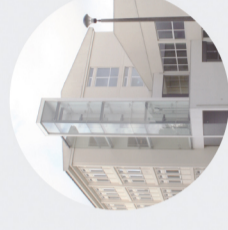
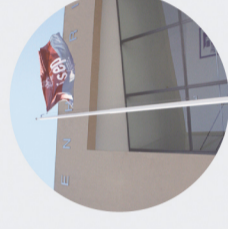




# Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para monitorização da radioterapia no melanoma

**SOFIA MANUELA VASCONCELOS CERQUEIRA**  
Outubro de 2019



## Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para monitorização da radioterapia no melanoma

**SOFIA MANUELA VASCONCELOS CERQUEIRA**  
Outubro de 2019





# **Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para monitorização da radioterapia no melanoma**

**Sofia Manuela Vasconcelos Cerqueira**

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a  
obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales

Doutora Felismina Teixeira Coelho Moreira

Doutor Rúben Fernandes



Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos e a toda a comunidade científica  
que luta todos os dias pelo desenvolvimento.



## **Agradecimentos**

Antes de mais agradeço aos meus pais, ao meu irmão e à minha irmã por todo apoio, dedicação e incentivo, por nunca me deixarem desistir e por terem acreditado desde o início que tudo isto seria possível.

À Doutora Goreti Sales por toda a ajuda, dedicação e transmissão de conhecimentos.

À Doutora Felismina Moreira por ter acreditado desde o início neste projeto, por todo o apoio, orientação, dedicação e transmissão de conhecimentos.

Ao Doutor Rúben Fernandes, por ter acreditado em mim desde o início, por me ter dado a oportunidade de trabalhar na área da investigação e por toda a dedicação e apoio.

À equipa do Biomark por me terem acolhido da melhor forma e por me terem feito sentir parte da equipa.

A todos os meus amigos que sempre me acompanharam, apoiaram e partilharam comigo estes últimos anos.

Agradeço ainda às entidades financiadoras, em particular à FCT e ao projeto SAICT-POL/24325/2016.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra me acompanharam e contribuíram para que tudo isto fosse possível.

A todos, um Muito Obrigada!



## Resumo

A incidência do cancro da pele em Portugal continua a ser preocupante em relação à média europeia. No que diz respeito ao melanoma, apesar de representar apenas 4% de todos os cancros da pele, representa a forma mais agressiva, devido ao seu elevado potencial de metastização, sendo responsável por cerca de 75% das mortes que estão associadas às neoplasias cutâneas. Alguns estudos demonstraram que a expressão da galactina-3 (Gal-3) estava associada à progressão do melanoma, pelo que poderá ser usada como um marcador da monitorização da eficácia terapêutica, como por exemplo da radioterapia. Adicionalmente, a Gal-3 tem revelado uma enorme versatilidade diagnóstica, tendo sido demonstrada a sua importância como biomarcador em diversos tipos de cancro, em doenças cardíacas e mais recentemente em distúrbios metabólicos como a diabetes.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e a otimização de um biossensor eletroquímico com base em polímeros de impressão molecular (do inglês, *molecularly-imprinted polymer*, MIP) para a monitorização do efeito da radioterapia no melanoma, através da deteção da Gal-3. O reconhecimento da molécula alvo foi feita através de um material MIP, criado na superfície do eléctrodo por eletropolimerização da mistura do analito (Gal-3) com o monómero (2-Aminofenol). Este processo formou então um polímero não condutor com locais de reconhecimento, demonstrando afinidade para a Gal-3. Posteriormente, a proteína foi removida por um tratamento com ácido oxálico.

O controlo da modificação da superfície foi feito por espectroscopia de RAMAN e por técnicas eletroanalíticas, nomeadamente a espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) e a voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry*, CV). A avaliação do desempenho analítico do sensor foi feita por EIS seguindo a resposta obtida com soluções padrão entre os 0,5 ng/mL e 5 ng/mL de Gal-3. A resposta obtida foi de interesse analítico, considerando que indivíduos saudáveis apresentam um nível fisiológico normal de 30 ng/mL. De uma forma geral, o biossensor apresentou um bom desempenho analítico geral em termos de limite de deteção, tempo de resposta

e reprodutibilidade. As características de desempenho do material MIP em soro foram também adequadas, considerando possíveis aplicações posteriores em amostras reais, revelando um reduzido impacto dos vários componentes deste fluído na resposta do biossensor.

Face ao exposto, o biossensor desenvolvido com base em anticorpos plásticos (MIP's) como elemento de biorreconhecimento, mostrou características relevantes em termos de simplicidade e sensibilidade, demonstrando um grande potencial para a aplicação no local em pesquisa médica e diagnóstico clínico.

**Palavras-chave:** Biossensor, Gal-3, melanoma, polímeros de impressão molecular.

## Abstract

The incidence of skin cancer in Portugal remains worrying compared to the European average. Regarding melanoma, despite representing only 4% of all skin cancers, it is the most aggressive form due to its high metastatic potential, being responsible for about 75% of deaths that are associated with skin cancer. Studies have shown that galactin-3 (Gal-3) expression was associated with melanoma progression and therefore it could be used as a marker for monitoring therapeutic efficacy, such as radiotherapy. In addition, Gal-3 has shown remarkable diagnostic versatility and its importance as a biomarker in various cancers, heart disease and more recently metabolic disorders such as diabetes has been demonstrated.

Thus, this work aimed at the development and optimization of an electrochemical biosensor based on molecular imprinted polymers (MIP) for monitoring the effect of radiotherapy in melanoma by detecting Gal-3.

The target molecule was recognized by a MIP material, created on the electrode's surface by electropolymerizing a mixture of the analyte (Gal-3) and the monomer (2-aminophenol). This process formed a non-conductive polymer with recognition sites showing affinity for the Gal-3. After this, the protein was removed from the polymeric material by oxalic acid treatment.

The control of the surface modification was monitored by RAMAN spectroscopy and electroanalytical techniques, namely electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). The analytical performance of the sensor was evaluated by EIS, by following the analytical response of standard solutions ranging from 0,5 ng/mL to 5 ng/mL Gal-3. The response obtained was of analytical interest, considering that healthy individuals show normal physiological levels of 30 ng/mL. In general, the biosensor displayed good analytical features, considering limit of detection, response time and reproducibility. The analytical features of the MIP material in serum were also suitable, considering future applications in real samples, evidencing a reduced impact in the response of the biosensor from components of biological fluids.

In general, the biosensor developed using plastic antibodies (MIPs) as a biorecognition element showed excellent features in terms of simplicity and sensitivity, demonstrating huge potential for on-site application in medical research and clinical diagnosis.

**Keywords:** Biosensor, Gal-3, melanoma, molecularly-imprinting polymers.

## Índice de Abreviaturas

### A

**(DNA)** Ácido desoxirribonucleico

**(RNA)** Ácido ribonucleico

### C

**(CRD)** Domínio de reconhecimento de carboidratos

**(C-SPE)** Sistema de três elétrodos impressos de carbono

**(CV)** Voltametria cíclica

### E

**(EIS)** Espetroscopia de impedância eletroquímica

### G

**(GAL-3)** Galactina-3

**(GCE)** Elétrodo de carbono vítreo

### K

**(KCl)** Cloreto de potássio

### L

**(LOD)** Limite de detecção

### M

**(MIP)** Polímeros de impressão molecular

### N

**(NIP)** Materiais de controlo não impressos

### R

**(RT)** Radioterapia

**(R<sub>et</sub>)** Resistência à transferência de carga

**(R<sub>s</sub>)** Resistência à solução

### S

**(SPE)** *Screen printed electrodes*

**(SWCNTs)** Nanotubos de carbono



# Índice

Capítulo 1 - Introdução .....	- 1 -
Capítulo 2 – Fundamentação Teórica .....	- 5 -
1. Melanoma.....	- 5 -
1.1. Incidência e epidemiologia .....	- 8 -
1.2. Fatores de risco .....	- 8 -
1.3. Fatores de prognóstico.....	- 9 -
1.4. Tipos de tratamentos.....	- 10 -
1.5. Diagnóstico .....	- 11 -
1.6. Biomarcadores para melanoma .....	- 11 -
1.6.1. Galactina-3 como biomarcador do melanoma .....	- 14 -
2. Biossensores .....	- 18 -
2.1. Estrutura de um biossensor .....	- 18 -
2.2. Elementos de Biorreconhecimento .....	- 21 -
2.2.1. Anticorpos .....	- 22 -
2.2.2. Enzimas .....	- 23 -
2.2.3. DNA/RNA.....	- 23 -
2.2.4. Aptâmeros.....	- 24 -
2.2.5. Polímeros de impressão molecular (MIP) .....	- 25 -
2.2.5.1. Síntese de um MIP.....	- 28 -
2.2.5.2. Impressão molecular de proteínas.....	- 29 -
2.3. Transdutores.....	- 31 -
2.3.1. Óticos.....	- 31 -
2.3.2. Piezoelétricos.....	- 32 -
2.3.3. Calorimétricos .....	- 32 -
2.3.4. Eletroquímicos .....	- 32 -
2.3.4.1. Sensores voltamétricos .....	- 35 -
2.3.4.2. Sensores Amperométricos .....	- 39 -
2.3.4.3. Sensores Potenciométricos.....	- 39 -
2.3.4.4. Sensores Condutimétricos .....	- 40 -
2.3.4.5. Sensores Impedimétricos.....	- 41 -

2.4. Análise Qualitativa dos Materiais .....	- 43 -
Capítulo 3 - Desenvolvimento do biossensor eletroquímico.....	- 45 -
1. Procedimento experimental.....	- 45 -
1.1. Materiais .....	- 45 -
1.1.1. Equipamento .....	- 45 -
1.1.2. Reagentes.....	- 46 -
1.1.3. Soluções .....	- 47 -
1.2. Procedimentos analíticos .....	- 48 -
1.2.1. Preparação do biossensor/Pré-tratamento.....	- 48 -
1.2.1.1. Limpeza eletroquímica .....	- 49 -
1.2.1.2. Eletropolimerização.....	- 50 -
1.2.1.3. Remoção da proteína.....	- 51 -
1.3. Avaliação do desempenho analítico do biossensor .....	- 52 -
1.3.1. Curva de calibração .....	- 52 -
1.3.2. Análise em soro .....	- 53 -
1.3.3. Estudo da seletividade .....	- 54 -
1.4. Análise Qualitativa dos Materiais .....	- 54 -
Capítulo 4 – Resultados e discussão .....	- 57 -
1. Construção do sensor .....	- 57 -
1.1. Limpeza eletroquímica .....	- 57 -
1.2. Impressão molecular.....	- 59 -
1.3. Remoção da proteína .....	- 61 -
2. Curva de calibração.....	- 62 -
3. Testes em soro.....	- 64 -
4. Estudo da seletividade .....	- 67 -
5. Análise Qualitativa de Materiais .....	- 68 -
Capítulo 5 – Conclusão .....	- 71 -
Bibliografia .....	- 73 -

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1</b> - Representação esquemática das camadas da pele.....	- 5 -
<b>Figura 2.2</b> - Representação da progressão do melanoma. a) Nevo benigno: proliferação controlada dos melanócitos normais; b) Nevo displásico/atípico: crescimento anormal dos melanócitos num nevo pré-existente ou numa nova localização que resulta numa lesão pré-maligna; c) Crescimento radial: os melanócitos adquirem a capacidade de proliferar horizontalmente na epiderme e histologicamente apresentam uma atipia contínua. A caderina-E tem como objetivo confinar as células à epiderme, no entanto, algumas células podem invadir a derme; d) Crescimento vertical: ocorrem diversos eventos bioquímicos que incluem a perda da caderina-E e a expressão da caderina-N, que permite que as células malignas invadam a membrana basal e proliferem verticalmente na derme com potencial metastático; e) Melanoma metastático: os melanócitos malignos propagam-se para outras áreas do corpo, começando pelos nodos linfáticos seguido da pele, tecidos moles, pulmões e cérebro .....	- 7 -
<b>Figura 2.3</b> – Semelhanças e diferenças entre as três classes de galactinas ...	- 15 -
<b>Figura 2.4</b> – Funções biológicas das galactinas nas células de melanoma e no microambiente circundante. A galactina-3 intracelular pode induzir a expressão de genes como a caderina-VE, a IL-8 e a autotaxina, que estão associados à progressão tumoral. A galactina-1 e a galactina-3 reduzem a atividade dos TIL (tumor-infiltrating lymphocyte) através da inibição da dimerização do TCR com o CD4 ou CD8 nas células T CD4+ e CD8+, respetivamente. Isto reduz a secreção de IL-2, INF- $\gamma$ e TNF (fator de necrose tumoral) no microambiente tumoral. Para além disto, as galactinas ligam-se também ao CD45 e induzem a apoptose de células T, que desta forma escapam à vigilância imunológica. Para além disto, tal como mostrado no canto superior esquerdo da figura, a galactina-3 pode ligar-se ao endotélio vascular, promovendo a saída de células tumorais para órgãos mais distantes e inibindo a ativação das células T anti-tumorais.....	- 17 -
<b>Figura 2.5</b> - Fluxo de medição de um biossensor.....	- 19 -

<b>Figura 2.6</b> - Representação esquemática dos componentes de um biossensor -	20
-	
<b>Figura 2.7</b> - Esquema representativo da formação de um polímero de impressão molecular.....	27
<b>Figura 2.8</b> - Screen-Printed Carbon Electrodes (DropSens) (C-SPE's) .....	34
<b>Figura 2.9</b> - Variação do potencial na forma de onda triangular (adaptado pelo autor) .....	36
<b>Figura 2.10</b> - Voltamograma cíclico obtido por CV, sendo que $n_e^-$ representa o número de eletrões que estão envolvidos (adaptado pelo autor).....	37
<b>Figura 2.11</b> - Representação esquemática da voltametria de onda quadrada..	39
<b>Figura 2.12</b> - Representação gráfica da impedância através da frequência de Nyquist (adaptado pelo autor) .....	42
<b>Figura 2.13</b> - Representação gráfica da impedância através do diagrama de Bode (adaptado pelo autor) .....	42
<b>Figura 2.14</b> - Exemplo de um espectro de Raman típico obtido.....	44
<b>Figura 3.15</b> – (a) Potencióstato/Galvanostato da Metrohm Autolab, (b) Caixa conectora da DROPSSENS.....	46
<b>Figura 3.16</b> - Espetrómetro Thermo Scientific DXR Raman. ....	46
<b>Figura 3.17</b> - Representação esquemática da preparação dos padrões utilizados para a construção da curva de calibração.....	48
<b>Figura 3.18</b> - Representação esquemático da construção do MIP. ....	49
<b>Figura 4.19</b> – Registos de CV (esquerda) e de EIS (direita) obtidos com a solução redox de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ , preparada com um eletrólito de KCl a 0,10 M após limpeza a com KCl e $H_2SO_4$ .....	58
<b>Figura 4.20</b> – Voltamograma cíclico relativo à síntese eletroquímica do MIP. .-	59
<b>Figura 4.21</b> – Registos de CV (esquerda) e de EIS (direita) obtidos com a solução redox de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ M preparada com um eletrólito de KCl a 0,1, M. C-SPE após a eletropolimerização (a e b) e após a remoção da proteína (c e d). ....	61
<b>Figura 4.22</b> – Registos eletroquímicos obtidos em solução redox de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ M, preparada com um eletrólito de	

KCl a 0,10 M. C-SPE após incubação com as várias concentrações de proteína preparadas em PBS (a, b e c) e representação da curva de calibração (d) ..... - 64 -

**Figura 4.23** – Registos eletroquímicos obtidos com a solução redox de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$  M preparada com um eletrólito de KCl a 0,10 M. C-SPE após incubação com as várias concentrações de proteína preparadas em soro (a, b e c) e representação da curva de calibração (d) ..... - 66 -

**Figura 4.24** - Gráfico ilustrativo dos resultados obtidos por seletividade. .... - 68 -

**Figura 4.25** – Espectro de Raman obtido na superfície de todos os C-SPE's utilizados, em modo Common Scale. .... - 69 -

**Figura 4.26** - Espectros de Raman característicos de cada C-SPE utilizado. .... - 70 -



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Exemplos de biomarcadores que atualmente são alvo de estudo em melanoma.....	- 13 -
<b>Tabela 2.2</b> - Componentes de um biossensor típico .....	- 19 -
<b>Tabela 2.3</b> - Comparação dos elementos de reconhecimento naturais com os MIP´s .....	- 27 -
<b>Tabela 3.4</b> - Lista de reagentes utilizados. ....	- 47 -
<b>Tabela 3.5</b> - Concentração das soluções que foram preparadas a partir da solução-mãe de Gal-3 em PBS. ....	- 53 -
<b>Tabela 3.6</b> - Concentração das soluções que foram preparadas a partir da solução-mãe de Gal-3 em soro.....	- 53 -
<b>Tabela 3.7</b> – Parâmetros definidos para a realização da espectroscopia de Raman.-	55 -
<b>Tabela 4.8</b> - Parâmetros analíticos obtidos referentes à média das curvas de calibração dos NIP´e dos MIP´s.....	- 67 -
<b>Tabela 4.9</b> – Valores obtidos por espectroscopia de Raman na superfície dos C-SPE´s utilizados. ....	- 69 -



## Capítulo 1 - Introdução

O corpo humano é constituído por tecidos formados por células normais, que por sua vez formam órgãos e que são capazes de se multiplicar e dividir através de um processo natural para formar novas células. Cada célula é codificada por genes que estão envolvidos nos processos celulares como o crescimento, desenvolvimento, diferenciação, reparação, sobrevivência, morte e divisão, apresentando um ciclo de vida no qual envelhecem, morrem e são substituídas por novas células. No entanto, os genes podem sofrer mutações durante os processos replicativos das células, que por seu turno podem dar origem ao processo de carcinogénese, onde possuem um aumento e descontrolo da capacidade de divisão celular, bem como a evasão à morte celular [1,2].

O crescimento progressivo do número de casos anuais de cancro deve-se, sobretudo, ao aumento da esperança de vida da população portuguesa. Segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, uma previsão realizada com base apenas no envelhecimento da população, determinou um aumento dos novos casos de cancro em 13,7% na União Europeia e de 12,6% em Portugal [3,4].

De acordo com a Direção Geral de Saúde, um estudo realizado em 2015, demonstrou que os cancros mais frequentes foram os da mama, próstata, cólon, pulmão e estômago, que em conjunto representaram cerca de 51,3% do total dos casos de patologias oncológicas em Portugal. No sexo masculino, 32,1% dos tumores tiveram origem no aparelho génito-urinário, sendo o cancro da próstata mais frequente e 31,7% dos casos tiveram origem no aparelho digestivo. Relativamente ao sexo feminino, o cancro mais frequente foi o da mama com cerca de 30,2%, seguido do cancro do cólon, da tiroide e do estômago. Relativamente ao cancro da pele, de acordo com António Figueiredo, presidente da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia, a sua incidência em Portugal continua a ser preocupante em relação à média europeia. No que diz respeito ao melanoma, apesar de representar apenas 4% de todos os cancros da pele, representa a forma mais agressiva, devido ao seu elevado potencial de metastização, sendo

responsável por cerca de 75% das mortes que estão associadas às neoplasias cutâneas [5,6].

O melanoma é uma neoplasia maligna, inicialmente considerada como um tipo de tumor radorresistente. No entanto, estudos realizados demonstraram que a radioterapia (RT) se tornou uma opção terapêutica eficiente, ao apresentar uma eficácia de aproximadamente 40 a 50% em casos paliativos, nos quais ocorre dor óssea, compressão da espinal medula e disfunção do sistema nervoso. A RT consiste numa modalidade terapêutica que recorre à radiação ionizante que é gerada num acelerador linear e pode ser administrada de forma neoadjuvante, adjuvante ou concomitante. Esta modalidade terapêutica é usada em casos de melanoma da pele por ser uma forma de tratamento eficaz e segura quando utilizada em casos curativos e paliativos, apresentando taxas de controlo da doença favoráveis com uma toxicidade mínima associada [7,8].

Como se trata de uma patologia cuja incidência tem vindo a aumentar, uma vez que se prevê que na população caucasiana este aumento seja de aproximadamente 3 a 7% por ano, surgiu a necessidade de melhorar as estratégias de prevenção, através da consciencialização para este problema de saúde pública, de monitorização e do acompanhamento dos doentes em tratamento. Neste contexto, os biossensores, surgiram como uma alternativa aos métodos convencionais, por fornecerem uma leitura direta e rápida dos resultados, sem que haja a necessidade de haver um transporte das amostras para um laboratório [9].

Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e otimização de um biossensor eletroquímico para a monitorização do efeito da radioterapia no melanoma, através da deteção de uma proteína, a galactina-3 (Gal-3). Esta proteína constitui um potencial biomarcador em doenças cardíacas, em diversos tipos de cancros assim como em distúrbios metabólicos como a diabetes, podendo por isso amplificar a utilização de um possível biossensor para esta proteína. Neste sentido este projeto resulta da necessidade de criar uma nova estratégia de monitorização do melanoma através da criação de um dispositivo mais barato, rápido e sensível, que possa ser comercializado e desta forma integrar todo o processo associado ao tratamento e *follow-up* desta patologia. Assim, pretende-

se, ao longo deste trabalho compreender, desenvolver e otimizar um biossensor que seja funcional e eficiente, tornando-o seletivo para a proteína em questão. No entanto, como se trata de uma área que requer estudo e desenvolvimento, o objetivo é dar início a este trabalho, para que no futuro possam ser criados dispositivos sensíveis, com uma resposta adequada aos objetivos propostos.

Relativamente à organização deste trabalho, este está organizado em cinco capítulos, sendo que no primeiro é apresentada uma breve introdução ao tema com o objetivo de contextualizar a escolha do trabalho desenvolvido. No capítulo II são apresentadas considerações teóricas relativas ao melanoma. Para isso focam-se aspetos relacionados com o desenvolvimento da patologia e fatores que lhe estão associados. Para além disto, são descritos os biomarcadores que existem, atualmente, para a doença, em específico a Gal-3, que será o biomarcador utilizado para o desenvolvimento do biossensor, sendo também abordados conceitos teóricos relativos aos biossensores e aos polímeros de impressão molecular. O capítulo III descreve o procedimento experimental e analítico para o desenvolvimento de um biossensor e no capítulo IV são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo de todas as etapas de desenvolvimento do projeto. Por fim, no capítulo V são descritas as considerações finais sobre todo o trabalho desenvolvido assim como as suas perspetivas futuras.

