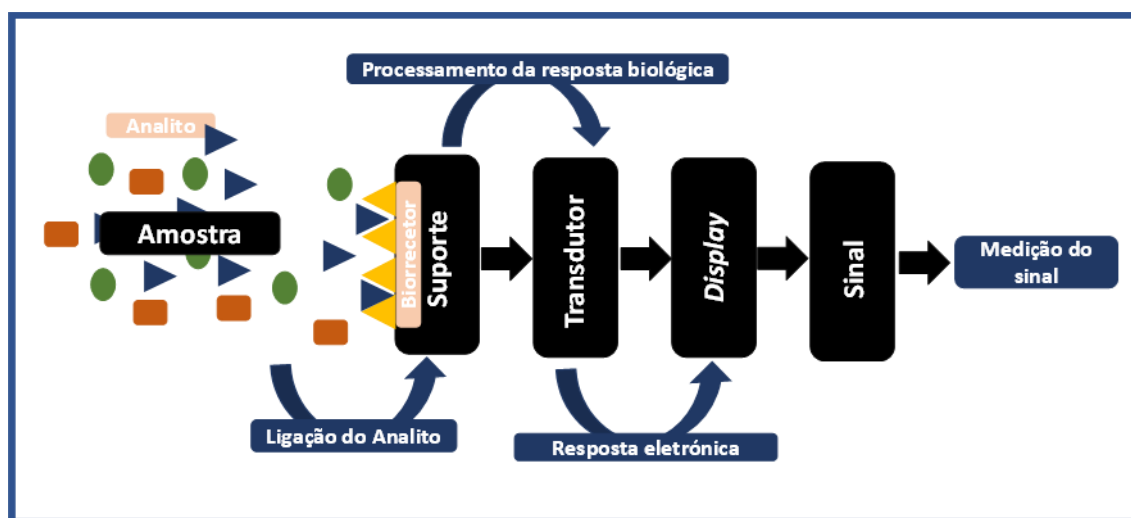


Figura 1.2: Esquema relativo à constituição geral de um biossensor. Imagem adaptada de [46].

Atualmente, os biossensores são utilizados numa vasta gama de aplicações e podem ser aplicados em inúmeras áreas, tais como a indústria alimentar, a área ambiental, o setor marítimo e a área da saúde, mais especificamente na deteção e na monitorização de doenças (através da análise dos biomarcadores associados) bem como no estudo de novos fármacos [47].

Até ao momento não foram relatados estudos na área dos biossensores envolvendo a STEAP1, o que seria de prever uma vez que ainda existe pouca informação relativamente aos níveis fisiológicos e ao comportamento desta biomolécula no tumor. No entanto, em relação à PSA estão relatados na literatura vários biossensores, como é o caso de biossensores piezoelétricos, biossensores eletroquímicos, biossensores óticos, entre outros [48]–[50].

Ao longo deste tópico será realizada uma revisão acerca dos principais componentes de um biossensor, como é o caso dos diferentes elementos de biorreconhecimento que podem ser utilizados e da variedade de transdutores que podem ser implementados, originando a tão diversa gama de biossensores atualmente estudados e aplicados nas mais diversas áreas.

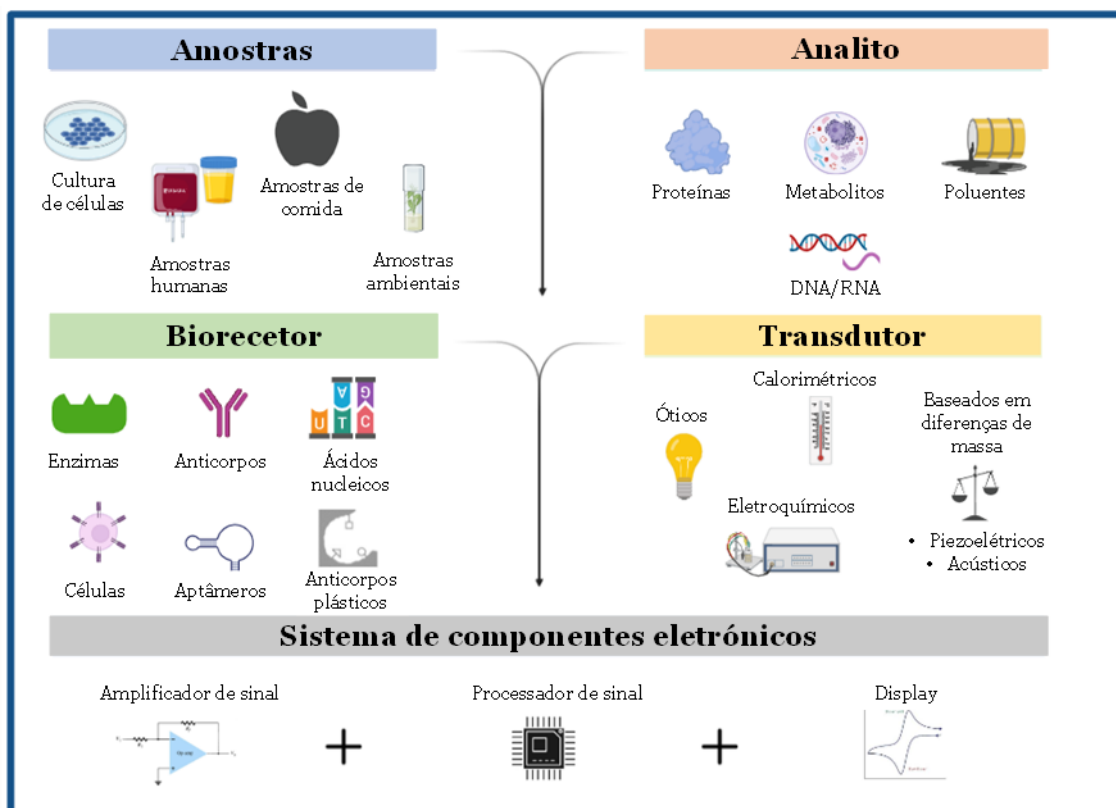


Figura 1.3: Componentes que caracterizam um biossensor. Figura adaptada de “Biosensors Classification and Applications”, por BioRender.com (2022).

1.2.1. Elementos de Biorreconhecimento

O elemento de biorreconhecimento é um dos principais componentes de um biossensor, influenciando parâmetros como a sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade e reutilização do dispositivo. De forma geral, a função deste elemento consiste em fornecer afinidade e seletividade de forma a que o analito de interesse se ligue ou interaja especificamente com o biossensor [50]. É também relevante realçar que a escolha do elemento de biorreconhecimento está altamente dependente do tipo de analito que se pretende detetar e/ou quantificar.

I. Enzimas

Os biossensores que utilizam enzimas como elemento de biorreconhecimento podem ser denominados de biossensores enzimáticos. Estas biomoléculas contêm uma estrutura 3D com cavidades de ligação às quais o analito se liga com elevada especificidade. No entanto, a utilização de enzimas como biorreceptores tem algumas limitações, como é o caso da sua baixa estabilidade, quer através da utilização de solventes orgânicos, como na sua exposição a temperaturas altas, em fatores que podem levar à sua desnaturação por perda da sua estrutura biologicamente ativa, com consequente perda de atividade [50], [51].

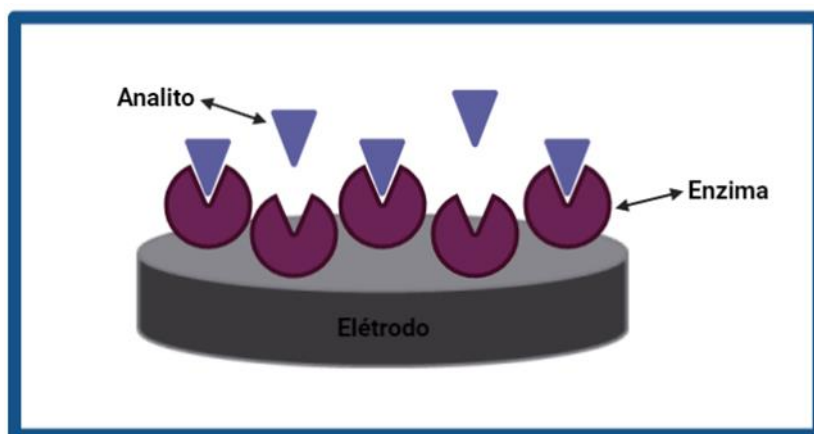


Figura 1.4: Esquema ilustrativo de um biossensor enzimático.

II. Ácidos nucleicos

Os biossensores que utilizam ácidos nucleicos como elementos de biorreconhecimento são denominados de genossensores. O seu princípio de funcionamento baseia-se na complementaridade das cadeias, ou seja, assim que definida a sequência do analito, é produzida artificialmente uma cadeia complementar que será posteriormente imobilizada na superfície do eléctrodo como biorreceptor. No entanto, apesar da elevada especificidade da complementaridade das cadeias, a sua aplicação é limitada apenas quando o objetivo é detetar/quantificar um ácido nucleico [52].

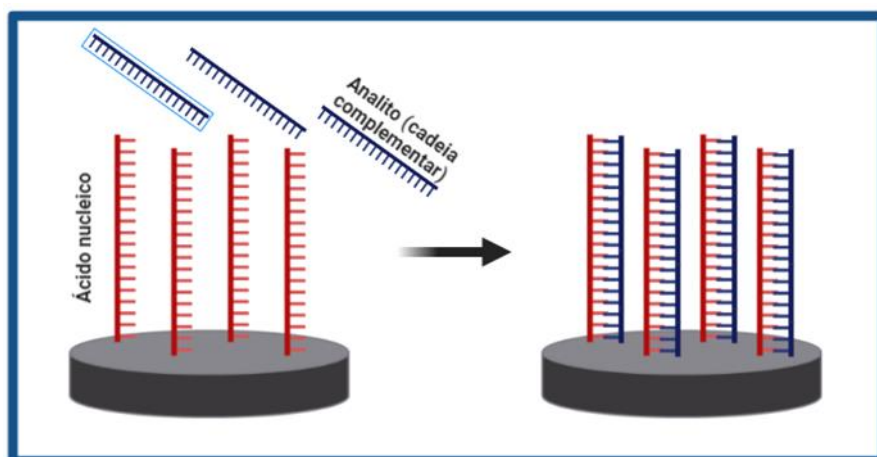


Figura 1.5: Esquema ilustrativo de um genossensor.

III. Anticorpos

Os biossensores que utilizam anticorpos como elementos de biorreconhecimento são denominados de imunossensores. O princípio de funcionamento baseia-se na imobilização de um anticorpo na superfície do eletrodo e, após o contacto do imunossensor com a amostra biológica, o analito de interesse, que funciona como antígeno, liga-se especificamente e seletivamente ao anticorpo imobilizado, dando-se a formação de um imunocomplexo altamente estável. Contudo, a utilização de anticorpos está associada a um elevado custo do processo, não só no caso de anticorpos comerciais, mas também no caso da sua produção recombinante ou sintética, uma vez que além de exigir estudos em animais, são necessárias etapas *downstream* de isolamento e purificação [50], [52].

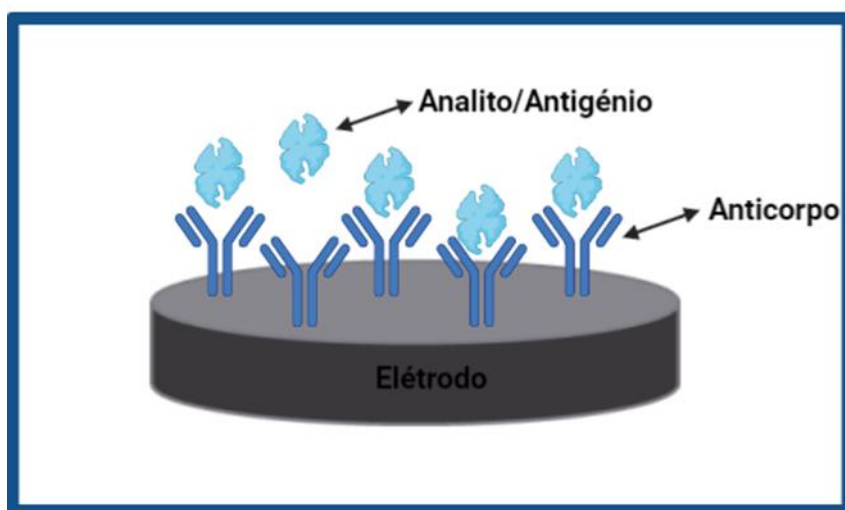


Figura 1.6: Esquema ilustrativo de um imunossensor.

IV. Aptâmeros

Os aptâmeros são oligonucleótidos de cadeia simples que podem ser imobilizados na superfície de um biossensor com o objetivo de ligar especificamente várias moléculas, como é o caso de íões metálicos, proteínas, pequenas moléculas e até outro tipo de analitos mais complexos, como é o caso de células inteiras. A principal vantagem na sua utilização foca-se na sua versatilidade, sendo que estes além de apresentarem maior estabilidade do que os ácidos nucleicos e do que os anticorpos, possuem uma estrutura que pode divergir entre três diferentes estados: aptâmero livre, aptâmero ligado ao alvo e aptâmero ligado a DNA complementar. No entanto, os aptâmeros apresentam uma elevada sensibilidade ao pH, sendo que em condições muito ácidas pode dar-se a sua depuração. Além disso, o elevado custo associado à produção de uma sequência de aptâmero altamente específica para o alvo ainda é um fator a ser ponderado no *design* destes biossensores [50], [53].

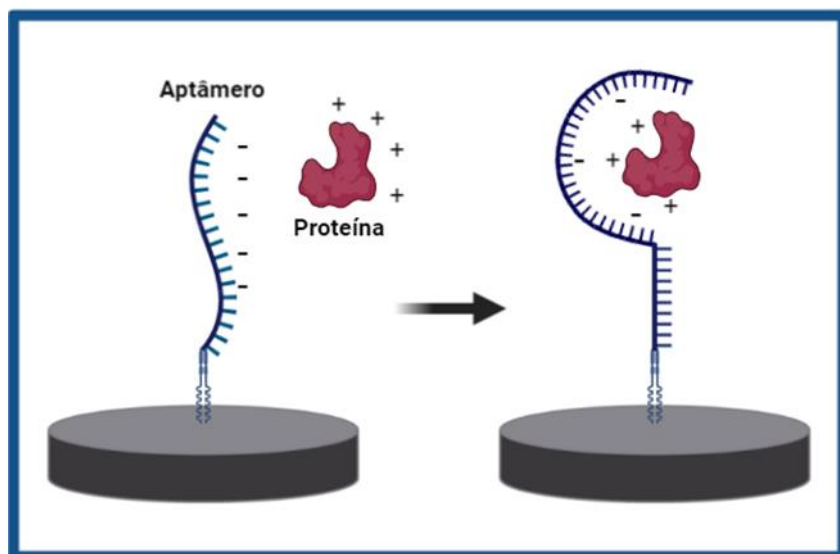


Figura 1.7: Esquema ilustrativo de um biossensor que utiliza aptâmeros como elementos de biorreconhecimento.

V. Células

Nos últimos anos, uma ampla variedade de diferentes tipos de células têm sido imobilizadas na superfície dos biossensores. A principal vantagem na sua utilização foca-se na produção de um biossensor de forma mais simples e económica do que no caso da utilização de biomoléculas como enzimas e anticorpos. Além disso, a utilização de células vivas torna possível a produção de uma resposta quantitativa a certos estímulos, devido a terem a capacidade de expressar uma ampla variedade de recetores específicos, o que permite também a deteção e quantificação de mais do que um analito através de um único biossensor.

No entanto, a vida útil de armazenamento, a sua regeneração, a baixa seletividade e a alta probabilidade de ligações não específicas são fatores ainda a ter em consideração antes da produção deste tipo de biossensores em larga escala [54], [55].

VI. Polímeros de Impressão Molecular (MIPs)

Os elementos de biorreconhecimento que provém de fontes naturais, apesar de possuírem uma elevada afinidade e seletividade para o analito, em muitos casos têm a sua aplicação limitada devido à sua durabilidade, estabilidade em certas condições (como a temperatura e pH), apresentando a longo prazo uma baixa estabilidade e, conseqüente perda de atividade, sem referir os altos custos que provém da sua produção, especialmente no caso dos anticorpos [56]. Devido a estas restrições, nos últimos anos a tecnologia de impressão molecular tem-se tornado cada vez mais um método alternativo à utilização de biomoléculas de origem natural, valorizando-se por ser uma alternativa mais barata, simples e de alta especificidade e seletividade para o analito de interesse [51].

Os polímeros de impressão molecular (MIPs), também denominados de anticorpos plásticos, são produzidos sinteticamente através da junção de uma molécula molde (analito), com monómeros que, após um processo de polimerização, formam uma rede polimérica altamente estável que envolve o molde através de ligações não covalentes. Em seguida, a molécula molde é removida da matriz através de métodos químicos ou enzimáticos, levando à formação de cavidades de ligação específicas em tamanho, forma e funcionalidade para o analito em solução. A Figura 1.8 representa de forma sucinta e esquemática o processo geral de produção de MIPs [56], [57].

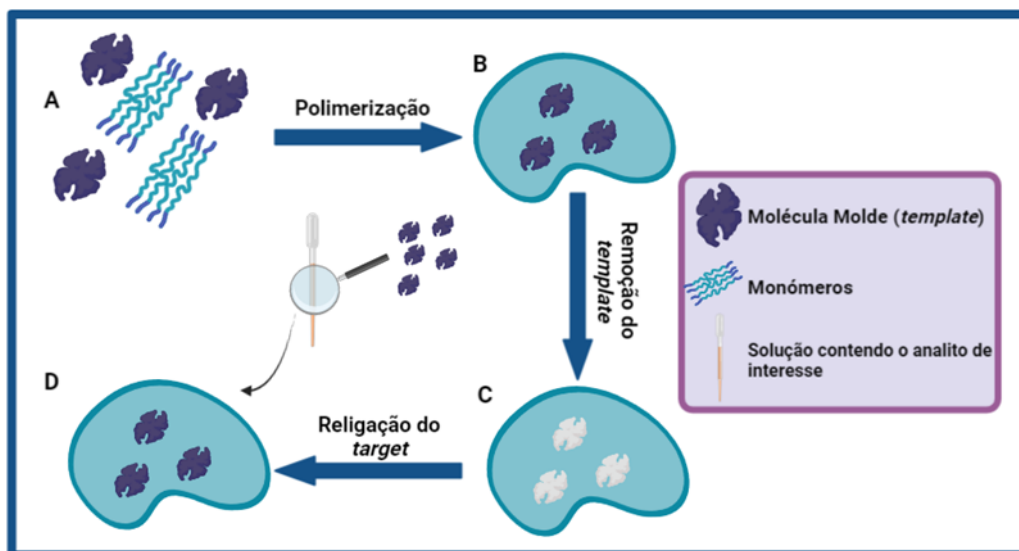


Figura 1.8: Esquema ilustrativo de um biossensor que utiliza polímeros de impressão molecular como elemento de biorreconhecimento. Em (A) tanto a molécula molde como os monómeros encontram-se livres em solução e, após um processo de polimerização ocorre a formação de uma matriz polimérica que envolve a molécula através de interações não covalentes (B). Seguidamente, é realizada a remoção da molécula molde ficando apenas a sua cavidade específica na matriz polimérica (C). Por fim, aquando do contacto do biossensor com uma solução que contém o analito, ocorre uma ligação altamente específica e seletiva deste às cavidades da molécula molde, ao qual é denominado de processo de religação (D).

Na área dos biossensores, tem ocorrido uma crescente investigação na utilização de MIPs, não só por tornarem a construção do biossensor mais económica, mas também devido a outros fatores como a simplicidade do processo, o seu fácil ajuste aos diferentes tipos de biossensores, a alta reprodutibilidade, tornando possível a sua produção a larga escala, a elevada estabilidade que apresentam a longo prazo e, como já foi referido, a seletividade e especificidade que apresentam para a molécula alvo [56]. Desta forma, tais elementos de biorreconhecimento tão inovadores têm sido aplicados nas mais diversas áreas, incluindo a área da saúde (deteção e quantificação de biomarcadores associados a diversas patologias), área alimentar (deteção de fatores de risco associados à segurança alimentar) e área ambiental (deteção de potenciais contaminantes ambientais) [57]–[59].

a) Síntese de MIPs

De forma geral, para a síntese de um MIP são necessários alguns componentes como a molécula molde (*template*), o monómero funcional, um agente de ligação cruzada ou “*cross-linker*”, o iniciador e o solvente porogénico. De salientar que nem sempre são necessários todos estes componentes, pelo que a sua utilização está altamente dependente do tipo de MIP a ser produzido [60].

Na Tabela 1.5 descrevem-se os componentes acima mencionados, bem como as suas principais funções aquando da síntese de um MIP.

Tabela 1.5: Componentes que constituem um biossensor [61].

Componente	Descrição	Exemplos
Molécula Molde ou <i>template</i>	Elemento fundamental na impressão molecular, uma vez que o <i>template</i> será o próprio analito, sendo este molecularmente impresso e seguidamente removido da matriz polimérica, formando uma cavidade molde e específica.	Iões Moléculas Orgânicas Biomacromoléculas Células e Vírus
Monómero Funcional	A sua escolha depende do analito, devendo apresentar grupos funcionais complementares com os grupos funcionais do <i>template</i> , para que seja possível a formação da matriz polimérica em torno deste.	Ácido Acrílico Acrilamida Pirrol
<i>Cross linker</i>	A sua principal função é manter a rigidez da estrutura da matriz polimérica após a remoção do <i>template</i> , de modo que a cavidade se mantenha intacta. Deve conter uma reatividade semelhante ao monómero, de modo que a polimerização ocorra de forma uniforme em toda a matriz.	Divinilbenzeno Metacrilato de Glicidila
Iniciador	A sua função consiste em iniciar o fenómeno de polimerização para a formação da matriz polimérica. O iniciador poderá ser um composto químico, um estímulo elétrico ou um composto fluorescente.	Peróxido de Benzoíla (BPO) Persulfato de Potássio (KPS)
Solvente porogénico	O seu papel foca-se na solubilização de todos os componentes necessários na etapa de síntese, bem como no auxílio na formação de poros.	Acetona Acetonitrilo 1,4-Dioxano

Em relação aos métodos de síntese de MIPs, mais especificamente no caso da impressão molecular de proteínas, que é o foco deste trabalho, existem dois métodos que se destacam na literatura: a Polimerização em *Bulk* e a Polimerização em Superfície.

1. Polimerização em Bulk

A polimerização em *bulk* distingue-se por ser o método mais simples e rápido na síntese de MIPs [62]. O método consiste em misturar o *template* com o monómero funcional, para que estes formem ligações específicas e complementares.

