



Desenvolvimento de um sensor eletroquímico seletivo para a deteção de Alfa-Fetoproteína

ANA SOFIA MONTEIRO OLIVEIRA
novembro de 2019

Desenvolvimento de um sensor eletroquímico seletivo para a deteção de Alfa-Fetoproteína

Ana Sofia Monteiro Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia de Computação e Instrumentação Médica

Orientadores:

Doutor João Pacheco

Doutor Hendrikus Nouws

Porto, Novembro de 2019

Resumo

A Alfa-fetoproteína (AFP), um dos primeiros biomarcadores tumorais de proteínas descobertos, é hoje amplamente utilizada na prática clínica. A sua aplicação para o diagnóstico do carcinoma hepatocelular (CHC), a forma mais frequente de tumor primário no fígado, é motivo de inúmeros debates. Para além dos estudos focados no papel da AFP no diagnóstico do CHC, esta proteína tem vindo a ser usada, nos últimos anos, para orientar a escolha terapêutica do CHC e monitorizar o seu tratamento.

A deteção precoce desta doença oncológica é uma das questões mais importantes para aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes. A deteção de biomarcadores de cancro ajuda a fornecer um diagnóstico antes que a doença se torne incurável em estágios posteriores. Os biomarcadores também podem ser usados para avaliar a progressão de terapias e tratamentos cirúrgicos. Nos últimos anos, sensores baseados em Polímeros Molecularmente Impressos (MIP) têm sido intensamente investigados como dispositivos analíticos promissores neste campo, oferecendo portabilidade, resposta rápida e especificidade a um baixo custo.

Assim, neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico (voltamétrico) específico para a deteção do biomarcador AFP.

Inicialmente foram realizados estudos do comportamento eletroquímico desta proteína, tendo-se verificado que apresenta um pico de oxidação aos +0.8 V, apresentando um mecanismo típico de difusão em eléctrodos de carbono. Contudo, a sensibilidade da deteção direta não foi suficiente para a deteção de AFP nos níveis de deteção pretendidos, além da pouca especificidade da resposta.

De seguida, foi desenvolvido um sensor molecularmente impresso por eletropolimerização de uma solução contendo pirrol (monómero funcional) e AFP (*template*), por voltametria cíclica. Foram otimizadas as condições de polimerização e realizou-se uma caracterização do sensor obtido por voltametria cíclica e por espectroscopia de impedância eletroquímica. O sensor mostrou uma resposta linear numa gama de concentrações de 5 a 50 ng/mL com um limite de deteção (LOD) de 2.4 ng/mL e um limite de quantificação (LOQ) de 7.9 ng/mL.

Palavras-chave: Cancro; Carcinoma Hepatocelular; Sensor Eletroquímico; Biomarcador; Alfa-fetoproteína; Polímero Molecularmente Impresso.

Abstract

Alpha-fetoprotein (AFP), one of the first protein tumor markers discovered, is widely used in clinical practice nowadays. Its application for the screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC), the most frequent form of primary liver tumor, is a matter of countless debates. In addition to the studies focused on the role of the AFP in the diagnosis of HCC, in recent years this protein has been used to guide the therapeutic choice in HCC and monitor its treatment.

Detecting cancer disease at an early stage is one of the most important issues for increasing the survival rate of patients. Cancer biomarker detection helps to provide a diagnosis before the disease becomes incurable in later stages. Biomarkers can also be used to evaluate the progression of therapies and surgery treatments. In recent years, molecularly imprinted polymer (MIP) based sensors have been intensely investigated as promising analytical devices in this field, offering portability, fast response and specificity at a low cost.

Thus, in this work, a specific electrochemical (voltammetric) sensor was developed for the detection of the AFP biomarker.

Initially, studies on the electrochemical behavior of this protein were performed and it was found that it has an oxidation peak at +0.8V presenting a typical mechanism of diffusion in carbon electrodes. However, the sensitivity of direct detection was not enough for AFP detection at the desired levels, besides poor response specificity.

Then, a molecularly imprinted sensor was developed by electropolymerization of a solution containing pyrrol (functional monomer) and AFP (template) by cyclic voltammetry. The polymerization conditions were optimized and it was performed a characterization of the sensor obtained by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The sensor showed a linear response over a concentration range of 5 to 50 ng/mL with a detection limit (LOD) of 2.4 ng/mL, and a quantitation limit (LOQ) of 7.9 ng/mL.

Key-words: Cancer; Hepatocellular Carcinoma; Electrochemical Sensor; Biomarker; Alfa-fetoprotein; Molecularly-imprinted polymer.

Agradecimentos

Com a finalização deste projeto de investigação no GRAQ, não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, me apoiaram na realização deste trabalho.

Ao doutor João Pacheco, o meu sincero obrigado por todo o acompanhamento, orientação e paciência que teve para comigo no decorrer desta investigação. Acima de tudo, considero-o uma referência de profissionalismo, pela sua experiência, dedicação ao trabalho e conhecimento.

A todos os colegas do GRAQ, em especial à Patrícia Rebelo, um muito obrigado por me terem recebido na equipa da melhor forma possível, por todos os conhecimentos transmitidos, palavras amigas e boa disposição que demonstraram ao longo destes 9 meses.

Ao doutor Hendrikus Nouws e ao engenheiro Carlos Ramos, por fazerem com que a realização deste projeto fosse possível nesta instituição de renome, um muito obrigado.

À minha prima Patrícia Barbosa, pelas palavras amigas e motivação que fizeram toda a diferença, obrigada.

Por fim, um obrigado muito especial à minha família e amigos por me apoiarem incondicionalmente e me incentivarem durante esta etapa da minha vida. A eles dedico todo este trabalho.

Índice

<i>Índice de Figuras</i>	xi
<i>Índice de Tabelas</i>	xiii
<i>Índice de Equações</i>	xv
<i>Lista de Abreviaturas</i>	xvii
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento	2
1.2 Objetivos.....	2
1.3 Motivação.....	2
1.4 Apresentação do GRAQ.....	3
1.5 Organização do Relatório.....	3
2 Conceitos e Fundamentos Teóricos.....	5
2.1 Carcinoma Hepatocelular.....	5
2.2 Sensores.....	8
2.2.1 Sensores Eletroquímicos.....	10
2.2.1.1 Célula Eletroquímica.....	11
2.2.1.2 Eléctrodos Serigrafados.....	12
2.2.2 Técnicas Eletroquímicas.....	13
2.2.2.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	13
2.2.2.2 Voltametria de Varrimento Linear.....	16
2.2.2.3 Voltametria Cíclica	17
2.2.2.4 Voltametria de Onda Quadrada.....	18
2.2.2.5 Voltametria de Pulso Diferencial.....	19
2.3 Biomarcadores.....	20
2.3.1 Biomarcadores para o Carcinoma Hepatocelular.....	20
2.3.2 Alfa-fetoproteína	21
2.4 Polímeros Molecularmente Impressos.....	22
2.4.1 Técnicas de Impressão.....	25
2.4.2 Técnicas de Polimerização	26
2.4.3 MIPs e Proteínas	27
3 Procedimento Experimental.....	29
3.1 Reagentes	29
3.2 Soluções.....	29

3.3	Equipamento	30
3.4	Preparação do Polímero Molecularmente Impresso.....	30
3.5	Medições Eletroquímicas	31
4	Resultados Obtidos e Discussão.....	33
4.1	Caracterização do comportamento eletroquímico da AFP	33
4.1.1	Estudo por Voltametria Cíclica.....	33
4.1.2	Influência do Tempo de Equilíbrio	34
4.1.3	Influência da velocidade de varrimento	35
4.1.4	Curva de Calibração	37
4.2	Desenvolvimento de um sensor seletivo para a AFP.....	37
4.2.1	Impressão Molecular.....	39
4.2.2	Otimização das Condições de Polimerização	40
4.2.2.1	Concentração de Pírrrol (Py).....	41
4.2.2.2	Concentração de AFP.....	42
4.2.2.3	Número de Ciclos.....	43
4.2.2.4	Tempo de Extração.....	43
4.2.2.5	Tempo de Incubação	44
4.2.3	Caracterização do Sensor	44
4.2.4	Resposta Analítica	45
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	47
	Referências Bibliográficas	49