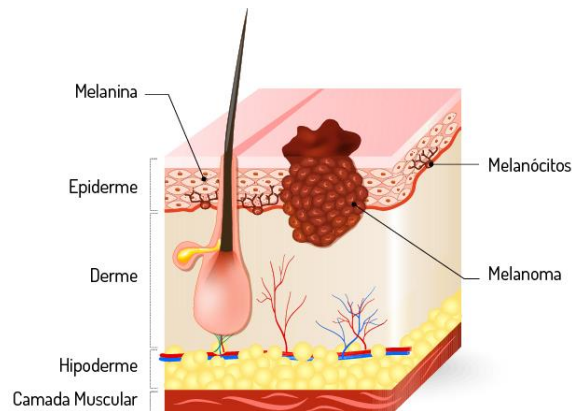


## Capítulo 2 – Fundamentação Teórica

### 1. Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna que tem origem nos melanócitos e que se desenvolve quando ocorrem danos irreparáveis no DNA das células da pele, muitas vezes causadas pela radiação ultravioleta proveniente do sol ou pela prática de solário. Estes fatores podem desencadear mutações genéticas que promovem a multiplicação rápida das células e conseqüentemente a formação de tumores malignos [10,11].

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e é constituída por duas camadas: a epiderme e a derme como se pode observar na figura 2.1. A epiderme é um tipo de tecido epitelial cuja função é proteger o corpo e controlar a sua temperatura e para além dos queratinócitos, é constituída por dois tipos de células dendríticas, as células de *Langerhans* e os melanócitos. As células *Langerhans* são células dendríticas processadoras de antigénios, localizadas na camada suprabasal da epiderme e que representam um papel fundamental na resposta celular aos antigénios tumorais e aos microrganismos [12,13].



**Figura 2.1** - Representação esquemática das camadas da pele [14].

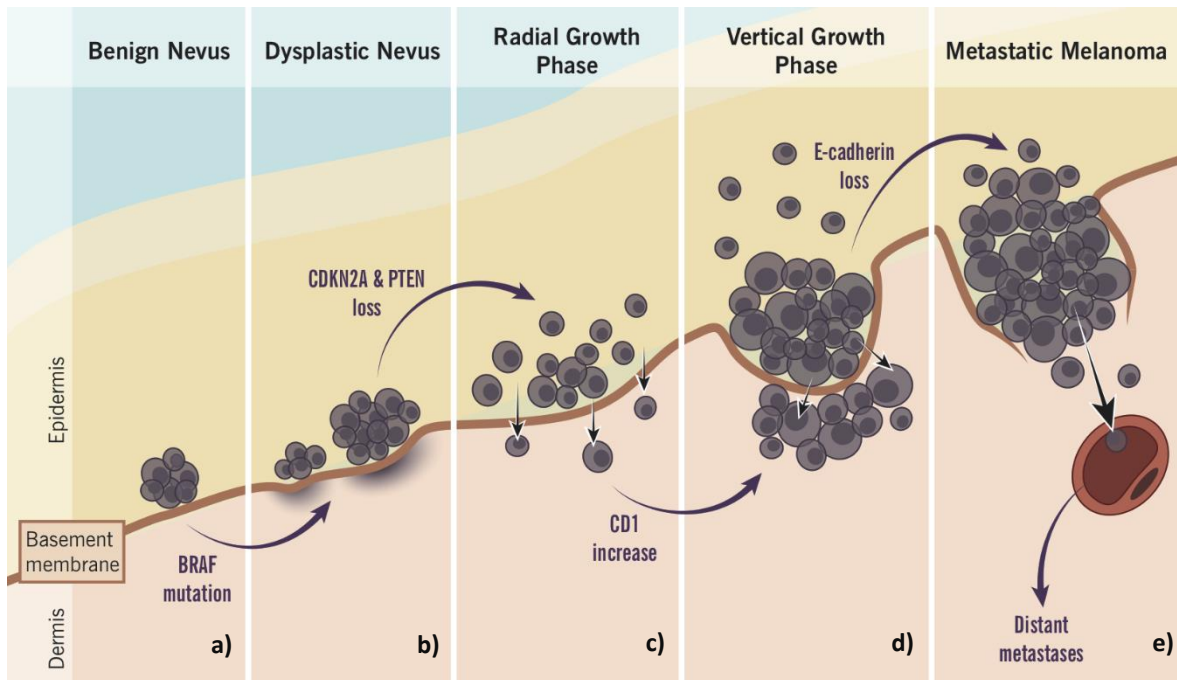
Este tipo de tumores resulta da transformação maligna dos melanócitos (produtores de melanina na camada basal da epiderme) que têm origem na crista-

neural e migram para a pele e para outros locais na periferia durante o desenvolvimento fetal. Encontram-se maioritariamente na pele, mas também podem estar localizados no revestimento das mucosas, nevos melanocíticos ou congénitos, nas vísceras e nos olhos. O ciclo de vida dos melanócitos tem em conta várias etapas, que incluem a especificação da linhagem para as células embriogénicas da crista neural (melanoblastos), a migração e proliferação destes, a diferenciação e maturação em melanócitos capazes de produzir melanina assim como o transporte dos melanosomas para queratinócitos e eventualmente a morte celular. Este tipo de eventos é regulado por diferentes fatores genéticos e epigenéticos, assim como fatores ambientais como a radiação ultravioleta. A síntetização da melanina pelos melanócitos ocorre através de um processo denominado de melanogénese. Desta forma, a formação da melanina ocorre no corpo celular no interior de um organelo, o melanosoma. Posteriormente, os melanosomas são transportados para a superfície do melanócito através das dendrites e são posteriormente libertados no citoplasma dos queratinócitos, agrupando-se sobre o seu núcleo protegendo-o da radiação UV (ultravioleta) [15,16].

Tal como foi referido anteriormente, o melanoma resulta da proliferação descontrolada dos melanócitos. Neste sentido, modelos de progressão tumoral descrevem que a formação do melanoma tem origem nos melanócitos que sofreram hiperplasia e posteriormente displasia, evoluindo para neoplasia. Numa fase inicial, as células tendem a crescer horizontalmente na transição dermo-epidérmica, não havendo a probabilidade de desenvolvimento de metástases. Esta fase é chamada de fase radial de crescimento e caracteriza os melanomas *in situ*. Por outro lado, quando as células invadem a derme e adquirem a capacidade de invasão vascular e linfática, assim como a probabilidade de ocorrer metastização estamos perante a fase vertical de crescimento como se pode observar na figura 2.2 [17].

Desta forma, a transformação neoplásica dos melanócitos dá origem ao melanoma maligno e segundo a Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo, cerca de 30% dos casos de melanoma surgem a partir de lesões pigmentadas prévias, sendo este um dos tipos de cancro mais grave cujas hipóteses de sobrevivência

dependem, particularmente, de um diagnóstico e tratamento adequado e precoce [11,12,18–20].



**Figura 2.2** - Representação da progressão do melanoma. a) Nevo benigno: proliferação controlada dos melanócitos normais; b) Nevo displásico/atípico: crescimento anormal dos melanócitos num nevo pré-existente ou numa nova localização que resulta numa lesão pré-maligna; c) Crescimento radial: os melanócitos adquirem a capacidade de proliferar horizontalmente na epiderme e histologicamente apresentam uma atipia contínua. A caderina-E tem como objetivo confinar as células à epiderme, no entanto, algumas células podem invadir a derme; d) Crescimento vertical: ocorrem diversos eventos bioquímicos que incluem a perda da caderina-E e a expressão da caderina-N, que permite que as células malignas invadam a membrana basal e proliferem verticalmente na derme com potencial metastático; e) Melanoma metastático: os melanócitos malignos propagam-se para outras áreas do corpo, começando pelos nodos linfáticos seguido da pele, tecidos moles, pulmões e cérebro [21].

## **1.1. Incidência e epidemiologia**

Nos últimos anos, verificou-se uma diminuição da incidência em vários tipos de tumores, no entanto, o melanoma continua a apresentar um aumento contínuo por todo o mundo (cerca de 4-8%/ano), tornando-se assim num problema socioeconómico e de saúde pública [19,22].

No início do século XX, o melanoma era considerado um tumor raro, no entanto, o risco de desenvolvimento nos EUA foi aumentando gradualmente nos últimos anos com uma incidência de aproximadamente 1/1500 em 1935, 1/1250 em 1980, 1/100 em 1991 e 1/70 em 2002. Por outro lado, em Portugal, surgem, anualmente cerca de 700 casos de melanoma maligno e segundo o Registo Oncológico Regional (ROR), a incidência do melanoma é de aproximadamente 6-8 casos/100000 habitantes que é semelhante à existente em países do Sul da Europa tais como, Espanha e Itália [6,12].

## **1.2. Fatores de risco**

Atualmente, o melanoma é considerado uma doença multifatorial que pode resultar da interação entre a suscetibilidade genética e a exposição ambiental. O fator de risco ambiental mais importante e potencial para o desenvolvimento do melanoma é a exposição à radiação ultravioleta (UV) devido ao seu efeito genotóxico, que de acordo com Elwood et al. é um fator de risco determinante para o desenvolvimento deste tipo de patologia. Para além disto, a exposição à radiação ultravioleta artificial pode apresentar um papel importante no desenvolvimento do melanoma, uma vez que a acumulação de radiação UVA proveniente da prática de solário, é significativamente superior em comparação com a exposição solar em atividades ao ar livre ou em banhos de sol [22].

Um dos fatores de risco mais importante no desenvolvimento do melanoma, está associado ao número de nevos melanocíticos, à história familiar ou à suscetibilidade genética. Os nevos melanocíticos são acumulações benignas de melanócitos ou células de nevos que podem ser congénitas ou adquiridas, sendo

que cerca de 25% dos casos de melanoma ocorrem em conjunto com nevos pré-existentes. Neste sentido, a contagem total de nevos está positivamente correlacionada com o risco de melanoma e varia tendo em conta o número, tamanho e tipo de nevo. Para além disto, a existência de história familiar de melanoma constitui também um dos fatores de risco por apresentar uma componente hereditária, assim como a história pessoal de cancro da pele não melanoma e o *xeroderma pigmentosum* (doença hereditária caracterizada por uma sensibilidade extrema aos raios ultravioleta provenientes da luz solar). Estudos epidemiológicos realizados identificaram ainda características fenotípicas tais como, cabelo loiro ou ruivo, pele e olhos claros, sardas, sensibilidade ao sol e dificuldade em bronzear com um risco aumentado de desenvolvimento de melanoma de aproximadamente 50% [11,22,23].

### **1.3. Fatores de prognóstico**

A deteção e o tratamento precoce do melanoma, normalmente são eficazes neste tipo de patologia, com uma sobrevida superior a 90% aos 5 anos. No entanto, quando ocorre o desenvolvimento de metástases, a sobrevida média é de apenas 6 a 9 meses. Assim, a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de patologia continua a ser de extrema importância para que haja um diagnóstico e tratamento cada vez mais precoce [19].

No que diz respeito aos fatores que influenciam o prognóstico, são analisados parâmetros clínicos como a idade, o sexo, o diâmetro da lesão, o local de acometimento e a presença ou não de ulceração. Por outro lado, também são analisadas características histopatológicas como o subtipo, o índice de *Breslow* (espessura do melanoma), o índice mitótico, a fase de crescimento (radial ou vertical), a existência de invasão neural e a regressão tumoral [19,24].

Neste sentido, o diagnóstico e o tratamento precoces continuam a ser a melhor forma de abordar o melanoma, sendo que o conhecimento das características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas do melanoma maligno

podem contribuir para melhorar o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, o aumento da sobrevivência e a diminuição da mortalidade e da morbidade [17].

#### **1.4. Tipos de tratamentos**

Relativamente ao tratamento do melanoma, tendo em conta o estadiamento, uma equipa multidisciplinar avalia e determina qual a melhor abordagem a adotar. Neste sentido, a cirurgia é considerada a modalidade terapêutica mais eficaz no tratamento deste tipo de patologia, no entanto, a radioterapia, tem evoluído constantemente nos últimos anos e o surgimento de estudos clínicos prospetivos e/ou randomizados permitiram à radioterapia assumir um papel cada vez mais importante no tratamento do melanoma. Apesar de inicialmente ser utilizada apenas em casos paliativos, o desenvolvimento de experiências clínicas nesta área assim como a aquisição de um conhecimento mais aprofundado sobre as características radiobiológicas das células do melanoma, permitiu contrariar o facto de este ser um tipo de tumor radorresistente. Neste sentido, atualmente a RT é considerada a modalidade não-cirúrgica mais eficaz na terapia loco-regional do melanoma, fazendo parte da abordagem multidisciplinar. Desta forma, estudos realizados demonstraram que esta modalidade é considerada uma opção eficaz e segura tanto no tratamento curativo como paliativo do melanoma, apresentando uma taxa de controlo eficaz da doença com baixa toxicidade [9].

A RT é assim, uma modalidade terapêutica que utiliza radiação ionizante de elevada energia que normalmente é gerada num aparelho, denominado de acelerador linear. Esta tem como objetivo administrar uma dose de radiação ionizante, que forma iões e deposita energia nas células dos tecidos por onde passa. Esta energia depositada tem a capacidade de provocar a morte das células tumorais ou de causar alterações genéticas, que podem resultar na sua morte. Desta forma, a radiação de alta energia danifica o material genético das células e bloqueia a sua capacidade de divisão e proliferação [25,26].

## **1.5. Diagnóstico**

Tal como referido anteriormente, o melanoma continua a ser a patologia com maior taxa de mortalidade no cancro da pele e neste sentido, a deteção precoce continua a ser um dos fatores preponderantes para a redução da mortalidade. Como se trata de uma patologia cuja localização é cutânea, é possível fazer uma deteção precoce recorrendo a abordagens não invasivas, no entanto, a exame patológico continua a ser a forma mais utilizada para diagnosticar o melanoma [22].

## **1.6. Biomarcadores para melanoma**

A incidência do melanoma cutâneo, mais do que duplicou nas últimas décadas em todos os países, especialmente em regiões com populações de pele clara. No entanto, apesar dos métodos clínicos, bioquímicos e histológicos fornecerem informações sobre o comportamento desta patologia, esta continua a ser uma doença imprevisível. Como apresenta uma taxa de mortalidade elevada, existe uma necessidade de procurar novos biomarcadores que sejam adequados e úteis para um diagnóstico precoce, estadiamento, prognóstico, assim como a monitorização da resposta ao tratamento [27,28].

Neste sentido, os biomarcadores apresentam propriedades moleculares, que permitem não só a deteção e o diagnóstico, como também fornecem informações relacionadas com o comportamento biológico do tumor e os mecanismos que estão associados à resistência e/ou sensibilidade ao tratamento. Os biomarcadores para melanoma podem ser divididos em diferentes categorias, sendo que grande parte deles apresenta uma maior expressão nas células de melanoma em relação às células do tecido normal, podendo assim ser utilizados como marcadores de diagnóstico. Para além destes, existem outros biomarcadores que podem servir de marcadores preditivos ou de prognóstico devido à sua expressão aumentada em estadios avançados da doença, como indicadores da resposta ao tratamento ou da recorrência da doença durante o período de *follow-up* [27].

Um biomarcador deve ser uma molécula metabolicamente e analiticamente estável que seja detetável e/ou quantificável no sangue ou noutros compartimentos que contém fluídos corporais, que são acessíveis através de procedimentos minimamente invasivos. Este tipo de biomarcador deve permitir o diagnóstico do tumor ou a possível resposta de um doente a um determinado tratamento, devendo apresentar sensibilidade e especificidade suficiente para minimizar os resultados falsos-positivos e falsos-negativos. Neste momento, no que diz respeito ao melanoma, não existe um biomarcador ideal, sendo que características patológicas do tumor como a espessura de *Breslow*, a taxa mitótica e o estado de ulceração, são fatores de prognóstico importantes, que apenas podem ser determinados após realização de uma biópsia ou resseção cirúrgica do tumor. No entanto, como as células de melanoma e as moléculas extracelulares que lhe estão associadas fornecem um acesso analítico não invasivo, uma vez que libertam proteínas e outras células no fluído extracelular, quando presentes na corrente sanguínea, podem servir de biomarcadores séricos. Neste sentido, com o objetivo de demonstrar os vários biomarcadores que atualmente são alvo de estudo em melanoma, foi elaborada a tabela 2.1 [27,28].

**Tabela 2.1** – Exemplos de biomarcadores que atualmente são alvo de estudo em melanoma [28].

<b>BIOMARCADOR</b>	<b>CORRELAÇÃO</b>	<b>AUTOR</b>
<b>LDH</b>	Estadio do tumor; prognóstico Taxa de sobrevivência	Egberts et al. [29] Balch et al. [30]
<b>Tirosinase</b>	Prognóstico Taxa de sobrevivência Sobrevivência global	Quaglino et al. [31] Visus et al. [32] Samija et al. [33]
<b>COX-2</b>	Progressão tumoral Espessura de Breslow	Kuzbicki et al. [34] Becker et al. [35]
<b>cMMP-1 e MMP-3</b>	Sobrevivência livre de doença.	Nikkola et al. [36]
<b>MMP-9</b>	Mau prognóstico	Nikkola et al. [37]
<b>MMP-2</b>	Progressão tumoral	Rotte et al. [38]
<b>VEGF</b>	Estadio do tumor; sobrevida Progressão tumoral Estadio do tumor	Ugurel et al. [39] Quaglino et al. [31] Pelletier et al. [40]
<b>Osteopontina</b>	Espessura de Breslow e sobrevida Mau prognóstico Estadio tumoral	Rangel et al. [41] Alonso et al. [42] Maier et al. [43]
<b>Gal-3</b>	Progressão tumoral	Brown et al. [44]
<b>YKL-40</b>	Progressão tumoral Mau prognóstico Estadio do tumor	Scmidt et al. [45] Schmidt et al. [46] Egberts et al. [29]
<b>MIA</b>	Taxa de sobrevida Mau prognóstico	Díaz-Lagares et al. [47] Essler et al. [48]
<b>CEACAM</b>	Estadio do tumor e sobrevida	Sapoznik et al. [49]
<b>S100B</b>	Taxa de sobrevida Deteção de metástases Mau prognóstico	Bouwhuis et al. [50] Oberholzer et al. [51] Beyeler et al. [52]
<b>IgG4</b>	Progressão e sobrevida global	Karagiannis et al. [53]
<b>IL-8</b>	<i>Tumor burden</i> , estadio e sobrevida	Sanmamed et al. [54]

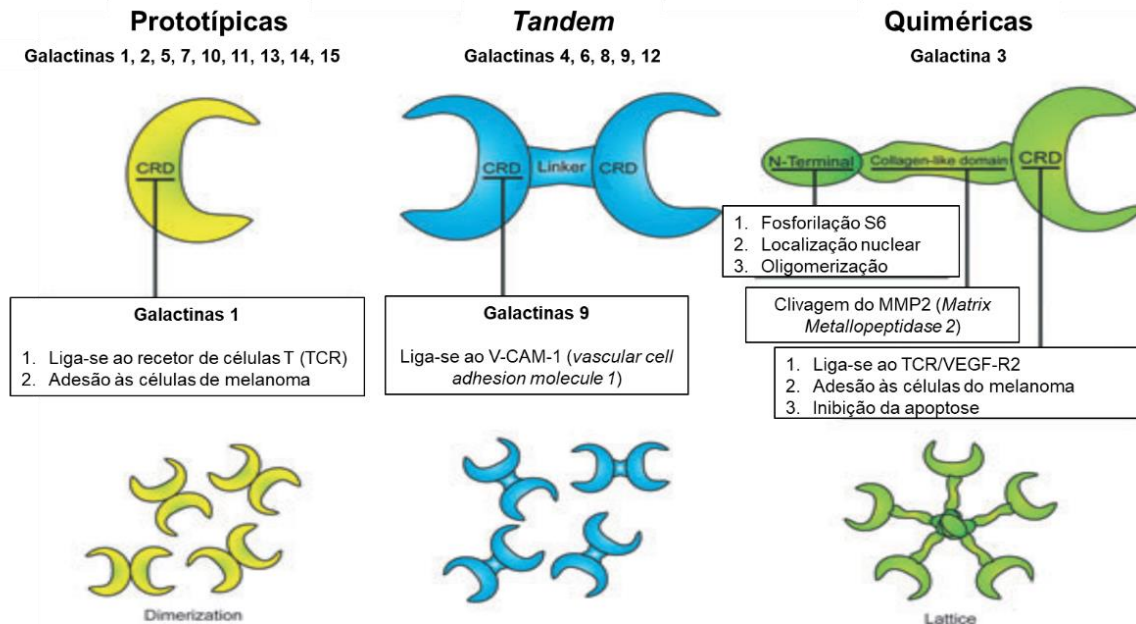
### 1.6.1. Galactina-3 como biomarcador do melanoma

Tal como referido anteriormente, o melanoma é considerado um dos tumores malignos mais agressivos, com pior prognóstico em doentes com estadios avançados e cuja mortalidade está particularmente associada com a presença de metástases. Apesar de ter havido um aumento da consciencialização e da deteção precoce com o objetivo de diminuir a probabilidade de recorrência, ainda é difícil identificar doentes inicialmente diagnosticados com melanoma localizado, que futuramente possam desenvolver doença metastática. Neste sentido, um dos grandes desafios nesta área, passa por compreender quais as alterações moleculares que estão associadas à progressão desta doença, que normalmente é acompanhada por múltiplas alterações genéticas, epigenéticas e ambientais. Desta forma, a identificação e o conhecimento dos mecanismos moleculares que estão na origem destas alterações, são essenciais para o desenvolvimento e a escolha dos tratamentos mais adequados [28].

Estudos realizados na área demonstraram que em determinados tipos de cancro como o cancro da mama, da tiroide, colorretal e melanoma, existe uma desregulação das galactinas, que provocam uma inibição da apoptose das células tumorais, promovendo o crescimento do tumor e aumentando o desenvolvimento de metástases. No entanto, apesar de já terem sido estudadas as suas funções em diferentes tipos de cancro, a sua função no melanoma ainda não é totalmente compreendida [29].

As galactinas são um grupo de proteínas que têm a capacidade de se ligar aos açúcares  $\beta$ -galactosidases e estão envolvidos em várias funções biológicas. Cada uma apresenta um *domínio de reconhecimento de carboidratos* (CRD) sendo classificados de acordo com o número e estrutura dos CRD's. Relativamente à arquitetura das mesmas, estas podem ser divididas em galactinas *tandem* (galactinas 4, 5, 8, 9 e 12), prototípicas (galactinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15) e quiméricas (galactina-3). As galactinas *tandem* apresentam duas subunidades de CRD's conectadas por um "*linker*", as prototípicas apresentam apenas uma

subunidade de CRD e as quiméricas apresentam um CRD, um domínio semelhante ao colagénio e um domínio N-terminal (figura 2.3) [29–31].