De seguida, é adicionado o agente de ligação cruzada e o iniciador pelo que, após um processo de polimerização, seguido de um processo de remoção do *template*, será produzido um MIP com estrutura heterogénea e rígida, sendo que em alguns casos será necessário recorrer à moagem deste antes da devida utilização. No entanto, este método de síntese é preferencialmente aplicado para moléculas molde de pequenas dimensões, uma vez que é facilitada a sua remoção dos locais de ligação de forma reprodutível. Para moléculas de maiores dimensões, como é o caso das proteínas, existem algumas limitações associadas a esta técnica [60], [63].

Em resumo, apesar deste método ser mais simples e rápido, uma vez que apenas consiste em misturar todos os componentes numa solução, em casos em que há a necessidade de moagem, esta etapa poderá levar à distribuição irregular do polímero produzido. Além disso, também poderá correr uma desintegração mecânica das cavidades formadas pelo molde, o que reduzirá significativamente a sensibilidade do método em si [60], [63].

Contudo, apesar das desvantagens referidas, a utilização deste método depende muito da aplicação desejada, da própria molécula a utilizar, do monómero e de diversos outros fatores que podem posteriormente ser otimizados tendo em conta as limitações da polimerização em *bulk*.

2. Polimerização em Superfície

O método de polimerização em superfície distingue-se por ser uma técnica mais sofisticada e, tal como o nome indica, esta refere-se a reações de polimerização que ocorrem na superfície de uma matriz sólida, ou seja, a formação dos locais de ligação dá-se na superfície do polímero. De forma geral, em termos de funcionamento, esta técnica inicia-se com a formação de um complexo entre o monómero funcional e o *template*. De seguida, a polimerização tem início na superfície de uma matriz sólida com o auxílio do iniciador e do agente de ligação cruzada. Por fim, ocorre a remoção do *template* através de métodos químicos ou enzimáticos, de forma a que ocorra a formação das cavidades molde [64].

Esta técnica é preferencialmente aplicada a proteínas, uma vez que é facilitada a difusão de moléculas de maiores dimensões na matriz polimérica. As suas principais vantagens focam-se na maior robustez física, a facilidade de integração na superfície de sensores, a maior eficiência e a rapidez de ligação entre o monómero funcional e a molécula molde [65].

Em resumo, no caso dos biossensores, a polimerização em *bulk* dá-se pela mistura de todos os componentes necessários numa solução, sendo esta posteriormente inserida na superfície do sensor para que decorra o processo de polimerização, tornando esta técnica mais simples e rápida. Já no caso da polimerização em superfície, os componentes são adicionados camada a camada à superfície do sensor, o que torna esta técnica mais sofisticada, mas demorosa.

b) Técnicas de indução de polimerização

Já foram referidos os dois principais métodos de síntese de MIPs. No entanto, outro fator relevante é os diferentes procedimentos de polimerização, de entre os quais a eletropolimerização, a polimerização radicalar, a polimerização por ultravioleta e a polimerização termal. As metodologias distintas são aplicadas de forma a iniciar/induzir a polimerização, ou seja, de forma que ocorra a formação da matriz polimérica que envolverá a proteína molde. A Tabela 1.6 descreve os diferentes métodos acima mencionados.

Tabela 1.6: Descrição das diferentes técnicas de polimerização [66]–[69].

Procedimento	Descrição
Eletropolimerização	Dá-se através da aplicação de um potencial, gerando processos de oxidação/redução que levam à formação da matriz polimérica. Requer a utilização de um monómero funcional e o <i>template</i> deve ser inerte para assegurar que seja impresso na sua forma natural e não na forma oxidada ou reduzida.
Polimerização radicalar	Requer a utilização de um monómero funcional que tenha dupla ligação, de forma a que a quebra origine radicais livres, o que permite a adição de outros monómeros, levando ao crescimento da cadeia e conseqüente polimerização. Dependendo do tipo de monómero a utilizar poderá ser ou não necessária a aplicação de uma alta temperatura para que haja o rompimento da dupla ligação. Usualmente é necessário um iniciador.
Polimerização por UV	Requer a utilização de monómeros que sejam responsivos à luz UV e, aquando da irradiação da superfície do sensor, irá dar-se início ao fenómeno de polimerização.
Polimerização térmica	Requer a utilização de um monómero funcional que sofra decomposição a uma dada temperatura. A decomposição do monómero promove a ligação dos grupos funcionais expostos e a formação de uma matriz polimérica estável. No entanto, é necessário que a molécula molde apresente estabilidade à temperatura utilizada.

No presente trabalho, foi utilizada a técnica de eletropolimerização por ser um processo simples e por permitir a otimização de vários parâmetros, como é o caso da espessura da matriz polimérica formada e da sua porosidade, através do ajuste dos parâmetros do processo eletroquímico.

1.2.2. Transdutores

Atendendo ao que anteriormente foi mencionado, os biossensores contêm elementos de biorreconhecimento que, ao interagirem com o analito, produzem uma resposta biológica. No entanto, seria impossível quantificar uma resposta biológica. Sendo assim, acoplado ao elemento de biorreconhecimento está um transdutor, que tem a capacidade de transformar a resposta biológica numa resposta que possa ser mensurável.

O elemento transdutor é dos principais componentes de um biossensor e, portanto, diferentes transdutores originam diferentes tipos de biossensores, que podem ser divididos em quatro categorias diferentes: eletroquímicos, óticos, calorimétricos e tendo por base as diferenças de massa (piezoelétricos e de ondas acústicas). É de salientar que a escolha do transdutor está altamente dependente do elemento de biorreconhecimento escolhido, uma vez que estes têm de ser compatíveis para que possa dar-se a conversão do sinal biológico num sinal mensurável [70].

I. Óticos

Um biossensor ótico contém o elemento de biorreconhecimento acoplado a um transdutor ótico, que tem por objetivo produzir um sinal proporcional à concentração de analito a interagir com o biorreceptor. O método de deteção destes biossensores baseia-se nas propriedades óticas do elemento de biorreconhecimento, como adsorção, emissão e reflexão. Além disso, a transdução ótica pode ser dividida em dois modos distintos: o modo *label-free*, no qual a deteção do sinal é gerada diretamente pela interação do analito com o transdutor, e o modo *label-based*, pelo qual o sinal é gerado através de métodos colorimétricos, fluorescentes ou luminescentes [71].

II. Calorimétricos

Os biossensores calorimétricos contém acoplado um transdutor capaz de medir o calor envolvido na reação, ou seja, aquando da ligação ou interação do analito com o elemento de biorreconhecimento irá estar envolvida energia na forma de calor. Desta forma, o calor será medido e convertido num sinal eletrónico através do transdutor, para que possa posteriormente ser mensurável. De forma geral, os biossensores calorimétricos são especialmente utilizados quando o processo envolve enzimas, uma vez que estas biomoléculas libertam calor aquando da ação enzimática, quer em casos da sua deteção, ou em casos em que são utilizadas como elementos de biorreconhecimento [72].

III. Baseados em diferenças de massa

a) Piezoelétricos

Os biossensores piezoelétricos utilizam materiais específicos que contêm propriedades piezoelétricas. Aquando da funcionalização da sua superfície com o elemento de biorreconhecimento, irá ocorrer uma alteração das características do material piezoelétrico, gerando-se um sinal (o que nos permite confirmar a funcionalização). Após a ligação/interação do analito ao biorreceptor, irá ocorrer a formação de um sinal diretamente proporcional à concentração de analito, devido à variação de massa à superfície, que causa um stress mecânico ao material piezoelétrico, levando à conversão da força mecânica produzida num sinal elétrico mensurável [72], [73].

b) Ondas acústicas

No caso dos biossensores acústicos, estes têm a capacidade de detetar/produzir ondas acústicas através da superfície de materiais piezoelétricos aquando da ligação/interação do analito com o elemento de biorreconhecimento. Em termos práticos, quando ocorre uma ligação ou interação do analito com o biorreceptor, ocorre uma alteração quer na velocidade, amplitude ou frequência das ondas acústicas produzidas pelo material piezoelétrico. Desta forma, através do transdutor acústico, ocorre a conversão do sinal destas ondas num sinal elétrico mensurável [74].

IV. Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos têm recebido especial atenção nos últimos anos nas mais diversas áreas de aplicação. Estes aparelhos surgiram como uma ferramenta importante para colmatar as desvantagens associadas a técnicas mais convencionais, como é o caso do limite de deteção, sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade, custo associado, entre outros. Tal subclasse de biossensores conjuga a elevada sensibilidade de um transdutor eletroquímico com a especificidade do processo de biorreconhecimento. Desta forma, uma larga gama de diferentes tipos de elementos de biorreconhecimento está disponível para ser incorporada neste tipo de aparelho, desde enzimas a tecidos [75].

O princípio de funcionamento dos biossensores eletroquímicos baseia-se na interação/ligação do analito com o elemento de biorreconhecimento. Aquando deste fenómeno, há a produção de um sinal que é proporcional à concentração de analito à superfície. Posteriormente, este sinal é transformado num sinal elétrico pelo transdutor, de forma a que possa ser mensurável [76].

Tipicamente, é necessário um sistema de elétrodos para o funcionamento de um biossensor eletroquímico. No caso de um sistema de três elétrodos, que é o mais convencional, este é constituído por um eléctrodo de trabalho (WE), um eléctrodo de referência e um eléctrodo auxiliar. O WE é o que faz contacto com o analito, tendo como função aplicar um potencial controlado de forma a que seja facilitada a transferência de eletrões da solução para o eléctrodo, tendo assim que ser constituído por um material inerte (como o carbono) na gama de potencial de interesse. No que diz respeito ao eléctrodo de referência, este é mantido a uma certa distância do WE para que seja mantido um potencial estável, conhecido e constante, de modo a que seja possível determinar a diferença de potencial no sistema de interesse. Por fim, o eléctrodo auxiliar (ou contra eléctrodo) é introduzido na célula eletroquímica de modo a assegurar que a corrente produzida no sistema não interfira no potencial constante do eléctrodo de referência, e estabelecendo ligação com a solução eletrolítica para que o potencial possa ser aplicado ao WE, tendo assim que ser constituído por um material condutor e quimicamente estável [77], [78].

Existe uma ampla variedade de elétrodos, sendo que os mais utilizados são os de ouro (Au), prata (Pt) e carbono (C-SPE). Uma das vantagens dos biossensores eletroquímicos é que se encontram disponíveis inúmeros tipos de elétrodos económicos, que podem ser conjugados com um sistema eletrónico portátil e simples para monitorização [74], [76]. No caso de materiais à base de carbono, como é o caso da grafite, estes apresentam a vantagem de serem inertes e oferecerem uma baixa resistência à passagem de corrente, o que torna o sistema de deteção mais sensível. Além disso, estes materiais apresentam uma estrutura cristalina que evita a formação de corrente residual ao passo que promove o aumento do rácio sinal-ruído [79].

Atualmente, são aplicados diferentes métodos eletroquímicos para a medição do sinal. Estes podem ser baseados quer em alterações de corrente, modificações de potencial, modificações na condutividade e alteração da impedância. Desta forma, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em: sensores voltamétricos (enquadram-se em técnicas de voltametria cíclica ou voltametria de onda quadrada); sensores amperométricos; sensores condutimétricos; sensores potenciométricos e, por fim, sensores impedimétricos (utilizam medidas de impedância) [79].

a) Sensores Voltamétricos

❖ Voltametria cíclica (CV)

A voltametria cíclica (CV) é descrita na literatura como uma técnica eletroquímica usualmente aplicada quando o objetivo é estudar o comportamento de oxidação/redução de uma espécie química. De forma geral, esta técnica eletroquímica origina um gráfico denominado de voltamograma ou voltamograma cíclico, cujo eixo das ordenadas (eixo-x) representa o potencial aplicado (E) (que varia consoante as condições experimentais) e o eixo das abcissas (eixo-y) representa a resposta a esse potencial, ou seja, a corrente resultante (i).

No gráfico da Figura 1.9 estão representados dois picos que se destacam, os quais correspondem à oxidação e redução da espécie química que é normalmente um complexo metal, como por exemplo o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ [79], [80].

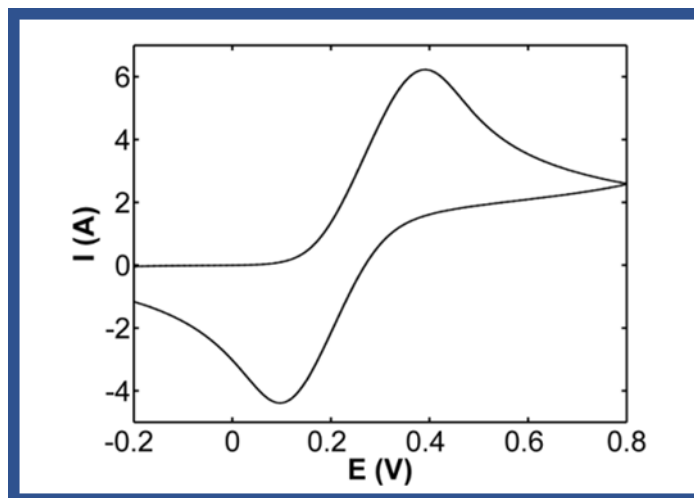


Figura 1.9: Exemplo de voltamograma [81].

No caso da aplicação desta técnica eletroquímica na área dos biossensores, a sua importância foca-se na possibilidade de analisar mudanças na superfície do sensor ao longo do processo de deteção do analito, ou seja, aquando da ligação/interação do analito com o elemento de biorreconhecimento, regista-se uma alteração no voltamograma, pelo que a resposta de corrente será proporcional à concentração de analito na amostra [82].

❖ **Voltametria de onda quadrada (SWV)**

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica voltamétrica eletroquímica que se distingue pela sua rapidez e alta sensibilidade. Em termos de funcionamento da técnica, esta consiste em definir uma escala de potencial que é modificada em pulsos com forma quadrada. Cada etapa da rampa de potencial é constituída por dois potenciais opostos, mas iguais em altura. A junção de ambos os potenciais dão origem a um ciclo de SWV, que é repetido várias vezes até originar o voltamograma típico obtido por esta técnica. É também importante referir que, a cada ciclo em SWV, o eléctrodo trabalha tanto em forma anódica como catiónica [81], [82]. A forma em onda, como pode ser visualizado na Figura 1.10, provém da simetria da onda quadrada em forma de escada.

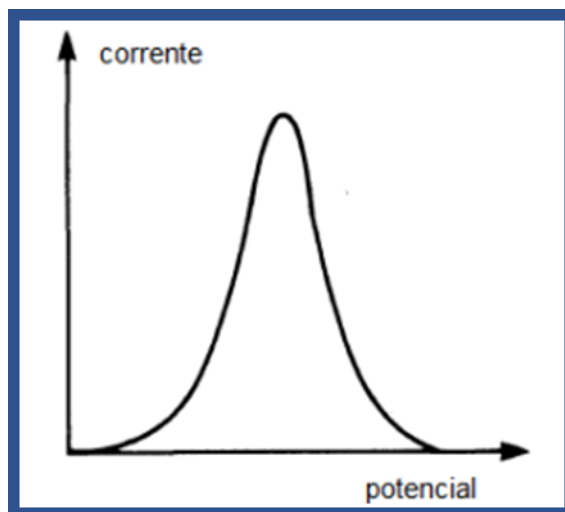


Figura 1.10: Exemplo de gráfico obtido através da técnica de SWV. Imagem adaptada de [83].

Em relação à técnica eletroquímica de SWV, esta tem sido frequentemente empregue na área dos biossensores devido à sua elevada sensibilidade e rapidez, o que são considerados fatores cruciais no desenvolvimento deste tipo de sensores, uma vez que a sua eficácia é diretamente proporcional à sensibilidade e seletividade o analito de alvo [84].

b) Sensores Amperométricos

A amperometria é uma técnica eletroquímica cujo princípio de funcionamento se baseia em aplicar um potencial constante, o que leva à ocorrência de transferência de eletrões, com uma taxa de difusão controlada, o que permite que o processo seja controlado por fenómenos de transferência de massa. Desta forma, é de salientar que nesta técnica a corrente formada é diretamente proporcional à concentração de analito, que provoca alterações de massa à superfície do WE [52], [84].

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica que utiliza os pulsos amperométricos a potencial constante com o objetivo de monitorizar e medir a corrente gerada em função do tempo [85]. A técnica de amperometria tem sido comumente utilizada na área dos biossensores devido às suas vantagens inerentes, como é o caso da sua simplicidade e de conferir ao sistema um baixo limite de deteção. Além disso, o facto de ser aplicado um potencial constante e característico para cada espécie, promove diminuição de interferências no sinal, que tendem a afetar o limite de deteção [86].

c) Sensores Condutimétricos

Um sensor condutimétrico utiliza um transdutor condutimétrico cujo princípio de funcionamento se foca na medição de alterações na condutância entre dois elétrodos metálicos, que resulta da interação/ligação do analito ao componente de biorreconhecimento. Assim, a diferença na condutância é diretamente proporcional à concentração de analito à superfície do WE [87].

Em termos da aplicação de transdutores condutimétricos na área dos biossensores, existem várias vantagens associadas a estes, nomeadamente o facto de não ser necessária a presença de um eléctrodo de referência, apresentarem fácil monitorização em termos de aparelhagem e o facto de operarem a uma baixa amplitude em termos de voltagem (o que previne a ocorrência de processos faradâicos nos elétrodos) [87], [88]. No entanto, algumas desvantagens, como é o caso da baixa seletividade, ainda tendem a restringir a sua utilização em aplicações como sensor de pH, biossensor para a deteção de compostos como a arginina em produtos farmacêuticos, entre outros [89], [90].

d) Sensores Potenciométricos

Os sensores potenciométricos constituem uma subclasse de biossensores eletroquímicos que se baseia em elétrodos seletivos de iões e em campos sensíveis a iões de efeito transitório. De forma geral, este tipo de sensores têm a capacidade de determinar a concentração de analito através da diferença entre o potencial de dois elétrodos, o WE e o eléctrodo de referência. Mais detalhadamente, após o contacto do WE com o analito de interesse, irá ocorrer uma acumulação de potencial na sua superfície, ao passo que o eléctrodo de referência estará com um potencial de zero ou próximo deste. Assim, a maior acumulação de potencial no WE em comparação com o eléctrodo de referência é diretamente proporcional com a concentração de analito. É também de salientar que este tipo de biossensores apresentam inúmeras vantagens associadas, como por exemplo, a facilidade de operação e de otimização, portabilidade, rápida resposta e, não menos importante, baixos custos de produção [91], [92].

e) Sensores Impedimétricos

Os sensores impedimétricos utilizam a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), a qual é largamente utilizada devido à sua sensibilidade para a determinação quantitativa de processos eletroquímicos [93]. Tipicamente, durante uma análise EIS, podem ser obtidos dois tipos de gráficos: *Bode* e *Nyquist*.

O gráfico de *Bode* (Figura 1.11) resulta da junção de dois gráficos em apenas um, sendo o eixo das abcissas (eixo-x) a escala logarítmica da frequência ($\log(f)$) e o eixo das ordenadas (eixo-y) a escala logarítmica da impedância ($\log|Z|$). A principal vantagem da sua utilização enquadra-se na análise dos dados, nomeadamente a maior clareza dos dados obtidos e ao facto da escala logarítmica facilitar a visualização dos processos [94].

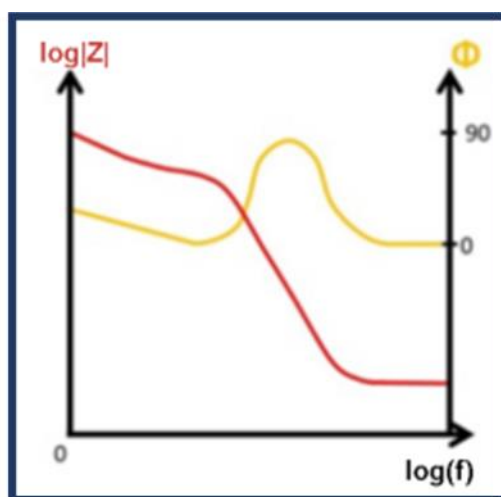


Figura 1.11: Gráfico de Bode [95].

O gráfico de *Nyquist* (Figura 1.12) tem como ordenada a componente imaginária da impedância (Z'') e como abcissa a componente real da impedância (Z'). Outro fator importante a referenciar é a área do semicírculo presente no gráfico de *Nyquist*, que representa a resistência à transferência de carga, ou seja, quanto maior a área do semicírculo (R_t), maior a resistência. Apesar do gráfico de *Nyquist* ser mais complexo de analisar, este é preferencialmente utilizado devido à maior sensibilidade [96].

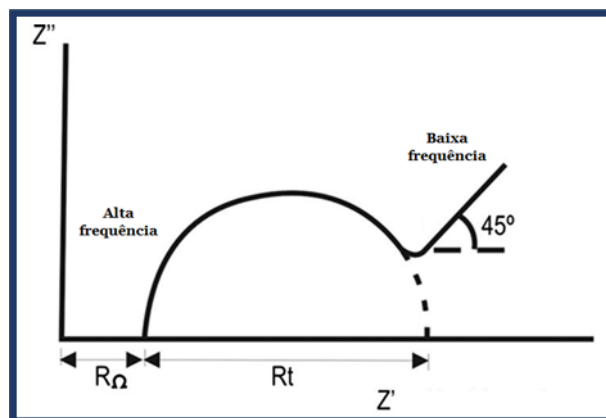


Figura 1.12: Gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de [97].

Aquando da ocorrência de processos de biorreconhecimento numa superfície devidamente modificada, ocorrem alterações a nível das propriedades interfaciais. Tais alterações, em processos eletroquímicos, envolvem a transferência de elétrons na superfície do WE, o que se deve à transferência de cargas e de massa entre a solução de *bulk* e a superfície modificada do eletrodo, o que provoca modificações a nível da resistência eletrolítica e à possível adsorção de espécies eletroatrativas, sendo estas posteriormente estudadas através da técnica de EIS na presença de uma dupla de iões redox (por exemplo, Fe^{2+} e Fe^{3+}). Ao nível dos dados gerados, a adsorção do analito de interesse na superfície do eletrodo modificado, leva a uma alteração da resistência à passagem de corrente. Desta forma, através da alteração deste parâmetro é possível prever se ocorreu ou não a interação/ligação do analito ao elemento de biorreconhecimento. Adicionalmente, as medidas de impedância na área dos biossensores também são frequentemente impostas quando o objetivo é verificar a ocorrência das diferentes modificações na superfície, de modo a confirmar se realmente ocorreram ou não e qual o seu efeito ao nível da resistência à passagem de corrente [95], [97], [98].