Índice de Figuras

Figura 1. Dados relativos à incidência dos vários tipos de cancro, globalmente, em 2018.a) Número de novos casos em 2018, para ambos os sexos e todas as idades. b) Número de mortes em 2018, para ambos os sexos e todas as idades. (<i>The Global Cancer Observatory</i> , 2019).....	6
Figura 2. Números estimados relativos à incidência do cancro no fígado de 2018 a 2040, globalmente, em todas as idades e ambos os sexos. a) Número de novos casos. b) Número de mortes. (Globocan, 2018)	7
Figura 3. Diagrama esquemático de um sensor. (Pacheco, J., 2017).....	8
Figura 4. Esquema de classificação de um sensor. (Velusamy, V. et al, 2010)	9
Figura 5. Exemplos de Células Eletroquímicas. A) Célula Galvânica. B) Célula Eletrolítica. (Ciobanu, M. et al. 2007)	11
Figura 6. Eléctrodo serigrafado. (DropSens, 2019)	12
Figura 7. Representação da dupla camada eléctrica (Hammond, J., 2017) e do circuito equivalente de <i>Randles</i> (Zhuravski, P., 2017)	14
Figura 8. Típico gráfico de Nyquist (Randviir, P., e Banks, E. 2013)	15
Figura 9. A) Voltametria de Varrimento Linear. B) Gráfico da corrente em função da tensão dependendo da taxa de varrimento. (Scott, K., 2016)	16
Figura 10. A) Forma de onda típica para CV analógica. B) Voltamograma cíclico teórico para um caso reversível. (Princeton Applied Research, 2019)	17
Figura 11. Forma de onda da variação de potencial da voltametria de onda quadrada. (Zhuravski, P., 2017).....	18
Figura 12. Voltametria de Pulso Diferencial A) Sobreposição de uma rampa <i>staircase</i> com pulsos de potencial. B) Gráfico do potencial em função do tempo resultante dessa sobreposição. (Scholz, F., 2015)	19
Figura 13. Representação esquemática da impressão molecular.....	22
Figura 14. Técnicas de impressão para a construção de um MIP. (Lopes, D., 2017)	25
Figura 15. Comportamento eletroquímico da AFP 10 µg/mL por voltametria cíclica em tampão fosfato 0.1M pH 7.2 em eléctrodos C-SPE. Velocidade de varrimento de 100 mV/s.....	33
Figura 16. Voltamogramas cíclicos consecutivos para uma solução AFP 10 µg/mL em tampão fosfato 0.1M pH 7.2 em eléctrodos C-SPE. Velocidade de varrimento de 100 mV/s.....	34
Figura 17. Voltamogramas cíclicos para uma solução de AFP 10 µg/mL em tampão fosfato 0,1M pH 7,2, para diferentes velocidades de varrimento.....	35

Figura 18. Gráfico de i_p em função de v .	36
Figura 19. Gráfico de $\log(i_p)$ em função de $\log(v)$.	36
Figura 20. DPV aplicada à AFP. A) Voltamograma para diferentes concentrações de AFP. B) Curva de calibração	37
Figura 21. Esquema de construção e funcionamento do sensor.	38
Figura 22. Voltamogramas registados durante a polimerização por CV. A) Voltamogramas da polimerização de um MIP por CV; B) Primeiro ciclo de polimerização de um MIP e de um NIP por CV.	39
Figura 23. Voltamogramas DPV do MIP e NIP, após a polimerização e após a extração.	40
Figura 24. Variação do Δi_p em função de concentração de pirrol, no NIP e MIP	41
Figura 25. Variação do Δi_p em função da concentração de AFP, no MIP	42
Figura 26. Variação do Δi_p em função da do número de ciclos, no MIP	43
Figura 27. Caracterização da construção passo a passo do sensor MIP Au-SPE. A) Voltamograma CV. B) Diagrama de Nyquist EIS	44
Figura 28. Resposta do MIP a diferentes concentrações de AFP	45
Figura 29. Curva de calibração com o sensor MIP.	46

Índice de Tabelas

Tabela 1. Monómeros mais comuns e procedimentos de polimerização usados em sensores MIP para a análise de biomarcadores de cancro.	24
---	----

Índice de Equações

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{W} \dots\dots\dots 23$$

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \dots\dots\dots 23$$

$$LOD/LOQ = F * \frac{SD}{m} \dots\dots\dots 24$$

Lista de Abreviaturas

AAHPPhPA	<i>2-acryloylamino-3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid</i>
AAM	Acrilamida
AC	Corrente Alternada (<i>Alternating Current</i>)
AE	Eléctrodo Auxiliar (<i>Auxiliary Electrode</i>)
AFP	Alfa-fetoproteína
APA	<i>2-acryloylamino-pentanedioic acid</i>
ATRP	Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo (<i>Atom Transfer Radical Polymerisation</i>)
BAAm	<i>N,N'-bisacrylamide</i>
BTBA	<i>2,2'-bithiophene-5-boronic acid</i>
CA-125	Antígeno de Cancro 125 (<i>Cancer Antigen 125</i>)
CC	Colangiocarcinoma
CDL	Capacitância de Camada Dupla
CEA	Antígeno Carcinoembrionário (<i>Carcinoembryonic Antigen</i>)
CEBTMB	<i>2-(cytosin-1-yl)ethyl p-bis(2,2'-bithien-5-yl)methyl benzoate</i>
CEQUP	Centro de Química da Universidade do Porto
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CPE	Elemento de Fase Constante (<i>Constant Phase Element</i>)
CV	Voltametria Cíclica (<i>Cyclic Voltametry</i>)
DFI	Departamento de Física
DMAEM	<i>2-(dimethylamino)ethyl methacrylate</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol (<i>Ethylene Glycol Dimethacrylate</i>)
EIS	Espetroscopia de Impedância Eletroquímica (<i>Electrochemical Impedance Spectroscopic</i>)
EMF	Força Eletromotriz (<i>Electromotive Force</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

GRAQ	Grupo de Reação e Análises Químicas
HEMA	Hidroxietyl Metacrilato (<i>Hydroxyethyl methacrylate</i>)
HTBT	<i>2,4,5,2',4',5',-hexa(thiophene-2-yl)-3,3'-bithiophene;</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<i>iCVD</i>	Deposição Química de Vapores (<i>initiated Chemical Vapour Deposition</i>)
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
ISE	Eléttodos seletivos de Iões (<i>Ion-Selective Electrodes</i>)
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto
LAQV	Laboratório Associado para a Química Verde
LECIM	Licenciatura em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica
LOD	Limite de Detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de Quantificação (<i>Limit of Quantitation</i>)
LSV	Voltametria de Varrimento Linear (<i>Linear Sweep Voltammetry</i>)
MATrp	<i>N-methacryloyl-L-tryptophan methylester</i>
MIP	Polímero Molecularmente Impresso (<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
MMA	Ácido Metacrílico (<i>Methacrylic Acid</i>)
MBAAm	<i>N,N'-methylenebisacrylamide</i>
NIP	Polímero Não Impresso (<i>Non Imprinted Polymer</i>)
NIPAAm	<i>N,N'-isopropylacrylamide</i>
NMP22	<i>Nuclear Matrix Protein 22</i>
POCT	Teste no Ponto de Interesse (<i>Point-of-care Testing</i>)
PSA	Antigénio Específico da Próstata (<i>Prostate Specific Antigen</i>)
RAFT	<i>Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer</i>
Rct	Resistência de Transferência de Carga
RE	Eléttodo de Referência (<i>Reference Electrode</i>)
RPS	Ressonância de Plasma de Superfície
RS	Resistência da Solução
SERS	Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i>)

Silane@CDs *Vinylsilane modified carbon dot*

SPE Elérodos Serigrafados (*Screen-Printed Electrodes*)

SPR Ressonância Plasmônica de Superfície (*Surface Plasmon Resonance*)

SWV Voltametria de Onda Quadrada (*Square Wave Voltammetry*)

US Ultrassons

W Impedância de *Warburg*

WE Elédrodo de Trabalho (*Working Electrode*)

1 Introdução

O diagnóstico precoce do cancro é um fator crucial para o sucesso do seu tratamento. Métodos altamente sensíveis, são urgentemente necessários para medir marcadores de cancro durante os estágios iniciais da doença, contribuindo assim para elevar as taxas de sobrevivência dos pacientes. (Zhurauski, P., 2017)

Porém, os testes existentes nem sempre são suficientemente sensíveis ou simples, sendo apenas possível, na maioria dos casos, a deteção de proteínas em níveis correspondentes a estágios avançados da doença. Dispositivos de pequenas dimensões, mais rápidos e mais baratos são uma necessidade bastante elevada, para assim substituir as demoradas análises laboratoriais. A disponibilização dos resultados analíticos num curto espaço de tempo, à beira do paciente, momentos depois da recolha das amostras, irá também melhorar em larga escala o diagnóstico e monitorização do cancro. (Zhurauski, P., 2017)