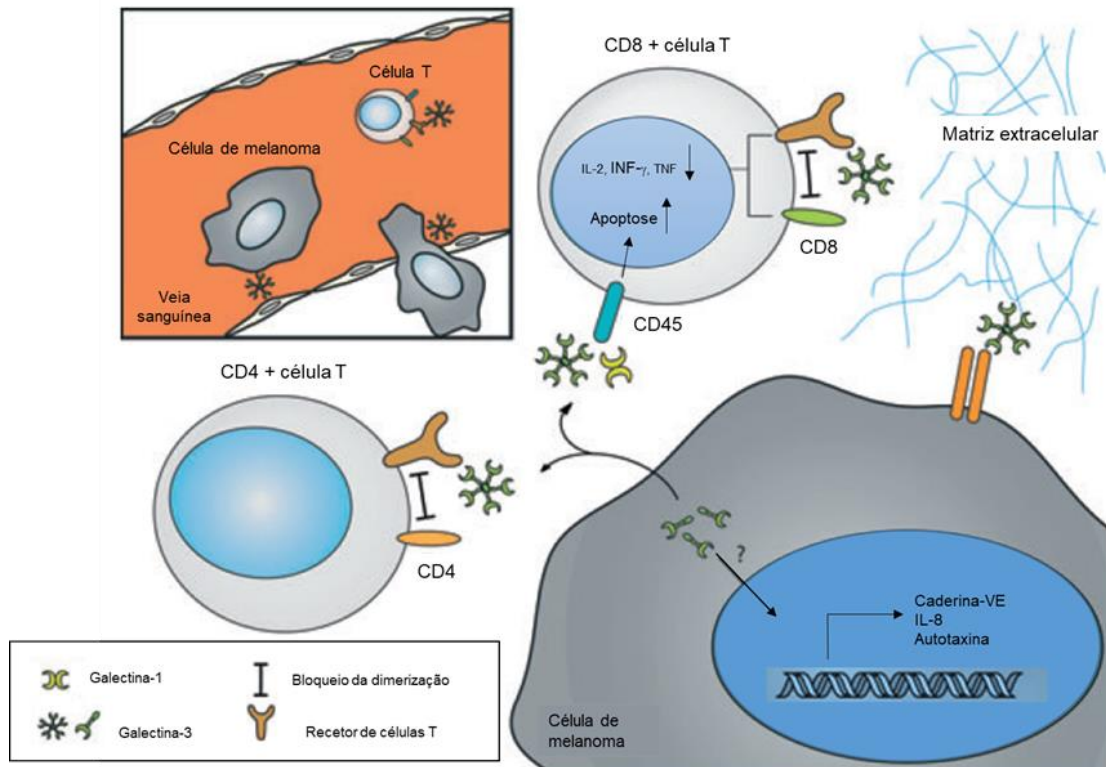


**Figura 2.3** – Semelhanças e diferenças entre as três classes de galactinas [29].

Relativamente à Gal-3, esta é uma proteína multifuncional membro da família das lectinas, com uma estrutura quimérica que desempenha um papel importante na adesão, proliferação, diferenciação, angiogénese e metastização em vários tipos tumores, sendo que a sua expressão está correlacionada positivamente com o potencial metastático das linhas celulares de melanoma humano. Tanto a atividade pró como anti-apoptótica da Gal-3 foram encontradas em determinados tumores estudados, tendo sido demonstrado que a expressão desta proteína pode estar associada à progressão do melanoma, podendo funcionar como um marcador de monitorização terapêutica do melanoma (figura 2.4). Estudos realizados demonstraram que em comparação com os nevos benignos, o melanoma localizado em áreas expostas ao sol, apresenta uma maior expressão citoplasmática e nuclear da Gal-3 e para além disto, foi demonstrado que a expressão desta proteína para além de estar correlacionada com a presença de metástases, também está associada a um pior prognóstico da doença. Mediante a imunohistoquímica foi

possível identificar a presença da Gal-3 em compartimentos membranares das células do melanoma, apresentando uma expressão aumentada no soro dos pacientes. Desta forma, é de salientar que esta proteína pode ter um papel no desenvolvimento de metástases no melanoma através de diversos mecanismos, uma vez que esta se encontra localizada em vários compartimentos subcelulares no interior do microambiente tumoral. A Gal-3 pode então ligar-se a múltiplas proteínas da superfície celular que expressam glicanos podendo formar homo-oligómeros ou pentâmeros quando se ligam a glicanos multivalentes, que permitem ligar-se a um amplo espectro de moléculas da superfície celular para iniciar a adesão e a formação de metástases [29,31,32].

Relativamente à deteção de proteínas, existem diversos métodos que podem ser utilizados na área da eletroquímica, tais como métodos óticos, separativos entre outros. No entanto, para a Gal-3 e após uma pesquisa bibliográfica, verificou-se que não existem métodos eletroquímicos desenvolvidos para esta proteína. Porém, como esta tem apresentado bons resultados como potencial biomarcador em diversas áreas e, uma vez que os biossensores são dispositivos sensíveis, seletivos, acessíveis e relativamente fáceis em termos de desenvolvimento comparando com outras técnicas que poderiam ser utilizadas, verificou-se que a construção de um biossensor para a deteção desta proteína seria a forma mais rápida e simples para desenvolver uma nova estratégia de apoio ao tratamento do melanoma, através da monitorização da eficácia da radioterapia [33].



**Figura 2.4** – Funções biológicas das galactinas nas células de melanoma e no microambiente circundante. A galactina-3 intracelular pode induzir a expressão de genes como a caderina-VE, a IL-8 e a autotaxina, que estão associados à progressão tumoral. A galactina-1 e a galactina-3 reduzem a atividade dos TIL (*tumor-infiltrating lymphocyte*) através da inibição da dimerização do TCR com o CD4 ou CD8 nas células T CD4+ e CD8+, respetivamente. Isto reduz a secreção de IL-2, INF- $\gamma$  e TNF (fator de necrose tumoral) no microambiente tumoral. Para além disto, as galactinas ligam-se também ao CD45 e induzem a apoptose de células T, que desta forma escapam à vigilância imunológica. Para além disto, tal como mostrado no canto superior esquerdo da figura, a galactina-3 pode ligar-se ao endotélio vascular, promovendo a saída de células tumorais para órgãos mais distantes e inibindo a ativação das células T anti-tumorais [29].

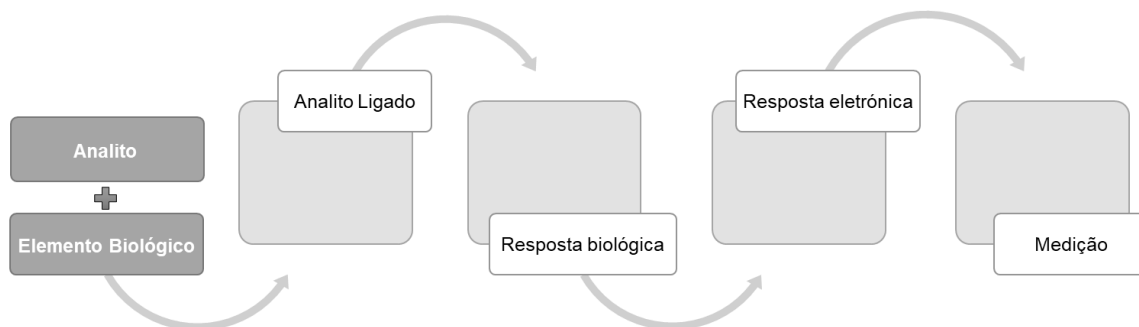
## 2. Biossensores

### 2.1. Estrutura de um biossensor

A quantificação de processos biológicos e bioquímicos tem sido cada vez mais importante em aplicações médicas, biológicas e biotecnológicas. No entanto, a conversão direta de dados biológicos em sinais eletrónicos continua a ser um desafio devido à complexidade que existe em conectar diretamente um dispositivo eletrónico a um ambiente biológico. Neste sentido, os biossensores eletroquímicos têm a capacidade de analisar o conteúdo de uma amostra através da conversão direta de um evento biológico num sinal elétrico [34,35].

Os biossensores têm sido amplamente utilizados em diversas aplicações tais como a monitorização de doenças, a deteção de poluentes e de microrganismos ou marcadores causadores ou indicadores de determinadas patologias, sendo que o primeiro biossensor foi desenvolvido em 1962 por Clark e Lyons com o objetivo de quantificar diretamente a concentração de glicose numa amostra. Desta forma, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) um biossensor é um dispositivo autónomo capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas usando um elemento de reconhecimento biológico (recetor bioquímico), que está em contacto direto com um elemento transdutor. Assim, o biossensor mede reações biológicas ou químicas, gerando sinais que são proporcionais à concentração do analito na reação, ou seja, é um dispositivo analítico que converte uma resposta biológica num sinal processável e quantificável. Cada biossensor tem um componente biológico que atua como sensor e um componente eletrónico que deteta e transmite o sinal. O elemento biológico ou bioelemento é imobilizado e mantém-se em contacto com o transdutor. Desta forma, vai interagir com o analito que está a ser testado e a resposta biológica é convertida num sinal elétrico pelo transdutor. O analito liga-se então ao material biológico para formar um analito ligado, que por sua vez vai produzir uma resposta eletrónica que pode ser medida. Por vezes, o analito é convertido num produto que pode estar associado à libertação de calor, gás (oxigénio), eletrões ou iões de

hidrogénio sendo que o transdutor converte então as alterações ligadas ao produto em sinais elétricos, que podem ser amplificados e medidos como pode ser observado na figura 2.5 pelo fluxo de medição de um biossensor. Se o bioelemento se ligar ao analito, o sensor é denominado de sensor de afinidade, caso o bioelemento e o analito deem origem a uma alteração química que pode ser usada para medir a concentração do substrato, o sensor é metabólico. Por fim, se o elemento biológico se combinar com o analito e não o alterar quimicamente, convertendo-o num substrato auxiliar, o sensor é catalítico [35–37].

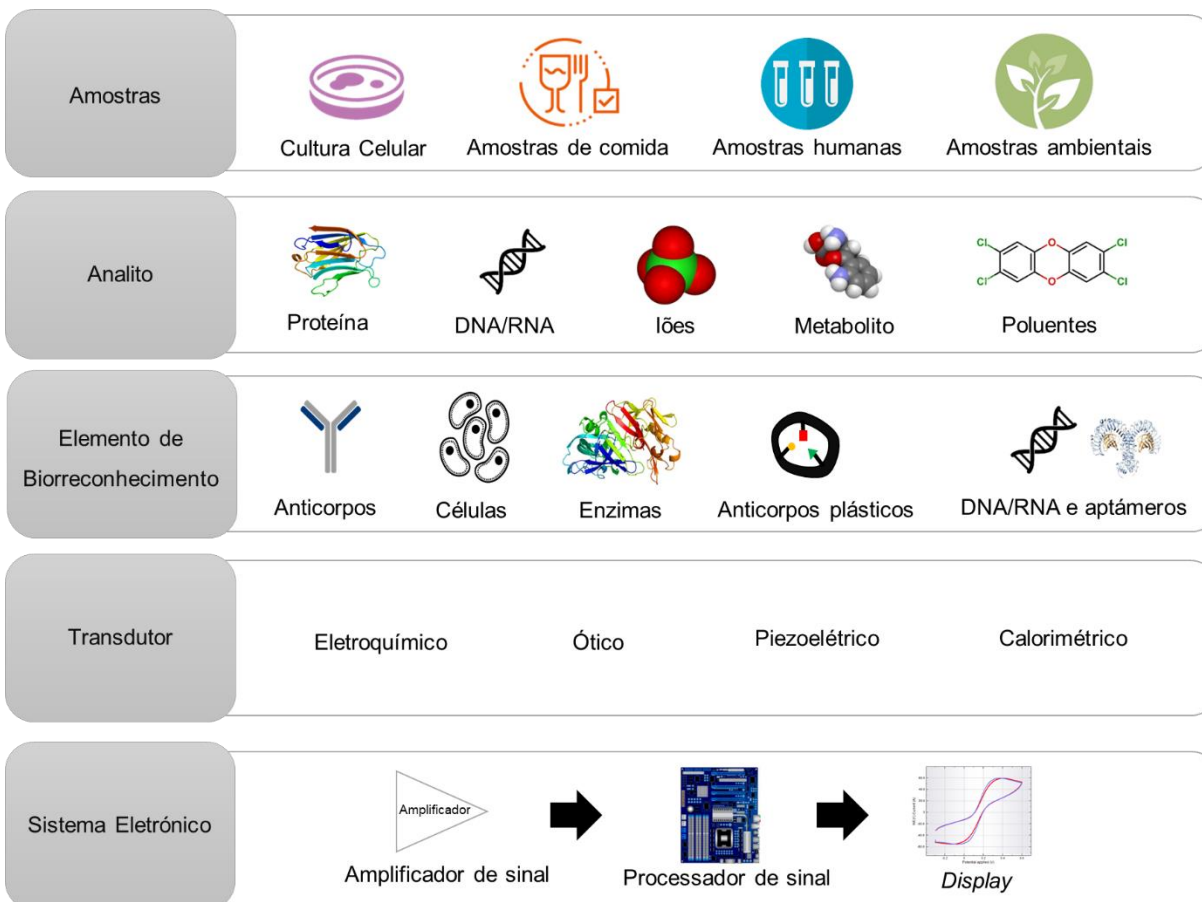


**Figura 2.5** - Fluxo de medição de um biossensor [38].

Relativamente à sua constituição, um biossensor é constituído por 5 componentes que se encontram descritos na tabela 2.2 e representados na figura 2.6.

**Tabela 2.2** - Componentes de um biossensor típico [36].

<b>ANALITO</b>	O analito representa a substância de interesse que vai ser detetada.
<b>ELEMENTO DE BIORRECONHECIMENTO</b>	Molécula que reconhece especificamente o analito alvo. Deve ser seletivo e sensível para evitar que haja interferência de outras substâncias presentes na amostra. Pode ser por exemplo enzimas, células, aptámeros, DNA ou anticorpos e o processo de geração do sinal (na forma de luz, pH, calor, carga, alteração da massa entre outras) resultante da interação do bioreceptor com o analito é denominado de biorreconhecimento.
<b>TRANSDUTOR</b>	É um elemento que converte uma forma de energia noutra. No caso dos biossensores, o transdutor converte o evento de biorreconhecimento num sinal mensurável. Este processo de conversão de energia é designado de sinalização. A maioria dos transdutores produz sinais óticos ou elétricos que geralmente são proporcionais à quantidade de interações entre o analito e o bioreceptor.
<b>SISTEMA ELETRÓNICO</b>	Parte do biossensor responsável por processar o sinal transduzido e prepará-lo para o display. É constituído por circuitos eletrónicos complexos que realizam o condicionamento de sinais como a amplificação e a conversão de sinais do formato analógico para digital. Os sinais processados são então quantificados pela unidade de display do biossensor.
<b>DISPLAY</b>	O display consiste num sistema de interpretação do utilizador. Consiste na combinação de software e hardware que gera os resultados no biossensor. O sinal de saída do <i>display</i> pode ser um gráfico, uma tabela, uma imagem ou um número dependendo dos requisitos do utilizador.



**Figura 2.6** - Representação esquemática dos componentes de um biossensor [35].

Um biossensor normalmente é utilizado como instrumento de análise, uma vez que apresenta determinadas características estáticas e dinâmicas como seletividade, reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade e linearidade, sendo que a otimização destas se reflete no desempenho do biossensor. Relativamente à seletividade, esta é considerada a característica mais importante do biossensor, uma vez que reflete a capacidade de um bioreceptor para detetar um analito específico numa amostra. No que diz respeito à reprodutibilidade, esta representa a capacidade que um biossensor tem para gerar respostas semelhantes, ou seja, traduz-se pela precisão e exatidão do transdutor e da eletrónica de um sensor. Por outro lado, a estabilidade de um biossensor está associada ao grau de suscetibilidade a perturbações ambientais no interior e em torno do sistema. Estas

perturbações podem causar um desvio nos sinais de saída, que podem provocar erros na concentração medida e afetar desta forma a precisão. Neste sentido, como a resposta dos transdutores e da eletrónica pode ser influenciada pela temperatura, pela afinidade do bioreceptor (grau com que o analito se liga ao bioreceptor) e pela degradação deste durante um determinado período de tempo, é necessário que haja um ajuste da eletrónica do biossensor para garantir que seja fornecida uma resposta estável. Relativamente à sensibilidade, esta representa a quantidade mínima do analito que pode ser detetada pelo biossensor e que define o limite de deteção (LOD). É de salientar que em casos de monitorização médica, é necessário que um biossensor detete concentrações na escala das ng/mL (nanogramas/mililitro) ou fg/mL (fentogramas/mililitro). No que diz respeito à linearidade, esta está associada à precisão da resposta medida, ou seja, está associada à resolução do biossensor e à gama de concentrações do analito que estão a ser estudadas. É então definida como a menor alteração na concentração de um analito que é necessária para provocar uma alteração no biossensor [36].

É ainda de salientar que a seletividade e a sensibilidade do biossensor são determinadas pela afinidade do elemento de biorreconhecimento com a molécula alvo e pelo transdutor utilizado. Neste sentido, tendo em conta o elemento de biorreconhecimento, o biossensor pode ser classificado como sendo um imunossensor, um biossensor enzimático, um genossensor, um biossensor celular ou um sensor biomimético [39].

## **2.2. Elementos de Biorreconhecimento**

Um biossensor é um dispositivo que mede reações biológicas ou químicas e gera sinais que são proporcionais à concentração de um analito na reação. Este é constituído por vários componentes, dos quais fazem parte os elementos de biorreconhecimento, que representam elementos que reconhecem especificamente o analito. Fazem parte deste conjunto anticorpos, células, enzimas, anticorpos plásticos (polímeros de impressão molecular), DNA/RNA e aptâmeros [36].

### **2.2.1. Anticorpos**

Os anticorpos são estruturas que pertencem à família das glicoproteínas, denominadas de imunoglobulinas (Ig) e são produzidos em resposta à presença de substâncias estranhas, os antígenos [40].

A estrutura proteica 3D dos anticorpos cria um padrão de reconhecimento que é exclusivo, apresentando uma elevada especificidade e precisão para o analito. Os anticorpos apresentam uma tendência para terem uma conformação 3D em forma de “Y” e são compostos por uma cadeia leve e uma cadeia pesada, com domínios de ligação para o analito localizados nos “braços”. O uso de anticorpos como elemento de biorreconhecimento nos biossensores é designado de imunossensor, ou seja, pode ser classificado como um sensor de afinidade, no qual o sinal deste, depende do evento de ligação para formar o imunocomplexo anticorpo-antígeno [41].

Um imunossensor é um tipo de biossensor no qual um analito alvo específico denominado antígeno é detetado pela formação de um imunocomplexo estável entre o antígeno e anticorpo como agente de captura, gerando um sinal mensurável fornecido pelo transdutor. Na literatura existem poucos imunossensores para a deteção da Gal-3 e é de salientar que durante a pesquisa bibliográfica não foi encontrado nenhum para a deteção desta proteína em melanoma. No entanto, como também é utilizada como biomarcador em casos de insuficiência cardíaca, existem imunossensores que utilizam como elemento de biorreconhecimento o anticorpo anti-Gal3 e diferentes métodos de transdução de sinal. Na prática, verificou-se que este tipo de sensor utilizando anticorpos para a deteção da Gal-3 em insuficiência cardíaca, apresenta resultados favoráveis, uma vez que os sensores desenvolvidos demonstraram ser seletivos, estáveis e com resultados reprodutíveis. Contudo, é de salientar que existem desvantagens associadas a este tipo de sensor, uma vez que o uso de elementos de biorreconhecimento de natureza proteica apresentam baixa estabilidade e um elevado custo [42–45].

### **2.2.2. Enzimas**

As enzimas são moléculas orgânicas com uma natureza proteica que agem nas reações bioquímicas como catalisadores eficientes, uma vez que aceleram a reação, fornecendo uma via de reação alternativa com uma energia de ativação menor [46].

A utilização de enzimas como elemento de biorreconhecimento dá origem aos biossensores enzimáticos. Estes são de natureza biocatalítica e a enzima tem a função de capturar o analito alvo e convertê-lo cataliticamente num produto mensurável, que é frequentemente monitorizado por métodos de transdução eletroquímicos e amperométricos. É de salientar que as enzimas são frequentemente incorporadas na superfície das estruturas o que permite que haja um caminho mais curto entre o elemento de biorreconhecimento e o transdutor [41].

Este tipo de biossensor tem a capacidade de ser seletivo, uma vez que a capacidade catalítica das enzimas sobre o analito ou sobre o reagente que vai provocar a alteração no sinal promove a seletividade da resposta. No entanto, como dependem da atividade catalítica do meio, variações em determinadas características, como no pH, mesmo que sejam pequenas, podem condicionar ou limitar a atividade catalítica da enzima [45].

Relativamente aos biossensores enzimáticos que existem para a deteção da Gal-3, constatou-se após a pesquisa bibliográfica, que ainda não foram desenvolvidos até à data.

### **2.2.3. DNA/RNA**

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é uma molécula que está presente no núcleo das células de todos os seres vivos e que transporta o código genético. A sua principal função passa por armazenar informações a longo prazo e apresentar instruções que são necessárias para construir outros componentes das células, tais como moléculas de ácido ribonucleico (RNA) [47].

Os biossensores que utilizam os ácidos nucleicos como elemento de biorreconhecimento são denominados genossensores, que têm a capacidade de detetar nucleótidos individuais que fazem parte de uma molécula de genoma (DNA) e tiram proveito da ligação do DNA para alcançar a especificidade do bioanalito. Posteriormente à identificação de uma sequência alvo, um fragmento de DNA pode ser projetado artificialmente e imobilizado na superfície do sensor como elemento de biorreconhecimento. Desta forma, a especificidade é alcançada através de um padrão único de reconhecimento complementar entre o fragmento de DNA imobilizado e a sequência alvo [37,41].

A utilização de DNA na construção de biossensores tem sido uma área de interesse devido à alta especificidade das sequências complementares, que têm a capacidade de hibridizar através do emparelhamento das bases nitrogenadas e desta forma realizar análises genéticas de uma forma simples, rápida e económica. No que diz respeito aos métodos de transdução que existem para monitorizar a hibridização, normalmente recorre-se a métodos de transdução óticos e eletroquímicos [48].

#### **2.2.4. Aptâmeros**

Os biossensores que utilizam aptâmeros como elemento de reconhecimento são denominados de aptasensores, são mais estáveis e adaptam-se melhor às condições das amostras reais, devido às suas propriedades específicas. Os aptâmeros são moléculas de RNA ou DNA de cadeia simples que se ligam às moléculas alvo com alta especificidade e afinidade. O facto de apresentarem um tamanho mais pequeno em comparação com outras moléculas de reconhecimento permite que haja uma imobilização mais eficiente dos aptâmeros. Neste sentido, a produção, miniaturização, integração e automação dos biossensores pode ser conseguida mais facilmente com a utilização de aptâmeros do que com anticorpos e uma vez seleccionados, os aptâmeros podem ser sintetizados com uma elevada reprodutibilidade e pureza [37].