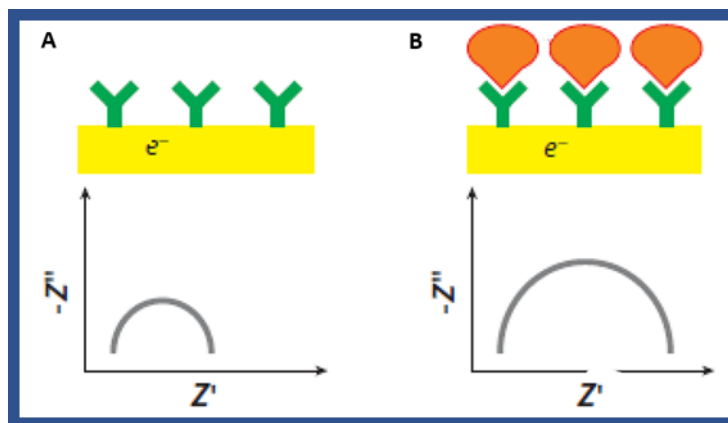


Figura 1.13: Imagem ilustrativa de um sensor impedimétrico. Em (A) está presente apenas a superfície do WE modificada com o elemento de biorreconhecimento e em (B) a ligação/interação do analito ao elemento de biorreconhecimento, com os respectivos gráficos de EIS. É de notar que, neste caso exemplar, a ligação do analito provocou um aumento da resistência na superfície do WE, dados observados através do gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de [97].

1.2.3. Análise Qualitativa dos Materiais

I. Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de *Raman* consiste numa técnica analítica vulgarmente utilizada na área dos biossensores com o intuito de caracterizar tanto a superfície do biossensor como os processos envolvidos nos mecanismos de deteção. Esta técnica analítica permite uma rápida identificação em termos de estruturas químicas, arranjos espaciais e estrutura das moléculas, sendo de salientar que esta não é de todo invasiva para o material, o que significa que após a análise será possível utilizar o biossensor para deteção, sem que este tenha que ser descartado [99].

Em termos de princípio de funcionamento, o *Raman* realiza uma análise extremamente específica dos materiais, sendo que cada material possui um espectro específico que o distingue dos restantes, tal como uma impressão digital, o que os torna facilmente distinguíveis em termos espectrais [100]. O seu princípio de funcionamento foca-se na utilização de um laser na gama do visível/infravermelho que incide fotões sobre a amostra. Posteriormente, os fotões incididos interagem com as moléculas vibracionais presentes na amostra, transferindo energia de forma vibracional. Uma vez que os espectros de energia vibracional dependem da composição química da amostra, serão originados espectros altamente específicos, sendo possível distinguir diferentes materiais [99].

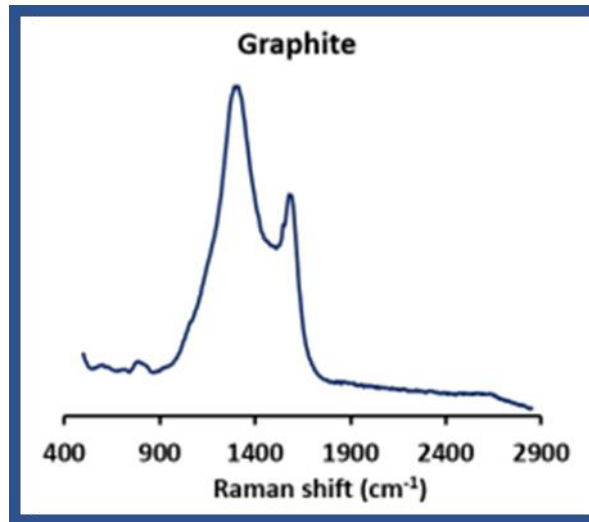


Figura 1.14: Exemplo de espectro de *Raman* específico para a grafite. Imagem adaptada de [101].

II. Microscopia eletrônica de superfície (SEM)

A microscopia eletrônica de superfície (SEM) é utilizada fundamentalmente para a análise da superfície de materiais, como é o caso da superfície dos biossensores. O princípio de funcionamento foca-se em aplicar um feixe de elétrons de elevada energia, usualmente através de uma fonte térmica, de modo a varrer toda a superfície da amostra. Posto isto, é gerada uma corrente secundária de elétrons que é posteriormente captada por um sensor, gerando um sinal elétrico que é seguidamente convertido para a forma de pixel numa tela, gerando-se a imagem topográfica requerida, com formato tridimensional. Desta forma, o SEM tem a capacidade de produzir imagens tridimensionais a preto e branco de alta resolução, tornando-se uma ferramenta essencial para a análise da superfície de materiais [102].

1.3. Objetivo geral da Dissertação

A presente dissertação consistiu no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico utilizando MIPs para a detecção da proteína STEAP1, devido a uma série de evidências científicas que a associam como um potencial biomarcador para o diagnóstico e prognóstico do PCa.

O principal objetivo foca-se na produção de um biossensor seletivo com base em MIPs para a detecção da proteína STEAP1. Para tal:

1. O C-SPE foi pré-ativado por tratamento eletroquímico;
2. Na superfície do WE foi fixado um nanocompósito de nanopartículas de platina aminadas com nanotubos de carbono (CNTs-PAH/Ptd);
3. Foi efetuada a síntese eletroquímica do MIP e do NIP;
4. Procedeu-se à remoção enzimática da proteína da matriz polimérica.

De forma a atingir os objetivos traçados, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico recorrendo à técnica de impressão molecular, que se baseou em modificar um eletrodo de carbono impresso (C-SPE) primeiramente com um pré-tratamento eletroquímico por cronoamperometria, aplicando um potencial de 1,7V durante 200 s (1). Posteriormente foi imobilizado na superfície do C-SPE um nanocompósito (CNTs-PAH/Ptd) (2), seguindo-se a eletropolimerização utilizando uma mistura contendo o monómero ácido pirrol-2-carboxílico (PY-COOH) e a proteína STEAP1 (3). O passo final consistiu na remoção da proteína por ação enzimática por via da tripsina, tendo-se dado a formação de cavidades molde específicas para a detecção do biomarcador em solução (4). As técnicas eletroquímicas utilizadas foram cronoamperometria, CV, SWV e EIS.

Ao longo do trabalho experimental foram realizadas otimizações em termos do passo de eletropolimerização, da composição da solução de polimerização e de outros parâmetros na modificação da superfície do eletrodo.

Para a análise do desempenho do biossensor foram realizadas calibrações em solução tampão (PBS) e em *pellet* de extratos celulares LNCaP. Seguidamente, foram realizados testes de seletividade para alguns possíveis interferentes, de forma a garantir a seletividade do biossensor para a STEAP1.

Por fim, para a análise qualitativa do biossensor, foram implementadas técnicas como a Espectroscopia de *Raman* e SEM.

Capítulo 2- Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico

Este capítulo tem como objetivo descrever e retratar os diferentes métodos, materiais e procedimentos que levaram ao *design* de um biossensor eletroquímico para a detecção da STEAP1, potencial biomarcador para o PCa.

2.1. Procedimento Experimental

2.1.1. Materiais

a) Equipamentos

Para a preparação das soluções foram utilizadas micropipetas da marca Gilson de volume regulável (100-1000 μL , 20-200 μL , 1-10 μL e 500-5000 μL). Relativamente à pesagem dos reagentes, recorreu-se a uma balança *Mettler Toledo* (modelo MS105DU e precisão $\pm 0,0001\text{g}$). As soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A (com capacidade de 10 mL e de 500 mL) e no caso das soluções com volume na gama dos μL , em tubos *ependorf* de 1.0 e de 2.0 mL. Além disso, para soluções de difícil dissolução, recorreu-se ao agitador de líquidos de baixa tensão superficial, da marca *Fisherbrand*. De forma a fixar o nanocompósito na superfície do sensor, recorreu-se à utilização de uma mufla da marca *Nabertherm* a uma temperatura de 60°C. Para a incubação a 37°C com o agente de remoção, foi utilizada uma estufa *P Selecta*.

As técnicas eletroquímicas foram aplicadas recorrendo a um potencióstato/galvanostato *Metrohm Autolab* (Figura 2.1) (controlado através do Software Nova 2.1) e a uma caixa conectora *DropSens* (DRP-DSC) (Figura 2.2 A), em interface com o aparelho Autolab. Os sensores C-SPE (Figura 2.2 B) foram adquiridos à *DropSens* (DRP-C110) e são constituídos por: substrato de cerâmica, contactos elétricos de prata, WE de carbono (4 mm de diâmetro), eléctrodo de referência de prata e eléctrodo auxiliar de carbono. Por último, para a análise qualitativa do biossensor, recorreu-se à técnica de espectroscopia de *Raman*, pela utilização de um espectrômetro *Thermo Scientific DXR Raman* com microscopia confocal, equipado com um laser de excitação de 532 nm (Figura 2.3). A análise SEM foi efetuada no microscópio FESEM, JEOL-JSM 6700F equipado com um sistema Oxford Inca EDX para a análise composicional e com um detetor de eletrões de retrodifusão retrátil.



Figura 2.1: Potenciostáto/galvanostato Metrohm Autolab.



Figura 2.2: (A) Caixa conectora DropSens (DRP-DSC). (B) Chips C-SPE DropSens (DRP-C110).



Figura 2.3: Thermo Scientific DXR Raman.

b) Reagentes

Na Tabela 2.1 discriminam-se todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho, bem como a sua origem comercial.

Tabela 2.1: Lista de materiais e reagentes utilizados.

Reagentes	Origem
Cloreto de Potássio (KCl)	Merck
Hexacianoferrato (II) de Potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$)	Riedel-de-Haen
Hexacianoferrato (III) de Potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Riedel-de-Haen
Tampão Fosfato-Salino (PBS)	VWR
Ácido pirrol-2-carboxílico ($C_5H_5NO_2$) (PY-COOH)	Alfa Aesar
Tripsina	Sigma Aldrich
STEAP1	Merck
Proteinase K	VWR
Sal monossódico de ácido L-glutâmico monohidratado ($C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$)	Sigma Aldrich
Ácido Oxálico ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$)	Merck
Ácido 3-aminobenzóico ($C_7H_7NO_2$)	Sigma Aldrich
CEA	Merck

c) Soluções

Para a realização dos ensaios eletroquímicos, foi necessária a preparação de algumas soluções. A solução de PBS (tampão fosfato salino) foi preparada com uma concentração de 100 mM em água ultrapura Milli-Q, apresentando um pH de aproximadamente 7.4. Por sua vez, a solução *redox* de ferro ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) foi preparada através da combinação de hexacianoferrato (II) de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) com hexacianoferrato (III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) em PBS a uma concentração de 5 mM. A solução de cloreto de potássio (KCl) foi preparada igualmente em PBS com uma concentração de 100 mM.

No que diz respeito às soluções dos diferentes agentes de remoção, as soluções de tripsina e proteinase K foram ambas diluídas 100× em PBS. A solução de ácido oxálico foi preparada água ultrapura a uma concentração de 50 mM. Para a preparação da solução de PY-COOH, este foi preparado em PBS com uma concentração de 10 mM. Relativamente à STEAP1, esta foi diluída em PBS para alcançar uma concentração final de 1 µg/mL.

Relativamente às soluções reacionais de polimerização, foram preparadas duas soluções de 500 µl, uma com proteína (solução de MIP) e outra sem proteína (solução de NIP). Para a solução com proteína, foram adicionados 100 µl da solução de PY-COOH (concentração final de 20 mM) e 50 µl da solução diluída de STEAP1 (concentração final de 0.1 µg/mL) e, por último, foram adicionados 350 µl de PBS para fazer o volume final de 500 µl. Para a solução sem proteína, o volume de PY-COOH foi o mesmo, sendo adicionado um maior volume de PBS (400 µl) para refazer o volume final.

Foram preparadas duas soluções padrão para a realização da reta de calibração. A primeira foi preparada através de diluições consecutivas da solução mãe (130 µg/mL) em PBS, tal como está ilustrado na Figura 2.4. A segunda solução padrão foi preparada da mesma forma, com o pormenor de que as diluições foram realizadas com *pellet* de extratos celulares LNCaP ao invés de PBS.

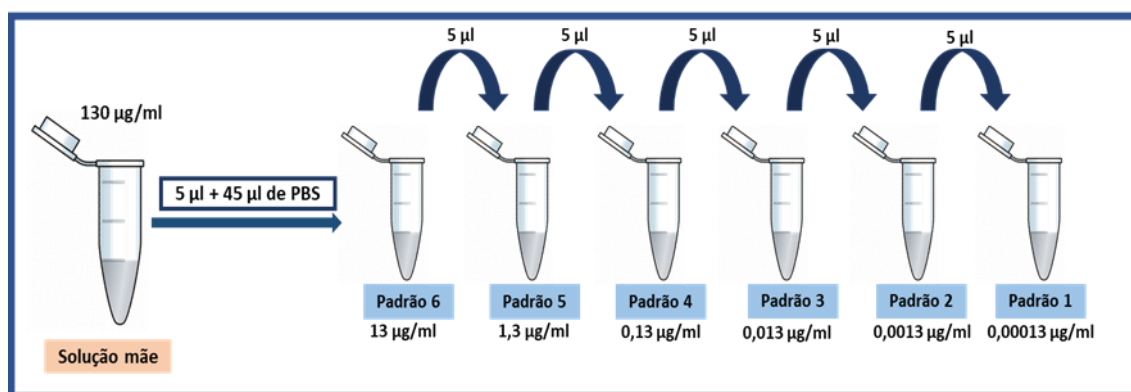


Figura 2.4: Esquema ilustrativo referente à preparação de diferentes padrões através de diluições consecutivas da solução mãe concentrada de STEAP1 (130 µg/mL).

Por fim, o estudo da seletividade foi realizado recorrendo à utilização de ácido L-glutâmico ($C=2 \mu\text{g/mL}$), ácido aminobenzóico ($C=0.1 \mu\text{g/mL}$) e uma biomolécula, a proteína CEA (antígeno carcinoembrionário) ($C= 0.00025 \mu\text{g/mL}$). Para a preparação das soluções de interferentes, no caso do ácido L-glutâmico e do ácido aminobenzóico, estes foram pesados e diluídos em PBS até atingir a concentração final pretendida.

No caso da CEA, foram realizadas diluições sucessivas em PBS até atingir a concentração final de 0.00025 µg/mL. Posteriormente, cada uma das soluções de interferentes foram misturadas com uma solução de STEAP1 (0.013 µg/mL).

2.2. Procedimentos Analíticos

Relativamente à construção do biossensor, esta foi realizada em cinco etapas distintas: (1) síntese do compósito CNTs-PAH/Ptd, (2) pré-tratamento eletroquímico, (3) fixação do compósito CNTs-PAH/Ptd na superfície do WE, (4) eletropolimerização e (5) remoção da STEAP1 da superfície do sensor, tal como está representado na Figura 2.5.

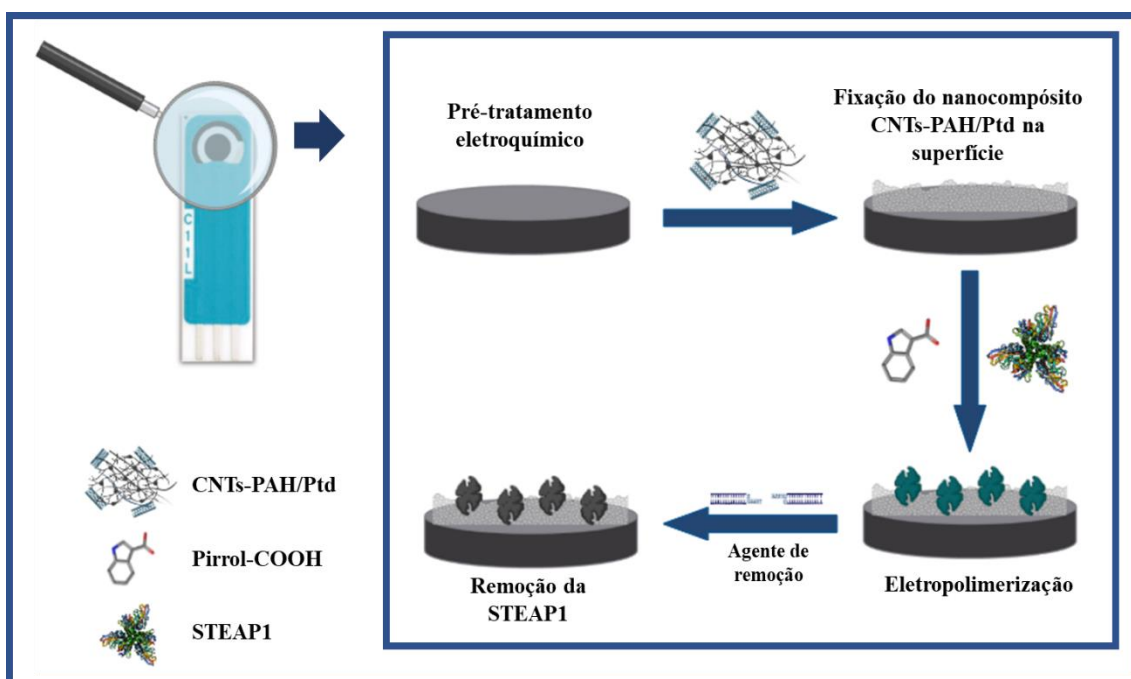


Figura 2.5: Esquema que ilustra as diferentes etapas na construção de um biossensor eletroquímico com base num MIP para a deteção da proteína STEAP1.

Sendo que um dos principais objetivos desta metodologia é demonstrar que a técnica de impressão molecular da proteína é essencial para a deteção da STEAP1, foram desenvolvidos biossensores com e sem impressão molecular, os NIPs (sem impressão molecular da STEAP1) e os MIPs (com impressão molecular da STEAP1).

Ao longo da descrição de cada um dos passos, serão igualmente referidas as diferentes otimizações realizadas ao longo do trabalho, cujos resultados serão descritos no capítulo 3.

2.2.1. Síntese do compósito CNTs-PAH/Ptd

O compósito CNTs-PAH/Ptd foi sintetizado pelo grupo CINBIO, *Nanomaterials, TeamNanoTech*, da Universidade de Vigo de acordo com o seguinte protocolo:

- I. O primeiro passo na síntese do compósito foi a funcionalização dos nanotubos de carbono (CNTs) com (poli)eletrólitos. Para tal, CNTs de paredes múltiplas (CNTs, Nanolab, 5-20 μm de comprimento e 10-15 nm de diâmetro) foram filtrados numa mistura de acetona/EtOH (1:1, 20 mL) durante 10 minutos e seguidamente centrifugados três vezes (9000 rpm, 20 minutos) e depois redispersos em água ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Após este processo, a amostra resultante sofreu liofilização durante 48 h e foi seguidamente utilizada sem qualquer tratamento posterior. O passo seguinte focou-se na dispersão dos CNTs (7.5 mg) numa solução aquosa de NaCl 500 mM (50 mL) com concentração de 1 % em peso de cloridrato de poliallamina (PAH), resultando numa concentração final de 150 mg/L. Para o revestimento dos CNTs por PAH, o pH da solução resultante foi ajustado para 9.5. Posto isto, a solução resultante de CNTs com PAH foi agitada magneticamente, sendo seguidamente sonicada com uma sonda ultra-sónica durante 3 h para assegurar que ocorresse dispersão. Para a remoção do excesso de PAH em solução, foram realizados 3 ciclos de centrifugação (12000 rpm, 24 h), seguidos de uma redispersão por sonicação em água. Após medição da absorvância e construção de uma curva de calibração foi determinada a concentração de CNTs com o valor de 0.6 mg/mL;
- II. Para a síntese das nanopartículas de platina dendríticas (Ptd-NPs), foi injetada uma mistura de NaBH_4 numa mistura de citrato de sódio tribásico di-hidratado (1.25 mL, 100 mM) em H_2O (21.52 mL) a 800 rpm de agitação. Por fim, a mistura resultante foi agitada durante 10 minutos;
- III. Para a deposição dos CNTs, foram adicionados à mistura de Ptd-NPs (10 mL, 4950 mM) 20 μL de CNTs-PAH (0.6 mg/mL) anteriormente sintetizados, sendo a mistura seguidamente agitada durante 30 minutos. Por fim, a dispersão resultante foi centrifugada a 9000 rpm durante 10 minutos (procedimento repetido 2 vezes) e redispersada em 5 mL de H_2O com uma concentração de 0.0024 mg/mL de CNTs.

2.2.2. Pré-tratamento eletroquímico

A primeira etapa na construção do biossensor é proceder à designada limpeza eletroquímica, que se define por ser essencial na eliminação de possíveis impurezas e contaminantes que possam estar presentes na superfície do C-SPE.

Além disso, tal etapa conduz à promoção da ativação de grupos funcionais que facilitam a formação da matriz polimérica à superfície do WE e a consequente ligação/interação da proteína com a matriz. Para esta etapa recorreu-se ao cloreto de potássio (KCl) (100 mM) como solução de limpeza e à cronoamperometria como técnica eletroquímica, tal como descrito por *M. Azizur* e colaboradores [103].

Para tal, foi colocado um volume de 150 μ l na superfície do C-SPE e aplicado um potencial de 1.7 V durante 200 s. Além disso, para confirmar o sucesso da limpeza foi realizada uma leitura com a solução *redox* de ferro antes e após a limpeza, de forma que fosse possível visualizar a diferença do sinal eletroquímico e comparar os sensores C-SPE entre eles. É igualmente importante salientar que as leituras com a solução *redox* de ferro são realizadas recorrendo a uma compilação de técnicas eletroquímicas: EIS (potencial circuito aberto (OCP) com gama de frequência entre 0.1 e 100 KHZ e amplitude 0.010 V), CV (10 ciclos com potencial compreendido entre -0.6 e 0.6 V e velocidade de varrimento 0.5 V/s) e, no caso da calibração, SWV (com potencial compreendido entre -0.1 e 0.5 V e velocidade de varrimento 0.5 V/s).

2.2.3. Fixação dos CNTs-PAH/Ptd na superfície do sensor

A segunda etapa foca-se na tentativa da inclusão de um nanocompósito no biossensor, neste caso CNTs-PAH/Ptd. O objetivo passou por levar a uma diminuição da resistência à passagem de corrente, uma vez que as nanopartículas são altamente condutoras, o que levaria a um consequente aumento da sensibilidade na etapa de deteção. Além disso, o facto de estarem presentes grupos amina nas nanopartículas irá favorecer a sua ligação aos respetivos grupos carboxilo da STEAP1 e do Py-COOH, através de pontes de hidrogénios e ligações electroestáticas, o que formará um complexo estável entre o nanocompósito, a STEAP1 e a matriz polimérica [104]. Relativamente aos nanotubos de carbono, estes são essenciais não só no ponto de vista da sua elevada condutividade, mas também pelo facto de diminuírem a resistência à passagem de corrente da matriz polimérica, que resulta de uma transferência de tensão da matriz para os nanotubos [105], [106].