A deteção de biomarcadores de cancro ajuda a fornecer um diagnóstico inicial, evitando que a doença se torne incurável em estágios posteriores. Estes biomarcadores podem também ser usados para avaliar a progressão de terapias e tratamentos cirúrgicos. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Desde o trabalho pioneiro de Polyakov na década de 1930 utilizando matrizes de sílica, o desenvolvimento contínuo de design, preparação, caracterização e aplicação de polímeros molecularmente impressos (*MIP – Molecularly Imprinted Polimers*) nos últimos anos, refletiu o crescimento e avanço gradual da tecnologia de impressão molecular (*MIT – Molecular Imprinting Technology*) assim como o amplo interesse demonstrado pela comunidade científica em geral. O número de revisões, artigos e monografias sobre a impressão molecular continua a aumentar, o que reflete diretamente o rápido desenvolvimento das tendências e áreas atuais. (Chen, L. et al. 2016)

Assim sendo, os sensores baseados em MIPs têm sido alvo de inúmeros estudos, considerando-se como promissores dispositivos analíticos em diversos campos, incluindo análises clínicas, oferecendo a portabilidade desejada, respostas rápidas, especificidade e baixo custo. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Avanços na biologia molecular levaram a uma compreensão mais aprofundada de potenciais biomarcadores que podem ser usados para o diagnóstico de diferentes tipos de cancro. Estratégias inovadoras de sensores permitem que este diagnóstico seja realizado num curto espaço de tempo, de forma barata e confiável, num ambiente descentralizado. (Zhurauski, P., 2017)

Estudos demonstraram que a Alfa-Fetoproteína (AFP) apresenta-se como um biomarcador fiável do cancro hepatocelular (CHC), já que níveis elevados de AFP foram associados ao aparecimento desta mesma doença. A AFP também demonstrou ser uma ferramenta valiosa na monitorização da resposta aos tratamentos. (Chen, L et al. 2016)

Neste sentido, esta tese em particular discutirá o uso de sensores eletroquímicos baseados em MIPs, para a deteção de cancro no fígado através da análise eletroquímica da AFP.

1.1 Enquadramento

Com o interesse em descobrir novas soluções que contribuam para o desenvolvimento da ciência, surge a possibilidade de realizar um projeto de investigação no âmbito da unidade curricular Projeto/Estágio (PESTF) do Mestrado em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica (MECIM), pertencente ao departamento de Física (DFI) do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

Este projeto envolve toda uma parte de investigação realizada ao longo de 9 meses no laboratório de eletroquímica do Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ), bem como uma parte de pesquisa sobre o tema.

Durante todo este período, houve um acompanhamento por parte dos orientadores João Pacheco (ISEP) e Hendrikus Nouws (ISEP).

1.2 Objetivos

O principal objetivo desta investigação foi o desenvolvimento de um sensor eletroquímico sensível para a deteção de AFP – Alfa-Fetoproteína, de modo a desenvolver competências no âmbito da eletroquímica e a consolidar conhecimentos adquiridos ao longo do curso. Este objetivo foi cumprido com a ajuda dos orientadores, bem como dos restantes colegas do GRAQ.

Não menos importante, outra meta deste projeto passava por desafiar-me a levar a cabo uma investigação numa área na qual não tenho muita experiência, embora tenha feito parte do meu plano de estudos.

Deste modo, é importante destacar que um dos parâmetros fulcrais deste projeto passou pela componente prática realizada no laboratório, possibilitando o conhecimento não só do funcionamento dos equipamentos, como também o desenvolvimento da própria autonomia na resolução de problemas.

Tudo isto contribui para um aperfeiçoamento das capacidades em diferentes níveis do domínio do saber, para assim desenvolver competências que permitam enfrentar os desafios profissionais que possam aparecer no futuro.

1.3 Motivação

O interesse na área da saúde juntamente com a eletroquímica foi um dos principais fatores que motivaram à realização desta investigação.

Não obstante, o “querer saber” juntamente com o “querer fazer” levaram à procura de uma equipa que pudesse proporcionar condições onde fosse possível ganhar conhecimentos e prática. É importante realçar que o GRAQ é uma excelente equipa, com boas referências, e todo o seu trabalho é feito com qualidade e nas condições necessárias.

Por fim, a própria organização da equipa bem como o facto de serem assegurados todos os recursos necessários para realizar este trabalho, levou, ao longo de todo o período de investigação, a manter um espírito otimista e sempre com vontade de trabalhar.

1.4 Apresentação do GRAQ

O GRAQ -Grupo de Reação e Análises Químicas -consiste numa equipa de investigadores que se dedica à investigação na área da Engenharia Química e da Química Verde, promovendo a inovação e contribuindo para a criação, aplicação e divulgação de conhecimento. Foi criado em Janeiro de 1999 como um grupo de investigação do ISEP com autonomia científica e financeira, integrado no Centro de Química da Universidade do Porto (CEQUP). (GRAQ - Grupo de Reação e Análises Químicas, 2019)

Em Novembro de 2001 o GRAQ passa a pertencer ao Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE). (GRAQ - Grupo de Reação e Análises Químicas, 2019)

O REQUIMTE foi originalmente criado como uma organização científica sem fins lucrativos em Janeiro de 2003, em parceria com as universidades do Porto e a NOVA Lisboa. Resulta de uma colaboração de longa data entre dois Centros de Pesquisa destas universidades nas áreas da Química, Bioquímica, Engenharia Química e Biotecnologia, Farmacologia e Ciência e Tecnologia de Alimentos. Em Novembro de 2001, a REQUIMTE foi oficialmente reconhecida pelo Ministro da Ciência e Ensino Superior de Portugal, como anfitriã de um Centro de Investigação em Excelência em Química Verde, Laboratório Associado para a Química Verde. (REQUIMTE, 2019)

1.5 Organização do Relatório

O presente documento está dividido em 5 capítulos, que por sua vez se subdividem noutros tópicos.

No primeiro capítulo é feita uma introdução, contextualizando-se o leitor para o tema em questão. De seguida são apresentados aspetos relacionados com o enquadramento, objetivos e motivação para a realização do projeto. Por fim é apresentado o conteúdo do relatório bem como uma breve apresentação do laboratório onde foi realizada esta investigação.

O segundo capítulo apresenta e explica alguns conceitos teóricos fundamentais, que ajudam na compreensão do tema abordado e de toda a parte experimental realizada ao longo de 9 meses.

No terceiro capítulo é apresentado todo o procedimento da parte experimental, materiais e reagentes utilizados. É então explicado como se procedeu para a síntese dos sensores MIP e NIP, a preparação das amostras e como são feitas as medições eletroquímicas.

O quarto capítulo é dedicado aos resultados obtidos e à discussão dos mesmos.

Por fim, no quinto capítulo, são apresentadas as conclusões e apreciações globais do projeto de investigação. São também sugeridas algumas ideias para apostar no futuro, bem como alternativas ao procedimento adotado.

2 Conceitos e Fundamentos Teóricos

Neste capítulo são apresentados alguns conceitos e fundamentos teóricos, essenciais à compreensão do tema em questão.