### **2.2.5. Polímeros de impressão molecular (MIP)**

O reconhecimento molecular é um princípio que está associado a muitos processos biológicos. Neste sentido, existem estruturas especializadas que se adaptam a alvos naturais como os anticorpos se adaptam aos antígenos, as enzimas aos seus substratos e os recetores hormonais às suas hormonas. Estas bio-macromoléculas são então utilizadas como sistemas de reconhecimento em aplicações na área biomédica e na área da química analítica. No entanto, como são instáveis fora do seu ambiente natural, podem existir em pequena quantidade ou até não existir para uma determinada molécula alvo, surgiu a necessidade de criar estas estruturas de forma artificial. Assim, o objetivo é criar recetores macromoleculares artificiais com elevada afinidade e seletividade, capazes de reconhecer e se ligarem a um determinado alvo molecular, através de uma técnica de impressão molecular de polímeros sintéticos. Comparado com os sistemas naturais, os métodos de impressão molecular apresentam determinadas características como baixo custo, robustez, alta capacidade de reconhecimento e durabilidade a longo termo o que permite que os polímeros impressos molecularmente possam ser usados em diversas áreas (tabela 2.3) [49].

A impressão molecular é uma tecnologia que permite produzir polímeros dotados de locais específicos de reconhecimento, moldados a partir de uma molécula molde, que pode ser o próprio analito ou um composto com uma estrutura semelhante. Atualmente, a impressão molecular tem sido usada na criação de superfícies de biorreconhecimento em biossensores e é uma técnica que permite sintetizar polímeros altamente reticulados com a capacidade de reconhecimento molecular seletivo [50,51].

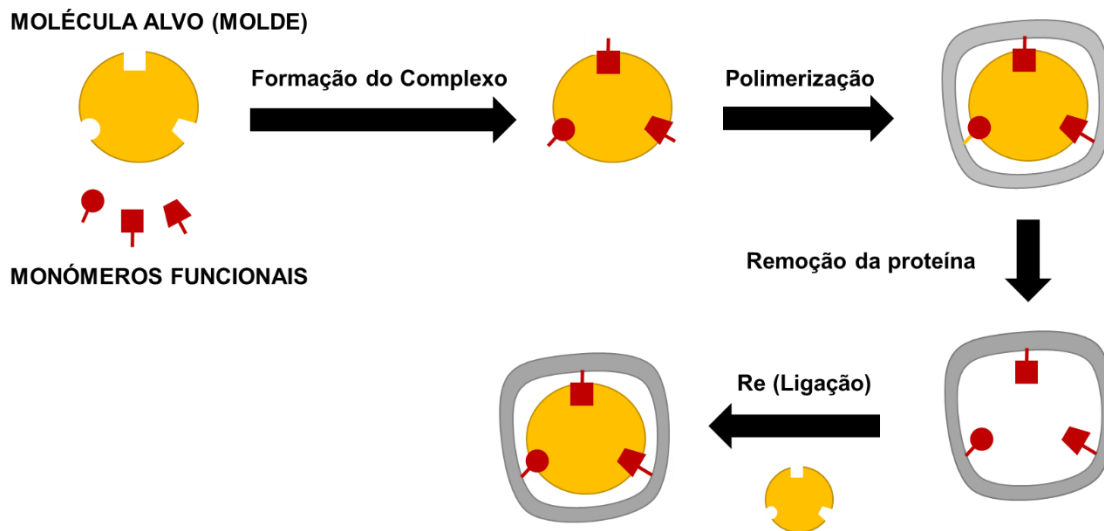
Os polímeros são chamados de polímeros de impressão molecular (MIP – *Molecularly Imprinted Polymers*) e o processo de síntese inicia-se com a formação de um complexo entre os monómeros funcionais e a molécula molde. Os monómeros funcionais devem apresentar grupos funcionais em posições complementares para que seja possível a interação com a molécula molde e haja a formação de um complexo estável. De seguida, é adicionado um agente de

reticulação e um iniciador, que normalmente é radicalar, dando-se início à polimerização em cadeia, formando assim uma matriz polimérica rígida. Posteriormente, a molécula molde é removida da matriz polimérica através de um solvente ou de um processo de clivagem química como pode ser observado na figura 2.7. Desta forma, os MIP's apresentam microcavidades que são complementares ao molde em forma, tamanho e funcionalidade química e têm a capacidade de reter de forma seletiva a molécula molde presente numa amostra, eliminando possíveis interferentes que estejam presentes [51–53].

Apesar do processo de formação dos MIP's ser relativamente simples, é necessário ter particular atenção na escolha dos reagentes e do procedimento que vai ser utilizado, para que seja evitada a formação de polímeros com características indesejáveis associadas à morfologia e à uniformidade das partículas e cavidades formadas. É de salientar que para que seja determinada a concentração da molécula de interesse que é adsorvida pelo MIP, podem ser utilizados métodos eletroquímicos como a condutimetria, amperometria, voltametria e potenciometria. No que diz respeito ao desenvolvimento de biossensores que usam MIP's como elemento de biorreconhecimento para a deteção da Gal-3, ainda não existem na literatura. No entanto, espera-se que este projeto sirva de ponto de partida para o estudo e desenvolvimento de novos biossensores, em especial na área do melanoma, tendo surgido a necessidade de desenvolver novos métodos de monitorização para servir de apoio no controlo deste tipo de doença [53,54].

**Tabela 2.3** - Comparação dos elementos de reconhecimento naturais com os MIP's [55].

	ELEMENTOS DE RECONHECIMENTO NATURAIS	MIP'S
<b>Afinidade de ligação</b>	Alta afinidade/especificidade	Varia (especialmente para modelos macromoleculares)
<b>Generalidade</b>	Um recetor por analito	Os MIP's podem ser desenvolvidos para qualquer template
<b>Robustez</b>	Estabilidade limitada (cada elemento possui requisitos operacionais próprios)	Estável em várias condições (pH, força iónica, solventes)
<b>Custo</b>	Síntese cara mas económica	Barato
<b>Armazenamento</b>	Armazenamento durante dias, à temperatura ambiente	Armazenamento a longo termo sem perda de desempenho (vários meses a anos)
<b>Síntese/preparação</b>	Demorada	Fácil
<b>Integração do sensor</b>	Baixa compatibilidade com as superfícies do transdutor	Totalmente compatível
<b>Infraestrutura necessária</b>	Instrumentos analíticos caros/ mão de obra qualificada	Deteção <i>label-free</i>



**Figura 2.7** - Esquema representativo da formação de um polímero de impressão molecular.

### **2.2.5.1. Síntese de um MIP**

Relativamente à síntese de polímeros moleculamente impressos, existem vários protocolos sintéticos que foram desenvolvidos. No entanto, os que apresentam maior eficiência para produzir este tipo de materiais, que são incluídos em sensores biomiméticos, são a polimerização em *bulk* e a polimerização em superfície [56].

#### **Polimerização em *Bulk***

Atualmente, um dos métodos mais utilizados na produção de MIP's é a polimerização em *bulk* devido à simplicidade do processo. O procedimento consiste na adição consecutiva do analito, do monómero, do solvente, do reagente de ligação cruzada e do iniciador. Como a reação de polimerização é normalmente desencadeada por um iniciador radicalar, é necessário que haja a remoção do oxigénio do meio. Neste sentido, a polimerização ocorre por aquecimento ou irradiação para aumentar o rendimento da reação, obtendo-se assim um sólido rígido e heterogéneo, que deve ser triturado, peneirado e extraído por um processo de eluição. Como se trata de uma técnica simples e de baixo custo, é possível produzir matrizes poliméricas estáveis em grande escala. No entanto, as cavidades formadas, muitas vezes apresentam formas e tamanhos irregulares, o que provoca a existência de locais de ligação com diferentes afinidades para a mesma molécula. Para além disto, trata-se de um processo demorado na obtenção de partículas com a forma e tamanho necessário e é possível que haja a destruição de locais de ligação durante o processo de moagem, o que diminuí de forma significativa o desempenho da técnica e a eficiência do MIP [53,57–59].

Relativamente à impressão em *bulk* para a criação de MIP's para proteínas, devido à complexidade química e geométrica destas, existem algumas limitações que estão associadas a esta técnica. Fatores como a configuração 3D da proteína a imprimir não são compatíveis com o processo de aquecimento do meio, para além disto, o facto das proteínas apresentarem um tamanho superior, dificulta a extração

de determinados componentes impressos, que ficam aprisionados no polímero e o facto deste processo necessitar de uma grande quantidade da molécula molde torna incompatível o uso desta técnica com o custo elevado da proteína [53,57].

### **Polimerização em superfície**

A polimerização em superfície caracteriza-se pela formação de locais de ligação que estão localizados na superfície do polímero ou próximo dela. Isto é conseguido através de uma abordagem semelhante à utilizada na polimerização em *bulk* ou através da ligação do molde da proteína à superfície (plana ou esférica) de um substrato, com subsequente polimerização. Este tipo de método facilita a difusão da macromolécula para o interior e exterior da rede, minimizando assim as preocupações com o tamanho do molde. Para além disto, os MIP's que usam a técnica de polimerização em superfície permitem que haja uma integração mais fácil com as plataformas do sensor e tendem a ser mais robustos fisicamente por possuírem um suporte [55].

Este tipo de técnica é particularmente útil na impressão de biomoléculas, como as proteínas, uma vez que a sua grande dimensão permite que seja criado um polímero com um grande controlo estrutural. Para além disto, a polimerização em superfície apresenta uma resposta rápida com elevada seletividade e como são utilizadas menos moléculas molde em comparação com as outras técnicas convencionais, uma vez que o molde é usado apenas na etapa de revestimento da superfície, a preparação dos MIP's torna-se mais rentável. No entanto, é possível que haja uma menor sensibilidade em comparação com a polimerização em *bulk*, uma vez que existe um menor número de locais impressos [50,53].

#### **2.2.5.2. Impressão molecular de proteínas**

Os polímeros impressos sintetizados na presença de modelos macromoleculares (>1500 Da) têm recebido um particular interesse por parte da comunidade científica nos últimos anos e em particular, as proteínas por se tratarem

de macromoléculas que apresentam atividades biológicas numa ampla gama de funções. No entanto, devido às propriedades inerentes a este tipo de macromolécula como o tamanho, a complexidade, a flexibilidade conformacional e a solubilidade, o desenvolvimento deste tipo de MIP's que usam proteínas como modelo, é inferior a cerca de 2% dos trabalhos realizados nesta área [55].

Relativamente ao tamanho molecular, normalmente, os blocos de polímeros típicos são relativamente densos, o que torna difícil para um molde macromolecular atingir ou deixar um local de ligação formado. Desta forma, o transporte de massa inadequado e o aprovisionamento permanente pode levar ao desenvolvimento de propriedades de reconhecimento inadequadas, o que torna necessário proceder à exposição dos locais de ligação através da quebra do bloco [60].

No que diz respeito à complexidade das proteínas, ao contrário dos modelos mais pequenos, estas apresentam um número elevado de locais de reconhecimento numa vasta área de superfície. No entanto, uma proteína apresenta regiões com características físico-químicas distintas o que pode levar a problemas associados ao reconhecimento e à reatividade cruzada. Neste sentido, como um MIP apresenta uma seletividade melhor quando existem poucos pontos de interação, mas cujas interações sejam fortes, o facto de existirem várias interações fracas favorece o aparecimento de ligações não específicas o que torna pouco provável desenvolver um MIP que seja altamente específico [60].

No que diz respeito à flexibilidade conformacional, as condições típicas de polimerização utilizadas, podem ser complexas quando aplicadas a proteínas, uma vez que pode provocar a sua desnaturação e forçá-las a conformações ou agregados que não são adequados para a impressão, o que pode afetar a seletividade [60].

Para além disto, relativamente à solubilidade um dos grandes desafios no desenvolvimento de um sensor, é a escolha do solvente. A maioria das impressões moleculares acontece com solventes orgânicos apolares com o objetivo de maximizar as interações eletrostáticas. No entanto, como as proteínas apresentam baixa estabilidade e solubilidade em solventes apolares, o seu uso é limitado. Isto também torna difícil a escolha de monómeros que estão disponíveis para seleção,

uma vez que muitos deles são insolúveis ou parcialmente solúveis em água que não é o solvente ideal para a impressão molecular convencional [60].

Apesar das dificuldades que estão inerentes à impressão molecular de proteínas, existem diferentes métodos que têm sido utilizados com este intuito e que estão descritos acima [61].

### **2.3. Transdutores**

Tal como referido anteriormente, um biossensor é um dispositivo constituído por um componente biológico acoplado a um transdutor, que converte a atividade bioquímica num sinal elétrico, podendo ser classificado de acordo com o princípio de transdução do sinal. O transdutor é um dos componentes do biossensor responsável por converter um conjunto de efeitos biológicos, físicos e químicos em sinais elétricos mensuráveis, resultantes da interação do analito com o bioreceptor. Este pode ser ótico (colorimétrico, fluorescente, luminescente e interferometria), eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), com base em massa (piezoelétrico e de ondas acústicas) e com base na temperatura (calorimetria) [39,62].

#### **2.3.1. Óticos**

Um biossensor ótico é um dispositivo analítico que contém um elemento sensor de biorreconhecimento integrado a um sistema transdutor ótico e tem como principal objetivo produzir um sinal que seja proporcional à concentração da substância medida (analito). A deteção ótica é feita através da interação do campo ótico com um elemento de reconhecimento biológico, podendo ser dividido em dois modelos gerais: *label-free* e *label-based*. No modo *label-free*, o sinal detetado é gerado diretamente através da interação do material com o transdutor, enquanto que no modo *label-based* o sinal ótico é gerado através de um método colorimétrico, fluorescente ou luminescente [63].

### **2.3.2. Piezoelétricos**

Os biossensores piezoelétricos baseiam-se num sistema de deteção sensível à massa, sendo que os transdutores são utilizados para a imobilização de biorecetores em cristais de quartzo. Estes cristais sofrem uma deformação elástica quando lhe é aplicado um potencial elétrico, que vai produzir uma onda estacionária no cristal, com uma frequência característica que é dependente das propriedades elétricas do cristal. Estes sensores baseiam-se no princípio da mudança da frequência de ressonância devido à interação dos biorecetores com os analitos. Neste caso, os sensores são feitos para vibrar numa frequência específica através da aplicação de um sinal elétrico, sendo que a frequência de oscilação do cristal depende da frequência aplicada [64–66].

### **2.3.3. Calorimétricos**

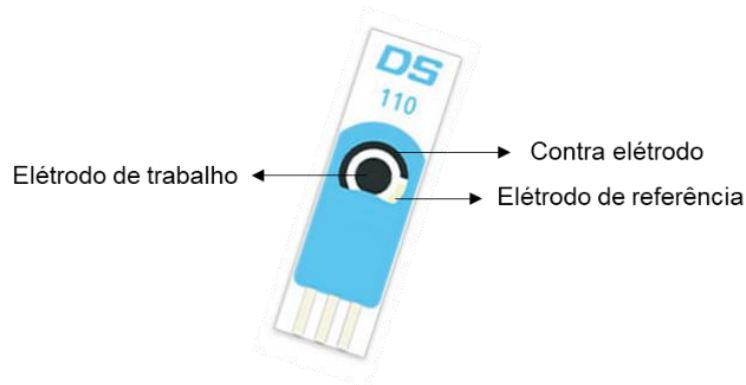
Nos biossensores calorimétricos, as enzimas são combinadas com um sensor de temperatura, para medir as alterações que ocorrem quando o analito interage com o biorecetor. Estas alterações são observadas através da quantidade de calor que é gerado ou consumido durante uma reação bioquímica e desta forma, o biossensor mede o calor da reação da enzima, que está linearmente relacionado com a concentração do analito [66].

### **2.3.4. Eletroquímicos**

Na área dos biossensores, a medição de propriedades elétricas para extrair informações dos sistemas biológicos é normalmente de natureza eletroquímica, na qual o componente bio-eletroquímico serve como principal elemento de transdução. Estes baseiam-se no consumo e/ou na geração de espécies eletroativas durante uma interação química e biológica, na qual o transdutor tem a função de medir o sinal eletroquímico resultante desta interação. A maioria dos biossensores utiliza este tipo de deteção para o transdutor uma vez que apresentam baixo custo, são de fácil uso, apresentam portabilidade e simplicidade na sua construção [35,39,67].

Relativamente ao princípio de funcionamento deste tipo de biossensores, as reações químicas que ocorrem entre a biomolécula imobilizada e o analito de interesse produz ou consome iões ou eletrões, o que afeta propriedades elétricas mensuráveis da solução, tais como a corrente ou o potencial elétrico [68].

Normalmente, os sensores eletroquímicos podem ser classificados em três categorias, biossensores potenciométricos, amperimétricos e impedimétricos, podendo ser distinguidos com base na forma como o analito é medido. Enquanto que a resposta ao analito na potenciometria envolve reações que provocam uma alteração na voltagem entre os elétrodos, que pode ser detetada ou medida, no caso da amperometria, esta mede as diferenças na corrente elétrica que está associada ao fluxo de eletrões proveniente de reações *redox*. Por outro lado, relativamente à condutometria, esta mede alterações na condutividade do meio que resultam por exemplo de reações enzimáticas que alteram a composição iónica e para além disto, existem referências a outras técnicas de deteção eletroquímica, como a impedimétrica, na qual é medida a impedância (resistência e reatância) e o efeito de campo. Como as reações normalmente são detetadas próximo da superfície do eléctrodo, estes apresentam um papel importante no desempenho dos biossensores. Um sensor eletroquímico normalmente necessita de um eléctrodo de referência, um contra eléctrodo ou eléctrodo auxiliar e um eléctrodo de trabalho, também referido como sensor ou eléctrodo *redox* como se pode observar na figura 2.8. O eléctrodo de referência normalmente é feito de Ag/AgCl (prata/cloreto de prata) sendo mantido a uma distância do local de reação para manter um potencial conhecido e estável. Relativamente ao eléctrodo de trabalho, este serve de elemento transdutor na reação bioquímica, enquanto que o contra eléctrodo estabelece uma conexão com a solução eletrolítica, para que uma corrente possa ser aplicada ao eléctrodo de trabalho. Como estes tipos de elétrodos devem ser condutores e quimicamente estáveis, dependendo do analito, podem ser normalmente de platina, ouro, carbono (por exemplo grafite) e silício [35,69,70].



**Figura 2.8** - Screen-Printed Carbon Electrodes (*DropSens*) (C-SPE's)

Relativamente às técnicas eletroquímicas, estas são utilizadas para estudar a perda (oxidação) ou o ganho de eletrões (redução) que um determinado material sofre durante a estimulação elétrica. Estas reações, também conhecidas como reações *redox* fornecem informações sobre a concentração, a cinética, os mecanismos de reação e outros comportamentos de uma espécie em solução. Neste sentido, numa medição eletroquímica, é possível medir o potencial, a corrente, a carga e o tempo, sendo que a resposta do sistema vai depender do parâmetro que é utilizado como sinal de excitação [71].

Na maioria destas técnicas existem três eletrodos que estão conectados a um potencióstato, que se trata de um instrumento que controla o potencial do eletrodo de trabalho e mede a corrente resultante. Numa medição eletroquímica, um potencial pode ser aplicado ao eletrodo de trabalho e a corrente resultante é medida em função do tempo (cronoamperometria) ou o potencial pode ser variado e a corrente resultante é representada em função da gama de potencial aplicado (técnicas voltamétricas). A combinação de diferentes parâmetros e tipos de eletrodos de trabalho, dá origem a diferentes técnicas que são utilizadas para a deteção da resposta eletroquímica, que inclui a voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, a cronoamperometria e a espectroscopia de impedância eletroquímica, que são técnicas que serão usadas no desenvolvimento deste projeto [71].

No que diz respeito aos biossensores eletroquímicos que já foram desenvolvidos para a deteção da Gal-3, Park et al., desenvolveu um biossensor eletroquímico para a deteção desta proteína, usando como sondas químicas, nanotubos de carbono (SWCNTs) conjugados com D-(+)-galactose. A plataforma de deteção foi preparada por moldagem em gota dos SWCNTs ligados à D-(+)-galactose num eléctrodo de molibdénio, pré-padronizado num substrato de SiO<sub>2</sub> impresso usando fotolitografia convencional. Este tipo de biossensor demonstrou bons resultados em termos de sensibilidade, com uma resposta na gama de concentrações entre 0,0156µg/100µL e 0,5µg/100µL.

Por outro lado, Tang et al. desenvolveu um imunossensor eletroquímico do tipo sanduiche relativamente simples e ultrasensível, baseado numa nova geração de amplificação do sinal, para a deteção da Gal-3, um biomarcador de insuficiência cardíaca. Para isso, um eléctrodo de carbono vítreo (GCE) foi modificado com um filme feito a partir nanofitas de grafeno imobilizadas em estruturas orgânicas metálicas à base de ferro, depositadas com nanopartículas de Au. O anticorpo primário contra a Gal-3 (Gal-3-Ab1) foi imobilizado nas nanopartículas de Au na superfície do GCE modificado, que posteriormente foi bloqueado com albumina de soro de bovino. Após a análise dos resultados, o imunossensor mostrou apresentar reprodutibilidade, estabilidade e uma seletividade aceitável, com um limite de deteção baixo de aproximadamente 33,33fg/mL. Relativamente a estes biossensores eletroquímicos para a deteção da Gal-3, ainda existem poucos na literatura, e para casos de melanoma, ainda não foram desenvolvidos ou publicados, no entanto, espera-se que esta seja uma área promissora para o desenvolvimento de novos projetos [43,72,73].