Neste sentido, de forma a fixar o nanocompósito CNTs-PAH/Ptd na superfície do C-SPE, são colocados 5 μ l da solução devidamente homogeneizada no WE. De seguida, o sensor é submetido a uma temperatura de 60°C durante 20 minutos, sendo este processo repetido duas vezes. Por fim, é realizada uma leitura com a solução *redox* de ferro para avaliar a variação do sinal eletroquímico na superfície do sensor após a funcionalização com CNTs-PAH/Ptd.

Durante o trabalho experimental, um dos objetivos foi confirmar se o nanocompósito CNTs-PAH/Ptd realmente melhorava a o desempenho analítico do biossensor, inicialmente apenas a nível da diminuição da resistência à passagem de corrente e subsequentemente, ao nível do desempenho do biossensor na etapa de deteção.

2.2.4. Síntese do MIP por eletropolimerização

A eletropolimerização é uma etapa fundamental na formação da matriz polimérica (filme ultrafino que é formado na superfície do WE), a qual irá interagir e ligar a STEAP1 que, após remoção, originará cavidades molde representativas de um MIP. Assim, torna-se fundamental escolher um polímero adequado para esta etapa. Neste sentido, foi escolhido o PY-COOH devido à suas características intrínsecas, nomeadamente a estabilidade, o facto de ser facilmente oxidado e a sua solubilidade em água. O facto de ter sido escolhido o PY-COOH e não simplesmente o pirrol, deve-se ao facto de este apresentar o grupo carboxílico (COOH), que apresenta a vantagem de interagir eficazmente com os grupos amina da proteína e com os grupos amina dos CNTs-PAH/Ptd, formando um complexo altamente estável. No entanto, apesar de todas as suas vantagens, este polímero está altamente dependente das condições de eletropolimerização [107].

Posto isto, foi seleccionada a técnica de CV para a etapa de eletropolimerização. Primeiramente, houve a necessidade de definir a gama de potencial a utilizar via a análise do pico de oxidação/redução do polímero. Após o estudo, uma vez que o pico de oxidação do PY-COOH foi observado a 0.9 V, foi definido um potencial compreendido entre -0.8 e 1.1 V com um total de 10 ciclos.

Após definir a gama de potencial e o número de ciclos, outra variante importante na etapa de eletropolimerização é a velocidade de varrimento, a qual está diretamente relacionada com a porosidade da matriz polimérica, ou seja, uma maior velocidade de varrimento originará uma matriz polimérica com poros de maior diâmetro. Assim, foram testadas duas velocidades de varrimento diferentes: 0.02 e 0.05 V/s.

Outro fator adicional em estudo foi a concentração de proteína a utilizar na mistura reacional, a qual influenciará no número de cavidades formadas após a sua remoção, correndo o risco de ocorrer saturação e bloquear a eletropolimerização do PY-COOH a concentrações demasiado elevadas da proteína. Assim, foram estudadas diferentes concentrações de STEAP1: 0.1 µg/mL e 1 µg/mL.

Após o processo de eletropolimerização são realizadas um total de três leituras com a solução *redox* de ferro, de modo a estabilizar a superfície do WE, de forma a que não ocorram alterações ao longo do tempo.

2.2.5. Remoção da STEAP1

Seguidamente à etapa de eletropolimerização, segue a etapa de remoção da proteína, passo altamente desafiante na técnica de impressão molecular.

O objetivo desta etapa foca-se em remover a STEAP1 da matriz polimérica anteriormente formada, através da quebra da cadeia polipeptídica da proteína em péptidos de menor dimensão, que acabam por sair naturalmente da matriz devido ao seu reduzido tamanho em comparação com a cavidade formada pela proteína intacta.

O desafio passa pelo facto de o agente de remoção afetar inevitavelmente a matriz polimérica. Devido a este desafio é fundamental a comparação de NIP com MIP, sendo que o objetivo é que o agente de remoção pouco ou nada altere o NIP, uma vez que como este não contém proteína, qualquer alteração na sua superfície se deve ou à adsorção do agente de remoção na superfície do sensor ou à alteração da própria matriz polimérica, por indução de danos na mesma.

Posto isto, testou-se o efeito de diferentes agentes de remoção, nomeadamente o efeito de diferentes enzimas com funções de quebra de cadeias peptídicas, a proteinase K e a tripsina. No caso da proteinase K, esta foi testada isoladamente e na presença do ácido oxálico, que tem por objetivo remover enzima que possa ter adsorvido à superfície, sendo que aquando da conjugação com o ácido, houve a necessidade de incubar o WE 30 minutos com PBS, de forma a neutralizar o mesmo.

Em relação à tripsina, esta foi testada em diferentes pHs, 6 e pH fisiológico, sendo que em ambos os casos se procedeu a uma limpeza eletroquímica com PBS (através da técnica de CV) para clarificar a superfície do WE de qualquer enzima que possa ter adsorvido à superfície.

Para todos os agentes de remoção testados, foram realizadas três leituras com a solução *redox* de ferro para confirmar o efeito e a estabilização após a remoção da STEAP1. A Tabela 2.2 apresenta o procedimento realizado com os diferentes agentes de remoção.

Tabela 2.2: Lista de agentes de remoção utilizados e respetivo procedimento prático.

Agente de remoção	Procedimento
Proteinase K	Incubação de 5 µl no WE durante 2 horas à temperatura ambiente em meio húmido.
Proteinase K + Ácido oxálico	Incubação de 5 µl no WE durante 2 horas seguida de 1 leitura com a solução <i>redox</i> de ferro. Seguidamente, incubação de 5 µl de ácido oxálico no WE e, por fim, neutralização de 30 minutos em PBS (5 µl no WE). Todo o procedimento foi realizado em ambiente húmido à temperatura ambiente.
Tripsina a pH 6	Todas as soluções foram preparadas em PBS a pH 6. Iniciou-se a incubação de 5 µl de tripsina no WE durante 1 hora a 37°C. Por fim, realizou-se a limpeza eletroquímica com PBS.
Tripsina a pH 7	Todas as soluções foram preparadas sem alteração do pH de aproximadamente 7,4 do PBS. Inicialmente, incubaram-se de 5 µl de tripsina no WE durante 1 hora a 37°C. Por fim, realizou-se a limpeza eletroquímica com PBS.

2.3. Análise do desempenho do biossensor

2.3.1. Curva de Calibração

Após todo o processo de construção do biossensor, o passo seguinte focou-se na avaliação da sua capacidade de detecção da STEAP1, ou seja, na capacidade de religar/interagir com a proteína através das cavidades molde formadas pela remoção da mesma. Posto isto, a curva de calibração é de extrema importância uma vez que representa a relação entre a concentração de analito e o sinal medido. Além disso, através da curva de calibração é possível definir um limite de detecção (LOD), que é entendido por ser a concentração mais baixa de analito que é facilmente distinguida de zero, ou seja, é a concentração mínima possível de detetar através da variação do sinal. Adicionalmente, parâmetros como a sensibilidade e a qualidade de resposta também podem ser mensurados através do declive de reta [108].

Deste modo, para a realização da curva de calibração, procedeu-se à estabilização do biossensor, através de incubações sucessivas de 5 µl do branco (PBS) durante 20 minutos na superfície do WE, sendo realizada uma leitura com a solução *redox* de ferro após cada incubação. Após a estabilização do sinal, são iniciadas as incubações com os padrões (Tabela 2.3), igualmente com um volume de 5 µl durante 20 minutos na superfície do WE, seguindo-se uma leitura com a solução *redox* após cada incubação. O papel da solução *redox* passa por avaliar o sinal produzido, ou seja, uma variação no sinal significa que ocorreu alguma alteração na superfície do biossensor, havendo assim a possibilidade de criar uma curva de calibração que relacione a variação do sinal com a alteração da concentração de proteína nos diferentes padrões utilizados.

Em suma, as curvas de calibração foram obtidas através da técnica de SWV e construídas através do auxílio de um conjunto de pontos obtidos através da leitura com a solução *redox* e que variam consoante a concentração de analito, o que nos permite assim ter uma relação de sinal/concentração de STEAP1.

Tabela 2.3: Conjunto de soluções padrão de STEAP1 diluída em PBS e respetiva concentração.

Padrão (preparado em PBS)	Concentração de STEAP1 ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,00013
2	0,0013
3	0,013
4	0,13
5	1,3
6	13

2.3.2. Análise em *pellet* de extratos celulares LNCaP

Nesta fase, foram igualmente realizados ensaios em *pellet* de extratos celulares LNCaP, de forma a avaliar a *performance* do biossensor em condições mais realistas, com a presença de outras moléculas que possam interferir na etapa de deteção.

Assim, iniciou-se igualmente o ensaio com a estabilização do biossensor, mas neste caso em *pellet* de extratos celulares LNCaP, que funcionou como branco. Seguidamente, os padrões (Tabela 2.4) foram preparados de acordo com o descrito no ponto 2.3.1, com a diferença de que a diluição da proteína para as diferentes concentrações foi realizada neste meio. Em termos do procedimento, as incubações foram realizadas nas mesmas condições (5 μl durante 20 minutos na superfície do WE), sempre seguidas de uma leitura com a solução *redox* de ferro.

A curva de calibração foi igualmente obtida através da técnica de SWV, pela utilização de um conjunto de pontos obtidos através da incubação com os diferentes padrões.

Tabela 2.4: Conjunto de padrões preparados através da solução mãe de STEAP1 em *pellet* de extratos celulares LNCaP.

Padrão (Preparado em <i>pellet</i> de extratos celulares LNCaP)	Concentração de STEAP1 ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,00013
2	0,0013
3	0,013
4	0,13
5	1,3
6	13

2.3.3. Estudo da seletividade

Relativamente ao desempenho analítico de um biossensor, além da sua capacidade de detetar o analito em diferentes concentrações, torna-se fundamental assegurar a sua seletividade para a biomolécula. Este facto relaciona-se com a utilização do biossensor em testes clínicos, uma vez que irá ser colocado em contacto com fluídos extremamente complexos, como é o caso de extratos celulares e de matrizes biológicas como o sangue, a urina e o soro. Assim um dos objetivos primordiais é que o biossensor seja capaz de identificar o analito num meio complexo. Desta forma, é de extrema importância certificar que o biossensor seja seletivo especificamente para o analito em questão.

Nesta fase, o estudo da seletividade foi realizado incluindo alguns possíveis interferentes como é o caso do ácido l-glutâmico ($C= 2 \mu\text{g/mL}$), o ácido aminobenzóico ($0.1 \mu\text{g/mL}$) e uma proteína associada ao cancro colorretal, o antigénio carcinoembrionário (CEA) ($C=0.00025 \mu\text{g/mL}$). Relativamente ao procedimento experimental, foi realizado um estudo da seletividade por mistura, ou seja, foram utilizados dois sensores (MIPs). Em um dos biossensores, após estabilização em PBS, foi incubado o padrão 3 ($0,013 \mu\text{g/mL}$ de STEAP1) preparado em PBS durante 20 minutos, seguido de uma leitura com a solução *redox* de ferro. Relativamente ao segundo biossensor, após estabilização, foi incubada uma mistura do padrão 3 com a solução diluída de interferente durante 20 minutos, seguida de uma leitura com a solução *redox* de ferro. Após a realização de triplicados para cada interferente, pretendeu-se garantir que o sinal obtido com a incubação da mistura do padrão 3 com o interferente fosse mínima ou até mesmo nula em relação ao sinal obtido pela incubação com apenas o padrão 3, o que irá garantir e assegurar a seletividade do biossensor, pelo menos para os interferentes testados.

De salientar que a escolha das concentrações dos interferentes foram definidas tendo em conta os seus níveis naturalmente presentes no meio utilizado para o crescimento das células LNCaP, que está contido no *pellet* de extratos celulares (no caso do ácido L-glutâmico e do ácido aminobenzóico). No entanto, uma vez que para efeitos de calibração o *pellet* foi diluído 10 vezes, os interferentes foram diluídos igualmente 10 vezes. No caso da proteína CEA, a sua concentração foi definida tendo em conta o seu limite fisiológico detetável em amostras de soro ($2.5 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$).

2.4. Análise qualitativa dos materiais

2.4.1. Análise em Raman

Para análise da superfície do biossensor em *Raman*, foram preparadas diferentes amostras, nomeadamente: C-SPE sem qualquer pré-tratamento; C-SPE funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd; MIP sem etapa de remoção; MIP com etapa de remoção e NIP. Para a obtenção dos espectros foi utilizado um microscópio confocal equipado com um laser de excitação de 532 nm com os parâmetros descritos na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Lista de parâmetros e respetiva configuração para a obtenção dos espectros em *Raman*.

Parâmetros	Configuração
<i>Potential</i>	<i>532 nm</i>
<i>Aperture</i>	<i>50 μm slit</i>
<i>Photo-Bleach</i>	<i>0.5 min</i>
<i>Max. Collect time</i>	<i>1.0 sec</i>
<i>Enlargement</i>	<i>50 x</i>

2.4.2. Análise em SEM

A análise em SEM foi realizada externamente pelo grupo CINBIO “*Nanomaterials, TeamNanoTech*”, da Universidade de Vigo para os seguintes materiais sensores: C-SPE sem pré-tratamento; C-SPE funcionalizado com o nanocompósito CNTs-PAH/Ptd; MIP com etapa de remoção da STEAP1; MIP sem etapa de remoção da STEAP1; MIP funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd com etapa de remoção da STEAP1; MIP funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd sem remoção da STEAP1; NIP funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd com etapa de remoção.

Capítulo 3 – Discussão e Resultados

No desenvolvimento do biossensor eletroquímico para a detecção da STEAP1 foram realizadas várias otimizações nos diferentes passos de construção anteriormente referidos no capítulo 2. Desta forma, o objetivo do capítulo 3 é descrever e discutir as diferentes otimizações que levaram ao *design* final do biossensor.

3.1. Construção do Biossensor

3.1.1. Síntese do MIP e do NIP

De forma a avaliar o efeito da impressão molecular na construção do biossensor, foram sintetizados dois materiais sensoriais, um MIP, que corresponde a um biossensor com impressão molecular da STEAP1 e um NIP, que não contém impressão molecular.

O presente trabalho foi inicialmente baseado no trabalho descrito por *Rui S.Gomes* e colaboradores, o qual descreve o desenvolvimento de um biossensor para a detecção de uma proteína associada ao cancro da mama (CA 15-3), pela utilização da tecnologia de impressão molecular. Para o desenvolvimento do biossensor, foi realizada a eletropolimerização de uma mistura reacional de PY-COOH, CA 15-3 e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) através da técnica de CV, sendo a proteína posteriormente removida por via enzimática com a tripsina [44].

Posto isto, após algumas modificações e otimizações, efetuou-se um pré-tratamento eletroquímico com KCl, seguido da fixação do nanocompósito CNTs-PAH/Ptd na superfície do C-SPE para ambos os materiais MIP e NIP. Posteriormente, para o passo de eletropolimerização foram realizadas duas misturas reacionais diferentes. No caso do MIP, foi realizada uma mistura reacional contendo o PY-COOH e a STEAP1. Relativamente ao NIP, a mistura reacional apenas continha o polímero PY-COOH.

Sendo que um dos objetivos na construção do biossensor seria incorporar o nanocompósito de CNTs-PAH/Ptd na superfície, cujo objetivo se focou em tornar o biossensor mais condutor e conseqüentemente mais sensível a alterações na sua superfície, a primeira otimização passou por confirmar se realmente este nanomaterial apresentaria o efeito esperado na superfície do biossensor.

Desta forma, após o pré-tratamento eletroquímico, incubaram-se 5 µl da solução de CNTs-PAH/Ptd na superfície do WE a 60°C por 20 minutos, repetindo duas vezes este procedimento. No final, através da leitura com solução *redox* de ferro, obtiveram-se gráficos de EIS e de CV, tal como demonstrado na Figura 3.1.

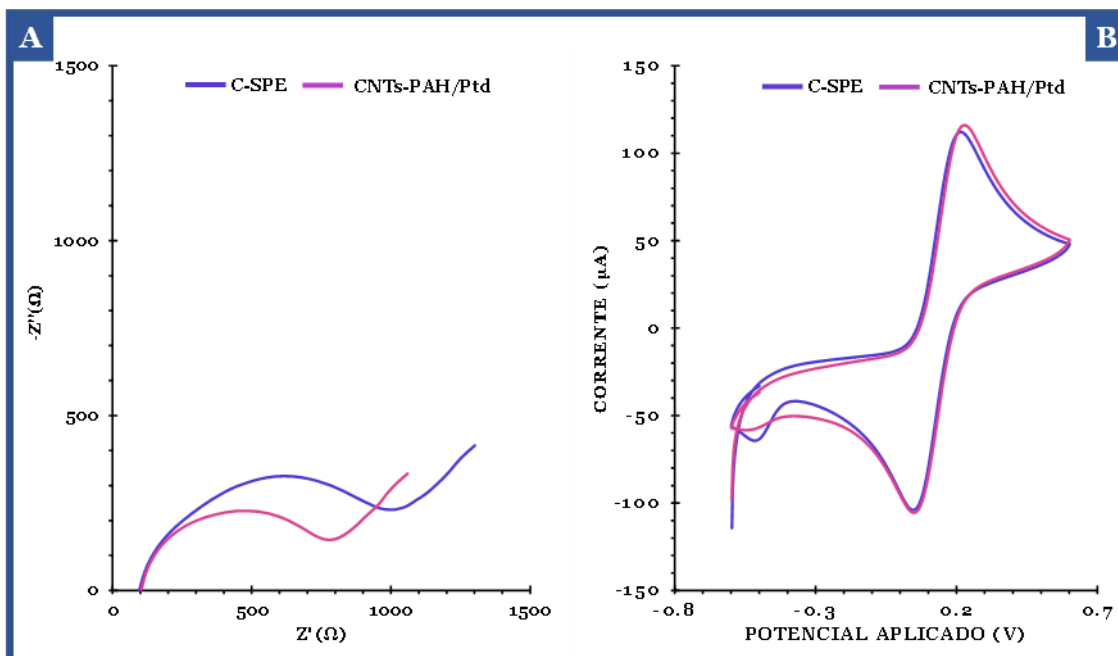


Figura 3.1: Resultados da leitura em solução redox de ferro após a fixação de CNTs-PAH/Ptd. (A) representa o gráfico de EIS antes e depois da fixação do composto. (B) representa o gráfico de CV antes e após a fixação do composto.

Após a análise da Figura 3.1, relativamente ao gráfico da EIS (A), é possível concluir que, comparando a superfície C-SPE (após a limpeza eletroquímica com KCl) e a superfície com CNTs-PAH/Ptd (após a fixação do nanocomposto), tal como seria de prever, deu-se um decréscimo explícito na resistência à transferência de carga, o que se deve principalmente à elevada condutividade do nanocomposto.

Em termos do gráfico relativo à técnica de CV (B), é de notar um ligeiro aumento da corrente nos picos de oxidação/redução da superfície CNTs-PAH/Ptd, facto este que permite constatar que o nanocomposto implementa no sistema biossensor uma diminuição da resistência à carga devido às suas propriedades de condutividade.

Em suma, após a análise dos resultados relativos ao papel dos CNTs-PAH/Ptd na superfície do C-SPE, é de concluir que a sua utilização alcançou o objetivo previsto em termos de melhoria da condutividade da superfície. No entanto, é igualmente fundamental comprovar o seu efeito na etapa final de deteção, resultados esses que serão discutidos posteriormente.

No que diz respeito ao passo de eletropolimerização, num passo inicial foi utilizada a técnica de CV com gama de potencial entre -0.8 e 1.1 V e com velocidade de varrimento de 0.02V/s. A Figura 3.2 demonstra os resultados da eletropolimerização para os diferentes materiais MIP e NIP.

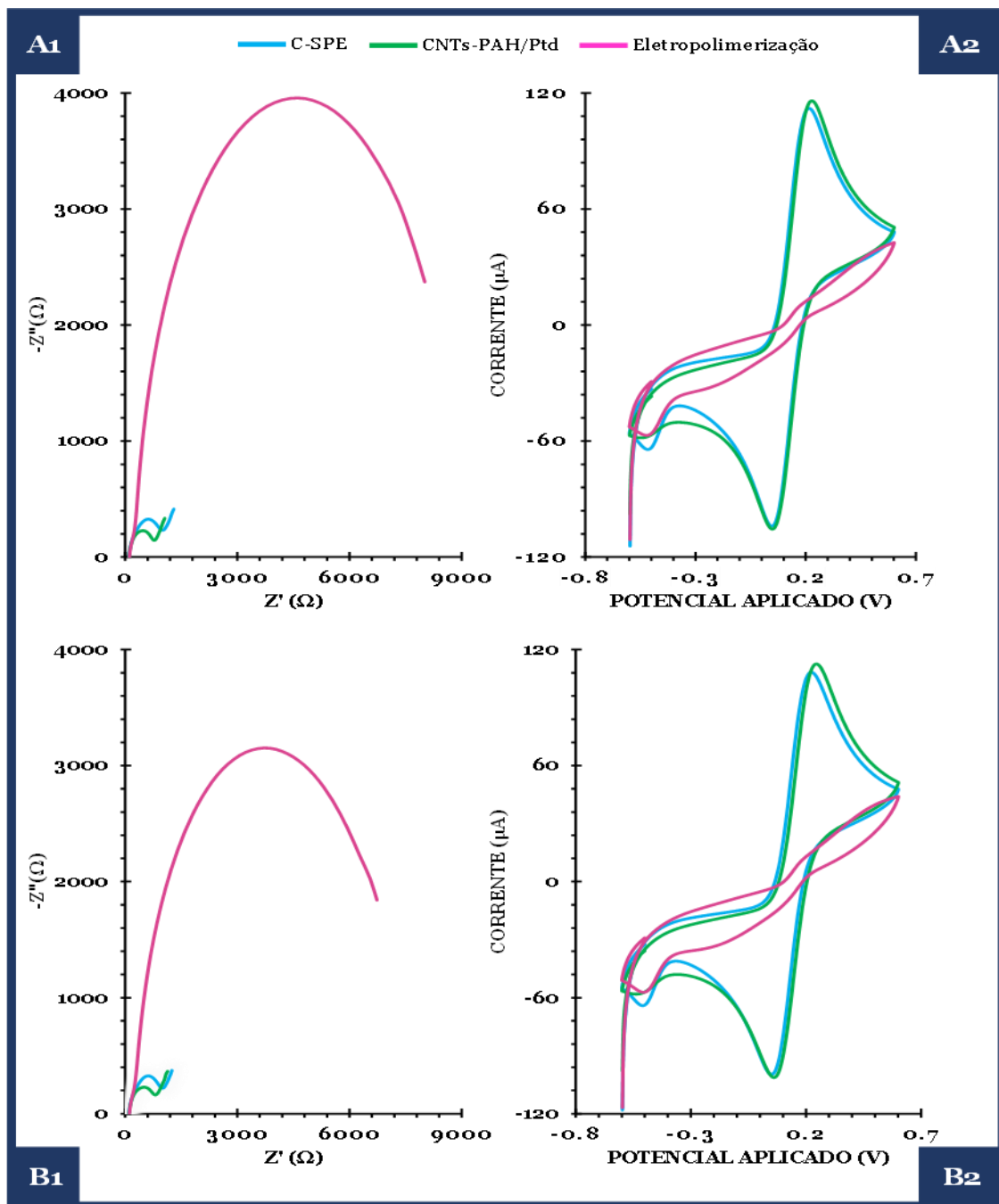


Figura 3.2: Resultados relativos às leituras com a solução redox de ferro para (i) C-SPE após pré-tratamento eletroquímico, (ii) após a fixação à superfície do compósito CNTs-PAH/Ptd e (iii) após eletropolimerização para MIP (A) e NIP (B).