2.1 Carcinoma Hepatocelular

O cancro é definido como um grupo de doenças que envolvem crescimento celular anormal que se pode espalhar para outras partes do corpo. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Esta proliferação descontrolada de células em certos tecidos do corpo humano é uma das principais causas do cancro e existem diversas razões para este fenómeno, como por exemplo a exposição prolongada a determinados tipos de vírus, agentes cancerígenos químicos ou simplesmente a própria genética. O resultado deste comportamento anormal é a interrupção do equilíbrio da vida das células do tecido envolvido. (Zhurauski, P., 2017)

O cancro pode então ser considerado uma infeção transmissível por um invasor externo, mas surge das células do próprio corpo. (Zhurauski, P., 2017)

Nos últimos cinquenta anos, esta tornou-se uma das principais causas de morte em todo o mundo. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (*IARC – International Agency for Research on Cancer*) estima que um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres em todo o mundo desenvolvam cancro ao longo da sua vida, e que um em oito homens e uma em cada onze mulheres morrerão dessa mesma doença. São vários os fatores que contribuem para estas estatísticas, particularmente o crescimento e envelhecimento da população global bem como o aumento na exposição a fatores de risco de cancro ligados ao desenvolvimento social e económico. (Globocan, 2018)

Existem alguns indícios de que os esforços de prevenção aumentaram, como por exemplo, a incidência de cancro de pulmão em homens no norte da Europa e na América do Norte, ou em cancro cervical na maioria das regiões, exceto na África Subsaariana, em comparação com os dados de 2012. (Globocan, 2018)

No entanto, os países estão a enfrentar um aumento geral no número absoluto de casos de cancro. A Ásia é responsável por quase metade dos novos casos desta doença e mais da metade das mortes pela mesma. Estima-se que a Ásia e a África tenham uma proporção maior de mortes por cancro (7.3% e 57.3%, respetivamente) em comparação com a sua incidência (5.8% e 48.4%, respetivamente). O IARC sugere que esta tendência poderá dever-se à maior frequência de tipos de cancro associados a um mau prognóstico, juntamente com o acesso limitado ao diagnóstico e tratamento oportunos. Os dados de 2018 sugerem também que os países com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) têm uma incidência de cancro 2 a 3 vezes maior do que aqueles com IDH baixo ou médio. Os principais cancros no mundo também mudaram em comparação com os dados de 2012. (Globocan, 2018)

Na Figura 1, estão representados dois gráficos circulares relativos aos números de novos casos de cancro em 2018 globalmente, bem como o número de mortes associado.

O cancro no fígado é o quinto tipo de cancro mais comum e a quarta causa mais frequente de mortes relacionadas com o cancro globalmente. Representa aproximadamente 5% de todos os cancros e conta com cerca de 841.080 novos casos e 781.631 mortes em 2018. (*The Global Cancer Observatory*, 2019)

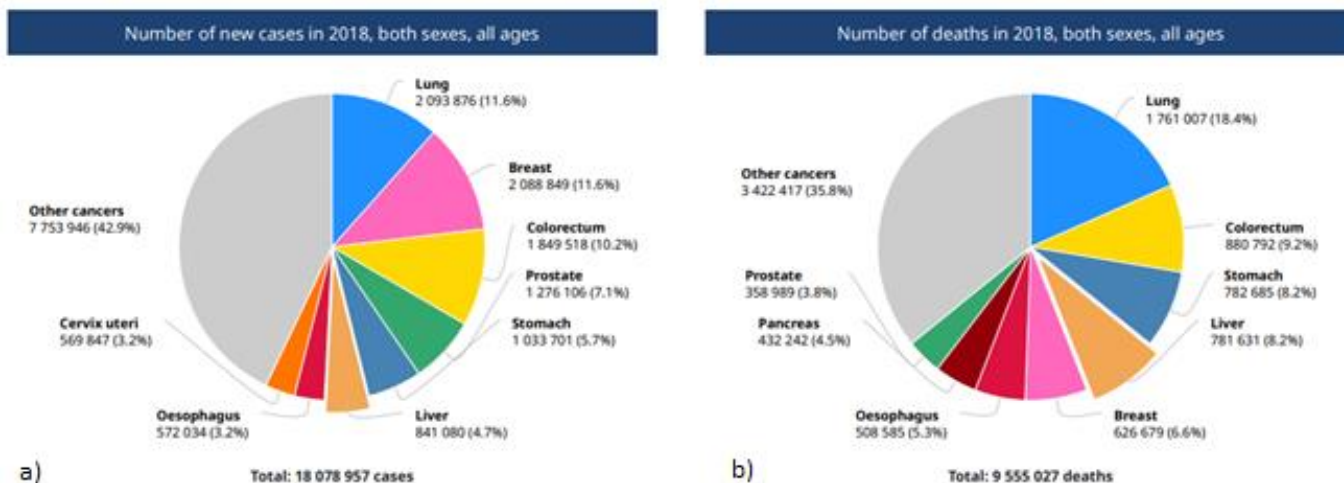


Figura 1. Dados relativos à incidência dos vários tipos de cancro, globalmente, em 2018. a) Número de novos casos em 2018, para ambos os sexos e todas as idades. b) Número de mortes em 2018, para ambos os sexos e todas as idades. (*The Global Cancer Observatory*, 2019)

O cancro de fígado inclui, entre outras doenças hepáticas malignas, o Carcinoma Hepatocelular (CHC), Colangiocarcinoma (CC) e Carcinoma Hepatocelular combinado com Colangiocarcinoma (CHC-CC). (Fu, Y., et al, 2017)

O Carcinoma Hepatocelular representa cerca de 90% dos cancros primários no fígado e constitui um problema sério de saúde global. A incidência de CHC tem tendência a aumentar com a idade em todas as populações, atingindo um pico aos 70 anos. Por sua vez, em populações chinesas e africanas, a idade média dos pacientes é consideravelmente menor. Estes dados contrastam fortemente com o Japão, onde a incidência de CHC é mais alta na população masculina de 70 a 79 anos. O CHC tem uma forte preponderância masculina, com uma proporção masculina/feminina estimada em 2 – 2.5 : 1. (*Journal of Hepatology*, 2018)

Estima-se que, globalmente, o número de casos incidentes de cancro no fígado em ambos os sexos e em todas as faixas etárias aumente de 841.080 em 2018 para 1.361.836 em 2040 (uma variação geral de + 61.9%). Estima-se também que o número de mortes por cancro no fígado em ambos os sexos e em todas as faixas etárias aumente de 781.631 em 2018 para 1.284.252 em 2040 (uma mudança geral de + 64.3%). A Figura 2 mostra o número estimado de casos de incidentes e mortes de 2018 a 2040. (Rawla, P., et al, 2018)

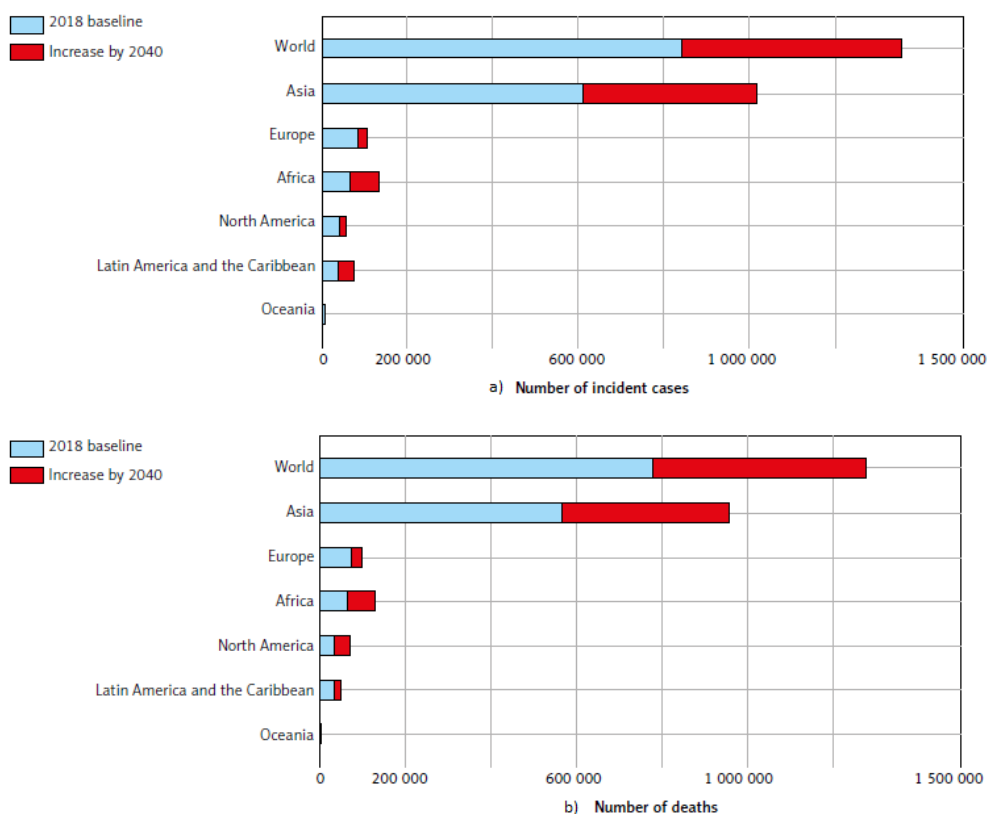


Figura 2. Números estimados relativos à incidência do cancro no fígado de 2018 a 2040, globalmente, em todas as idades e ambos os sexos. a) Número de novos casos. b) Número de mortes. (Globocan, 2018)