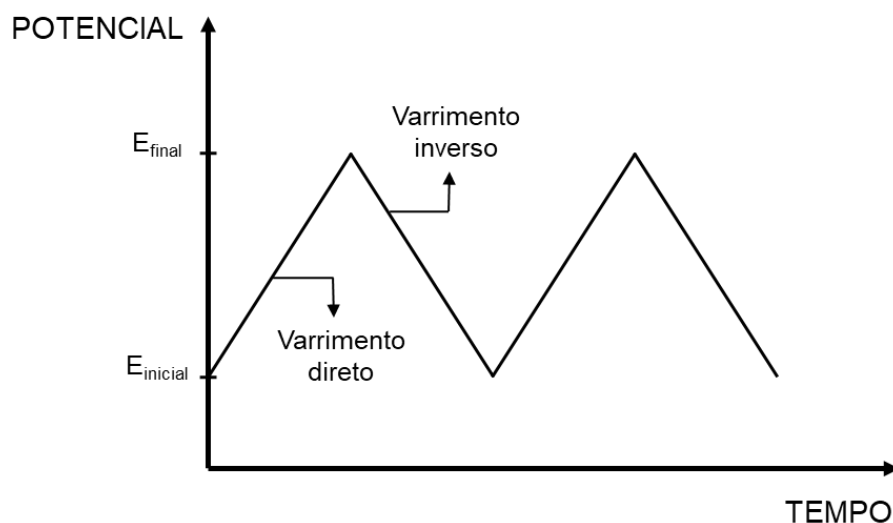
#### **2.3.4.1. Sensores voltamétricos**

##### **Voltametria Cíclica (CV)**

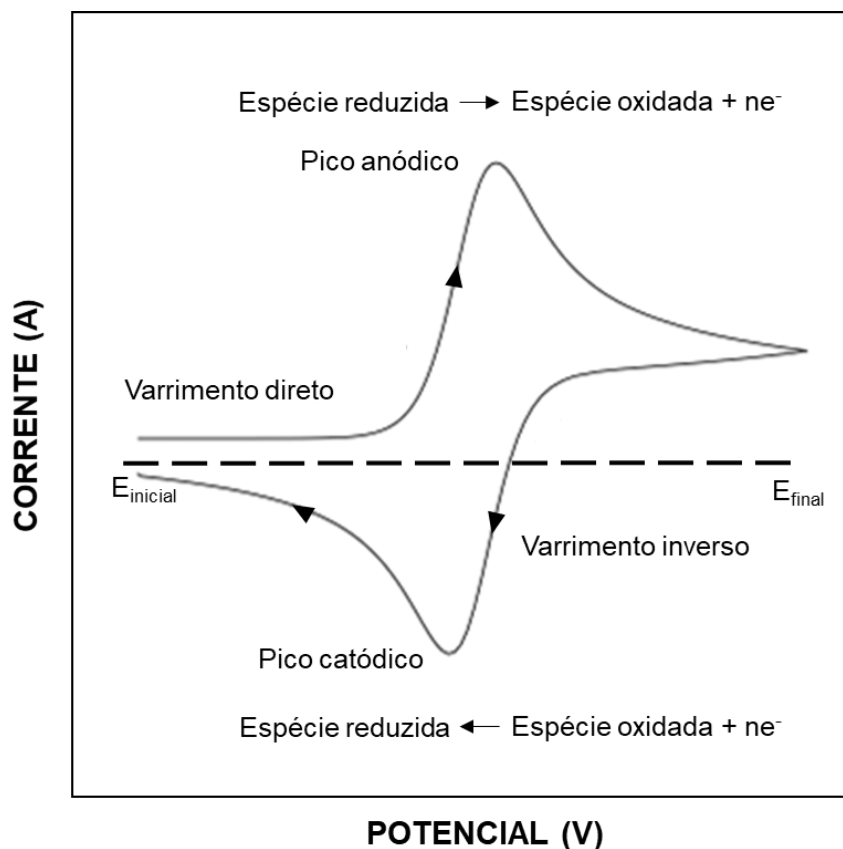
A voltametria cíclica é a técnica mais usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, uma vez que tem a capacidade de

fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica dos processos *redox*, da cinética de reações de transferência eletrônica e sobre reações químicas acopladas a processos de adsorção, podendo desta forma caracterizar um sistema eletroquímico [71,74].

Relativamente ao procedimento associado a esta técnica, este baseia-se na aplicação de um potencial linear na forma de onda triangular a um eletrodo de trabalho, provocando reações de oxidação e redução quando existem espécies eletroativas na solução ou na superfície do eletrodo. Neste sentido, como pode ser observado na figura 2.9, um potencial inicial ( $E_{inicial}$ ) é escolhido e varrido linearmente (varredura direta), com uma velocidade constante em função do tempo até ser atingido um potencial final desejado ( $E_{final}$ ). Quando é atingido este potencial, o varrimento é invertido em direção ao  $E_{inicial}$ . Como este ciclo é repetido, obtém-se um voltamograma cíclico, que representa um gráfico de corrente versus potencial como pode ser observado na figura 2.10 [75].



**Figura 2.9** - Variação do potencial na forma de onda triangular (adaptado pelo autor) [75].



**Figura 2.10** - Voltamograma cíclico obtido por CV, sendo que  $ne^-$  representa o número de elétrons que estão envolvidos (adaptado pelo autor) [75].

Relativamente ao voltamograma cíclico, quando ocorre o varrimento do potencial que é inicialmente aplicado, para regiões mais positivas, existe a oxidação da espécie eletroativa que existe em solução e consequentemente o aumento da corrente, o que provoca a formação de um pico anódico de corrente que é proporcional à concentração do analito. De seguida, em vez de ocorrer uma estabilização no pico, existe uma diminuição da corrente à medida que o potencial aumenta uma vez que o analito apresenta uma menor concentração próximo da superfície do eléctrodo e a difusão da solução torna-se lenta para conseguir repor o analito que está próximo do eléctrodo. Por sua vez, quando o  $E_{final}$  é atingido, o varrimento do potencial passa a ser feito no sentido inverso. Caso seja uma reacção reversível, que tem a capacidade de ser suficientemente rápida para manter as concentrações de equilíbrio dos reagentes e dos produtos que existem na superfície

do eletrodo, os produtos gerados durante o varrimento direto vão ser reduzidos durante o varrimento inverso dando origem a um pico catódico que é simétrico ao pico anódico que foi gerado anteriormente [75].

### **Voltametria de onda quadrada**

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas mais rápida e sensível cuja análise dos seus parâmetros, permite fazer uma avaliação cinética e mecanística do processo. Neste sentido, trata-se de uma técnica dinâmica e baseia-se na cronoamperometria, onde a corrente medida é em função do tempo de aplicação dos pulsos de potencial, ou seja, baseia-se num conjunto de saltos cronoamperométricos que acontecem no sentido direto e inverso, sendo que a medida da corrente é feita no final de cada salto. Durante esta técnica que está representada na figura 2.11, uma onda quadrada com uma amplitude simétrica  $\Delta E_p$ , sobreposta a uma rampa de potencial em forma de escada  $\Delta E_s$  é aplicada ao eletrodo. A corrente é então amostrada quando a direção do pulso é igual à do varrimento e quando a direção do pulso é no sentido contrário à direção do varrimento. Estas medidas de corrente que são em função do tempo dão origem a um voltamograma que pode ser utilizado para estudos analíticos. O voltamograma obtido resulta da relação entre a diferença das duas correntes e o potencial rampa que foi aplicado [74,76].

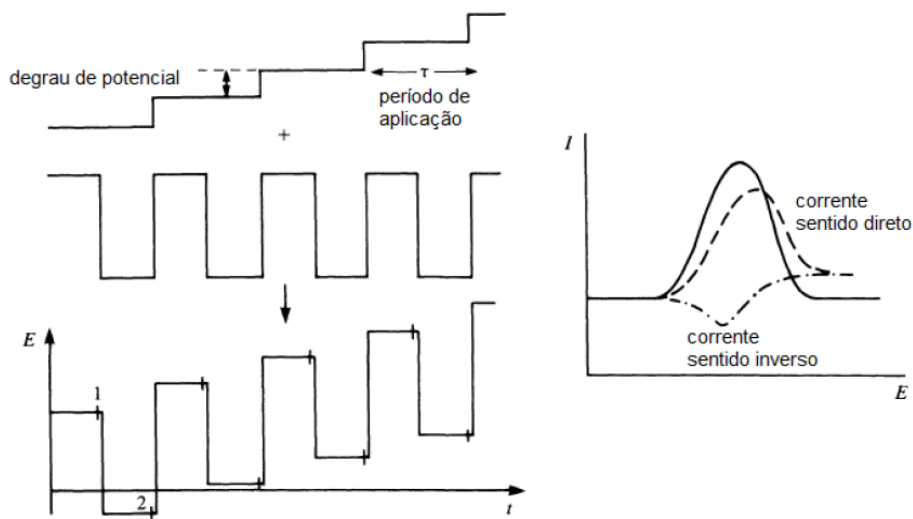


Figura 2.11 - Representação esquemática da voltametria de onda quadrada [74].

#### 2.3.4.2. Sensores Amperométricos

Os biossensores amperométricos, são um tipo de sensor eletroquímico no qual é mantido um potencial constante entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo de referência. Este mede continuamente a corrente produzida pela oxidação ou redução eletroquímica de uma espécie eletroativa na superfície do elétrodo, quando ocorre a transferência de elétrões do analito para o elétrodo ou do elétrodo para o analito. Esta direção do fluxo vai depender das propriedades do analito e pode ser controlada através da aplicação de um potencial elétrico no elétrodo. A corrente gerada é então medida e o sinal obtido é diretamente proporcional à concentração de espécies eletroativas [35,68,69].

#### 2.3.4.3. Sensores Potenciométricos

Os biossensores potenciométricos medem a diferença de potencial elétrico entre o elétrodo de referência e o de trabalho. Este funciona de acordo com o princípio da acumulação de carga junto à superfície do elétrodo de trabalho, o que resulta numa elevada diferença de potencial em relação ao elétrodo de referência.

Enquanto que este eléctrodo apresenta um potencial constante e permanece invariante durante toda a medição, com uma corrente faradaica nula e uma corrente capacitiva constante, o eléctrodo de trabalho sofre alterações significativas no seu potencial mesmo que hajam pequenas alterações na concentração do analito. Este tipo de medição também pode ser utilizado para monitorizar a acumulação de carga que é criada pela ligação do analito à superfície do eléctrodo e que tem um valor igual a zero [65,77].

#### **2.3.4.4. Sensores Condutimétricos**

Os biossensores condutimétricos medem a capacidade de um analito (por exemplo, soluções eletrolíticas) ou um meio (por exemplo, nanofios) para conduzir uma corrente eléctrica entre os eléctrodos ou nós de referência. Ou seja, medem a variação da condutividade eléctrica que ocorre em processos biológicos e que é provocada pelas alterações que ocorrem na concentração das espécies iónicas em solução. Neste tipo de biossensor, a condutividade é medida através da aplicação de uma corrente alternada entre dois eléctrodos imersos em solução e fundamenta-se no facto de determinadas reações enzimáticas gerarem produtos que são eletricamente carregados a partir de substratos neutros. Normalmente este tipo de sensor está associado a enzimas, uma vez que a força iónica, e conseqüentemente, a condutividade de uma solução entre dois eléctrodos é alterada devido à reação enzimática. Desta forma, este tipo de dispositivos pode ser usado para estudar as reações enzimáticas que produzem alterações na concentração de espécies carregadas na solução. Para além disto, também é possível monitorizar as alterações na condutância do eléctrodo, que resulta da imobilização de enzimas, pares complementares de anticorpos-antígenos, entre outros, na superfície do eléctrodo [35,77].

#### 2.3.4.5. Sensores Impedimétricos

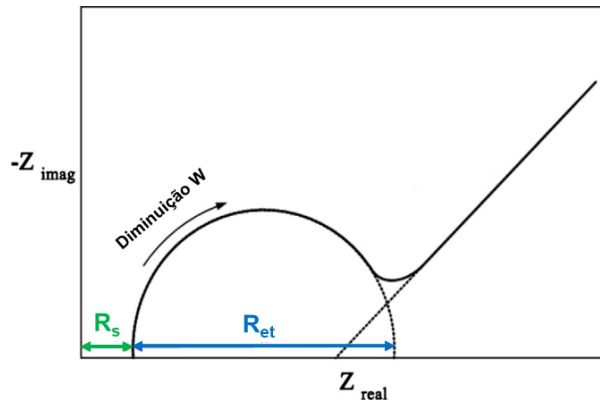
A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica rápida para a caracterização da estrutura e operação funcional de elétrodos que utilizam biomateriais. A imobilização destes nos elétrodos produz alterações na capacitância e na resistência à transferência de eletrões, provocando alterações na impedância. Desta forma, as alterações que são geradas pelos processos de biorreconhecimento podem ser detetadas por esta técnica eletroquímica [78].

A impedância de um componente elétrico genérico é dada pela divisão do potencial de corrente alternada (AC) que é aplicado nos seus terminais e a corrente que flui através deles. Desta forma, a resposta no domínio das frequências pode fornecer informações úteis sobre as alterações físico-químicas que ocorrem quando um analito se liga a um bioreceptor imobilizado num elétrodo e estas informações incluem a resistência da solução, os processos de transferência de carga da solução para a superfície do elétrodo, assim como a difusão de espécies de e para a solução [78].

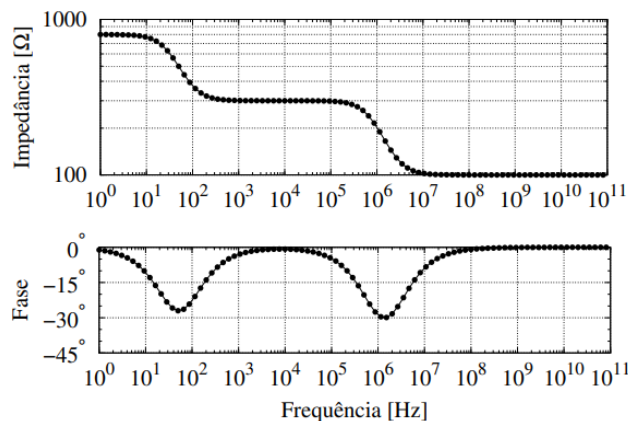
A representação gráfica da impedância normalmente é feita através dos gráficos de *Nyquist* (onde a parte imaginária da impedância está em função da parte real) e de Bode (onde a impedância ou o ângulo da fase são colocados em função da frequência). O gráfico de *Nyquist* contém informações sobre a interface eletrificada e a reação da transferência de eletrões, sendo que este tipo de gráfico inclui um semicírculo situado no eixo, seguido de uma linha reta. Enquanto que o semicírculo normalmente é observado para frequências mais altas e corresponde ao processo limitado de transferência de eletrões, a parte linear é característica de frequências mais baixas e representa o processo de difusão eletroquímico. Em casos em que o processo de transferência de eletrões é muito rápido, o espetro de impedância pode conter apenas a zona linear, enquanto que se este processo for muito lento, é possível que apenas haja um semicírculo sem ser acompanhado pela linha reta. A cinética da transferência de eletrões e as características de difusão podem ser extraídas do espetro, ou seja, o diâmetro do semicírculo representa a resistência à transferência de eletrões ( $R_{et}$ ) e a interceção deste com o eixo  $Z'$  nas

altas frequências, representa a resistência da solução ( $R_s$ ). Para além disto, a extrapolação do círculo para frequências mais baixas, produz uma interceção que corresponde a  $R_s + R_{et}$  (figura 2.12) [37].

Relativamente ao diagrama de Bode, este é outra forma utilizada para a representar a impedância e pode ser realizada de duas formas, num gráfico onde a impedância é colocada em função da frequência ou quando é colocado o ângulo da fase em função da frequência. Normalmente a frequência nestes casos, é representada logaritmicamente para permitir que a mesma quantidade de pontos seja extraída a cada década (figura 2.13) [79].



**Figura 2.12** - Representação gráfica da impedância através da frequência de *Nyquist* (adaptado pelo autor) [37].



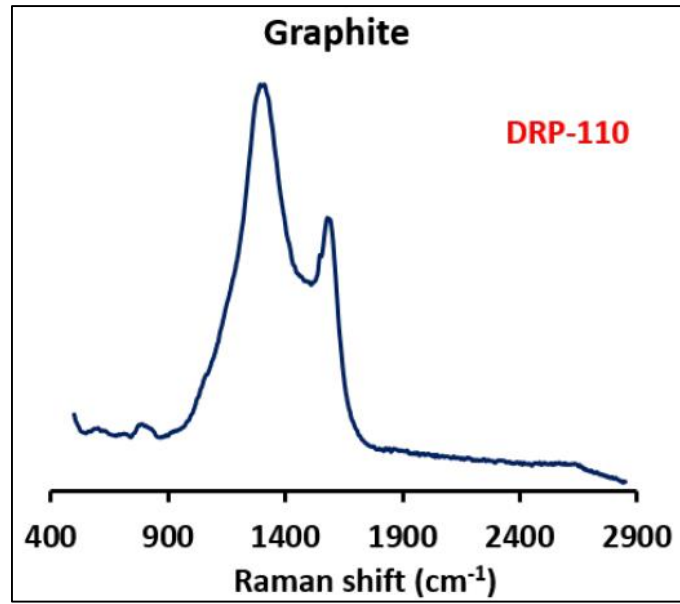
**Figura 2.13** - Representação gráfica da impedância através do diagrama de Bode (adaptado pelo autor) [79].

## 2.4. Análise Qualitativa dos Materiais

### Espetroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é um método analítico que fornece informações específicas e detalhadas a um nível molecular, oferecendo informações que muitas vezes podem não ser obtidas através de outros métodos espectroscópicos. Desta forma, esta técnica permite que seja feita uma identificação rápida dos materiais, permite fornecer informações sobre a estrutura, o arranjo espacial das moléculas e a realização de análises estruturais. Analogamente à realidade, em que cada ser humano tem um conjunto de impressões digitais pelas quais um indivíduo pode ser identificado, cada substância também apresenta características únicas no espectro de Raman. Este espectro, normalmente, apresenta vários picos que indicam a intensidade e a posição do comprimento de onda da luz dispersa de Raman e cada pico corresponde a uma vibração específica de uma ligação molecular, incluindo ligações específicas como C-C, C≡C, N-O, C-H entre outras e grupos de ligações como o anel de benzeno, vibrações na cadeia dos polímeros entre outras [80,81].

De uma forma geral, a espectroscopia de Raman é uma técnica útil para a caracterização de materiais e permite conhecer algumas informações sobre a estrutura dos materiais de carbono em termos de ligações  $sp^2$  e  $sp^3$  e sobre as suas propriedades. Normalmente o espectro obtido para materiais de carbono apresenta dois picos (figura 2.14) representados pela banda G (cerca de  $1580\text{ cm}^{-1}$ ), que fornece informações sobre a fração de ligações  $sp^2$  e a banda D (cerca de  $1300\text{ cm}^{-1}$ ), que fornece informações sobre a fração de ligações  $sp^3$  e possíveis distúrbios na estrutura. Em determinados casos, é possível que apareça a banda G' em torno dos  $2600\text{ cm}^{-1}$ , que fornece algumas informações sobre a estrutura dos materiais em camadas [82].



**Figura 2.14** - Exemplo de um espectro de Raman típico obtido [82].

## Capítulo 3 - Desenvolvimento do biossensor eletroquímico

Neste capítulo serão abordados de forma detalhada os equipamentos, materiais, reagentes e os procedimentos experimentais envolvidos na síntese e na construção do biossensor, assim como a avaliação do desempenho analítico dos dispositivos obtidos.

### 1. Procedimento experimental

#### 1.1. Materiais

##### 1.1.1. Equipamento

Para as soluções preparadas, foram utilizados balões volumétricos classe A com a capacidade de 5 mL, 10 mL, 200 mL e 250 mL de capacidade total, tendo sido usados também tubos *ependorf* de 1,0 mL e 2,0 mL para medições na ordem dos  $\mu\text{L}$ . Para medições rigorosas de volumes até 5 mL foram usadas pipetas automáticas *Gilson* de volume regulável (2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 500-5000  $\mu\text{L}$ ). Relativamente às pesagens dos reagentes, estas foram efetuadas numa balança RADWAG com um erro de  $\pm 1\text{mg}$  e em alguns casos, foi necessário recorrer ao banho de ultrassons termostaticado SELECTA para diminuir o tempo necessário para a dissolução de soluções.

As medidas eletroquímicas foram realizadas com recurso a um potencióstato/galvanostato da *Metrohm Autolab*, que se encontra representado na figura 3.15 (a), controlado pelo Software Nova 1.11. Os C-SPE's utilizados foram adquiridos à DROPSSENS (DRP-C220AT) e são constituídos por um substrato de cerâmica com os contactos elétricos feitos de prata, com um eletrodo de trabalho (4 mm de diâmetro) e um eletrodo auxiliar, ambos feitos de carbono e um eletrodo de referência de prata. Estes são colocados numa caixa conectora (DROPSSENS) que faz a interface com o potencióstato/galvanostato (figura 3.1 b). O potencióstato é um equipamento eletrónico que controla o

potencial aplicado ao elétrodo de trabalho e que permite medir a corrente que o atravessa. Para além disto, a análise da estrutura do material e da superfície dos C-SPE's foi realizada com recurso à espectroscopia de Raman e, para isso, foi utilizado um espectrómetro *Thermo Scientific DXR Raman* com microscopia confocal e equipado com um laser de excitação de 532 nm [77].



**Figura 3.15** – (a) Potencióstato/Galvanostato da *Metrohm Autolab*, (b) Caixa conectora da *DROPSSENS*.



**Figura 3.16** - Espectrómetro *Thermo Scientific DXR Raman*.

### 1.1.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho encontram-se listados na tabela 3.4 assim como a sua origem comercial.

**Tabela 3.4** - Lista de 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 ( $K_3[Fe(CN)_6]$ )	$K_3[Fe(CN)_6]$
Tampão Fosfato-Salino - PBS (Phosphate Buffered Saline)	Amresco
Ácido Sulfúrico 95-97% ( $H_2SO_4$ )	Sigma Aldrich
Ácido Oxálico di-hidratado ( $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ )	Merck
3-Aminofenol, 99%	Acros Organics
Soro CORMAY HN	Cormay
Recombinant human Galectin-3 protein ab50236	abcam
Glucose (Dextrose monohidratada)	Alfa Aesar
Creatinina	Fluka
Albumin, bovine BSA	Amresco
CA15-3	Sigma Aldrich

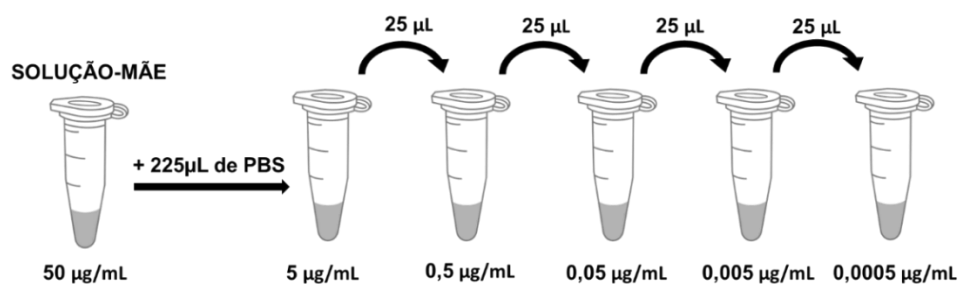
### 1.1.3. Soluções

Durante a realização deste trabalho, os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando uma solução *redox* de ferro constituída por  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$  M, preparada com um eletrólito de cloreto de potássio (KCl) a 0,10 M. A solução de Tampão Fosfato-Salino (PBS) foi preparada com uma concentração de 100 mmol em água ultrapura com um pH igual a 7,4 e a solução de  $H_2SO_4$  foi preparada com uma concentração de 0,50 M em água ultrapura. Relativamente às soluções de aminofenol e de ácido oxálico, estas foram preparadas em PBS e água ultrapura, respetivamente, com uma concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  M no caso do aminofenol e de 0,50 M para o ácido oxálico. No que diz respeito à preparação da Gal-3, esta foi diluída em 1,0 mL de PBS ficando assim com uma concentração de 50  $\mu$ g/mL.