De acordo com os resultados referenciados na Figura 3.2 é possível comprovar o sucesso da eletropolimerização tanto no MIP (Figura 3.2 A) como no NIP (Figura 3.2 B), através do aumento significativo da resistência à passagem de corrente presente em ambos os gráficos relativos à técnica EIS (gráfico A1 e B1). Adicionalmente, em ambos os gráficos relativos à CV (gráfico B1 e B2) é possível visualizar uma diminuição significativa do valor da corrente dos picos de oxidação/redução, o que mais uma vez remete para a formação da matriz polimérica em ambos os materiais MIP e NIP.

Ambas as alterações observadas podem ser explicadas pelo princípio do aumento de massa à superfície do C-SPE devido à formação da matriz polimérica isolante, o que conseqüentemente leva a um aumento da resistência à passagem de carga à superfície, tornando esta menos condutora [109].

No que diz respeito à diferenciação entre os materiais MIP e NIP, é de notar que o MIP após eletropolimerização apresentou uma maior resistência à passagem de corrente, o que é facilmente entendido devido à presença de proteína, o que leva a um aumento adicional de massa à superfície em relação ao NIP, que apenas continha polímero na sua mistura reacional.

Seguidamente foi efetuada a etapa de remoção da proteína tanto no MIP como no NIP (ponto 3.1.3), de forma a avaliar o efeito do agente de remoção na matriz polimérica com e sem proteína.

Ao longo dos próximos tópicos serão abordadas as diferentes otimizações realizadas, sendo evidenciadas as diferenças significativas entre MIP e NIP, em especial na etapa de avaliação da *performance* do biossensor na deteção de STEAP1.

3.1.2. Efeito dos agentes de remoção na matriz polimérica

O papel do agente de remoção é essencial na *performance* do biossensor, isto porque, uma vez que se trata de um MIP, o objetivo é remover a proteína sem danificar a matriz polimérica.

Assim, em condições ideais, o agente de remoção deve promover uma alteração do sinal do MIP e deve manter o sinal do NIP praticamente inalterável, o que iria significar que ocorreu a remoção da proteína sem riscos da sua adsorção à superfície e sem danificação da matriz polimérica. Desta forma, foram testados diferentes agentes de remoção tais como a proteinase K, a proteinase K juntamente com o ácido oxálico, a tripsina a pH 6 e a tripsina a pH fisiológico.

Uma vez que o ponto isoelétrico da STEAP1 é de 9.28, dependendo do pH do meio, esta pode encontrar-se em estado positivo ou negativo [110]. Uma vez que a pH fisiológico (pH de 7.4) a proteína se encontra com carga positiva e dado que a solução *redox* de ferro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) contém cargas negativas, irá ocorrer uma interação iónica entre a proteína e a solução *redox*, o que levará a uma diminuição da resistência à passagem de corrente. No entanto, durante a remoção da proteína por via do agente de remoção, dá-se uma diminuição do número de cargas positivas no meio, o que leva a uma menor interação com a solução *redox* e a um aumento conseqüente da resistência à passagem de corrente. Neste sentido, será de esperar que após a remoção da proteína, com qualquer um dos agentes de remoção testados, haja um aumento da resistência à passagem de corrente, uma vez que o pH do meio é sempre inferior ao ponto isoelétrico da proteína.

De forma a avaliar o efeito dos diferentes agentes de remoção, recorreu-se às leituras com a solução *redox* de ferro, obtendo-se assim informação acerca da alteração da superfície aquando da incubação com tais agentes, tal como demonstrado na Figura 3.3.

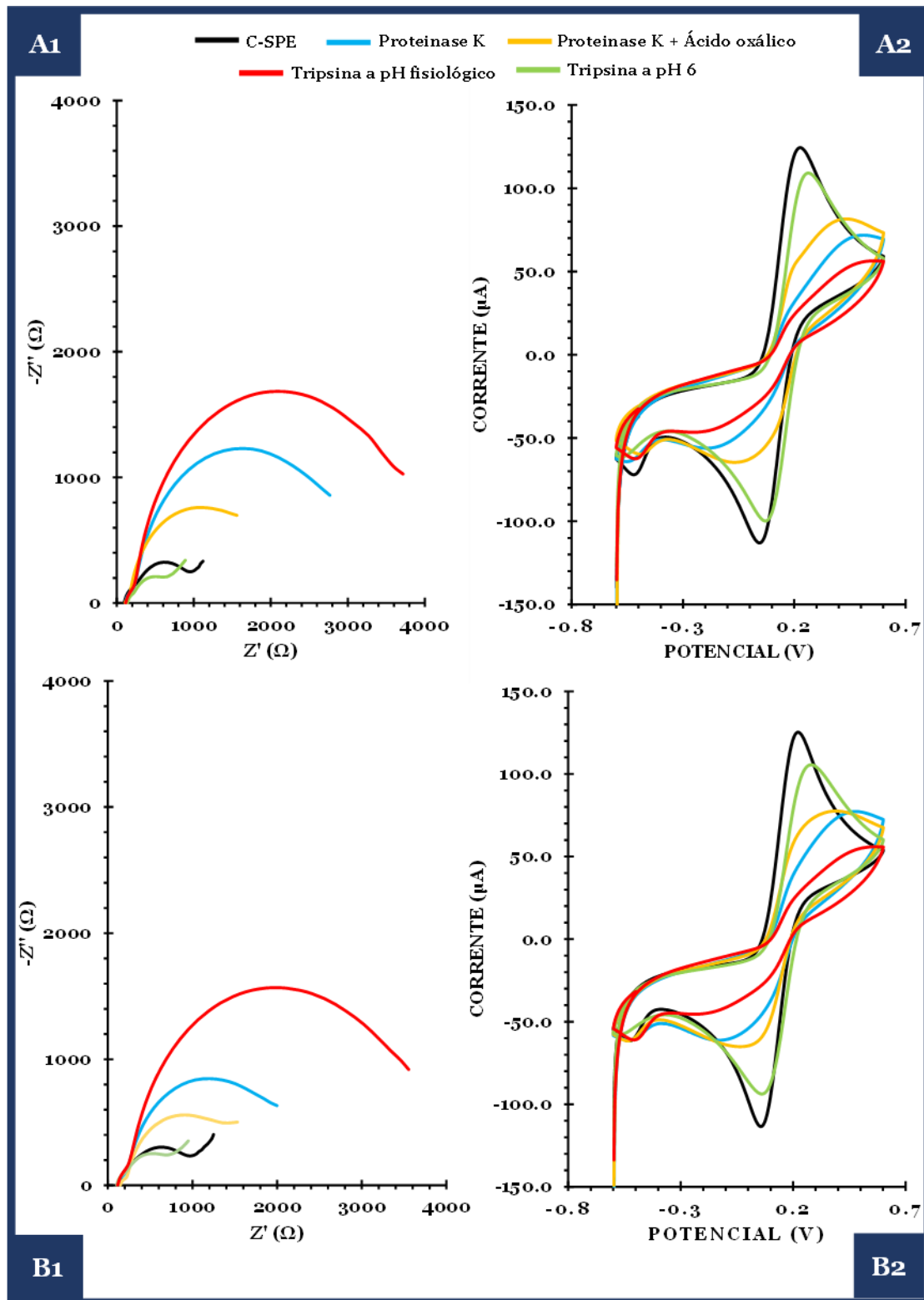


Figura 3.3: Resultados de leituras com solução redox de ferro referentes à técnica EIS (A1 e B1) e CV (A2 e B2) após incubação de quatro diferentes agentes de remoção em MIP (A) para: (i) MIP + proteinase K; (ii) MIP + proteinase K + ácido oxálico; (iii) MIP + tripsina a pH 6; (iv) MIP + tripsina a pH fisiológico e em NIP (B) para: (i) NIP + proteinase K; (ii) NIP + proteinase K + ácido oxálico; (iii) NIP + tripsina a pH 6; (iv) NIP + tripsina a pH fisiológico.

Pela análise da Figura 3.3, tal como seria de prever, após a remoção da STEAP1 com os agentes de remoção, há um aumento significativo da resistência à passagem de corrente (com exceção da remoção efetuada com tripsina a pH 6). Comparativamente ao trabalho descrito por *M. de Lurdes Gonçalves* e colaboradores, que focou no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção de interleucina-6 através da técnica de impressão molecular, aquando da remoção da biomolécula ocorreu igualmente um aumento da resistência à passagem de corrente, ao invés da suposta diminuição da resistência pela diminuição de massa à superfície do WE. Este fenómeno está associado à diminuição de cargas positivas à superfície, uma vez que antes da sua remoção a proteína se encontrava protonada à superfície do WE e, após a sua remoção, deu-se uma diminuição da interação iónica entre a proteína e a solução *redox* de ferro ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$), levando a um conseqüente aumento da resistência à passagem de carga [111].

Relativamente à análise do comportamento dos materiais NIP após serem expostos aos diferentes agentes de remoção, há igualmente um aumento da resistência à passagem de corrente após o procedimento de incubação. Tal comportamento pode ser justificado não devido à interação iónica, uma vez que não existe proteína protonada na superfície, mas sim por motivos ou de adsorção do agente de remoção à superfície ou, simplesmente, por alteração química da superfície da matriz polimérica, o que acaba por se tornar inevitável. No que toca à impregnação da técnica de impressão molecular no desenvolvimento de um biossensor, é quase inevitável que a superfície do NIP não seja alterada após o processo de remoção, tal como observado na literatura [44], [111], [112].

Em relação aos diferentes agentes de remoção testados, tanto a tripsina a pH 6, a proteinase K e a sua conjugação com o ácido oxálico, não apresentaram qualquer resultado positivo na *performance* do biossensor, tendo-se obtido calibrações sem linearidade. No entanto, apesar da tripsina a pH fisiológico ter demonstrado uma maior variação em termos de aumento da resistência, esta foi a que levou a uma calibração mais linear, tal como pode ser observado na Figura 3.4.

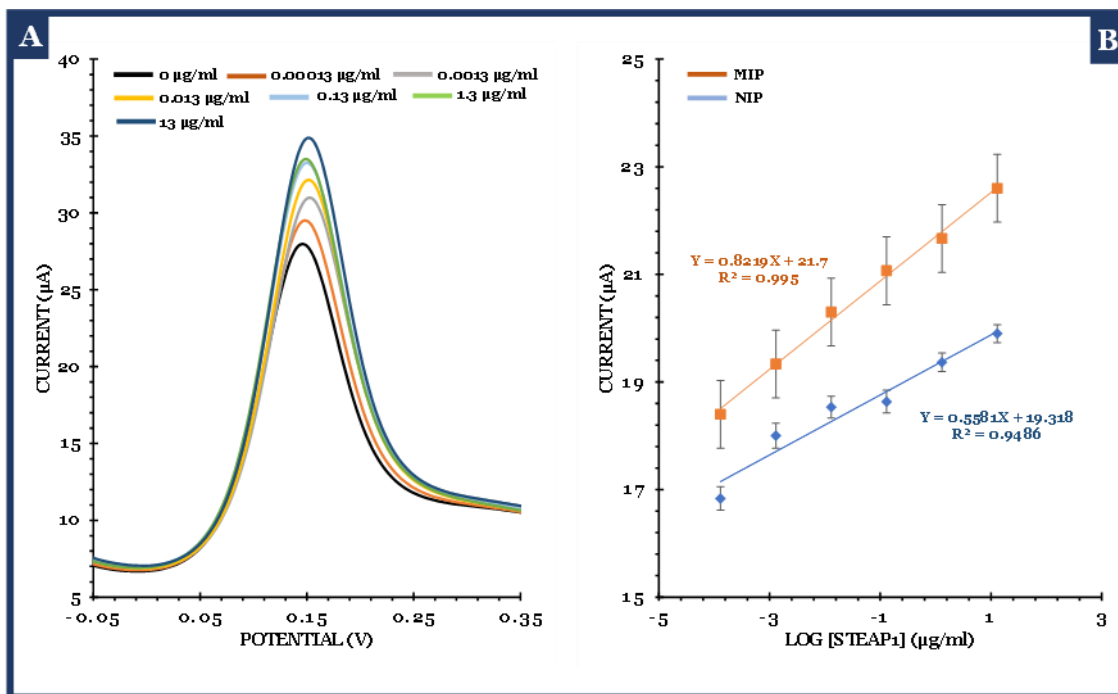


Figura 3.4: Resultados relativos à calibração com os diferentes padrões, utilizando a tripsina a pH fisiológico como agente de remoção. Em (A) está presente o gráfico relativo à SWV correspondente à calibração em PBS de um MIP. Em (B) estão presentes as retas de calibração com as respectivas barras de erro de triplicados de MIP e NIP.

Da análise dos resultados constata-se que, apesar de a tripsina a pH fisiológico ter alterado notoriamente a superfície do NIP, a calibração do MIP demonstrou alta linearidade, sendo que o aumento do sinal é diretamente proporcional ao aumento da concentração de STEAP1. Além disso, no que diz respeito às retas de calibração, o MIP apresentou um melhor valor de declive (0.8219), que é sinónimo de maior sensibilidade, e maior valor de R^2 (0.995) em relação ao NIP (declive de 0.5581 e R^2 de 0.9486).

Assim podemos concluir que a tripsina a pH fisiológico é a melhor opção como agente de remoção, salientando a ideia de que a técnica de impressão molecular é realmente uma mais-valia na *performance* do biossensor.

3.1.3. Otimização dos parâmetros de eletropolimerização

A eletropolimerização foi realizada recorrendo à técnica de CV. Inicialmente, foi necessário definir a gama de potencial a utilizar, pelo que se concluiu que a melhor gama seria de -0.8 a 1.1 V, uma vez que o pico de oxidação do PY-COOH ocorre ao potencial de 0.9 V.

Posteriormente, outro fator a otimizar foi a velocidade de varrimento, de forma a obter uma matriz polimérica mais estável. Tal como já foi referido anteriormente, a velocidade de varrimento, no caso da impressão molecular, influencia diretamente a porosidade da matriz polimérica, ou seja, quanto maior a velocidade de varrimento, maior a porosidade da matriz formada pela eletropolimerização do PY-COOH.

Ao longo das otimizações anteriormente referidas, foi utilizada uma velocidade de varrimento de 0.02 V/s, tal como descrito por *Rui S.Gomes* e equipa de investigação [113]. No entanto, foi testada uma velocidade superior de 0.05 V/s, de forma a analisar se este fator facilitava a ligação da proteína à matriz e a sua posterior remoção. A Figura 3.5 apresenta os resultados das leituras com a solução *redox* de ferro referentes à alteração da superfície do sensor com as diferentes velocidades de varrimento testadas.

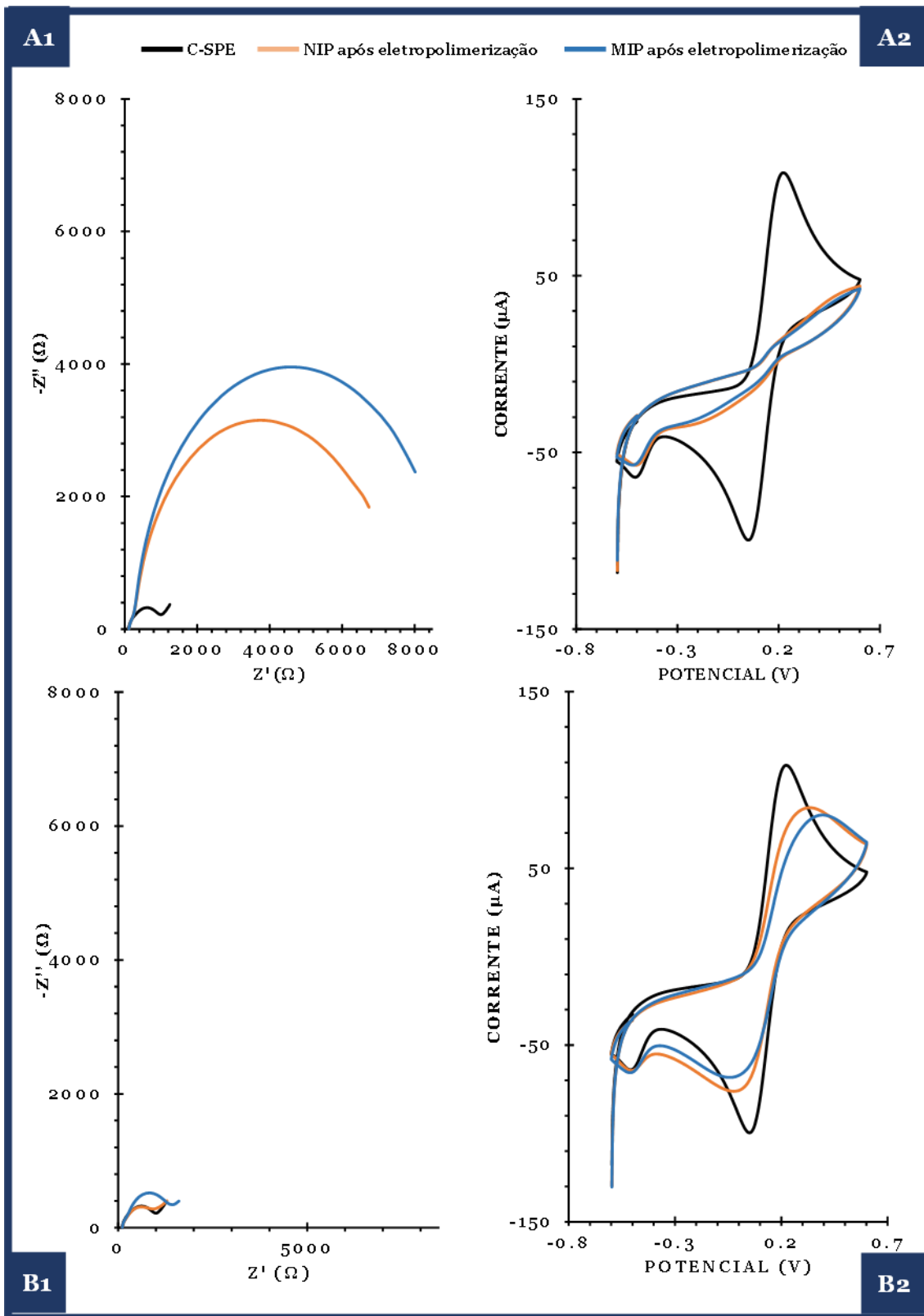


Figura 3.5: Resultados relativos às leituras com solução redox de ferro para diferentes velocidades de varrimento (0.02 e 0.05 V/s). Em (A1) e (A2) estão presentes os gráficos de EIS e CV, respectivamente, para a velocidade de varrimento de 0.02 V/s. Em (B1) e (B2) estão presentes os gráficos de EIS e CV, respectivamente, para a velocidade de varrimento de 0.05 V/s.

Em cada um dos gráficos representados na Figura 3.5, estão referidas as leituras para o sensor C-SPE, MIP e NIP após a eletropolimerização. Pelos perfis obtidos constata-se que, para 0.02 V/s de velocidade de varrimento existe um aumento significativo da resistência à passagem de corrente em relação à velocidade de 0.05 V/s (gráficos A1 e B1). Este registo é explicado pela porosidade da matriz polimérica, ou seja, quanto maior a velocidade de varrimento, maior o diâmetro dos poros formados pela eletropolimerização do PY-COOH. Assim, e de acordo com *Alexandra R. T. Santos* e colaboradores, maiores velocidades de varrimento originam poros que possam dificultar a impressão molecular devido ao tamanho destes ser superior ao diâmetro da biomolécula. Adicionalmente, com o aumento da velocidade de varrimento há um aumento da transferência de eletrões, com conseqüente diminuição da resistência à passagem de corrente [114].

Posto isto, pela observação dos gráficos relativos à EIS (A1 e B1) existe uma elevada discrepância no que diz respeito à resistência à passagem de corrente. Com a velocidade de varrimento de 0.05 V/s a resistência é significativamente menor, o que se deve à maior facilidade de passagem de eletrões entre os poros da matriz polimérica. No que refere aos gráficos relativos à técnica de CV (A2 e B2) o mesmo sucede, há uma diferença acentuada nos picos de oxidação/redução, sendo estes mais evidentes para 0.05 V/s, devido à maior facilidade de passagem de eletrões.

De forma a entender a influência das diferentes velocidades de varrimento testadas na *performance* do biossensor, a Figura 3.7 representa as retas de calibração dos MIPs com 0.02 V/s e com 0.05 V/s de velocidade de varrimento.