Estes dados, embora meramente estatísticos, alertam para um acentuado crescimento do número de casos incidentes de cancro no fígado bem como de mortes até 2040. É de salientar que a hepatite viral crónica e o consumo de álcool têm sido os dois fatores de risco mais impactantes para o desenvolvimento de cirrose hepática e subsequente CHC, levando a este crescimento esperado em todo o mundo. O estilo de vida, bem como fatores ambientais e genéticos, contribuem também como fatores de risco para esta doença oncológica. (Rawla, P., et al, 2018)

Os recentes desenvolvimentos de medicamentos na farmacoterapia do tratamento da hepatite viral crónica têm um longo caminho para limitar o número de doenças hepáticas progressivas e CHC. O conhecimento aprofundado sobre os mecanismos moleculares de desenvolvimento do CHC levou a uma vigilância mais ativa entre pacientes com fatores de risco estabelecidos. A prevenção da doença hepática alcoólica combinada com uma dieta e estilo de vida saudáveis e melhores condições ambientais são algumas estratégias importantes que ajudariam a reduzir ainda mais a ameaça de aumento da incidência de CHC, especialmente nos países em desenvolvimento. (Rawla, P., et al, 2018)

No entanto, se for diagnosticado num estágio inicial, antes de ter hipóteses de aumentar de tamanho ou de se alastrar para outras partes do corpo, a probabilidade do cancro ser controlado ou até mesmo de ser tratado com sucesso aumenta consideravelmente. No caso do cancro se espalhar, o seu tratamento torna-se mais complexo e a probabilidade de sobrevivência do paciente pode diminuir. Neste contexto, a necessidade de descobrir, desenvolver e aplicar novas ferramentas de diagnóstico torna-se urgente. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Essas ferramentas têm em vista a resolução ou minimização de problemas relacionados ao diagnóstico clínico clássico, como a necessidade de instrumentação cara e sofisticada (por exemplo, a tomografia axial computadorizada, ressonância magnética ou ultrassonografia), o pessoal qualificado e o longo tempo de espera de resultados de análises. Isto porque, atualmente, o diagnóstico preciso da doença oncológica baseia-se na avaliação histológica dos tecidos, através de técnicas como ensaios de imunoabsorção enzimática, radioimunoensaios, imunofluorescência, entre outras, que muitas vezes podem ser demoradas e incapazes de fornecer resultados num tempo razoavelmente curto, dificultando o diagnóstico precoce do cancro. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Os avanços tecnológicos no âmbito dos (bio)sensores, bem como a disponibilidade de vários biomarcadores estáveis, sensíveis e não invasivos para distinguir diferentes estágios no CHC, facilitaram muito a identificação da doença e a monitorização em tempo real da resposta à terapia. Os biomarcadores são extremamente úteis na prática clínica para doenças hepáticas, estando associados à secreção de várias proteínas ou nucleotídeos relacionados a tumores. A necessidade de identificação de biomarcadores específicos de CHC tem vindo a aumentar.

2.2 Sensores

De acordo com a IUPAC, um sensor é um dispositivo que transforma informação química num sinal analítico utilizável. A informação pode ser obtida a partir de uma reação química do analito ou de uma propriedade física. (IUPAC, 1999) Os sensores físicos realizam a medição de propriedades físicas como a temperatura, índice de refração entre outros. Quanto aos sensores químicos, estes podem ser utilizados tanto para análise qualitativa (por exemplo, identificação de constituintes químicos de uma amostra) como para análise quantitativa (por exemplo, determinação da concentração dos constituintes de uma amostra). (Zadeh, K. e Fry, B., 2008)

Um sensor químico é um dispositivo analítico constituído por três partes, tal como se pode observar na Figura 3: o elemento sensor (recetor), o transdutor e o sistema eletrónico. O elemento sensor é um componente fundamental no dispositivo pois tem a propriedade de reconhecer seletivamente e de interagir com o analito. Posteriormente, a interação entre o elemento sensor e o analito é transformada num sinal elétrico mensurável, que é recebido e tratado no sistema eletrónico. (Wilson J., 2005)

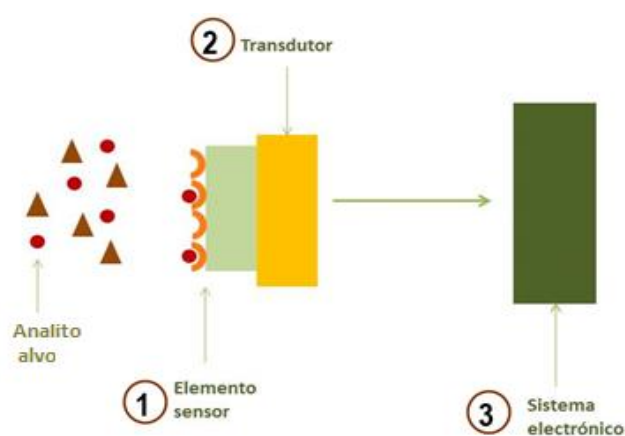


Figura 3. Diagrama esquemático de um sensor. (Pacheco, J., 2017)

O elemento sensor reconhece o analito alvo e as respostas correspondentes são então convertidas em sinais elétricos equivalentes pelo transdutor. O amplificador responde ao pequeno sinal de entrada do transdutor e emite um sinal de saída que contém os recursos essenciais da forma de onda do sinal de entrada. O sinal amplificado é então processado pelo processador de sinal, onde posteriormente pode ser armazenado, exibido e analisado. (Velusamy, V. et al. 2010)

Os sensores podem ser classificados através do seu elemento de reconhecimento ou pelo tipo de transdutor. Na Figura 4 está representado um esquema de classificação de um biossensor.

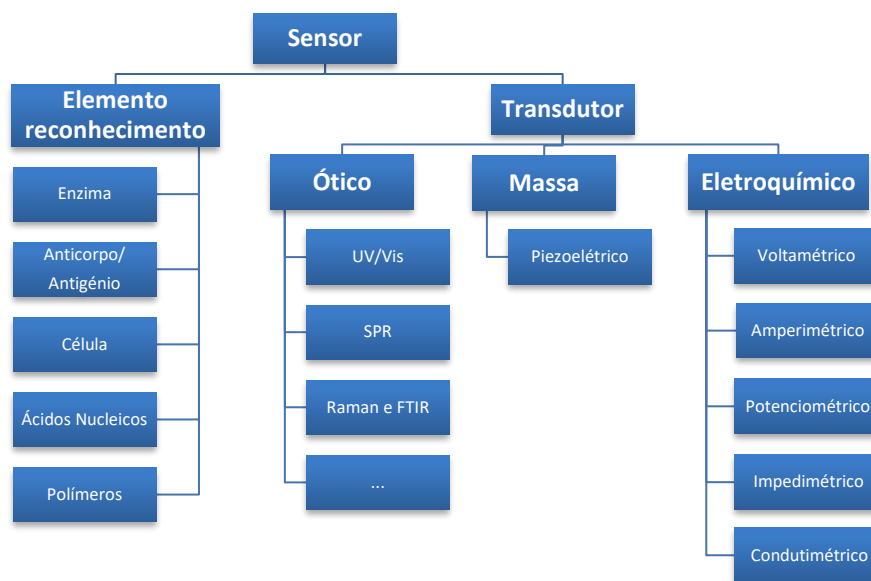


Figura 4. Esquema de classificação de um sensor. (Velusamy, V. et al, 2010)

Os elementos sensores são a chave para a especificidade das tecnologias de Sensores. Consistem numa espécie molecular que utiliza um mecanismo para reconhecimento e são responsáveis por ligar o analito de interesse ao sensor para a medição. (Velusamy, V. et al. 2010)

A seleção do elemento sensor tem em consideração a molécula alvo. São, por isso, selecionados de acordo com sua afinidade e estabilidade à molécula alvo. (Saylan, Y. et al 2017)

Estes podem ser classificados em várias categorias diferentes, destacando-se anticorpo/antigénio, enzimas, ácidos nucleicos/DNA, estruturas celulares/células e polímeros. As enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos são as principais classes de biorreceptores amplamente utilizados em aplicações de biossensores. Podem também ser utilizados polímeros molecularmente impressos (Velusamy, V. et al. 2010)