As soluções padrão utilizadas para a realização da curva de calibração, foram preparadas a partir da solução mãe (50  $\mu$ g/mL), diluída em tampão (PBS). Os

padrões mais diluídos foram obtidos a partir da diluição rigorosa das soluções anteriores no mesmo tampão como pode ser observado na figura 3.17.

O estudo da seletividade foi feito com possíveis interferentes como a glucose ( $7,0 \times 10^{-4}$  g/mL) a creatinina ( $1,0 \times 10^{-5}$  g/mL), a albumina de soro de bovino (BSA) ( $4,0 \times 10^{-2}$  g/mL) e o marcador tumoral CA15-3 (30 U/mL). Para todos os compostos foi feita a pesagem dos mesmos, para posterior dissolução e diluição em solução tampão de PBS. No caso da creatinina e do BSA foi necessário fazer uma diluição de 100 vezes e 1000 vezes respetivamente das soluções preparadas inicialmente, para evitar uma possível interferência desproporcionada dos compostos.



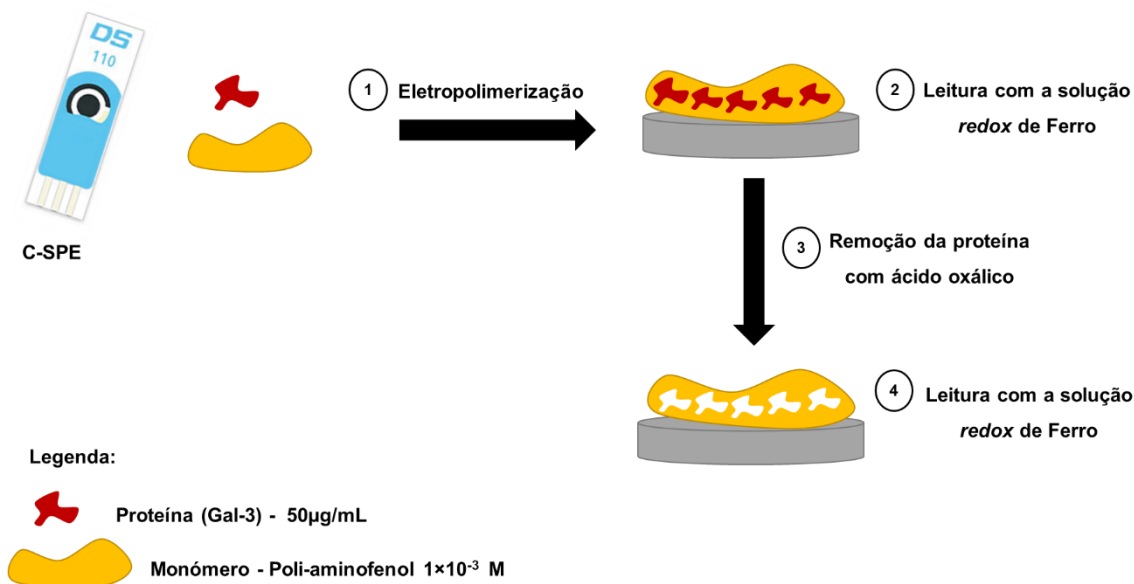
**Figura 3.17** - Representação esquemática da preparação dos padrões utilizados para a construção da curva de calibração.

## 1.2. Procedimentos analíticos

### 1.2.1. Preparação do biossensor/Pré-tratamento

Como um dos objetivos na construção do biossensor consistiu na avaliação da presença da impressão molecular da molécula molde, Gal-3, foi sintetizado na superfície do eléctrodo de trabalho (C-SPE) um polímero sem a impressão molecular (NIP) e em paralelo um polímero com a proteína molecularmente impressa (MIP), seguindo-se a sua remoção do seio da matriz polimérica por ação do ácido oxálico. Neste sentido, a preparação e construção do sensor foi feita em três etapas: a limpeza eletroquímica, a eletropolimerização e a remoção da proteína como pode

ser observado na figura 3.18, através da representação esquemática da construção de um MIP.



**Figura 3.18** - Representação esquemático da construção do MIP.

#### 1.2.1.1. Limpeza eletroquímica

Os C-SPE's foram sujeitos a um pré-tratamento eletroquímico com o objetivo de remover possíveis contaminantes que estejam na superfície do eletrodo (limpeza com KCl) e promover a sua ativação através do aparecimento de grupos funcionais (OH e COOH), que aumentam a aderência do polímero ao eletrodo, através da utilização do  $H_2SO_4$ . Inicialmente foi feita uma leitura com a solução *redox* de ferro, para verificar o estado inicial dos chips, com um volume utilizado em cada ensaio de 100 µL. Posteriormente, os C-SPE's foram sujeitos a uma limpeza eletroquímica por cronoamperometria com um potencial de 1,7 V com uma duração de 200 s, utilizando uma solução de KCl de 0,10 M. De seguida, procedeu-se à ativação da superfície do eletrodo de trabalho, através da colocação de 100 µL de  $H_2SO_4$  a 0,5 M, fazendo-se um varrimento por CV durante 15 ciclos, com uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s num intervalo de potencial entre -0,2 e 1,2 V. É de salientar que após cada medição eletroquímica, procedeu-se a uma leitura com a solução

*redox* de ferro, para que fosse possível observar as diferenças entre os sinais obtidos antes e depois de cada procedimento.

#### **1.2.1.2. Eletropolimerização**

Após o processo de limpeza eletroquímica, procedeu-se à eletropolimerização, que se trata de um método tradicionalmente utilizado na síntese de polímeros de impressão molecular. Para que o processo de impressão seja feito nas melhores condições, a escolha do polímero e das condições de polimerização ideais são passos fundamentais que dependem de vários parâmetros como a escolha do pH, do eletrólito, da gama de potencial escolhida, do número de ciclos, da velocidade de varrimentos e dos grupos funcionais do monómero. A correta seleção do monómero é fundamental pois os seus grupos funcionais irão interagir com locais específicos da proteína, promovendo uma maior eficácia da impressão molecular. A eletropolimerização é uma técnica que tem a capacidade de formar filmes ultra-finos, permitindo controlar a quantidade de polímero que é formado na superfície do eletrodo, necessitando apenas de pequenas quantidades de monómero. Tem ainda a capacidade de aumentar a seletividade devido à exclusão de moléculas que apresentam um peso molecular ou um diâmetro superior ao poro do polímero e devido à adição de materiais dopantes/aditivos que excluem por repulsão determinados compostos interferentes. Para além disto, consegue aumentar a sensibilidade dos eletrodos modificados em relação a um analito, através da modificação dos parâmetros de eletropolimerização, do pH e do eletrólito que permite obter polímeros molecularmente impressos com diferentes características morfológicas e químicas que melhoram a sensibilidade do sensor [83,84].

Para a realização da eletropolimerização do monómero, foi escolhido o 2-aminofenol que faz parte dos aminofenóis, que são derivados do fenol e da anilina. Este trata-se de um monómero que apresenta dois grupos que podem ser facilmente oxidados eletroquimicamente (OH e NH<sub>2</sub>), sendo que a geração de filmes

poliméricos a partir destes, tem sido importante para o desenvolvimento de novos materiais [85].

Neste sentido, para a síntese do polímero de impressão molecular foi usado o aminofenol como monómero e o processo de polimerização foi em *Bulk*. Assim, preparou-se uma solução constituída por aminofenol ( $1,0 \times 10^{-3}$  M) e Gal-3 ( $5,0 \times 10^3$  ng/mL) em tampão PBS com um pH igual a 7,4 para os MIP's. Em paralelo foi preparado um polímero sem impressão molecular (NIP) da mesma forma que o MIP, mas sem a presença da proteína. De seguida, foram colocados 100  $\mu$ L de cada solução no chip correspondente e procedeu-se à eletropolimerização por CV, durante 10 ciclos com uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s, numa gama de potencial entre -0,2 e 0,8 V. Previamente, de forma a escolher a condição de polimerização que garantia as melhores características em termos de estabilidade do polímero, foi otimizado o número de ciclos de polimerização, fixando-se a velocidade de varrimento em 0,05 V/s, numa gama de potencial entre -0,2 e 0,8 V. Para além disto, também foi efetuado um estudo com 5, 10 e 15 ciclos, no entanto, verificou-se que 10 ciclos era o número ideal para que o polímero estabilizasse.

### **1.2.1.3. Remoção da proteína**

Posteriormente à eletropolimerização, procedeu-se à remoção da proteína, incubando 5  $\mu$ L de ácido oxálico 0,50 M na superfície do eléctrodo de trabalho e o processo de remoção foi efetuado durante a noite com os sensores armazenados num exsiccador.

Relativamente à remoção da proteína, a escolha do agente de remoção deve ser ponderada, uma vez que este não deve interferir com o polímero e apenas deve remover a proteína, formando as cavidades. Para isso, foram estudados vários agentes de remoção como o SDS em PBS, a proteinase K, a tripsina e o ácido oxálico, no entanto, verificou-se que o ácido oxálico era o solvente que menos interferia com a superfície do polímero e o que apresentava resultados mais favoráveis. Após a incubação dos C-SPE's com ácido oxálico durante a noite, foi

necessário colocar os chips em PBS durante aproximadamente 30 minutos para estabilização do pH.

### **1.3. Avaliação do desempenho analítico do biossensor**

#### **1.3.1. Curva de calibração**

A avaliação do desempenho analítico do biossensor foi efetuada através do traçado da curva de calibração, que expressa a relação entre o sinal medido e a concentração do analito. Esta fornece informações sobre o limite de deteção (LOD), assim como a sensibilidade do sensor e a qualidade da resposta que é obtida a partir do declive da curva. Um dos objetivos na utilização dos biossensores é que estes determinem concentrações dentro de um determinado nível específico. Deste modo, o LOD representa a concentração mais baixa para a qual o sensor ainda consegue fornecer resultados confiáveis, ou seja, é a menor concentração de uma substância que pode ser distinguida da ausência dessa substância (um valor do branco) dentro de um determinado limite de confiança [53,86].

Neste sentido, o procedimento começou com a estabilização do sensor. Para isso, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de PBS em cada C-SPE e incubou-se durante cerca de 20 minutos, sendo efetuada posteriormente uma leitura com a solução *redox* de ferro. Este procedimento deve ser repetido até que haja a estabilização do sensor, sendo que a medição obtida após a estabilização, será o sinal do “branco”. Após o sensor estar estável, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de várias concentrações de proteína preparadas previamente (tabela 3.5) na superfície do sensor e incubou-se os chips durante aproximadamente 20 minutos. É de salientar que, após a incubação de cada concentração, foi feita uma leitura com a solução *redox* de ferro, com o objetivo de observar a ligação da proteína ao polímero nas cavidades que foram produzidas anteriormente.

As curvas de calibração foram então obtidas pela técnica de voltametria de onda quadrada a um potencial de 0,3 V e desta forma foram construídas a partir de um conjunto de pontos obtidos através da observação do sinal de saída do

transdutor (corrente, A) para um determinado valor do sinal de entrada, que é a concentração do analito.

**Tabela 3.5-** Concentração das soluções que foram preparadas a partir da solução-mãe de Gal-3 em PBS.

Solução Padrão	Concentração de Gal-3 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0,0050
2	0,050
3	0,50
4	5,0
5	50,0

### 1.3.2. Análise em soro

Os ensaios foram também realizados com a preparação de soluções padrão de Gal-3 em soro humano (*Cormay Serum HN*), com o objetivo de avaliar o comportamento do biossensor num contexto mais realista. Para isso, inicialmente foi necessário estabilizar os chips em soro e, posteriormente, incubá-los com as soluções padrão preparadas, durante aproximadamente 20 minutos. As curvas de calibração foram obtidas por voltametria de onda quadrada com um potencial de -0,3 V com concentrações semelhantes às utilizadas anteriormente, entre 0,00050  $\mu\text{g/mL}$  até 5,0  $\mu\text{g/mL}$  preparadas em soro (tabela 3.6).

**Tabela 3.6-** Concentração das soluções que foram preparadas a partir da solução-mãe de Gal-3 em soro.

Solução Padrão	Concentração de Gal-3 ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0,00050
2	0,0050
3	0,050
4	0,50
5	5,0

### 1.3.3. Estudo da seletividade

Qualquer dispositivo necessita que seja feito um estudo de seletividade, uma vez que o biossensor em condições reais implica uma coexistência da proteína em estudo com outras espécies iónicas diferentes e que podem condicionar a resposta.

A seletividade é a capacidade que um bioreceptor tem para detetar um analito específico numa amostra que contém outros compostos. Neste sentido, foi utilizado um método de soluções separadas que consiste na preparação de compostos como a glucose ( $7,0 \times 10^{-4}$  g/mL), a creatinina ( $1,0 \times 10^{-5}$  g/mL), o BSA ( $4,0 \times 10^{-2}$  g/mL) e o CA15-3 (30 U/mL), com o objetivo de verificar se o biossensor responde seletivamente à proteína em estudo. As concentrações das soluções foram ajustadas tendo em conta os valores típicos em fluídos biológicos, no entanto é de salientar que a solução de creatinina e de BSA foram sujeitas a uma diluição da solução inicial, para evitar uma interferência desajustada no sensor. Assim, o procedimento começou com a estabilização do biossensor em PBS e após este processo, cada chip foi incubado com os diferentes compostos durante cerca de 20 minutos para garantir que era atingido o equilíbrio, mesmo quando as espécies interferentes estavam presentes. Foi então efetuado um varrimento por voltametria cíclica com um potencial de -0,3 V a 0,6 V com uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s com a solução padrão *redox* de ferro após cada incubação, para verificar o comportamento do sensor aos vários compostos. É de salientar que para além da incubação dos C-SPE's com os compostos, foi necessário incubar o chip correspondente à proteína com um valor de concentração que tem em consideração o limite fisiológico da Gal-3, neste caso com um valor que ronda os 30 ng/mL, com o objetivo de fazer uma comparação com os outros compostos que também se encontram na gama dos limites fisiológicos para verificar a interferência no sensor.

### 1.4. Análise Qualitativa dos Materiais

A análise qualitativa dos materiais foi feita com recurso à espectroscopia de Raman e para isso, foi utilizado um espectrómetro *Thermo Scientific DXR Raman*

com um microscópio confocal e equipado com um laser de excitação de 532 nm. A obtenção das imagens espectrais resultou da configuração dos parâmetros descritos na tabela 3.7 e a análise foi realizada diretamente na superfície do sensor a quatro C-SPE's, um C-SPE sem qualquer pré-tratamento, um NIP, um MIP antes da remoção da proteína e um MIP após a remoção.

**Tabela 3.7** – Parâmetros definidos para a realização da espectroscopia de Raman.

PARÂMETRO	CONFIGURAÇÃO
<i>Potential</i>	8
<i>Aperture</i>	50µm slit
<i>Photo-Bleach</i>	1,0 minutos
<i>Max. Collect time</i>	2,0 minutos
Ampliação	50 vezes



## Capítulo 4 – Resultados e discussão

No presente capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o processo de desenvolvimento de um biossensor para a deteção da Gal-3. Para isso são descritos os procedimentos e resultados da preparação do sensor, do estudo das condições de funcionamento, da seletividade e da aplicação do biossensor em amostras de soro sintético.

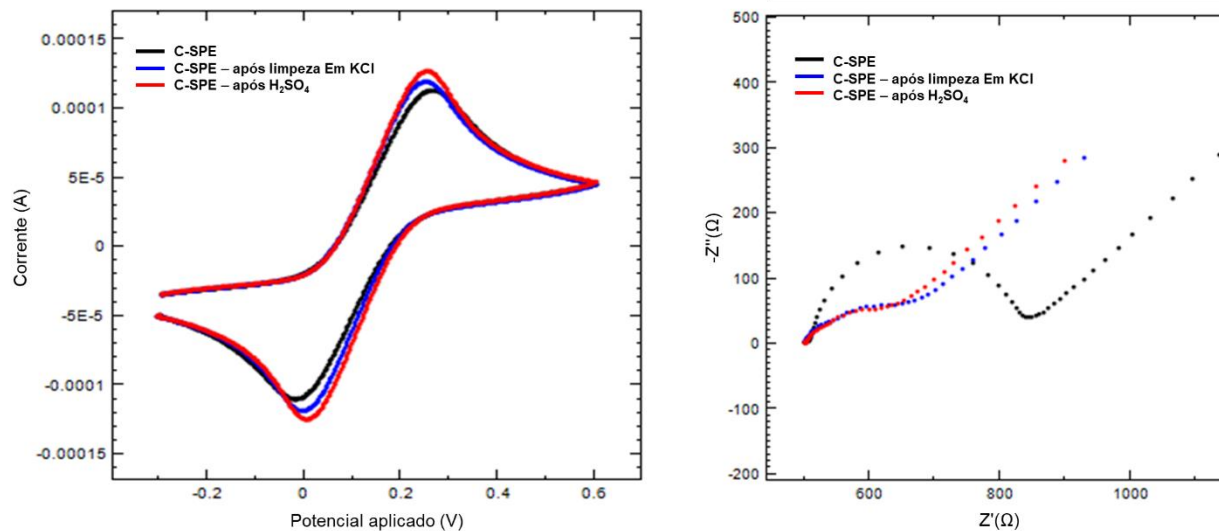
A análise eletroquímica foi feita com recurso às técnicas de cronoamperometria, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e espectroscopia de impedância eletroquímica. Relativamente aos ensaios, as leituras foram feitas em triplicado utilizando uma solução padrão *redox* de ferro ( $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) em KCl (eletrólito).

### 1. Construção do sensor

Como o objetivo dos biossensores é que estes sejam dispositivos simples, rápidos, portáteis e rentáveis utilizou-se como transdutor eletroquímico, eléctrodos *screen printed electrodes* (SPE) cujo eléctrodo de trabalho é feito de carbono, C-SPE. Como se trata de um tipo de eléctrodo com um tamanho menor, isto possibilita que seja utilizado um volume de amostra mais pequeno, tornando este tipo de dispositivos útil em amostras reais e biológicas. Para isso, foram preparados 3 eléctrodos de carbono para sintetizar NIP's e outros 3 para sintetizar MIP's, para desta forma observar as modificações que ocorreram durante as várias fases do desenvolvimento do sensor.

#### 1.1. Limpeza eletroquímica

Após limpeza eletroquímica por cronoamperometria a 1,7 V durante 200 s com uma solução de KCl 0,10 M e tratamento ácido utilizando  $H_2SO_4$  0,50 M por CV, efetuaram-se leituras do CV e EIS, com a solução padrão *redox*. Os resultados obtidos encontram-se na figura 4.19.



**Figura 4.19** – Registos de CV (esquerda) e de EIS (direita) obtidos com a solução *redox* de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$ , preparada com um eletrólito de KCl a 0,10 M após limpeza com KCl e  $H_2SO_4$ .

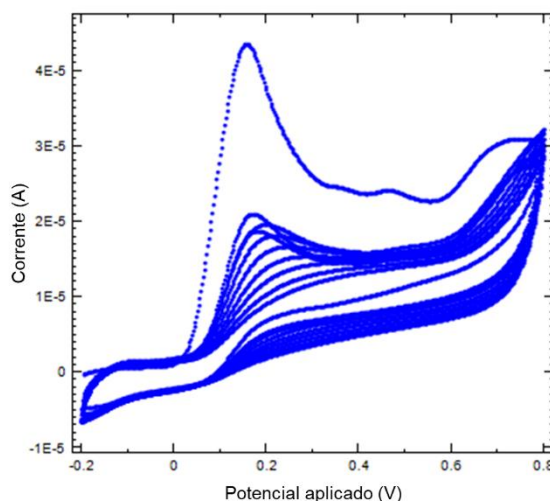
Após a observação da figura 4.19 podemos referir que existe uma diminuição da resistência à transferência de eletrões após o pré-tratamento do C-SPE. No entanto, esta diminuição é semelhante tanto na limpeza com KCl como com  $H_2SO_4$ . Isto acontece devido à remoção/oxidação dos compostos orgânicos que estão presentes e devido à introdução de iões na superfície do eléctrodo.

Na figura 4.19, esquerda (CV), observa-se um ligeiro aumento no valor de corrente (A) nos picos de oxidação e de redução e uma diminuição da separação dos picos após o pré-tratamento. Relativamente à figura 4.19, direita (EIS), observa-se uma diminuição no valor da impedância (resistência à transferência de eletrões). Desta forma, estes resultados demonstram que há uma melhoria após o pré-tratamento no processo de transferência de eletrões entre a superfície do eléctrodo e o eletrólito.

## 1.2. Impressão molecular

A técnica utilizada durante este procedimento foi a polimerização em *bulk* por eletropolimerização, uma vez que foi necessário proceder à mistura do monómero com a molécula molde e a impressão foi feita diretamente na superfície do eléctrodo num único procedimento. Este tipo de técnica permite ajustar as condições eletroquímicas e desta forma controlar a espessura do polímero e a sua morfologia. Para além disto, é ainda possível que haja simultaneamente a impressão e comunicação entre o polímero formado e a superfície do transdutor, o que torna o processo repetível e fácil [83].

A eletropolimerização foi realizada através da execução consecutiva de ciclos de CV sobre a superfície dos C-SPE's. Sendo que no primeiro ciclo, a corrente aumenta em direção aos potenciais de oxidação atingindo um pico em torno de 0,2 V, que representa a oxidação do monómero permitindo assim a ocorrência da eletropolimerização. Os ciclos seguintes demonstram que ocorre uma diminuição contínua da corrente do sistema o que confirma o crescimento de uma camada não-condutora de polímero (figura 4.20).