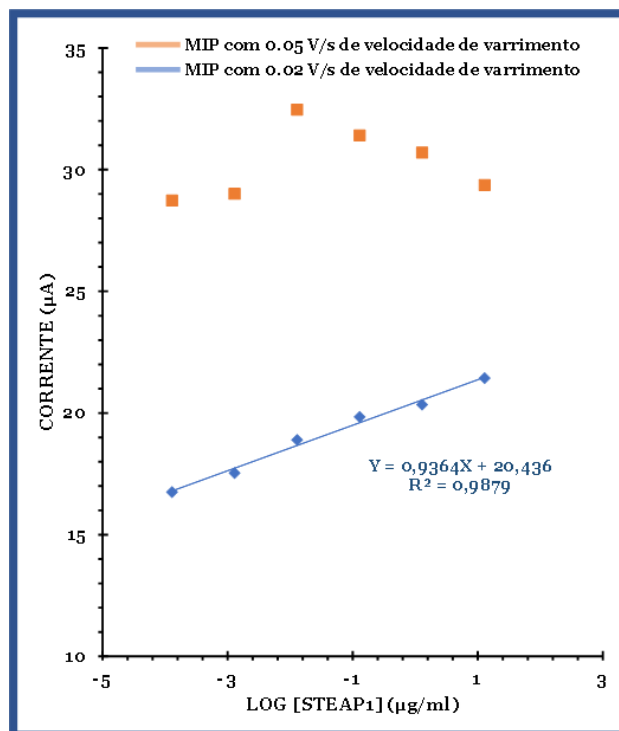


Figura 3.6: Retas de calibração correspondentes ao MIP com 0.02 V/s e ao MIP com 0.05 V/s de velocidades de varrimento.

De acordo com a Figura 3.6 a velocidade de varrimento de 0.02 V/s foi, sem dúvida, a que levou à melhor performance do biossensor (declive de 0.9364 e R^2 de 0.9879), apresentando linearidade de valores. No caso de 0.05 V/s não foi possível traçar qualquer tipo de reta, uma vez que apresentou um resultado completamente aleatório na calibração, sem linearidade.

Assim sendo, conclui-se que com 0.05 V/s poderá não ter ocorrido impressão molecular devido ao diâmetro de poros da matriz polimérica ser superior ao diâmetro da proteína, o que é justificado não só pela aleatoriedade da reta de calibração, mas também pela reduzida resistência à passagem de corrente.

3.1.4. Estudo das condições de concentração de STEAP1

Após a otimização da etapa de remoção da proteína, outro fator de estudo é a otimização das condições da solução de polimerização, nomeadamente a concentração de STEAP1. É importante salientar que a concentração de proteína é fundamental para a impressão molecular, uma vez que, quanto maior a concentração, maior o número de impressões da mesma na superfície da matriz polimérica [110].

Por outro lado, a utilização de uma concentração demasiado elevada poderá levar a uma saturação da rede, impedindo a certo ponto a eletropolimerização do PY-COOH [109].

No estudo das condições de remoção foi utilizada na solução reacional uma concentração de proteína *standart* de 0.1 µg/mL. No entanto, optou-se por testar uma segunda concentração de 1 µg/mL, de forma a avaliar a *performance* do biossensor aquando de diferentes condições de concentração, utilizando a tripsina a pH fisiológico como agente de remoção.

Na Figura 3.7 estão presentes os resultados relativos às leituras com a solução *redox* de ferro antes da remoção e após a remoção com tripsina.

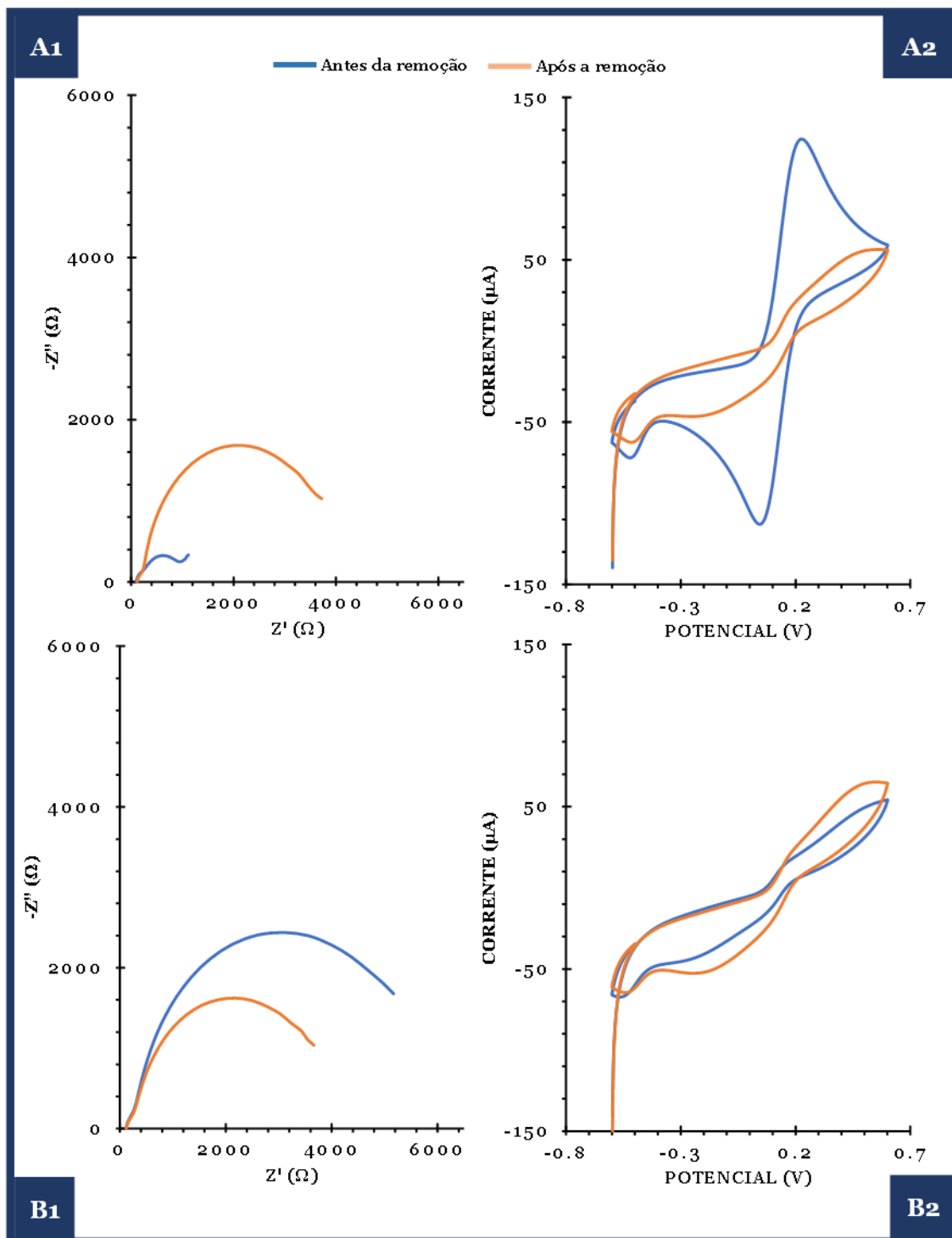


Figura 3.7: Resultados relativos às leituras com solução redox de ferro para diferentes concentrações de proteína (0.1 e 1 µg/mL). Em (A1) e (A2) representam-se os gráficos de EIS e CV, respetivamente, para a concentração de STEAP1 de 0.1 µg/mL. Em (B1) e (B2) estão presentes os gráficos de EIS e CV, respetivamente, para a concentração de STEAP1 de 1 µg/mL.

Da análise dos resultados apresentados na Figura 3.7, podemos constatar que para o MIP com 0.1 µg/mL de STEAP1, relativamente ao gráfico A1, como seria de prever ocorreu um aumento da resistência à passagem de corrente após a remoção da STEAP1 devido à diminuição da interação iónica entre a proteína protonada e a solução *redox* de ferro.

Por sua vez, no caso do gráfico B1, relativo ao MIP com 1 µg/mL de STEAP1, ocorreu o inverso, havendo uma redução da resistência à passagem de corrente. Tal facto ocorreu devido à concentração superior de proteína, que teve um maior impacto aquando da eletropolimerização na matriz, devido à formação de um maior número de cavidades. Assim, uma vez que na eletroquímica existe um balanço entre cargas e massa à superfície, após remoção da STEAP1 ocorreu uma maior redução de massa à superfície do WE, provocando uma diminuição na resistência à passagem de corrente e balanceando o efeito da interação iónica. Além desse facto, aquando da eletropolimerização, o MIP com 1 µg/mL de STEAP1 apresentou uma maior resistência à passagem de corrente (B1) do que o MIP com 0.1 µg/mL de STEAP1 (A1), o que se deve ao aumento de massa à superfície devido à maior concentração de STEAP1 utilizada na solução de polimerização.

De forma a comprovar as diferenças entre as duas concentrações de proteína utilizadas foram construídos triplicados de MIPs com 0.1 µg/mL de STEAP1, MIPs com 1 µg/mL de STEAP1 e NIPs (sem proteína), sendo posteriormente construídas retas de calibração com as médias da altura do pico relativo à técnica SWV para a incorporação de barras de erro, de forma a definir a melhor concentração de STEAP1 a utilizar, conforme demonstrado na Figura 3.8.

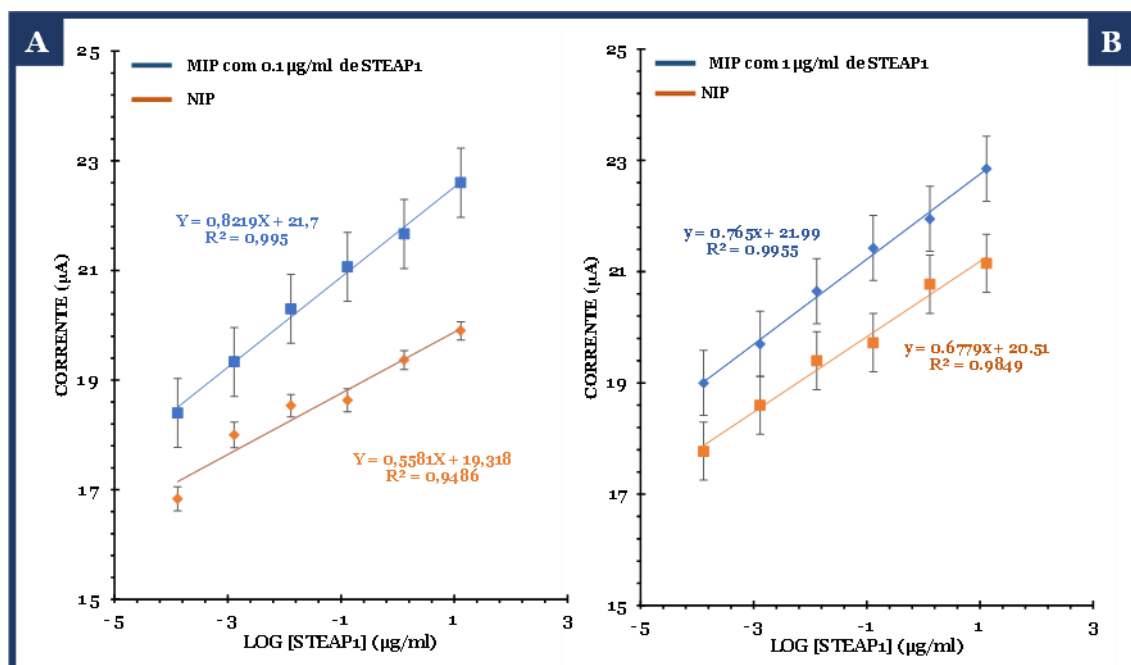


Figura 3.8: Retas de calibração com as médias de triplicados, juntamente com as respetivas barras de erro. (A) corresponde às retas de calibração de MIP com 0.1 µg/mL de STEAP1 e de NIP. (B) corresponde às retas de calibração de MIP com 1 µg/mL de STEAP1 e de NIP.

Tendo em consideração os resultados obtidos (Figura 3.8), é de concluir que o MIP com 0.1 µg/mL de proteína apresentou maior sensibilidade (declive de 0.8219) e um valor semelhante de R² (0.995) relativamente ao MIP com 1 µg/mL de proteína (declive de 0.765 e R² de 0.9955).

Desta forma, sabendo que o MIP com menor concentração de proteína apresentou boa linearidade, reprodutibilidade e maior sensibilidade, foi estabelecido avançar os restantes estudos com o mesmo.

Adicionalmente, constata-se na Figura 3.8 que a impressão molecular é indispensável no desenvolvimento do biossensor, uma vez que os resultados de calibração em NIP são insatisfatórios em relação a ambos os MIPs desenvolvidos.

3.1.5. Estudo do efeito do compósito CNTs-PAH/Ptd na etapa de deteção

Apesar de já ter sido comprovado o efeito do compósito CNTs-PAH/Ptd na superfície do sensor, tal como descrito no ponto 1.1, resta provar se realmente a sua incorporação tem um impacto significativo na *performance* do biossensor. Desta forma, foram realizados triplicados de NIPs e MIPs com e sem CNTs-PAH/Ptd, cujos resultados constam na Figura 3.9.

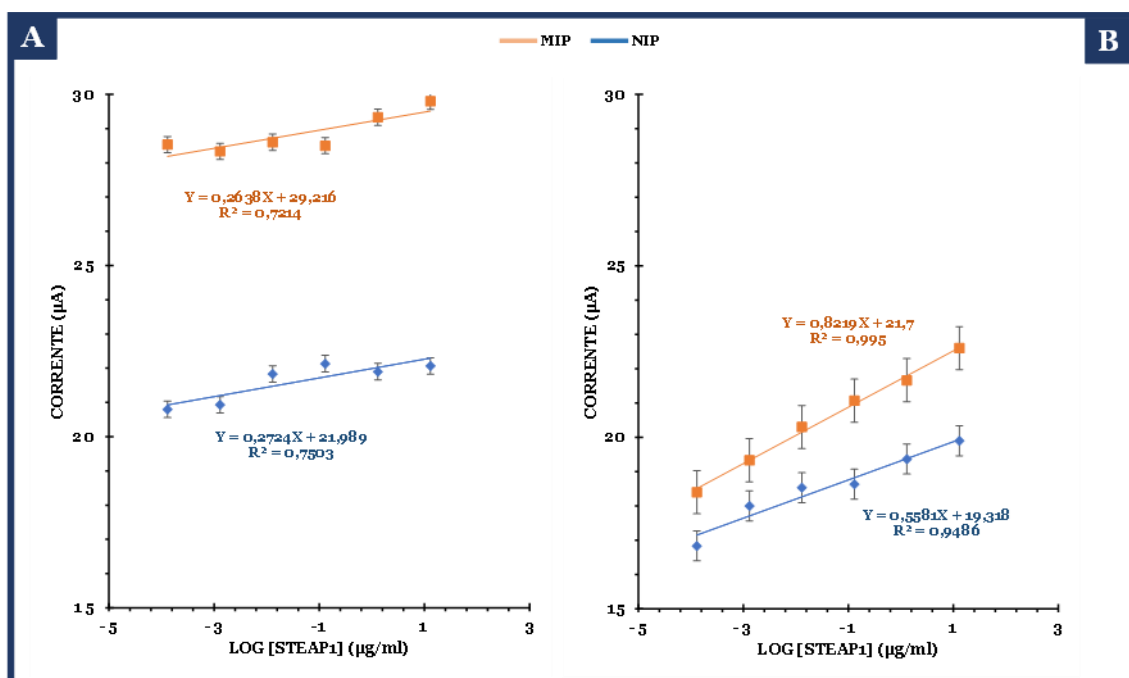


Figura 3.9: Retas de calibração correspondentes a triplicados de MIP e NIP sem (A) e com (B) CNTs-PAH/Ptd.

De acordo com os resultados da Figura 3.8, é de notar que a incorporação do compósito CNTs-PAH/Ptd melhora significativamente a detecção de STEAP₁, o que pode ser comprovado tanto pela maior linearidade das retas de calibração obtidas, como pelos valores de declive e R², correspondentes ao NIP e MIP com CNTs-PAH/Ptd (B) em comparação com os seus correspondentes sem o nanocompósito incorporado (A).

No entanto, no caso dos materiais sensores sem a incorporação do nanocompósito (A), é de notar um valor significativamente superior da corrente, o que pode ser justificado pela utilização de diferentes lotes de chips C-SPE, nos quais existem algumas diferenças em termos da condutividade, fator esse que não pode ser contornado.

Posto isto, é de concluir que a inclusão dos CNTs-PAH/Ptd apresenta um papel fundamental, não só por tornar a superfície do sensor mais condutora, mas também por melhorar a *performance* do biossensor na etapa final de detecção.

3.1.6. Avaliação da performance do biossensor na detecção de STEAP₁ em *pellet* de extratos celulares LNCaP

Após terem sido definidos todos os parâmetros para a construção do biossensor, é fundamental perceber o seu comportamento aquando da detecção de STEAP₁ num meio mais complexo do que o PBS. Desta forma, foram realizadas calibrações em triplicados utilizando padrões diluídos em *pellet* de extratos celulares LNCaP (10 vezes diluído). A Figura 3.10 representa o gráfico relativo à reta de calibração com as médias de triplicados de MIP.

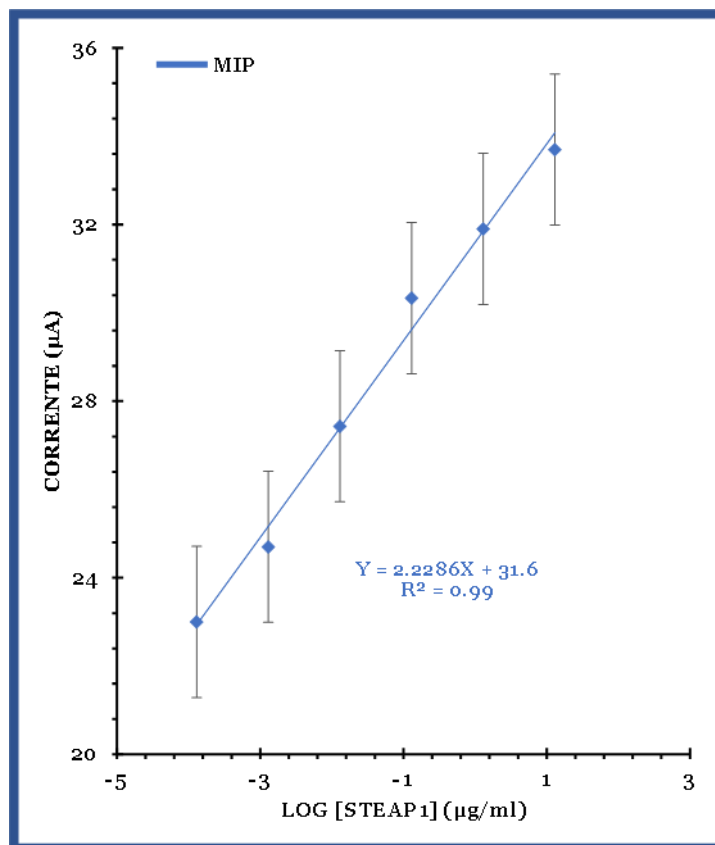


Figura 3.10: Retas de calibração correspondente aos triplicados de calibração em *pellet* de extratos celulares LNCaP de MIP.

Pela observação do gráfico da Figura 3.10, salienta-se a linearidade nos resultados alcançados e a boa sensibilidade do biossensor para a detecção de STEAP1 em *pellet* de extratos celulares LNCaP, o que pode ser comprovado pelo valor de declive e R^2 da reta (2.2286 e 0.99, respetivamente). Em paralelo, foi igualmente testado um NIP que, mais uma vez, não apresentou resultados tão promissores como o MIP.

3.1.7. Estudo da seletividade do biossensor

Após comprovar que o biossensor tem a capacidade de detetar a proteína alvo num meio mais complexo, no caso particular do *pellet* de extratos celulares LNCaP, analisou-se a seletividade do biossensor, de forma a compreender a sua capacidade de distinguir a STEAP1 num meio com potenciais interferentes.

Desta forma, foi analisada a composição do meio de cultura de células LNCaP (meio RPMI 1640) e foram escolhidos dois componentes diferentes, nomeadamente um aminoácido (ácido L-glutâmico) e uma vitamina (ácido aminobenzóico) [115].

Tal como referido anteriormente no capítulo 2 (ponto 1.3.3.), o ácido L-glutâmico foi utilizado a uma concentração de 2 µg/mL (diluição de 10 vezes) e o ácido aminobenzóico a uma concentração de 0.1 µg/mL (diluição de 10 vezes). Além disso, foi testado um 3º possível interferente, neste caso uma proteína, a CEA (antigénio carcinoembriogénico), pelo facto de, tal como a STEAP1, ser uma biomolécula associada a uma doença oncológica, neste caso o cancro colorretal. A CEA foi utilizada a uma concentração de 0.00025 µg/mL, que constitui o seu limite fisiológico detetável em amostras de soro [116].

Posto isto, a percentagem de interferência foi avaliada através do método de mistura, que consistiu em realizar dois MIPs, um no qual foi apenas avaliada a deteção de um padrão de STEAP1 (0.013 µg/mL) e outro em que se avaliou a interferência de uma mistura de STEAP1 com o interferente, sendo que o objetivo passe por não haver diferença de sinal entre ambos os MIPs. A Figura 3.10 representa o gráfico relativo aos resultados de triplicados com os três interferentes testados e as respetivas variações percentuais.

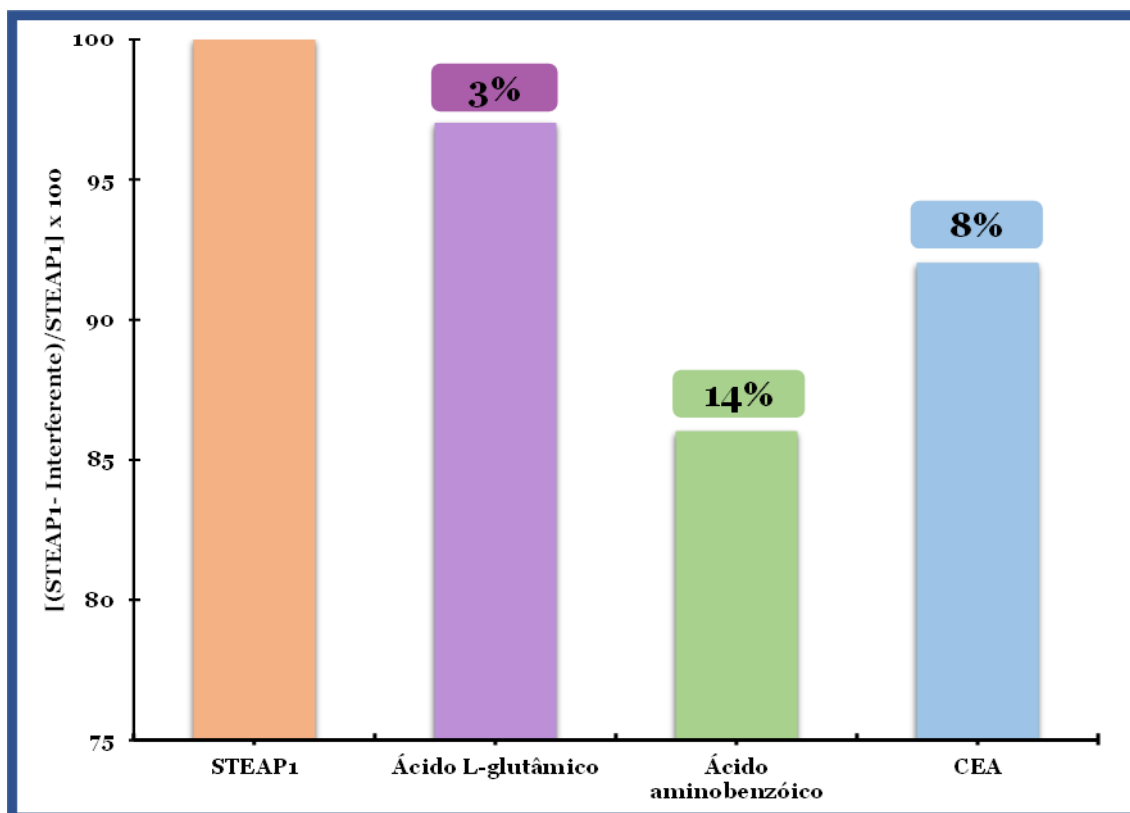


Figura 3.11: Gráfico que representa os resultados do teste de seletividade realizado para diferentes espécies interferentes.