Os transdutores também desempenham um papel preponderante num sensor, pois transformam a interação entre o analito e o recetor num sinal elétrico. Os sensores podem também ser classificados com base nos métodos de transdução que empregam. Embora existam novos tipos de transdutores a ser constantemente desenvolvidos para uso em biossensores, os métodos de transdução, como ótico, eletroquímico e baseado em massa, são os mais utilizados. (Velusamy, V. et al. 2010)

2.2.1 Sensores Eletroquímicos

A construção de sensores eletroquímicos tem sido amplamente realizada, pois este tipo de sensores permite a obtenção de sinal com uma manipulação mínima do sistema. Além disso são normalmente dispositivos muito sensíveis, baratos, fáceis de utilizar e portáteis. Deste modo são facilmente aplicados em análises *in situ*. (Brett, C., 2001) (Lowinsohn, D. e Bertotti, M., 2006)

Este método simples de transformar uma interação entre analito e recetor num sinal elétrico, torna-o atraente para a indústria de sensores. A sua grande vantagem é a ampla gama de propriedades elétricas que podem ser medidas e quantificadas com métodos como:

- **Voltametria:** consiste na aplicação de um potencial na célula eletroquímica, medindo-se a corrente resultante. Através desta técnica obtém-se informação quantitativa e qualitativa específica sobre as espécies envolvidas nas reações redox. Os métodos voltamétricos, explicados no subcapítulo seguinte, podem ainda ser divididos em Voltametria Cíclica (*CV – Cyclic Voltammetry*), Voltametria de Pulso Diferencial (*DPV - Differential Pulse Voltammetry*), Voltametria de Varrimento Linear (*LSV - Linear Sweep Voltammetry*), Voltametria de Onda Quadrada (*SWV - Square Wave Voltammetry*) entre outros;
- **Amperometria:** consiste na medição da corrente direta da reação redox sob um potencial constante aplicado ao eléctrodo de trabalho. A atividade do elemento de reconhecimento varia antes e depois da interação com uma molécula alvo. O produto deve ser eletroativo e passa por um processo redox. A corrente medida é então uma taxa de eletrões transferidos e é proporcional à concentração do analito;
- **Potenciometria:** consiste na medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos mergulhados numa solução. Essa diferença de potencial elétrico ou força eletromotriz (*EMF – Electromotive Force*) é medida em condições de corrente praticamente nula. A diferença de potencial é formada quando, por exemplo, ocorre uma interação antigénio-anticorpo;
- **Impedância eletroquímica:** consiste na medição da impedância do eléctrodo. O método, chamado Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (*EIS – Electrochemical Impedance Spectroscopy*), caracteriza a estrutura e a função dos eléctrodos, especialmente aqueles que foram modificados com material biológico. Pode ainda ser classificada como Faradaica ou Não Faradaica, dependendo da presença/ausência de um par redox na solução;
- **Condutimetria:** consiste na medição da variação da força iónica de uma solução, que altera o fluxo de corrente ou a condutividade elétrica. (Dziabowska K et al. 2017)

2.2.1.1 Célula Eletroquímica

Uma célula eletroquímica é um dispositivo que envolve a presença de correntes faradaicas como resultado de reações químicas redox. Como está representado na Figura 5, estas células podem ser galvânicas, quando envolvem reações espontâneas, ou eletrolíticas, quando envolvem reações não espontâneas. (Ciobanu, M. et al. 2007)

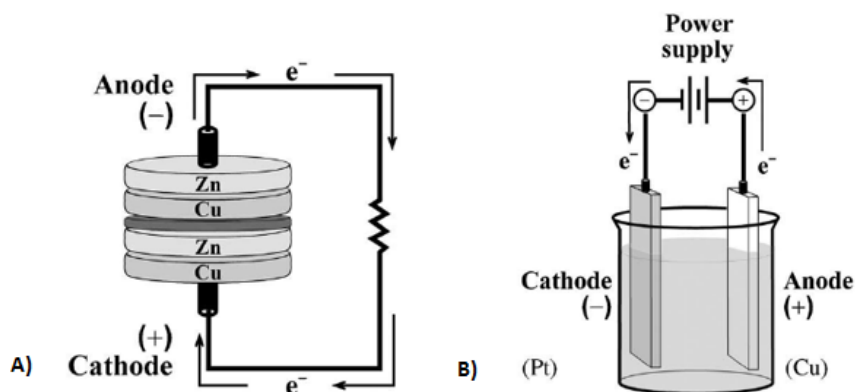


Figura 5. Exemplos de Células Eletroquímicas. A) Célula Galvânica. B) Célula Eletrolítica. (Ciobanu, M. et al. 2007)

Na Figura 5. A) está esquematizada uma célula galvânica, composta por discos empilhados de cobre e zinco, separados por papel embebido numa solução ácida. Por sua vez, na Figura 5. B), está representada uma célula eletrolítica composta por eletrodos de cobre e platina imersos numa solução aquosa contendo H_2SO_4 e $CuSO_4$. (Ciobanu, M. et al. 2007)

Embora possa ser suficiente descrever os eletrodos de uma célula galvânica como simplesmente um ânodo ou cátodo, os eletrodos das células eletrolíticas desempenham funções mais especializadas. Para diferenciar os eletrodos, estes são rotulados de acordo com seu papel específico na célula: o eletrodo de trabalho (*WE – Working Electrode*), o eletrodo auxiliar (*AE – Auxiliary Electrode*) e o eletrodo de referência (*RE – Reference Electrode*). (Dziabowska K et al. 2017)

O WE é geralmente o local onde ocorre a reação de interesse. Tipicamente, são compostos por metais nobres (especialmente ouro ou platina), carbono (incluindo carbono pirolítico, carbono vítreo e pasta de carbono), metais líquidos (como o mercúrio) e semicondutores (como óxido de índio e estanho). Estes podem ser modificados para aumentar a sua sensibilidade e seletividade em relação a espécies específicas ou para diminuir o potencial necessário para conduzir uma reação específica. (Dziabowska K et al. 2017)

Independentemente de uma célula eletrolítica ter uma configuração de dois ou três eletrodos, deve conter um eletrodo de referência. O RE é composto por um sistema de fases, que retém uma composição essencialmente constante e, portanto, fornece um potencial estável pelo qual o potencial do WE pode ser monitorizado. As fases presentes nos REs passam por processos redox reversíveis a uma taxa muito alta, permitindo que eles se ajustem rapidamente às mudanças na atividade iônica da solução, deixando-os, no entanto, sensíveis à passagem de grandes densidades de corrente. Para alguns sistemas, onde não há grandes flutuações da atividade iônica, um eletrodo composto por um metal nobre (por exemplo, um fio de platina) pode ser substituído pelo eletrodo

de referência. Nesse caso, o substituto é referido como um eletrodo de quase referência. (Ciobanu, M. et al. 2007)

Como os REs podem ser danificados pela presença de grandes densidades de corrente e podem perder o seu comportamento ideal não polarizável, é frequentemente utilizada a configuração com três eletrodos. O terceiro eletrodo, AE, é usado como um coletor de corrente para desviar o excesso de corrente do RE. O AE é geralmente escolhido para ser inerte sob as condições da reação (por exemplo, um eletrodo composto por um metal nobre de grande área como a platina). (Ciobanu, M. et al. 2007)

2.2.1.2 Eléttodos Serigrafados

Nos últimos anos, os eletrodos serigrafados (*SPEs – Screen Printed Electrodes*), com baixo custo, facilidade e velocidade de produção em massa, usando a tecnologia de filme impresso, têm sido utilizados para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos. A principal vantagem associada à miniaturização dos sensores eletroquímicos (com dimensões de aproximadamente 3.4 x 1.0 x 0.05 cm) é a redução do volume necessário da amostra para apenas alguns microlitros, o que, por sua vez, ajuda a reduzir o tamanho geral do sistema de diagnóstico no qual o dispositivo será integrado. (Taleat, Z. et al. 2014) (DropSens, 2019)

A superfície dos SPEs pode ser facilmente modificada para atender a vários propósitos relacionados com diferentes analitos e para melhorar o seu desempenho. Essa versatilidade, o seu tamanho miniaturizado e a possibilidade de integrá-lo em dispositivos portáteis, tornam possível a determinação no local altamente específica dos analitos alvo. Além disso, estes eletrodos evitam alguns dos problemas comuns dos eletrodos sólidos clássicos, como efeitos de memória e processos de limpeza tediosos. (Taleat, Z. et al. 2014)