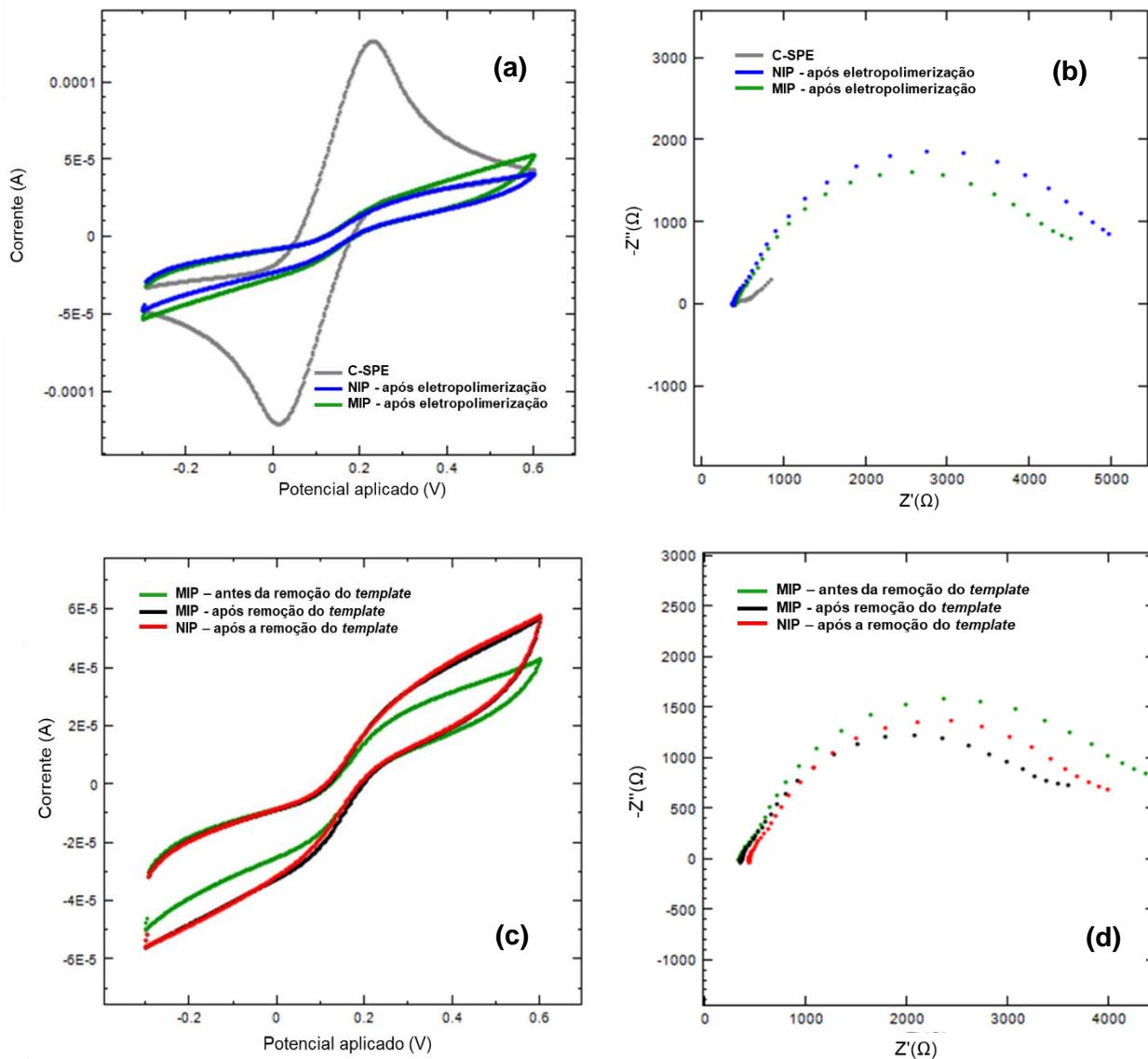


**Figura 4.20** – Voltamograma cíclico relativo à síntese eletroquímica do MIP.

Após a eletropolimerização verificou-se que os picos de oxidação/redução quase desaparecem e o facto de existir uma maior separação entre os picos de

potencial demonstra que a superfície está bloqueada, devido à formação da camada polimérica como se pode observar na figura 4.21 (a). Para além disto, através do gráfico de *Nyquist* que consiste num semicírculo, é possível observar que antes da eletropolimerização, a resistência à transferência de eletrões é inferior comparada com a obtida após as modificações poliméricas que ocorrem na superfície (figura 4.21 b). Neste sentido, o polímero formado na superfície do C-SPE, aumenta significativamente a resistência à transferência de eletrões devido às propriedades não condutoras do aminofenol. No que diz respeito ao MIP, é de salientar que a resistência aumentou significativamente após a eletropolimerização, uma vez que a proteína se encontra no interior do polímero e a sua presença na matriz altera as propriedades elétricas da superfície onde o polímero está a ser formado, afetando desta forma o seu crescimento. Relativamente ao NIP, este foi sintetizado sem a presença da proteína e verificou-se que a resistência obtida por este tipo de C-SPE foi superior à obtida pelo MIP (figura 4.21 b), o que pode ser justificado pelo facto do ponto iselétrico da proteína ( $\approx 8,58$ ) ser superior ao pH do tampão ( $\approx 7,4$ ), encontrando-se desta forma protonada predominantemente com carga positiva, o que faz com que a proteína atraia para si a solução padrão de ferro que apresenta carga negativa, provocando uma diminuição na resistência à carga. De uma forma geral, a diferença que existe entre o NIP e o MIP ocorre devido ao impacto da proteína nas propriedades elétricas da superfície, o que provoca um crescimento diferenciado do polímero devido a várias propriedades elétricas.

No que diz respeito ao número de ciclos de eletropolimerização que deveriam ser utilizados para que fosse possível obter o polímero mais estável, foi efetuado um estudo utilizando a técnica de CV para 5, 10 e 15 ciclos. Foi necessário proceder a 3 leituras com a solução padrão de ferro para que houvesse estabilização e verificou-se que 10 ciclos era o valor mais estável e o que apresentava menor resistência em comparação com os outros.



**Figura 4.21** – Registos de CV (esquerda) e de EIS (direita) obtidos com a solução *redox* de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$  M, preparada com um eletrólito de KCl a 0,1, M. C-SPE após a eletropolimerização (a e b) e após a remoção da proteína (c e d).

### 1.3. Remoção da proteína

Para a remoção da proteína que se encontra na superfície do polímero que foi impresso molecularmente, foi necessário expor os C-SPE's a uma solução de ácido oxálico 0,5 M com o objetivo de quebrar ligações peptídicas entre os

aminoácidos da proteína. É de salientar que a escolha do agente de remoção da proteína é importante, uma vez que o objetivo é apenas remover a proteína sem interferir com o polímero, para que sejam expostas as cavidades formadas. Neste sentido, foi feito um estudo com 4 compostos a tripsina, o SDS em PBS, a proteinase K e o ácido oxálico para verificar o efeito destes na remoção da Gal-3 no MIP, sem alterar a superfície polimérica do NIP. Verificou-se então que o ácido oxálico foi o único que não promoveu alterações significativas na superfície sensora do NIP, tendo sido por isso o escolhido no desenvolvimento do sensor MIP.

Desta forma, após a eletropolimerização do MIP e NIP foram colocados 5  $\mu$ L de ácido oxálico na superfície dos elétrodos de trabalho de cada C-SPE e deixou-se incubar à temperatura ambiente durante a noite. Após o tempo de incubação os chips foram lavados com KCl e condicionados em PBS durante aproximadamente 30 minutos, para estabilização do pH.

Com a remoção da proteína ocorreram alterações na resistência à transferência de carga ( $R_{et}$ ) e verificou-se que esta era diferente nos MIP's e nos NIP's após a ação do solvente utilizado para a remoção. Através da análise da figura 4.21 (c) e (d) verificou-se que ocorreu uma diminuição da  $R_{et}$  tanto no NIP como no MIP, no entanto, esta foi mais significativa no MIP. Seria de esperar que no NIP não houvesse alterações após a ação do solvente, uma vez que este é sintetizado sem a presença da proteína e esta não existe para ser digerida. No entanto, esta ligeira diminuição no valor de  $R_{et}$  pode estar relacionada com a perda parcial do polímero, que pode ter sido digerido parcialmente pelo ácido, provocando uma diminuição na  $R_{et}$  ou por alteração da protonação do polímero. Relativamente ao MIP, este sofreu uma diminuição significativa na  $R_{et}$ , uma vez que a formação das cavidades no polímero facilita o acesso da *redox probe* à superfície do eletrodo promovendo uma diminuição da resistência à transferência de carga.

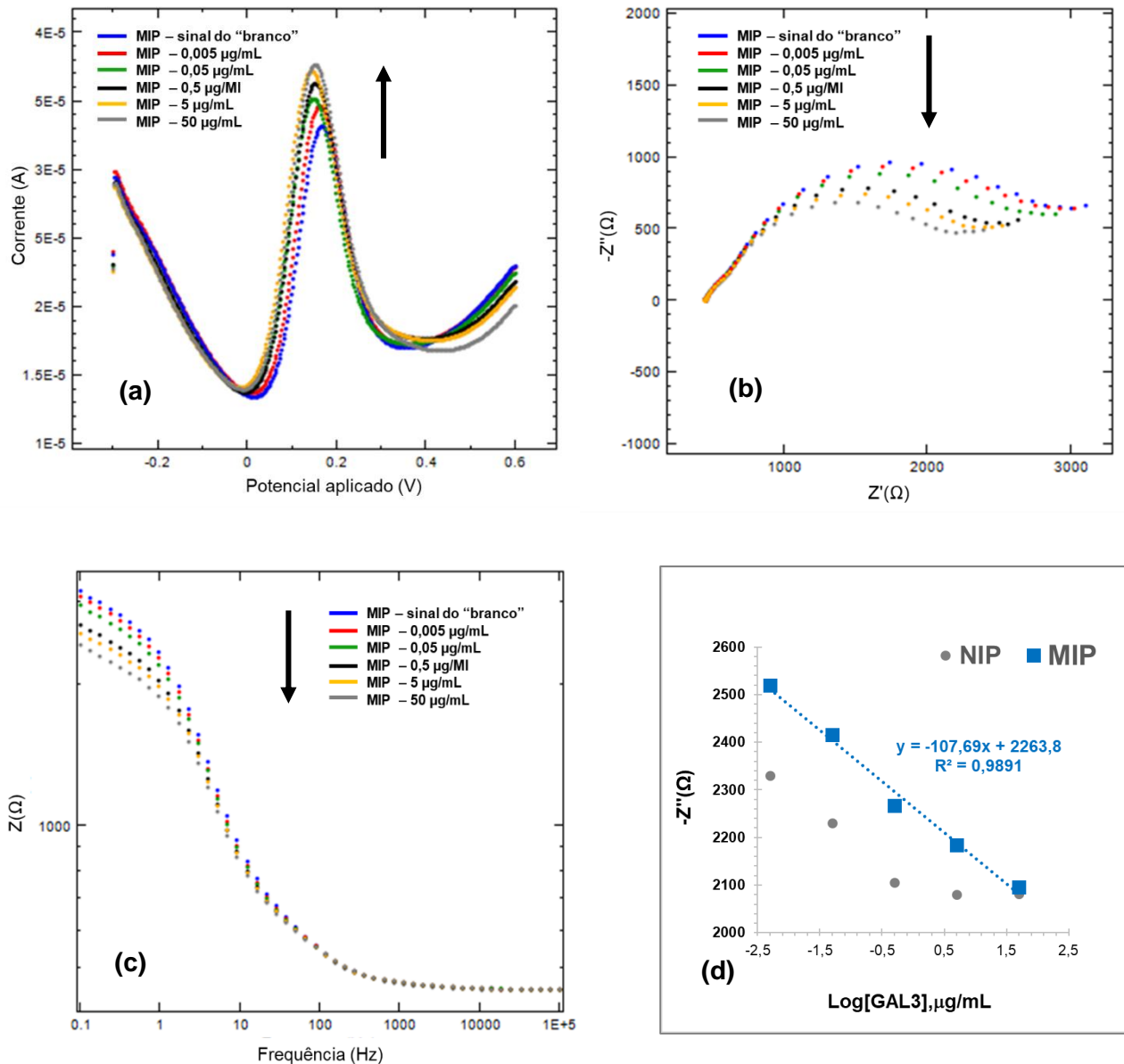
## 2. Curva de calibração

Para avaliar o desempenho analítico do biossensor, foi necessário construir a curva de calibração, que expressa a relação entre o sinal medido e a concentração

do analito e desta forma analisar a capacidade de o sensor interagir novamente com a proteína nas cavidades formadas após a sua remoção. Este processo consistiu na adição de 5  $\mu\text{L}$  de várias concentrações padrão de proteína no elétrodo de trabalho e procedeu-se à incubação num exsiccador durante cerca de 20 minutos entre cada adição, para que fosse possível a religação da proteína. Após a incubação, a superfície do elétrodo foi lavada com KCl e procedeu-se a uma leitura com a solução padrão de ferro, para observar o comportamento do sensor às várias concentrações de proteína (0,0050  $\mu\text{g/mL}$  até 50  $\mu\text{g/mL}$ ), após a formação das cavidades.

Para a construção das curvas de calibração, foram efetuadas 2 calibrações para o MIP em paralelo com o NIP, tendo sido ainda calculado a média, o desvio-padrão, o limite inferior de resposta e o respetivo declive de cada leitura. Neste sentido, as figuras 4.22 (a), (b) e (c) representam os resultados obtidos.

Relativamente à  $R_{\text{et}}$ , tanto o NIP como o MIP apresentam resistências à transferência de eletrões decrescentes à medida que a concentração da proteína aumenta, o que confirma a existência da ligação da proteína à superfície do sensor. No entanto, esta é mais significativa no MIP, uma vez que a resposta linear deste é estendida a uma faixa mais ampla de concentrações, o que faz com que a quantidade de proteína ligada na superfície sensora seja maior e conseqüentemente a superfície disponível para a medição seja menor, como pode ser observado na figura 4.22 (a) e (b). Relativamente ao declive da curva de calibração, este foi obtido a partir do gráfico resultante do diagrama de bode (figura 4.22 (c) e podemos verificar que este representa a sensibilidade, que pode ser definida como a relação entre o sinal analítico e o logaritmo da concentração do analito. Desta forma, quanto maior foi o declive, maior será a sensibilidade do sensor como pode ser observado na figura 4.22 (d). Esta representa o gráfico obtido pela média de ensaios duplicados, cujo declive do MIP é superior à do NIP. Relativamente ao cálculo da média, do desvio padrão e do limite inferior de deteção, estes encontram-se representados na tabela 4.8.

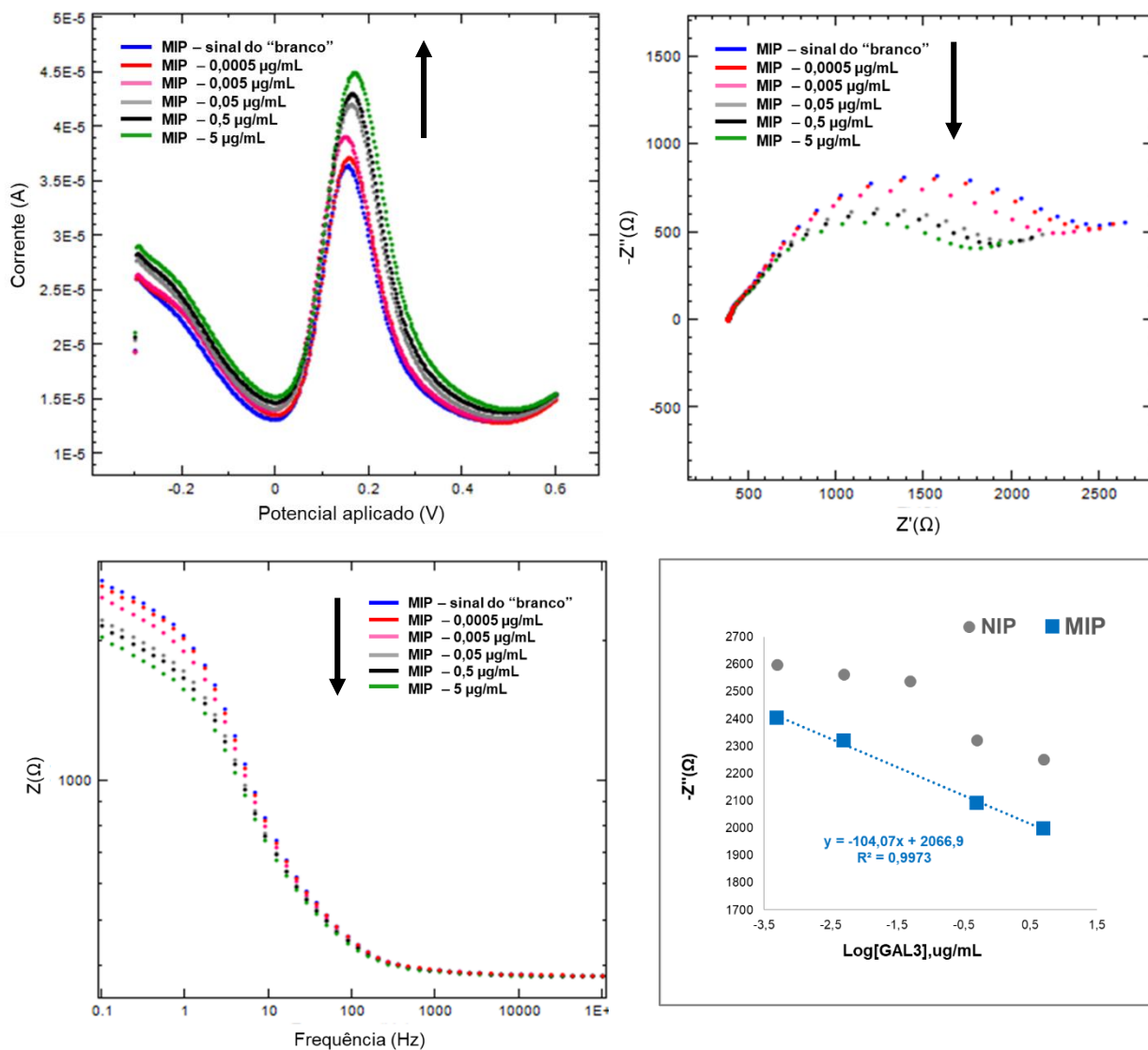


**Figura 4.22** – Registos eletroquímicos obtidos em solução *redox* de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$  M, preparada com um eletrólito de KCl a 0,10 M. C-SPE após incubação com as várias concentrações de proteína preparadas em PBS (a, b e c) e representação da curva de calibração (d) .

### 3. Testes em soro

Com o objetivo de avaliar o comportamento do biossensor num contexto mais realista, foram realizados ensaios com a preparação de soluções padrão de Gal-3

em soro humano (*Cormay Serum HN*) numa gama de concentrações entre 0,0005  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$ , para verificar o desempenho analítico do sensor num contexto real. Na figura 4.23 (a), (b) e (c) podemos observar os resultados obtidos da calibração após incubação com as várias concentrações de proteína preparadas em soro humano. Neste sentido, podemos observar que tanto o NIP como o MIP apresentam resultados semelhantes aos obtidos com a utilização de soluções padrão preparadas em PBS na mesma gama de concentrações, o que demonstra um bom comportamento do sensor num contexto prático. Para além disto, é necessário referir que os testes em soro foram realizados com um padrão mais diluído em relação ao sensor utilizado para efetuar a curva de calibração em PBS, o que demonstra a capacidade de este ler concentrações mais baixas num contexto mais real e desta forma seja mais sensível. Na figura 4.23 (d) é possível observar o gráfico correspondente à média das medições em triplicado para o NIP e para o MIP, onde podemos observar que o MIP apresenta melhor sensibilidade e um  $r^2 > 0,99$ . Relativamente ao cálculo da média, do desvio padrão e do limite inferior de deteção, estes encontram-se também representados na tabela 4.8.



**Figura 4.23** – Registos eletroquímicos obtidos com a solução *redox* de  $K_3[Fe(CN)_6]$  e  $K_4[Fe(CN)_6]$ , com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-3}$  M, preparada com um eletrólito de KCl a 0,10 M. C-SPE após incubação com as várias concentrações de proteína preparadas em soro (a, b e c) e representação da curva de calibração (d) .

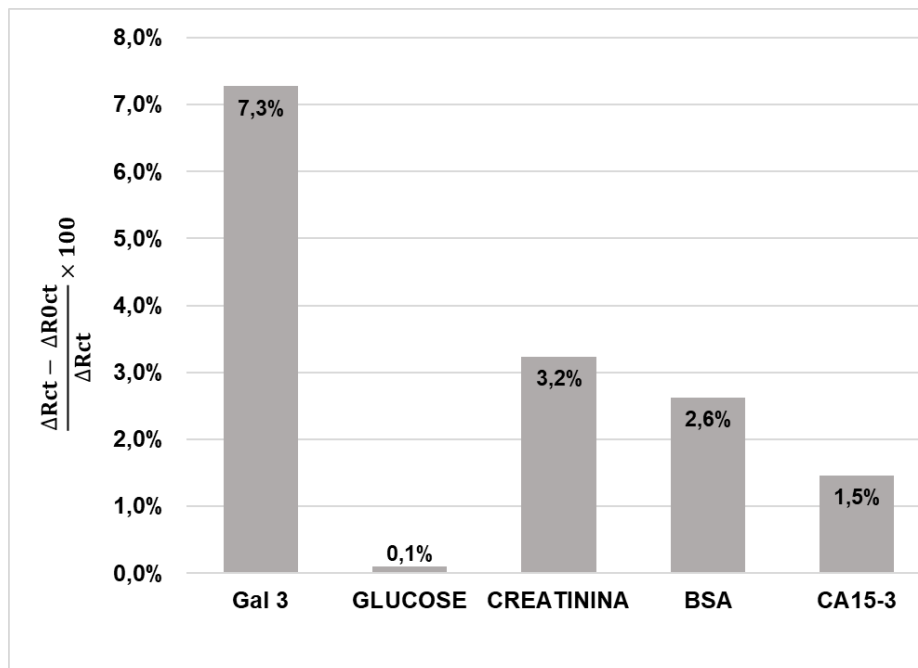
**Tabela 4.8** - Parâmetros analíticos obtidos referentes à média das curvas de calibração dos NIP e dos MIP's.

Parâmetros	ELP (10 CICLOS) EM PBS		ELP (10 CICLOS) EM SORO	
	NIP	MIP	NIP	MIP
Declive	-107,16±55,824	-107,68±55,3	-93,271±92,89	-97,911±36,9809
R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <0,96	0,99115	R <sup>2</sup> <0,96	0,9842
LIRL (µg/mL)	-	0,005	-	0,0005
LSRL(µg/mL)	-	50	-	5

#### 4. Estudo da seletividade

Para avaliar a seletividade do sensor e verificar a capacidade que este tem para detetar um analito específico numa amostra que contém outros compostos, neste caso, a glucose, a creatinina, a BSA e o CA15-3, foi utilizado o método das soluções separadas. Para isso, o período de incubação dos C-SPE's com os interferentes foi de 20 minutos para garantir que fosse atingido um equilíbrio, mesmo na presença destes compostos. Após a análise dos resultados obtidos (figura 4.24), verificou-se que a ligação das espécies referidas anteriormente foi pouco significativa no caso da glucose e da proteína CA15-3, com valores de 0,1 e 1,5% respetivamente. Relativamente à creatinina e a BSA estes possuem valores superiores de 3,2 e 2,6% respetivamente. No entanto, estes valores poderão ser negligenciados uma vez que a gama de linearidade da calibração do sensor em soro situa-se entre 0,5 ng/mL e  $5 \times 10^3$  ng/mL, sendo que o valor fisiológico de concentração da Gal-3 é de 30 ng/mL. Desta forma, a amostra poderá ser diluída cerca de 60 vezes, diminuindo a interferência destes compostos no sinal analítico.