Pela análise da Figura 3.11, é de notar que o ácido aminobenzóico foi o interferente com mais impacto na superfície do biossensor, apresentando uma variação de 14% em relação ao sinal da STEAP1.

Por contraste, o ácido L-glutâmico foi o interferente com menos impacto na alteração da superfície do biossensor. No entanto, no geral todos os interferentes testados apresentaram uma variação dentro do limite aceitável [117].

Em conclusão, apesar de só terem sido testados três espécies interferentes, pode-se dizer que o biossensor é seletivo para a detecção da STEAP1.

3.2. Caracterização dos Materiais

3.2.1. Caracterização físico-química em Raman

A espectroscopia de *Raman* é uma técnica de alta resolução que pode fornecer rapidamente informação química e estrutural de um material. Os espectros obtidos através desta técnica possuem 3 picos característicos e distintos: 1 pico referente à banda G, que corresponde à ligação de carbono (C=C); 1 pico relativo à banda D, que corresponde aos defeitos, ou seja, à desordem estrutural dos materiais e, por fim, 1 pico correspondente à banda 2D, que corresponde ao prolongamento da banda G com frequências mais elevadas [99], [118].

No que diz respeito à banda G, relativa à frequência de deslocamento tangencial (próxima de 1590 cm^{-1}), esta é sensível à transferência de carga entre a superfície do eletrodo e a mistura reacional [119]. Além disso, a banda G está igualmente relacionada com o modo tangencial (no plano) de dois átomos de carbono em vibração um com o outro, modo denominado por simetria de camada interna E_{2g} , que representa o grau de cristalinidade dos materiais [118].

Por sua vez, a banda D, com intensidade compreendida entre 1290 e 1350 cm^{-1} , está relacionada com camada amorfa do carbono. Assim, a banda D está associada aos defeitos e às modificações químicas da estrutura hexagonal dos carbonos [120].

O índice ID/IG é particularmente útil para avaliar as diferentes modificações nos materiais. Assim, um valor de índice ID/IG superior está associado a uma estrutura com mais defeitos e, por sua vez, um índice ID/IG inferior está associado a uma estrutura mais cristalina [118].

Posto isto, foram analisados por *Raman* os seguintes materiais:

- C-SPE;
- CSPE-CNTs-PAH/Ptd;
- NIP;
- MIP sem remoção da STEAP1;
- MIP com remoção da STEAP1.

Após a análise dos materiais acima mencionados, é necessário, através dos espectros de *Raman*, avaliar a intensidade das bandas G e D, bem como analisar o valor do índice ID/IG, de modo a que seja possível comparar e avaliar as principais diferenças registadas.

Na Tabela 3.1 estão discriminados os valores relativos às bandas D e G e ao índice ID/IG obtidos através dos espectros de cada um dos materiais em análise (Figura 3.12).

Tabela 3.1: Resultados dos valores de bandas e índice ID/IG resultantes da análise em Raman.

Materiais	Banda D (cm ⁻¹)	Banda G (cm ⁻¹)	ID/IG
C-SPE	770.64	1000.76	0.772
C-SPE-CNTs-PAH/Ptd	550.34	764.37	0.725
NIP	561.57	912.73	0.615
MIP sem remoção	738.9	882.00	0.844
MIP com remoção	738.1	934.96	0.789

+

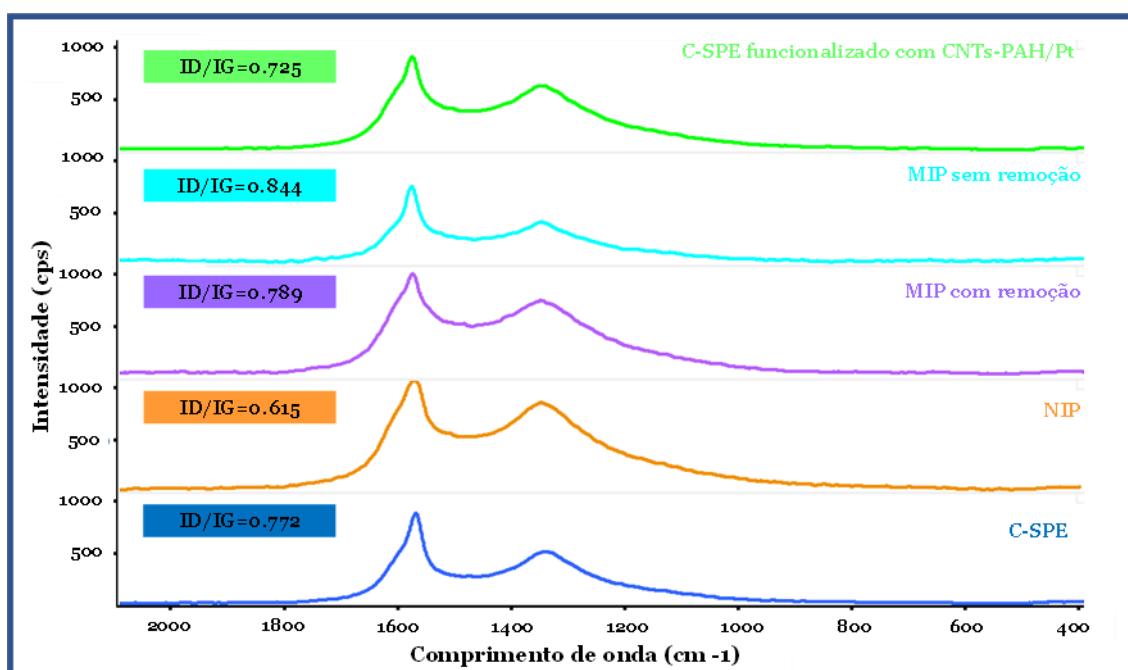


Figura 3.12: Gráficos resultantes da análise em Raman para diferentes materiais sensores.

Analisando a estrutura geral do espectro (Figura 3.12), são destacados dois picos muito distintos. O primeiro pico está presente na região à volta dos 1300 cm⁻¹ (banda D) e o segundo na região dos 1600 cm⁻¹ (G). Além disso, é igualmente indicado o rácio da intensidade entre os picos D e G, o que é especialmente útil para determinar a pureza e o grau de modificação química de cada amostra. Assim, é possível observar diferenças consideráveis de intensidade e deslocamento dos picos entre os diferentes materiais.

Comparando a presença e o deslocamento das bandas entre o C-SPE e o C-SPE funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd, com valores de índice ID/IG de 0.772 e 0.725, respetivamente, tal diminuição do índice deve-se ao facto da presença de um decréscimo dos defeitos estruturais da amostra devido à presença dos nanotubos de carbono (CNTs) no material compósito. Estes mesmos defeitos favorecidos em termos de decréscimo (ID/IG=0.615) com a presença do NIP na superfície do eletrodo modificado com o compósito, o que comprova a presença de polímero na sua superfície.

Relativamente aos espectros *Raman* dos materiais MIP sem remoção e MIP com remoção, as informações mais relevantes envolvem o rácio dos seus picos. Os rácios ID/IG de 0.844 e 0.789 indicam que os defeitos diminuíram devido à remoção da proteína na matriz. Assim, pode ser referido que a proteína interfere com a superfície do biossensor através da indução de desordenação na estrutura do material.

No geral, tais resultados confirmam a ocorrência de modificações químicas no eletrodo, sendo possível distinguir as diferentes etapas de modificação por este meio, tal como registado em diferentes trabalhos presentes na literatura [117], [112], [121].

3.2.2. Microscopia eletrónica de superfície (SEM)

A microscopia eletrónica de superfície (SEM), é uma ferramenta essencial para a análise morfológica dos materiais, sendo capaz de produzir imagens tridimensionais de alta resolução [102]. Desta forma, torna-se essencial comprovar as alterações à superfície induzidas no biossensor. Para tal, foram analisados os seguintes materiais:

- C-SPE;
- CSPE -CNTs-PAH/Ptd;
- MIP com etapa de remoção da STEAP₁;
- MIP sem remoção da STEAP₁;
- MIP funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd com etapa de remoção da STEAP₁;
- MIP funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd sem remoção da STEAP₁;
- NIP funcionalizado com CNTs-PAH/Ptd com etapa de remoção;
- NIP com etapa de remoção.

Foram analisados diferentes materiais com o objetivo de conseguir distinguir as diferentes modificações na superfície do sensor. Neste sentido, na Figura 3.13 estão presentes as imagens tridimensionais obtidas por SEM com um grau de ampliação de 20 000, 50 000 e 100 000 X.

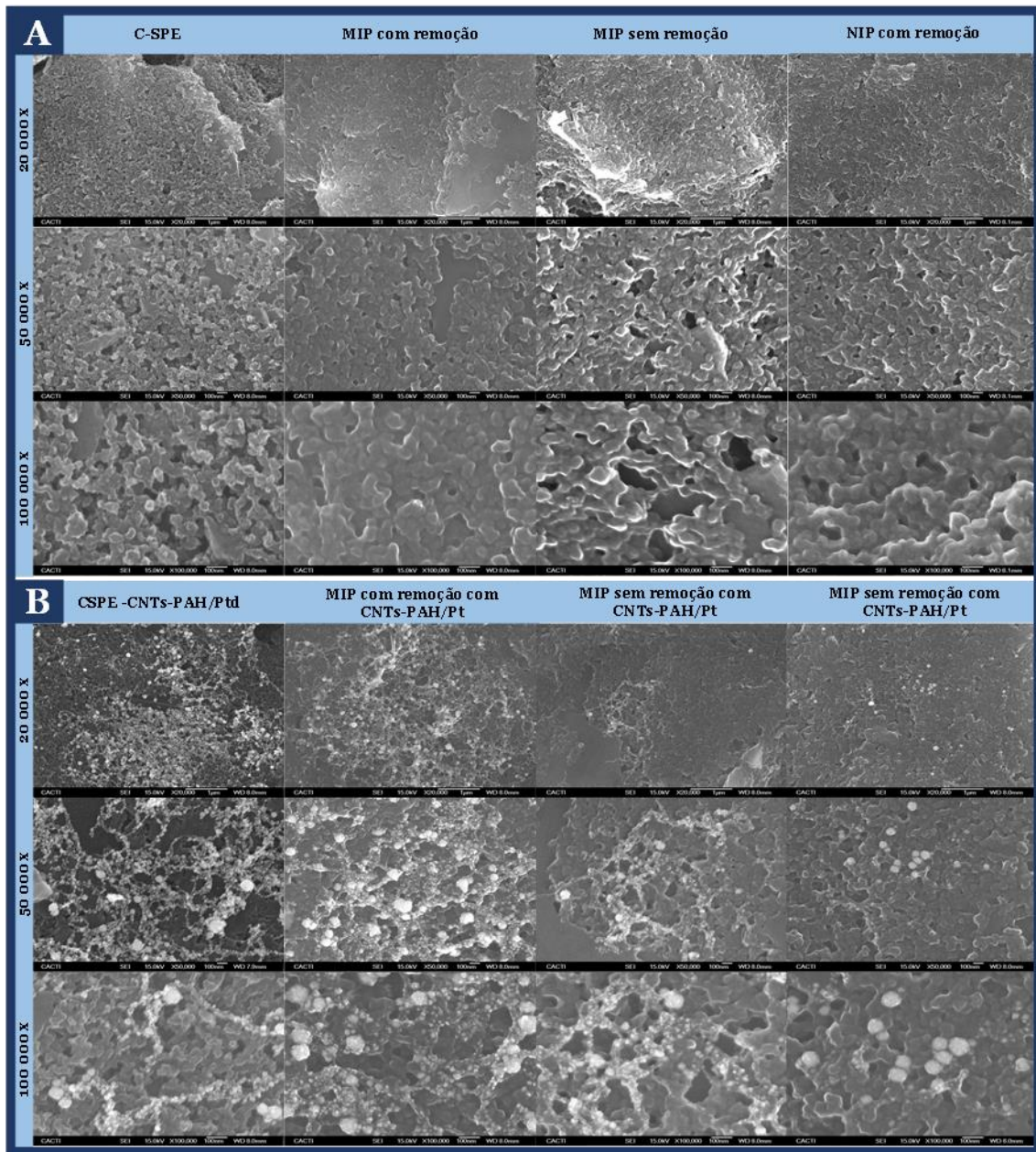


Figura 3.13: Resultados relativos à análise por SEM de diferentes materiais sensores a diferentes ampliações (20 000, 50 000 e 100 000x). Em A) e B), respectivamente, estão apresentados os resultados relativos aos materiais sem o compósito CNTs-PAH/Ptd e os materiais funcionalizados com o compósito CNTs-PAH/Ptd.

Pela análise da Figura 3.13, é possível distinguir as diferentes modificações nos materiais. Primeiramente, comparando a Figura 3.13 A com a Figura 3.13 B, cuja diferença se foca na presença do nanocompósito CNTs-PAH/Ptd, é possível diferenciar no caso da Figura 3.13 B esferas brancas que correspondem ao compósito CNTs-PAH/Ptd, o que significa que a sua fixação à superfície foi realizada com sucesso.

Adicionalmente, é possível observar a presença da matriz polimérica formada pela eletropolimerização do PY-COOH, que se encontra presente em todos os materiais com exceção do material C-SPE e do material CSPE- CNTs-PAH/Ptd (que não continham polímero), o que pode ser visualizado pela diferença na rugosidade da superfície. Relativamente à STEAP1, é possível comprovar a sua presença na Figura 3.13 A pela diferença entre o MIP sem remoção e o NIP, através do aparecimento de manchas mais escuras que não aparecem no NIP (que apenas contém a matriz polimérica). No caso do MIP com remoção funcionalizado com o nanocompósito, a proteína não é tão visível uma vez que se encontra complexada com o polímero e com os CNTs-PAH/Ptd, o que dificulta a sua visualização à superfície. Além disso, a presença da STEAP1 à superfície do material pode também ser comprovada pela diferente rugosidade entre o NIP e o MIP, tanto com remoção como sem remoção.

Capítulo 4 – Conclusão e Perspetivas Futuras

A nível global, o PCa é uma doença altamente incidente em pessoas do sexo masculino. A principal causa de morte provém do diagnóstico da doença num estado mais avançado, minimizando a eficácia do tratamento e a qualidade de vida do paciente. Assim, torna-se essencial o estudo de novas estratégias para a deteção precoce desta oncologia. APSA, apesar de ser o único biomarcador aprovada pela FDA, apresenta algumas limitações, como é o facto de ser uma proteína específica do órgão e não da patologia, o que poderá levar a inúmeros falsos positivos. Assim, a STEAP1 surge como um biomarcador alternativo ao convencional, apresentando evidências da sua elevada expressão apenas em células cancerígenas e maioritariamente na próstata, o que a torna altamente específica para o PCa.

Os biossensores eletroquímicos apresentam-se como uma alternativa a métodos de deteção mais convencionais e evasivos, tendo recebido especial atenção nos últimos anos nas mais diversas áreas de aplicação. O seu desenvolvimento vem colmatar diversas desvantagens associadas a técnicas mais convencionais, como é o caso da sensibilidade, reprodutibilidade, limite de deteção e estabilidade.

O presente trabalho focou-se no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção da STEAP1, incorporando a tecnologia da impressão molecular e um nanocompósito condutor de nanopartículas de platina dendríticas aminadas com nanotubos de carbono (CNTs-PAH/Ptd). Para a construção do material sensorial foi utilizada a técnica de eletropolimerização de uma mistura de STEAP1 com um polímero, o PY-COOH e, por fim, a remoção enzimática por via da tripsina.

No desenvolvimento experimental desta dissertação foram realizadas diversas otimizações, nomeadamente na escolha do melhor agente de remoção, seleção da melhor concentração de STEAP1 e otimização dos parâmetros que influenciam a eletropolimerização. Assim sendo, após serem estudados possíveis agentes de remoção, foi definido que a tripsina com pH fisiológico seria a melhor opção, uma vez que permitiu uma melhor linearidade na etapa de deteção. Além disso, a STEAP1 foi definida a uma concentração de 0.1 µg/mL, mostrando sensibilidade e linearidade na resposta obtida. Na etapa de eletropolimerização, foi utilizada a técnica de CV a um potencial compreendido entre -0.8 e 1.1 V durante 10 ciclos com uma velocidade de varrimento de 0.02 V/s. Relativamente ao papel do compósito CNTs-PAH/Ptd na superfície do biossensor, a sua incorporação levou a uma diminuição da resistência à passagem de corrente e a uma melhor performance na etapa de deteção da STEAP1, levando a um incremento notório tanto na sensibilidade como na linearidade de deteção.

Adicionalmente, foram aplicadas técnicas para a caracterização da superfície do biossensor, nomeadamente a espectroscopia de *Raman* e a microscopia eletrónica de superfície (SEM).

Com o auxílio destas técnicas de cariz mais químico e de análise da estrutura de materiais, foi possível comprovar o sucesso das diferentes modificações realizadas na superfície do material sensor.

Em suma, o biossensor desenvolvido neste trabalho apresentou boas características em termos de seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade, apresentando igualmente um baixo tempo de medição e elevada linearidade na etapa de deteção. Assim sendo, pode ser concluído que a abordagem desenvolvida nesta dissertação poderá, num futuro próximo, ser aplicada clinicamente à deteção da STEAP1 no local de cuidado.

Futuramente, apesar do biossensor apresentar aptidão para a deteção da STEAP1, ainda não existem evidências científicas acerca da excreção da proteína na forma de vesículas extracelulares como exossomas, ficando assim por definir o limite fisiológico da proteína e a amostra fisiológica a utilizar para a sua deteção. Neste sentido, como perspetivas futuras, seria de elevado interesse científico comprovar o papel da STEAP1 como biomarcador do PCa e, posteriormente, adequar o biossensor desenvolvido na presente dissertação para a sua comercialização em larga escala.

Referências Bibliográficas

- [1] “Cancer Today (Portugal) ‘International Agency for Research on Cancer.’” [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=620&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group. [Accessed: 28-Jul-2022].
- [2] J. Mayor De Castro, J. Caño Velasco, J. Aragón Chamizo, G. Andrés Boville, F. Herranz Amo, and C. Hernández Fernández, “Cáncer de próstata localmente avanzado. Definición, diagnóstico y tratamiento,” *Arch. Esp. Urol.*, vol. 71, no. 3, pp. 231–238, 2018.
- [3] Y. Bhanji, W. B. Isaacs, J. Xu, and K. A. Cooney, “Prostate Cancer Predisposition,” *Urol. Clin. North Am.*, vol. 48, no. 3, pp. 283–296, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.ucl.2021.03.001.
- [4] M. W. Dunn and M. W. Kazer, “Prostate Cancer Overview,” *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 27, no. 4, pp. 241–250, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.soncn.2011.07.002.
- [5] “Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ).” [Online]. Available: <https://effectivehealthcare.ahrq.gov/products/prostate-cancer-therapies-update/espanol>.
- [6] J.-L. Descotes, “Diagnosis of prostate cancer,” *Asian J. Urol.*, vol. 6, no. 2, pp. 129–136, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.ajur.2018.11.007.
- [7] J. R. Packer and N. J. Maitland, “The molecular and cellular origin of human prostate cancer,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, no. 6, pp. 1238–1260, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.02.016.
- [8] B. S. Knudsen and V. Vasioukhin, “Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression,” in *Advances in Cancer Research*, vol. 109, no. C, Elsevier Inc, 2010, pp. 1–50.
- [9] D. A. Lawson, Y. Zong, S. Memarzadeh, L. Xin, J. Huang, and O. N. Witte, “Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 6, pp. 2610–2615, Feb. 2010, doi: 10.1073/pnas.0913873107.
- [10] M. Zhou, “High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate,” *Mod. Pathol.*, vol. 31, no. S1, pp. 71–79, Jan. 2018, doi: 10.1038/modpathol.2017.138.
- [11] R. C. Langan, “Benign Prostatic Hyperplasia,” *Prim. Care Clin. Off. Pract.*, vol. 46, no. 2, pp. 223–232, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.pop.2019.02.003.
- [12] “Cancer Today ‘International Agency for Research on Cancer.’” .
- [13] “Cancer Tomorrow ‘International Agency for Research on Cancer.’” [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_population_s=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&types=0&sexes=1&age_start=0&single_unit=500000&years=2030&cancers=40_27&key=percent&show_bar_mode_prop=0&group_cancers=0. [Accessed: 30-Jul-2022].