Esta tecnologia de serigrafia consiste em deposições de tinta por camadas sobre um substrato sólido, através do uso de uma tela ou malha, definindo a geometria do sensor. Esta tecnologia possui vantagens de flexibilidade do seu desenho, automação de processos, boa reprodutibilidade, e a possibilidade de utilização de uma ampla variedade de materiais. (Taleat, Z. et al. 2014)

Os SPEs, como representados na Figura 6, geralmente têm uma configuração de três eletrodos (WE, RE e AE) impressos nos vários tipos de substratos de plástico ou cerâmica, que são facilmente modificáveis com uma grande variedade de tintas comerciais ou até mesmo caseiras. (Taleat, Z. et al. 2014)

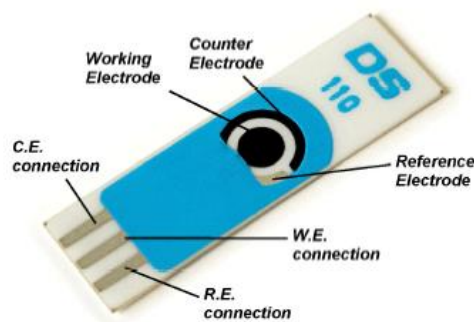


Figura 6. Eléttodo serigrafado. (DropSens, 2019)

Durante o processo de impressão dos SPEs, as pastas mais usadas são a tinta de prata e a tinta de carbono. A tinta de prata é impressa como uma faixa condutora, enquanto os elétrodos de trabalho são impressos principalmente usando tintas de grafite, tintas à base de ouro, platina ou prata. A composição das várias tintas usadas para imprimir elétrodos determina a sensibilidade necessária para cada análise. No entanto, deve-se ter em conta que alguns ingredientes desconhecidos nessas tintas podem induzir influências imprevisíveis na detecção e análise. (Kadara, O. et al. 2009)

As tintas de carbono consistem em partículas de grafite, aglutinante polimérico e outros aditivos que são utilizados para tarefas de dispersão, impressão e adesão. A pasta de carbono é um material difundido porque é relativamente barato, fácil de modificar e quimicamente inerte. A pasta de ouro também é utilizada nos SPEs, embora com menos frequência que o carbono, devido ao seu custo mais elevado. Porém, estes elétrodos à base de ouro têm vindo a suscitar bastante interesse, sendo atualmente aplicados como biossensores eletroquímicos, incluindo enzimáticos, imunológicos ou genossensores. (Kadara, O. et al. 2009)

A ampla gama de formas de modificação de SPEs possibilita um vasto campo de aplicações para esses elétrodos. Para além disso, têm sido feitos grandes avanços na fabricação de SPEs usando nanomateriais. Alguns desses materiais, como Au (ouro), Ag (prata), Pt (platina), Pd (paládio), nanopartículas de metal e nanotubos de carbono (CNTs) e tintas à base de grafeno também são utilizados na sua construção. Estes materiais conferem uma maior eficiência de imobilização de moléculas biológicas e aceleram a taxa de transferência de eletrões na superfície do eletrodo. (Taleat, Z. et al. 2014)

2.2.2 Técnicas Eletroquímicas

As técnicas eletroquímicas permitem realizar análises qualitativas e quantitativas de qualquer composto eletroativo. Baseiam-se em reações de oxidação e redução, possibilitando a recolha de informação sobre a concentração, a cinética, o mecanismo de reação, o estado químico e outros comportamentos da espécie em solução ou à superfície do eletrodo.

Existem diferentes técnicas eletroquímicas utilizadas no desenvolvimento de biossensores. Entre elas destacam-se a EIS, LSV, CV, SWV e DPV.

2.2.2.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) é uma técnica eletroquímica sensível e *label-free* que tem sido extensivamente usada como uma técnica de detecção para desenvolver novos biossensores para várias aplicações, incluindo diagnóstico molecular. Em suma, mede as alterações na impedância causada pela ligação que ocorre entre a superfície do eletrodo e o eletrólito. Isto é, uma medida da corrente que flui entre os elétrodos (WE e AE) para a solução eletrolítica da célula. Estas alterações de impedância devem-se às alterações das propriedades elétricas causadas pela molécula alvo. (Zhuravski, P., 2017) (Hammond, J., 2017)

Muitos dos processos que envolvam a alteração da condutividade de um sistema podem ser reconhecidos pela EIS, assim como uma infinidade de propriedades. (Hammond, J., 2017)

As medições EIS são baseadas em processos faradaicos que utilizam um par redox (o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ é tipicamente utilizado como um par redox) numa concentração equimolar das formas reduzida e oxidada, a fim de simplificar a análise. Resumidamente, um processo faradaico é aquele em que uma reação eletroquímica resulta na transferência de carga (elétrons) através da interface do eletrodo de trabalho e da solução de eletrólitos. Tipicamente, para realizar uma medição EIS, é aplicada uma pequena tensão de corrente alternada (CA) que é sobreposta a um potencial do respetivo par redox. (Zhurauski, P., 2017)

Para um sistema específico, a impedância da interface eletroquímica pode ser interpretada usando um circuito elétrico equivalente específico. Entre muitos tipos de circuitos disponíveis, o circuito equivalente de *Randles* (Figura 7) é o circuito tipicamente utilizado. (Zhurauski, P. 2017)

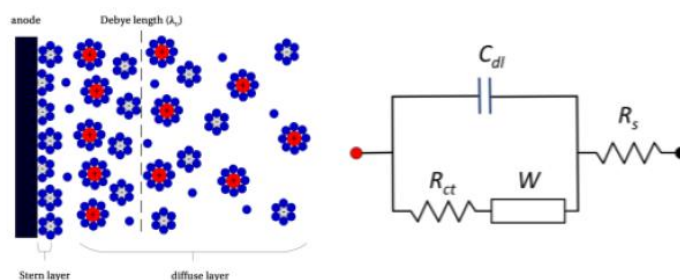


Figura 7. Representação da dupla camada elétrica (Hammond, J., 2017) e do circuito equivalente de *Randles* (Zhurauski, P., 2017)

Um circuito de *Randles* normalmente inclui a resistência da solução (R_s), a resistência da transferência de elétrons (também chamada resistência de transferência de carga (R_{ct}), a capacitância da camada dupla (C_{dl}) e um elemento de impedância de *Warburg* (W). Embora o elemento *Warburg* forneça apenas informações sobre a difusão do par redox, os valores de R_s dependem apenas da solução juntamente com a distância entre o WE e o AE. (Zhurauski, P., 2017)

Num biossensor que utiliza um elemento biológico, o elemento capacitivo ideal ($n = 1$) é substituído por um elemento de fase constante (*CPE – Constant Phase Element*), capaz de modelar o comportamento capacitivo da camada dupla. No entanto, os desvios de uma capacitância ideal são razoavelmente pequenos. (Zhurauski, P. 2017)

Como mencionado anteriormente, o elemento de impedância de Warburg (W) representa a pseudo-impedância causada pelo efeito de transferência de massa (a difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo). Como as correntes faradaicas são afetadas pelos efeitos de difusão, o valor de W em frequências mais baixas torna-se predominante, com um ângulo de fase 45° para um processo faradaico controlado por difusão. (Zhurauski, P., 2017)

Os resultados de uma medição EIS são tipicamente representados por um gráfico de Nyquist (Figura 8) mostrando a parte real e imaginária da impedância. Esse gráfico permite fazer uma comparação direta do valor da resistência da transferência de carga fornecido pelo diâmetro do semicírculo ao longo dos eixos Z' . (Randviir, P., e Banks, E., 2013)

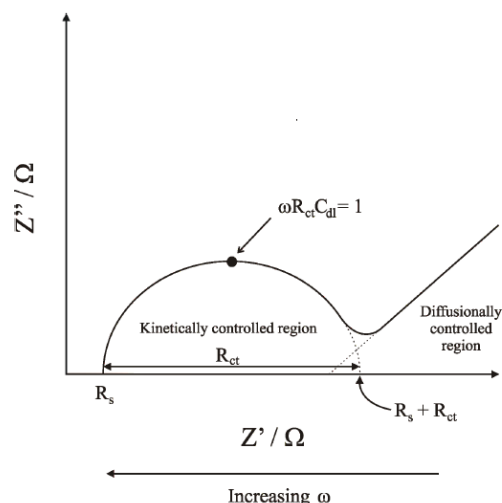


Figura 8. Típico gráfico de Nyquist (Randviir, P., e Banks, E. 2013)