Além disso, não será expectável que a leitura do composto alvo sofra interferência em soro, uma vez que a calibração do biossensor neste meio apresentou características semelhantes àquelas obtidas em tampão. De uma forma geral, o registo observado poderá ter acontecido pela ausência de competição entre o composto alvo e o composto interferente, na sequência da utilização do método das soluções separadas.



**Figura 4.24** - Gráfico ilustrativo dos resultados obtidos por seletividade.

## 5. Análise Qualitativa de Materiais

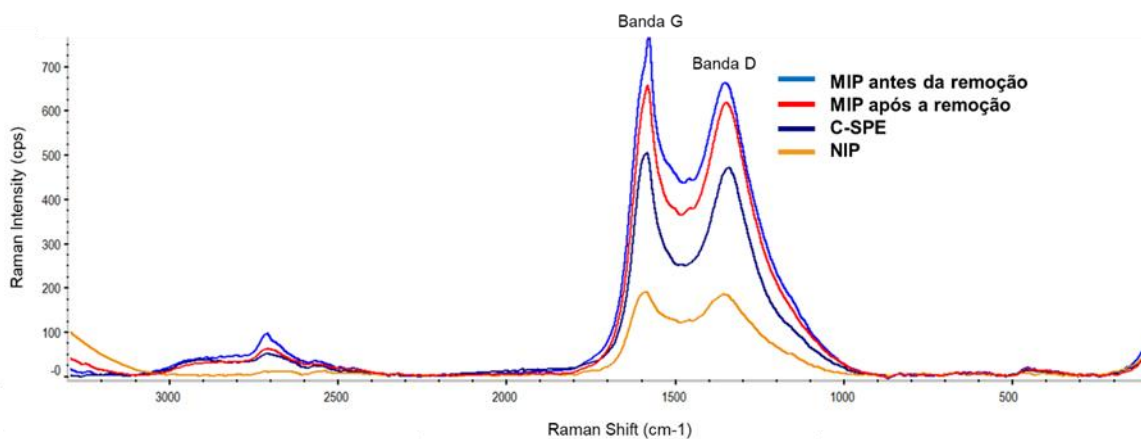
As análises qualitativas foram realizadas diretamente nos C-SPE's sem qualquer tratamento e para isso foram analisadas quatro amostras, um C-SPE sem qualquer modificação, um NIP após tratamento com ácido oxálico, um MIP antes da remoção da proteína e um MIP após a remoção da proteína com ácido oxálico. A análise foi efetuada por espectroscopia de Raman e os resultados obtidos foram tratados no programa *OMNIC Software*.

Após a análise dos resultados (figura 4.25 e 4.26) e de acordo com a tabela 4.9, verificamos que a razão dos picos ID/IG é muito semelhante para todos os C-SPE's. No entanto, é possível observar, mesmo que pouco significativo, que o MIP antes da remoção da proteína (ID/IG = 0.855) apresenta um valor superior ao C-SPE (ID/IG = 0,846) o que demonstra um aumento dos defeitos devido às ligações na superfície do sensor tornando-a menos cristalina. Esses defeitos estruturais podem estar associados à presença da proteína na matriz polimérica.

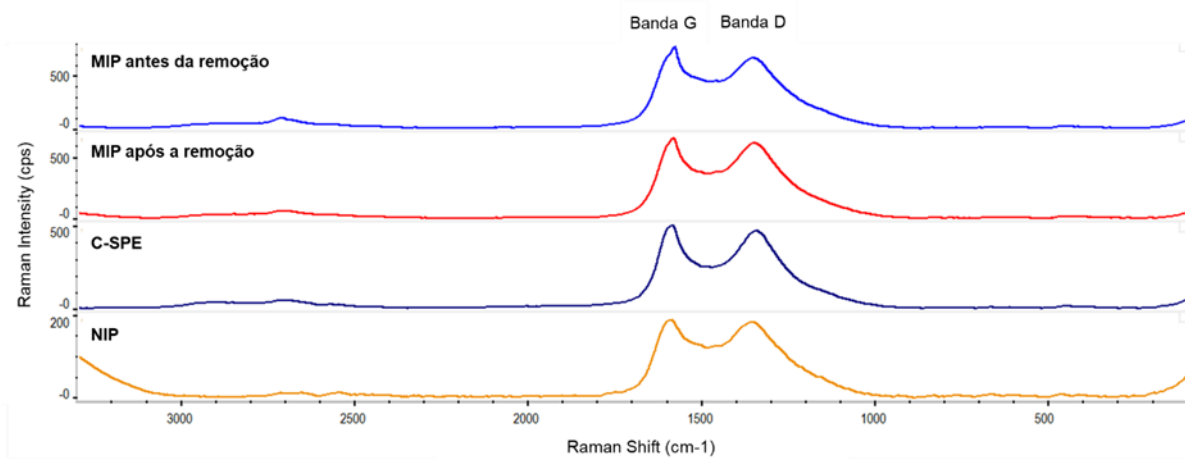
Relativamente ao MIP após a remoção da proteína e tendo em conta que o NIP também foi submetido a um tratamento ácido, verificou-se que os valores obtidos são praticamente iguais, o que é esperado, uma vez que o polímero é o mesmo. Por fim, verificou-se que o MIP antes da remoção também apresenta um valor superior ao MIP após a remoção, devido à presença da proteína na matriz polimérica.

**Tabela 4.9** – Valores obtidos por espectroscopia de Raman na superfície dos C-SPE's utilizados.

C-SPE'S UTILIZADOS	POSIÇÃO DO PICO		ID IG
	Banda G	Banda D	
C-SPE	1588,19	1343,79	0,846
NIP	1587,75	1355,17	0,853
MIP antes da remoção da proteína	1582,26	1353,46	0,855
MIP após a remoção da proteína	1585,31	1350,81	0,852



**Figura 4.25** – Espectro de Raman obtido na superfície de todos os C-SPE's utilizados, em modo *Common Scale*.



**Figura 4.26** - Espectros de Raman característicos de cada C-SPE utilizado.

## Capítulo 5 – Conclusão

Tal como foi referido anteriormente, o melanoma é uma patologia cuja incidência tem vindo a aumentar e tornou-se num problema de saúde pública. Neste sentido, surgiu a necessidade de criar novas estratégias para tentar combater a mortalidade e a diminuição da qualidade de vida que está associada a este tipo de doença. Como se trata de uma patologia multifatorial, a escolha do tratamento mais adequado por vezes torna-se difícil, no entanto, nos últimos anos estudos realizados demonstraram que a RT se tornou numa opção terapêutica eficiente. Desta forma, com o objetivo de criar uma nova estratégia de monitorização desta terapia durante o processo de tratamento do melanoma, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para a deteção da Gal-3, que está associada a um pior prognóstico da doença.

Para o desenvolvimento do biossensor foram utilizados elétrodos de carbono e o analito em estudo foi a Gal-3. Relativamente ao material sensor, este foi sintetizado por eletropolimerização do monómero aminofenol e o processo de polimerização foi em *bulk*. Posteriormente, a remoção da proteína foi feita com recurso ao ácido oxálico, que demonstrou ser o único composto cuja interferência no polímero era insignificante, para desta forma remover a proteína e dar origem às cavidades que foram formadas.

De uma forma geral, o biossensor demonstrou apresentar bons resultados em termos de seletividade, de limite de deteção (na ordem dos ng/mL), de tempo de resposta (tempo máximo de incubação de 20 minutos) e em termos de reprodutibilidade. Relativamente aos limites de resposta, verificou-se que estes estavam na gama dos 0,50 ng/mL e os  $5,0 \times 10^3$  ng/mL, o que inclui os valores fisiológicos da proteína (30 ng/mL). Neste sentido, o desenvolvimento deste biossensor com recurso a anticorpos plásticos demonstrou ser simples e sensível, o que torna promissor o desenvolvimento de novos sensores.

Sendo ambicioso o objetivo inicial de preparar um biossensor para utilizar na monitorização terapêutica da RT, ficam questões em aberto, que poderão ser respondidas em trabalhos futuros.

Do ponto de vista analítico, seria ainda importante avaliar a concordância deste novo biossensor com os métodos considerados *gold standard* no âmbito dos laboratórios clínicos, ou seja, avaliar a correlação das medições obtidas pelo biossensor com as medições obtidas por ELISA, por exemplo. Seria igualmente importante avaliar o desempenho do biomarcador em doentes com melanoma sujeitos a RT, fazendo medições regulares, de forma a compreender se as variações da Gal-3 seriam suficientes para ser detetadas com este novo biossensor, e sendo possível, seria ainda útil compreender se é possível discriminar os doentes responsivos, ou não, aos tratamentos com RT.

Finalmente, e como mencionado, a Gal-3 é uma proteína que poderá ser utilizada em conjunto com outros biomarcadores clínicos em diferentes patologias. No cenário em que o biossensor para a Gal-3 estivesse pronto a ser utilizado num contexto real, seria ainda interessante avaliar o valor diagnóstico enquanto marcador cardíaco em conjunto com os demais marcadores de lesão cardíaca ou ainda como marcador de progressão metabólica da diabetes.

Em suma, um biossensor de fácil produção, barato, rápido e sensível para a Gal-3, que cobre perfeitamente os limites fisiológicos, poderá ter inúmeras aplicações biomédicas e potencial impacto clínico não apenas oncológico que poderiam e deveriam ser exploradas.

## Bibliografia

1. Instituto CUF de Oncologia. O que é o cancro? [Internet] [cited 2019 Jun 8]. Available from: <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/o-que-e-o-cancro>
2. Instituto Nacional de Câncer (INCA). ABC do câncer - Abordagens Básicas para o controle do Câncer. Rio de Janeiro; 2011.
3. Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca. Prevalência das neoplasias malignas. Lisboa; 2016.
4. Direção Geral de Saúde. Portugal Doenças Oncológicas em números – 2013. Lisboa; 2013.
5. Direção Geral de Saúde. A Saúde dos Portugueses. Perspetiva 2015. Lisboa; 2015.
6. Moura C. Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo [Internet]. Melanoma por Cecília Moura. [cited 2018 May 28]. Available from: <http://www.apcancrocuteano.pt/index.php/saiba-mais/artigos-de-opiniao/29-melanoma-por-cecilia-moura>
7. Instituto CUF Porto. CUF Instituto Porto [Internet]. Radioterapia. [cited 2019 Jul 9]. Available from: <https://www.saudecuf.pt/unidades/porto-instituto/areas-clinicas/radioterapia>
8. Mahadevan A, Patel V, Dagoglu N. CancerNetwork [Internet]. Radiation Therapy in the Management of Malignant Melanoma. 2015 [cited 2019 Jul 22]. Available from: <https://www.cancernetwork.com/melanoma/radiation-therapy-management-malignant-melanoma>
9. Strojjan P. Role of radiotherapy in melanoma management. Radiology and Oncology. 2010;1–12.
10. The Skin Cancer Foundation. The Skin Cancer Foundation [Internet]. Melanoma. [cited 2019 May 5]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma#panel1-4>
11. Anderson C, Tabacof J, Legha S. Malignant Melanoma: Biology, Diagnosis, and Management. Oncology Journal. 2005.
12. Instituto CUF de Oncologia. Instituto Cuf de Oncologia [Internet]. Cancro da

- Pele-Melanoma. [cited 2019 May 22]. Available from: <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-da-pele-melanoma/o-orgao>
13. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. *Dermatology Research and Practice*. 2010;1–8.
  14. MSD Investing for Life. MSD Investing for life [Internet]. O que é o melanoma? [cited 2019 May 28].
  15. Oliveira S, Coelho P, Prudêncio C, Vieira M, Soares R, Guerreiro SG, et al. Melanoma and obesity : Should antioxidant vitamins be addressed ? *Life Sciences*. 2016;83–90.
  16. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes : biology and development. *Postepy Dermatologii I Alergologii*. 2013;30–41.
  17. Brechtbühl ER. Tratamento do melanoma (Parte1): doença localizada. *Onco&*. 2014;18–21.
  18. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Dove Press Journal*. 2018;
  19. Moreira J, Moreira E, Azevedo F, Mota A. Melanoma Maligno Cutâneo : Estudo Retrospectivo de Sete Anos (2006-2012). *Revista Científica da Ordem dos Médicos*. 2014;480–9.
  20. Silva J. Cuf [Internet]. Aprenda a reconhecer o melanoma. 2014 [cited 2019 Jun 9]. Available from: <https://www.saudecuf.pt/mais-saude/artigo/aprenda-a-reconhecer-o-melanoma>
  21. Seuradge J, Wong E. Melanoma. *The New England Journal of Medicine* [serial on the Internet]. 2006; Available from: <http://www.pathophys.org/melanoma/>
  22. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology , Risk Factors , Pathogenesis , Diagnosis and Classification. *In Vivo*. 2014;1005–11.
  23. Genetics Home Reference. Genetics Home Reference [Internet]. Xeroderma pigmentosum. 2019 [cited 2019 Jun 14]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/xeroderma-pigmentosum>
  24. Costa HO. Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos finos : análise da densidade microvascular utilizando-se os marcadores D2-40 e CD31 [master's thesis]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;

2008.

25. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K. Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions. International Journal of Medical Sciences. 2012;193–4.
26. Beyzadeoglu M, Ozyyigit G, Ebruli C. Basic Radiation oncology. Nova Iorque: Springer; 2010. 4, 75 p.
27. Ward W, Farma J. Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy. Codon Publications; 2017. 39-43 p.
28. Karagiannis P, Fittall M, Karagiannis S. Evaluating biomarkers in melanoma. Frontiers in Oncology. 2015;1–12.
29. Brauer R, Shoshan E, Kamiya Tt, Bar-Eli M. The sweet and bitter sides of galectins in melanoma progression. Pigment Cell & Melanoma Research. 2012;
30. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, et al. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. Annals of Translational Medicine. 2014;1–7.
31. Buljan M, Situm M, Tomas D, Milosevic M, Kruslin B. Prognostic value of galectin-3 in primary cutaneous melanoma. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2011;1174–81.
32. Brown ER, Doig T, Anderson N, Brenn T, Doherty V, Xu Y, et al. Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. European Journal of Cancer. 2011;865–74.
33. Calil SS, Silva PRQ. Biossensores: estrutura , funcionamento e aplicabilidade. 2011;1-9.
34. Koyun A, Ahlatcioglu E, Ipek YK. Biosensors and Their Principles. In: A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones. Intechopen; 2012.
35. Grieshaber D, Mackenzie R, Voros J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. Sensors. 2008;1400–58.
36. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. Biochemistry. 2016;1–8.
37. Karunakaran C, Bhargava K, Benjamin R. Introduction to Biosensors. In: Biosensors and Bioelectronics. 2015. p. 3-17,55-58.

38. Malhotra S, Verma A, Tyagi N, Kumar V. Biosensors: Principle, Types and Applications. IJARIEE. 2017;3(2):3639–44.
39. Alves L. Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato [master's thesis]. Universidade Federal de Uberlândia; 2014.9-19p.
40. Riccardi C, Costa P, Yamanaka H. Imunossensor Amperométrico. Química Nova. 2002;25:316–20.
41. Morales M, Halpern JM. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. Bioconjugate Chemistry. 2018;3231–9.
42. Mollarasouli F, Kurbanoglu S, Ozkan S. The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. Biosensors. 2019;1–20.
43. Tang Z, He J, Chen J, Niu Y, Zhao Y, Zhang Y, et al. A sensitive sandwich-type immunosensor for the detection of galectin-3 based on N-GNRs-Fe-MOFs@AuNPs nanocomposites and a novel AuPt-Methylene blue nanorod. Biosensors and Bioelectronic. 2017.
44. Primo E, Kogan M, Verdejo H, Bollo S, Rubianes M, Rivas G. Label-Free Graphene Oxide-Based Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Quantification of Galectin-3, a Novel Cardiac Biomarker. ACS Applied Materials & Interfaces. 2018.
45. Santos A. Desenvolvimento de um biossensor para um biomarcador do cancro da mama [master's thesis]. Universidade de Aveiro; 2014.13-14p.
46. Royal Society of Chemistry. Chemistry for Biologists [Internet]. Enzymes. 2004 [cited 2019 Sep 10]. Available from: <https://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>
47. Davis F, Higson SPJ. Biosensors for DNA and RNA detection and characterization. In: Biosensors for medical applications. Woodhead Publishing Limited; 2012. p. 163–90.
48. Ferreira F. Desenvolvimento de genossensor eletroquímico para diagnóstico de meningite pneumocócica [master's thesis]. Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; 2017.23-26p.
49. Haupt K, Linares A V., Bompert M, Bui BTS. Molecularly Imprinted Polymers. Topics in Curr Chemistry. 2011.

50. Ertürk G, Mattiasson B. Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors. *Sensors*. 2017;1–17.
51. Peçanha BR, Dias L, Spinelli E, Muri E. Polímeros de Impressão Molecular Obtidos Através de Polimerização por Precipitação e sua Aplicação na Técnica de Extração em Fase Sólida. *Polímeros*. 2013;
52. Vasapollo G, Sole R Del, Mergola L, Lazzoi MR, Scardino A, Scorrano S, et al. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;5908–45.
53. Sacramento AIS. Desenvolvimento de um biossensor para monitorização de acetilcolina, um biomarcador associado à Doença de Alzheimer [master's thesis]. [Porto]: Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2014.
54. Leitão GSF. Desenvolvimento de um polímero impresso molecularmente para análise de galaxolide em matrizes ambientais [master's thesis]. [Porto]: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; 2014. 9-11p.
55. Kryscio DR, Peppas NA. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*. 2012;8(2):461–73.
56. Hillberg AL, Tabrizian M. Biomolecule imprinting : Developments in mimicking dynamic natural recognition systems. *IRBM*. 2008;89–104.
57. Vieira CAC. Desenvolvimento de Anticorpos Plásticos para um Biomarcador do Cancro [master's thesis]. [Porto]: Instituto Superior de Engenharia do Porto; 2014.10-12p.
58. Neto JRM. Sensor amperométrico de um polímero de impressão molecular com protoporfirina IX de ferro para a determinação de 4-Aminofenol [master's thesis]. Universidade Federal do Maranhão; 2010.38-41p.
59. Figueiredo EC, Dias ACB, Arruda MAZ. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *RBCF*. 2008;44.
60. Turner NW, Jeans CW, Brain KR, Allender CJ, Hlady V, Britt DW. From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins. *Biotechnology Progress*. 2006;1474–89.
61. Saylan Y, Yilmaz F, Ozgur E, Derazshamshir A, Yavuz H, Denizli A. Molecular

- Imprinting of Macromolecules for. Sensors. 2017;
62. Karunakaran C, Bhargava K, Benjamin R. Biosensors Components and Performance Factors. In: Biosensors and Bioelectronics. 2016. p. 25–7.
  63. Damborsky P, Svitel J, Katrl J. Optical biosensors. Biochemistry. 2016;91–100.
  64. Choudhary, A K, Kailash. Biosensor based on piezoelectric crystal probe. Advances in Applied Science Research. 2015;91–5.
  65. National Programme on Technology Enhanced Learning (NPTEL). Types of biosensors. 2013.3-10.
  66. Narang J, Pundir CS. Biosensors for Serum Metabolites. In: Biosensors an Introductory Textbook. 2017. p. 93–8.
  67. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. Chemical Society Reviews. 2010;
  68. Touhami A. Biosensors and Nanobiosensors: Design and Applications. Nanomedicine. 2015;374–403.
  69. Special Lecture Series. Lecture 3: Introduction to Electrochemical Biosensing.1-9.
  70. Iqbal MA, Gupta SG, Hussaini SS. A Review on Electrochemical Biosensors: Principles and Applications. Advances in Bioresearch. 2012;158–63.
  71. Princeton Applied Research. A Review of Techniques for Electrochemical Analysis. 2010.
  72. Park YK, Bold B, Lee WK, Jeon MH, An KH, Jeong SY, et al. D-(+)-Galactose-Conjugated Single-Walled Carbon Nanotubes as New Chemical Probes for Electrochemical Biosensors for the Cancer Marker Galectin-3. International Journal of Molecular Sciences. 2011;2946–57.
  73. Pasinszki T, Krebsz M, Tung TT, Losic D. Carbon Nanomaterial Based Biosensors for Non-Invasive Detection of Cancer and Disease Biomarkers for Clinical Diagnosis. Sensors. 2017;1–32.
  74. Pacheco WF, Semaan FS, Almeida VGK, Ritta AGSL, Aucélio RQ. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. Revista Virtual de Química. 2013;5(4):516–37.

75. Souza PHM. Estudos Eletroquímicos de Complexos de Cu(II) de Antibióticos da Classe das Fluorquinolonas [master's thesis]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2011.10-16p.
76. Dantas LMF. Determinação de hibrazina por voltametria de onda quadrada sobre elétrodo de grafite modificado com FeTPyPz [master's thesis]. Universidade Federal do Maranhão; 2007.16-19p.
77. Teles FSRR. Desenvolvimento de um biossensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluídos biológicos [master's thesis]. Universidade Federal de Pernambuco; 2006.24-26p.
78. Hammond JL, Formisano N, Estrela P, Carrara S, Tkac J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Biochemistry*. 2016;69–80.
79. Filho EJDC. Projeto e Fabricação de um Sistema Sensor de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica [master's thesis]. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas; 2014.9-10p.
80. Vašková H. A powerful tool for material identification: Raman spectroscopy. *International Journal of Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*. 2011;
81. Horiba. Horiba [Internet]. Raman Imaging and Spectroscopy. [cited 2019 Sep 25]. Available from: [https://www.horiba.com/en\\_en/raman-imaging-and-spectroscopy/](https://www.horiba.com/en_en/raman-imaging-and-spectroscopy/)
82. Metrohm DropSens. The carbon battle characterization of screen- printed carbon electrodes with SPELEC RAMAN. 2019.
83. Reis MAG. Produção de anticorpos para tratameno do cancro da mama [master's thesis]. [Lisboa]: Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa; 2014.16-17p.
84. Moreira F, Sales G. Biossensores. Escola Superior de Saúde. 2018.
85. Felipe AC, Franco D., Brito-Madurro JM. Estudo da eletropolimerização de 2-Aminofenol utilizando microbalança eletroquímica de cristal de quartzo [Internet]. 2008. Available from: <http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/13/13-104-4439.htm>
86. Banica F-G. *Chemical Sensors and Biosensors*. WILEY; 2012. 10-11 p.