- [14] “Cancer Tomorrow (Portugal and Europe) ‘International Agency for Research on Cancer.’” [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_population_s=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&types=0&sexes=1&age_start=0&single_unit=500000&years=2030&cancers=27&key=percent&show_bar_mode_prop=0&group_cancers=0&populations=908_62. [Accessed: 02-Aug-2022].
- [15] L. A. Mucci, K. M. Wilson, and E. L. Giovannucci, “Epidemiology of Prostate Cancer,” in *Pathology and Epidemiology of Cancer*, vol. 10, no. 2, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 107–125.
- [16] L. Moris *et al.*, “Benefits and Risks of Primary Treatments for High-risk Localized and Locally Advanced Prostate Cancer: An International Multidisciplinary Systematic Review,” *Eur. Urol.*, vol. 77, no. 5, pp. 614–627, May 2020, doi: 10.1016/j.eururo.2020.01.033.
- [17] H. M. Tamim, A. H. Hajeer, J.-F. Boivin, and J.-P. Collet, “Association between antibiotic use and risk of prostate cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 127, no. 4, p. NA-NA, 2010, doi: 10.1002/ijc.25139.
- [18] A. Habib *et al.*, “Risk Factors Associated with Prostate Cancer,” *J. Drug Deliv. Ther.*, vol. 11, no. 2, pp. 188–193, Mar. 2021, doi: 10.22270/jddt.v11i2.4758.
- [19] L. Naji *et al.*, “Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Ann. Fam. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 149–154, Mar. 2018, doi: 10.1370/afm.2205.
- [20] E. J. Bass *et al.*, “Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging targeted biopsy techniques compared to transrectal ultrasound guided biopsy of the prostate: a systematic review and meta-analysis,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 174–179, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41391-021-00449-7.
- [21] R. Kvåle *et al.*, “Concordance between Gleason scores of needle biopsies and radical prostatectomy specimens: a population-based study,” *BJU Int.*, vol. 103, no. 12, pp. 1647–1654, Jun. 2009, doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.08255.x.
- [22] “Prostate Conditions Education Council (PCEC).” [Online]. Available: <https://www.prostateconditions.org/about-prostate-conditions/prostate-cancer/newly-diagnosed/gleason-score%0A>.
- [23] “Prostate Conditions Education Council (PCEC) ‘Prostate Cancer Grading & Prognostic Scoring.’” .
- [24] A. Borges, *Imunohistoquímica 1.* .
- [25] S. Mallett, A. Timmer, W. Sauerbrei, and D. G. Altman, “Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines,” *Br. J. Cancer*, vol. 102, no. 1, pp. 173–180, Jan. 2010, doi: 10.1038/sj.bjc.6605462.
- [26] R. H. Getzenberg and A. W. Partin, “Prostate Cancer Tumor Markers,” in *Campbell-Walsh Urology*, Tenth Edit., Elsevier, 2012, pp. 2748-2762.e6.
- [27] R. B. dos Reis and M. F. Cassini, “Antígeno Prostático Específico (PSA),” in *Urologia Fundamental*, pp. 190–194.
- [28] D. A. Chistiakov, V. A. Myasoedova, A. V. Grechko, A. A. Melnichenko, and A. N. Orekhov, “New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 52, no. January, pp. 9–16, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.012.

- [29] S. M. Rocha, J. Barroca-Ferreira, L. A. Passarinha, S. Socorro, and C. J. Maia, “The Usefulness of STEAP Proteins in Prostate Cancer Clinical Practice,” in *Prostate Cancer*, no. June, Exon Publications, 2021, pp. 139–154.
- [30] Diana Rute Tavares Duarte, “Improvement of STEAP 1 Biosynthesis from *Pichia pastoris* X33 cells under an optimized feeding strategy,” UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR, 2017.
- [31] S. M. Rocha, S. Socorro, L. A. Passarinha, and C. J. Maia, “Comprehensive Landscape of STEAP Family Members Expression in Human Cancers: Unraveling the Potential Usefulness in Clinical Practice Using Integrated Bioinformatics Analysis,” *Data*, vol. 7, no. 5, p. 64, May 2022, doi: 10.3390/data7050064.
- [32] S. E. A. Burnell *et al.*, “Utilisation of the STEAP protein family in a diagnostic setting may provide a more comprehensive prognosis of prostate cancer,” *PLoS One*, vol. 14, no. 8, p. e0220456, Aug. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0220456.
- [33] X. Xue *et al.*, “Quantitative proteomics identifies STEAP4 as a critical regulator of mitochondrial dysfunction linking inflammation and colon cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 45, pp. E9608–E9617, Nov. 2017, doi: 10.1073/pnas.1712946114.
- [34] J. Barroca-Ferreira *et al.*, “Targeting STEAP1 Protein in Human Cancer: Current Trends and Future Challenges,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 18, no. 3, pp. 222–230, Feb. 2018, doi: 10.2174/1568009617666170427103732.
- [35] D. R. Duarte *et al.*, “Impact of glycerol feeding profiles on STEAP1 biosynthesis by *Komagataella pastoris* using a methanol-inducible promoter,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 105, no. 11, pp. 4635–4648, Jun. 2021, doi: 10.1007/s00253-021-11367-y.
- [36] K. Khanna, N. Salmond, K. S. Lynn, H. S. Leong, and K. C. Williams, “Clinical significance of STEAP1 extracellular vesicles in prostate cancer,” *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 24, no. 3, pp. 802–811, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41391-021-00319-2.
- [37] T. Abeel, T. Helleputte, Y. Van de Peer, P. Dupont, and Y. Saeys, “Robust biomarker identification for cancer diagnosis with ensemble feature selection methods,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 3, pp. 392–398, Feb. 2010, doi: 10.1093/bioinformatics/btp630.
- [38] D. R. Walt, “Optical Methods for Single Molecule Detection and Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 3, pp. 1258–1263, Feb. 2013, doi: 10.1021/ac3027178.
- [39] L. Denoroy, L. Zimmer, B. Renaud, and S. Parrot, “Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review,” *J. Chromatogr. B*, vol. 927, pp. 37–53, May 2013, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.12.005.
- [40] S. Arya and P. Estrela, “Recent Advances in Enhancement Strategies for Electrochemical ELISA-Based Immunoassays for Cancer Biomarker Detection,” *Sensors*, vol. 18, no. 7, p. 2010, Jun. 2018, doi: 10.3390/s18072010.
- [41] K. Shah and P. Maghsoudlou, “Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics,” *Br. J. Hosp. Med.*, vol. 77, no. 7, pp. C98–C101, Jul. 2016, doi: 10.12968/hmed.2016.77.7.C98.
- [42] M. R. Gordon, M. Canakci, L. Li, J. Zhuang, B. Osborne, and S. Thayumanavan, “Field Guide to Challenges and Opportunities in Antibody–Drug Conjugates for Chemists,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, no. 11, pp. 2198–2215, Nov. 2015, doi:

10.1021/acs.bioconjchem.5b00399.

- [43] S. Mousa, "Biosensors: the new wave in cancer diagnosis," *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 4, no. 1, p. 1, Dec. 2010, doi: 10.2147/NSA.S13465.
- [44] R. S. Gomes, F. T. C. Moreira, R. Fernandes, and M. G. F. Sales, "Sensing CA 15-3 in point-of-care by electropolymerizing O-phenylenediamine (oPDA) on Au-screen printed electrodes," *PLoS One*, vol. 13, no. 5, p. e0196656, May 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0196656.
- [45] B. Pejcic, R. De Marco, and G. Parkinson, "The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases," *Analyst*, vol. 131, no. 10, p. 1079, 2006, doi: 10.1039/b603402k.
- [46] A. B. F. Vitoreti, "Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a identificação de toxinas de serpentes," Universidade de São Paulo, 2014.
- [47] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications – A review," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, May 2016, doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
- [48] T. Kotas *et al.*, *Biosensors and Biodetection*, vol. 1572, no. Chapter 4. New York, NY: Springer New York, 2017.
- [49] H. D. Jang, S. K. Kim, H. Chang, and J.-W. Choi, "3D label-free prostate specific antigen (PSA) immunosensor based on graphene–gold composites," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 63, pp. 546–551, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.08.008.
- [50] A. S. Basaleh, "Zn (II) Metal-organic Framework Nanoparticles : Synthesis , Characterization and Application as Optical Biosensor for Prostate-Speci c Antigen," no. Ii, pp. 1–19.
- [51] M. A. Morales and J. M. Halpern, "Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors," *Bioconjug. Chem.*, vol. 29, no. 10, pp. 3231–3239, Oct. 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592.
- [52] A. Saadati *et al.*, "Recent advances on application of peptide nucleic acids as a bioreceptor in biosensors development," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 114, pp. 56–68, May 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.02.030.
- [53] C. Analysis, "The Role of Electrochemical Immunosensors in," pp. 1–19, 2019.
- [54] Y. Zhao, K. Yavari, and J. Liu, "Critical evaluation of aptamer binding for biosensor designs," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 146, p. 116480, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.trac.2021.116480.
- [55] N. Gupta, V. Renugopalakrishnan, D. Liepmann, R. Paulmurugan, and B. D. Malhotra, "Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 141, no. May, p. 111435, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111435.
- [56] Y. Saylan, S. Akgönüllü, H. Yavuz, S. Ünal, and A. Denizli, "Molecularly Imprinted Polymer Based Sensors for Medical Applications," *Sensors*, vol. 19, no. 6, p. 1279, Mar. 2019, doi: 10.3390/s19061279.
- [57] R. D. Crapnell, N. C. Dempsey-Hibbert, M. Peeters, A. Tridente, and C. E. Banks, "Molecularly imprinted polymer based electrochemical biosensors: Overcoming the challenges of detecting vital biomarkers and speeding up diagnosis," *Talanta Open*, vol. 2, no. September, p. 100018, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.talo.2020.100018.

- [58] Y. Cao, T. Feng, J. Xu, and C. Xue, “Recent advances of molecularly imprinted polymer-based sensors in the detection of food safety hazard factors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 141, no. 5, p. 111447, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.bios.2019.111447.
- [59] P. Rebelo *et al.*, “Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for environmental analysis,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 172, p. 112719, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112719.
- [60] A. L. Hillberg and M. Tabrizian, “Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems,” *IRBM*, vol. 29, no. 2–3, pp. 89–104, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.rbmret.2007.11.023.
- [61] A. M. Mostafa, S. J. Barton, S. P. Wren, and J. Barker, “Review on molecularly imprinted polymers with a focus on their application to the analysis of protein biomarkers,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 144, p. 116431, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.trac.2021.116431.
- [62] M. Włoch and J. Datta, “Synthesis and polymerisation techniques of molecularly imprinted polymers,” in *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 86, 2019, pp. 17–40.
- [63] E. C. Figueiredo, A. C. B. Dias, and M. A. Z. Arruda, “Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos,” *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 44, no. 3, pp. 361–375, Sep. 2008, doi: 10.1590/S1516-93322008000300005.
- [64] C. Dong, H. Shi, Y. Han, Y. Yang, R. Wang, and J. Men, “Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique,” *Eur. Polym. J.*, vol. 145, no. September 2020, p. 110231, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110231.
- [65] D. R. Kryscio and N. A. Peppas, “Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 2, pp. 461–473, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.actbio.2011.11.005.
- [66] L. Moreira Gonçalves, “Electropolymerized molecularly imprinted polymers: perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 25, p. 100640, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.coelec.2020.09.007.
- [67] C. C. Villa, L. T. Sánchez, G. A. Valencia, S. Ahmed, and T. J. Gutiérrez, “Molecularly imprinted polymers for food applications: A review,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 111, no. March, pp. 642–669, May 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.03.003.
- [68] G. Selvolini and G. Marrazza, “MIP-Based Sensors: Promising New Tools for Cancer Biomarker Determination,” *Sensors*, vol. 17, no. 4, p. 718, Mar. 2017, doi: 10.3390/s17040718.
- [69] N. Griffete, J. Fresnais, A. Espinosa, D. Taverna, C. Wilhelm, and C. Ménager, “Thermal Polymerization on the Surface of Iron Oxide Nanoparticles Mediated by Magnetic Hyperthermia: Implications for Multishell Grafting and Environmental Applications,” *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 1, no. 2, pp. 547–555, Feb. 2018, doi: 10.1021/acsanm.7b00063.
- [70] Y. D. Han, H. J. Chun, and H. C. Yoon, “Low-cost Point-of-Care Biosensors Using Common Electronic Components as Transducers,” *BioChip J.*, vol. 14, no. 1, pp. 32–47, Mar. 2020, doi: 10.1007/s13206-020-4104-8.
- [71] P. Damborský, J. Švitel, and J. Katrik, “Optical biosensors,” *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 91–100, Jun. 2016, doi: 10.1042/EBC20150010.

- [72] A. I. Jeffree, S. Karman, S. Ibrahim, M. S. A. Karim, and S. Rozali, "Biosensors Approach for Lung Cancer Diagnosis—A Review," in *Lecture Notes in Mechanical Engineering*, Springer Singapore, 2020, pp. 425–435.
- [73] M. T. Chorsi *et al.*, "Piezoelectric Biomaterials for Sensors and Actuators," *Adv. Mater.*, vol. 31, no. 1, p. 1802084, Jan. 2019, doi: 10.1002/adma.201802084.
- [74] M. P. Nair, A. J. T. Teo, and K. H. H. Li, "Acoustic Biosensors and Microfluidic Devices in the Decennium: Principles and Applications," *Micromachines*, vol. 13, no. 1, p. 24, Dec. 2021, doi: 10.3390/mi13010024.
- [75] P. Bhattarai and S. Hameed, "Basics of Biosensors and Nanobiosensors," in *Nanobiosensors*, Wiley, 2020, pp. 1–22.
- [76] J. L. Hammond, N. Formisano, P. Estrela, S. Carrara, and J. Tkac, "Electrochemical biosensors and nanobiosensors," *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 69–80, Jun. 2016, doi: 10.1042/EBC20150008.
- [77] D. M. Heard and A. J. J. Lennox, "Electrode Materials in Modern Organic Electrochemistry," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 59, no. 43, pp. 18866–18884, Oct. 2020, doi: 10.1002/anie.202005745.
- [78] M. D. Kärkäs, "Electrochemical strategies for C–H functionalization and C–N bond formation," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 15, pp. 5786–5865, 2018, doi: 10.1039/C7CS00619E.
- [79] S. Zhang, "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 15, no. 5–6, pp. 273–282, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0956-5663(00)00076-2.
- [80] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, and J. L. Dempsey, "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry," *J. Chem. Educ.*, vol. 95, no. 2, pp. 197–206, Feb. 2018, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- [81] M. A. HERAS VIDAURRE, Á. COLINA SANTAMARÍA, J. y GAROZ RUIZ, and D. IBÁÑEZ MARTÍNEZ, "Dispositivo para la realización de medidas espectroelectroquímicas de absorción UV/VIS y de dispersión Raman simultáneamente," 2017.
- [82] S. G. Meirinho, L. G. Dias, A. M. Peres, and L. R. Rodrigues, "Voltammetric aptasensors for protein disease biomarkers detection: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 5, pp. 941–953, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.006.
- [83] W. F. Pacheco, F. S. Semaan, V. G. K. De Almeida, A. G. S. L. Ritta, and R. Q. Aucélio, "Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Abstract : The present work presents a simple and didactic approach regarding some Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos," *Rev. Virtual Química*, vol. 5, no. 4, pp. 516–537, 2013.
- [84] A. Chen and B. Shah, "Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry," *Anal. Methods*, vol. 5, no. 9, p. 2158, 2013, doi: 10.1039/c3ay40155c.
- [85] A. Amine and H. Mohammadi, "Amperometry," in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, no. September, Elsevier, 2018, pp. 85–98.
- [86] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Electrochemical biosensors," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 5, p. 1747, 2010, doi: 10.1039/b714449k.
- [87] E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, "Electrochemical biosensors for hormone

- analyses,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 68, pp. 62–71, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.12.054.
- [88] S. Dzyadevych and N. Jaffrezic-Renault, “Conductometric biosensors,” in *Biological Identification*, Elsevier, 2014, pp. 153–193.
- [89] L. Manjakkal, D. Szwagierczak, and R. Dahiya, “Metal oxides based electrochemical pH sensors: Current progress and future perspectives,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 109, no. May, p. 100635, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.pmatsci.2019.100635.
- [90] O. V. Soldatkina, O. O. Soldatkin, T. P. Velychko, V. O. Prilipko, M. A. Kuibida, and S. V. Dzyadevych, “Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals,” *Bioelectrochemistry*, vol. 124, pp. 40–46, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2018.07.002.
- [91] N. Jaffrezic-Renault and S. Dzyadevych, “Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring,” *Sensors*, vol. 8, no. 4, pp. 2569–2588, Apr. 2008, doi: 10.3390/s8042569.
- [92] H. Karimi-Maleh *et al.*, “A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 184, no. January, p. 113252, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113252.
- [93] E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, “A review on impedimetric biosensors,” *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 248–262, Jan. 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.942456.
- [94] A. G. Silva, “Estudo do comportamento eletroquímico do nióbio sob carregamentos e descarregamento de hidrogênio,” *Diss. apresentada ao Programa Interdiscip. Pós-graduação em Eng. da Univ. Fed. do Paraná*, p. 113, 2007.
- [95] P. Alexandra and A. D. Martins, “Instrumentação para biossensor eletroquímico utilizando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica,” Universidade de Aveiro, 2019.
- [96] S. Wang, J. Zhang, O. Gharbi, V. Vivier, M. Gao, and M. E. Orazem, “Electrochemical impedance spectroscopy,” *Nat. Rev. Methods Prim.*, vol. 1, no. 1, p. 41, Dec. 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00039-w.
- [97] D. V. Ribeiro and J. C. C. Abrantes, “Application of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to monitor the corrosion of reinforced concrete: A new approach,” *Constr. Build. Mater.*, vol. 111, pp. 98–104, May 2016, doi: 10.1016/j.conbuildmat.2016.02.047.
- [98] M. Pohanka and P. Skládal, “Electrochemical biosensors - principles and applications,” *J. Appl. Biomed.*, vol. 6, no. 2, pp. 57–64, Jul. 2008, doi: 10.32725/jab.2008.008.
- [99] I. Notingher, “Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors,” *Sensors*, vol. 7, no. 8, pp. 1343–1358, Jul. 2007, doi: 10.3390/s7081343.
- [100] H. Vašková, “A powerful tool for material identification: Raman spectroscopy,” *Int. J. Math. Model. Methods Appl. Sci.*, vol. 5, no. 7, pp. 1205–1212, 2011.
- [101] D. A. N. Ra-, “The carbon battle characterization of screen- printed carbon electrodes with SPELEC RAMAN.”
- [102] A. Abdullah and A. Mohammed, “Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review,” *Proc. 2018 Int. Conf.*

Hydraul. Pneum. - HERVEX, pp. 77–85, 2019.

- [103] M. A. R. Khan, F. T.C. Moreira, J. Riu, and M. G. F. Sales, “Plastic antibody for the electrochemical detection of bacterial surface proteins,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 233, pp. 697–704, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.snb.2016.04.075.
- [104] M. Jeyaraj, S. Gurunathan, M. Qasim, M.-H. Kang, and J.-H. Kim, “A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 12, p. 1719, Dec. 2019, doi: 10.3390/nano9121719.
- [105] R. Andrews and M. . Weisenberger, “Carbon nanotube polymer composites,” *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 31–37, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.cossms.2003.10.006.
- [106] P. J. F. Harris, “Carbon nanotube composites,” *Int. Mater. Rev.*, vol. 49, no. 1, pp. 31–43, Feb. 2004, doi: 10.1179/095066004225010505.
- [107] A. Curulli and G. Palleschi, “Electropolymerization of pyrrole-2-carboxylic acid and 4,4'-dihydroxybenzophenone on platinum electrodes. Applications to assemble novel glucose sensors,” *Electroanalysis*, vol. 9, no. 14, pp. 1107–1112, Oct. 1997, doi: 10.1002/elan.1140091414.
- [108] Á. Lavín *et al.*, “On the Determination of Uncertainty and Limit of Detection in Label-Free Biosensors,” *Sensors*, vol. 18, no. 7, p. 2038, Jun. 2018, doi: 10.3390/s18072038.
- [109] M. Frasco, L. Truta, M. Sales, and F. Moreira, “Imprinting Technology in Electrochemical Biomimetic Sensors,” *Sensors*, vol. 17, no. 3, p. 523, Mar. 2017, doi: 10.3390/s17030523.
- [110] M. Elshiaty, H. Schindler, and P. Christopoulos, “Principles and Current Clinical Landscape of Multispecific Antibodies against Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 11, p. 5632, May 2021, doi: 10.3390/ijms22115632.
- [111] M. de L. Gonçalves, L. A. N. Truta, M. G. F. Sales, and F. T. C. Moreira, “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.*, vol. 54, no. 16, pp. 2611–2623, Nov. 2021, doi: 10.1080/00032719.2021.1879108.
- [112] S. M. V. Cerqueira, R. Fernandes, F. T. C. Moreira, and M. G. F. Sales, “Development of an electrochemical biosensor for Galectin-3 detection in point-of-care,” *Microchem. J.*, vol. 164, no. January, p. 105992, May 2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.105992.
- [113] R. S. Gomes, B. A. Gomez-Rodríguez, R. Fernandes, M. G. F. Sales, F. T. C. Moreira, and R. F. Dutra, “Plastic Antibody of Polypyrrole/Multiwall Carbon Nanotubes on Screen-Printed Electrodes for Cystatin C Detection,” *Biosensors*, vol. 11, no. 6, p. 175, May 2021, doi: 10.3390/bios11060175.
- [114] A. Santos, F. Moreira, L. Helguero, and M. Sales, “Antibody Biomimetic Material Made of Pyrrole for CA 15-3 and Its Application as Sensing Material in Ion-Selective Electrodes for Potentiometric Detection,” *Biosensors*, vol. 8, no. 1, p. 8, Jan. 2018, doi: 10.3390/bios8010008.
- [115] “ThermoFisher Scientific “Technical Resources 1187-RPMI 1640.” .
- [116] B.-K. Ahn, “Individualized Cutoff Value of the Serum Carcinoembryonic Antigen Level According to TNM Stage in Colorectal Cancer,” *Ann. Coloproctol.*, vol. 29, no. 3, p. 91, 2013, doi: 10.3393/ac.2013.29.3.91.

- [117] M. Eduarda Schneider, L. Guillade, M. A. Correa-Duarte, and F. T. C. Moreira, "Development of a biosensor for phosphorylated Tau 181 protein detection in Early-Stage Alzheimer's disease," *Bioelectrochemistry*, vol. 145, p. 108057, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.bioelechem.2022.108057.
- [118] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, and A. Jorio, "Raman spectroscopy of carbon nanotubes," *Phys. Rep.*, vol. 409, no. 2, pp. 47–99, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.physrep.2004.10.006.
- [119] Zlatko Meić Mladen Žinić Snežzana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, "Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 38, no. April, pp. 1538–1553, 2007, doi: 10.1002/jrs.
- [120] M. BURGHARD, "Electronic and vibrational properties of chemically modified single-wall carbon nanotubes," *Surf. Sci. Rep.*, vol. 58, no. 1–4, pp. 1–109, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.surfrep.2005.07.001.
- [121] A. Ben Hassine, N. Raouafi, and F. T. C. Moreira, "Novel Electrochemical Molecularly Imprinted Polymer-Based Biosensor for Tau Protein Detection," *Chemosensors*, vol. 9, no. 9, p. 238, Aug. 2021, doi: 10.3390/chemosensors9090238.