Dependendo da presença ou ausência de espécies redox no eletrodo ou no eletrólito, a técnica pode ser classificada como EIS faradaica ou não-faradaica, respectivamente. A escolha do método de detecção mais adequado depende principalmente da aplicação. Apesar dos métodos não faradaicos apresentarem vantagens como a possibilidade de miniaturização dos eletrodos e permitirem a ausência de pares redox, os sensores faradaicos tendem a ser mais sensíveis. (Faria, R. 2019)

- **EIS Faradaica**

Na EIS faradaica, as reações de oxidação e/ou redução entre espécies eletroativas ocorrem no eletrodo levando à geração de corrente elétrica. Assim, os sensores faradaicos exigem a presença de sondas redox e a aplicação de condições de corrente contínua para possibilitar reações eletroquímicas. Este tipo de EIS tem o nome de 'Faradaica' porque a corrente gerada obedece à Lei de Ohm, o que significa que a corrente faradaica está relacionada com o número de elétrons transferidos nas reações redox, com a constante de Faraday, com a área superficial de o eletrodo e com o fluxo de moléculas eletroativas no limite da interface. (Faria, R. 2019)

A partir da corrente gerada pelas reações redox, os sensores faradaicos podem alcançar maior sensibilidade em comparação com os dispositivos não faradaicos. A modelação do circuito equivalente apropriado associado aos sensores faradaicos, foi explicada anteriormente e está esquematizado na Figura 7. (Faria, R., 2019)

Experiências típicas utilizando EIS Faradaica consistem em registrar as variações causadas devido a um evento de ligação que pode produzir um efeito de bloqueio maior ou menor. Como resultado, há alterações na acessibilidade dos marcadores redox da solução eletrolítica (eletrólito) para a superfície do eletrodo. (Zhurauski, P., 2017)

- **EIS Não Faradaica**

Ao contrário do EIS faradaica, o método não faradaico não exige o uso de pares redox e, conseqüentemente, nenhum elétrodo de referência é também necessário, pois não é preciso potencial DC. Estas características tornam esse tipo de sensor mais acessível à miniaturização e a aplicativos on-line/em tempo real. (Faria, R., 2019)

Neste tipo de técnica, ao carregar e descarregar a capacitância de dupla camada, é possível avaliar as alterações dielétricas no elétrodo. Assim, a impedância de um sensor não faradaico surge do efeito causado pelas características isolantes da ligação do analito alvo ao substrato condutor. Normalmente, o parâmetro de impedância mais valioso é a capacitância de dupla camada e é limitada apenas pela natureza dos portadores de carga e da sua concentração na camada limite do substrato do transdutor. (Faria, R., 2019)

Neste caso, o circuito equivalente consiste numa combinação de resistências e condensadores. (Zhurauski, P., 2017)

É importante destacar que, no caso de processos não faradaicos, o foco é dado à análise da camada dupla C_{dl} , em vez de R_{ct} . De facto, em experiências não faradaicas, a transferência de carga pode ser negligenciada, pois não há marcadores redox na solução e a principal contribuição para a impedância é dada pelo condensador. (Zhurauski, P., 2017)

2.2.2.2 Voltametria de Varrimento Linear

A Voltametria de Varrimento Linear (LSV) envolve o varrimento (ou rampa) do potencial do elétrodo de trabalho linearmente com o tempo a velocidades tipicamente entre 1.0 e 1000 mV s⁻¹. Para qualquer espécie que possa ser reduzida (ou oxidada) na faixa do potencial varrido, a forma de onda (Figura 9) produz um pico de corrente. (Scott, K., 2016)

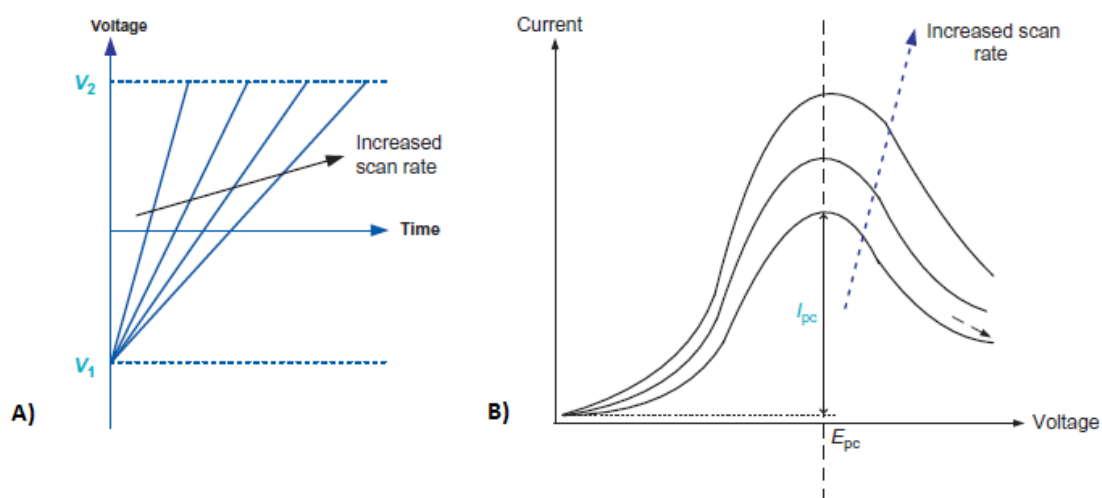


Figura 9. A) Voltametria de Varrimento Linear. B) Gráfico da corrente em função da tensão dependendo da taxa de varrimento. (Scott, K., 2016)

Como se pode reparar pela Figura 9. B, cada curva tem a mesma forma, mas é aparente que a corrente total aumenta com o aumento da taxa de varrimento. Este efeito pode ser racionalizado novamente considerando o tamanho da camada de difusão e o tempo necessário para gravar o *scan*. Claramente, o voltamograma de varredura linear levará mais tempo a gravar à medida que a taxa de varrimento diminui. Deste modo, o tamanho da camada de difusão acima da superfície do eletrodo será diferente, dependendo da taxa de varrimento de tensão utilizada. (University of Cambridge, 2019)

2.2.2.3 Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (CV), uma das técnicas eletroanalíticas mais usadas, é uma excelente técnica eletroquímica qualitativa, mas geralmente não é uma boa técnica para análise quantitativa. A sua principal vantagem na eletroanálise é a capacidade de caracterizar um sistema eletroquímico. (Princeton Applied Research, 2019)

Várias experiências CV podem ser usadas para uma variedade de aplicações, incluindo a determinação da reversibilidade ou irreversibilidade de um par redox, o número de elétrons transferidos numa oxidação ou redução, coeficientes de difusão, entre outras. (Princeton Applied Research, 2019)

As suas medições são realizadas aplicando-se um potencial variável no WE (varredura potencial) entre dois limites de potencial definidos, tanto no sentido positivo como no sentido negativo como mostra a Figura 10. Ao fazer o varrimento, as moléculas eletroativas na solução podem perder elétrons (oxidação) ou obter elétrons (redução) nos seus respetivos potenciais e os picos podem ser obtidos em apenas uma varredura de CV. Essa técnica geralmente permite o reconhecimento juntamente com a quantificação (pico faradaico) de um grande número de compostos em estudo. (Zhurauski, P. 2017)

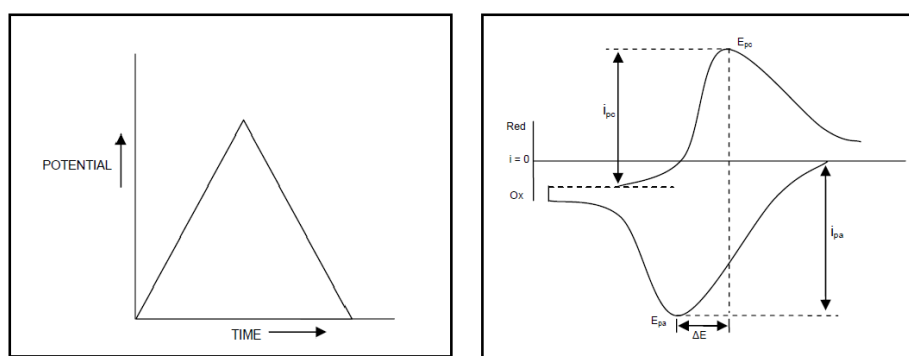


Figura 10. A) Forma de onda típica para CV analógica. B) Voltamograma cíclico teórico para um caso reversível. (Princeton Applied Research, 2019)

Como se pode ver pela Figura 10. A, o potenciostato aplica uma rampa potencial ao eletrodo de trabalho para alterar gradualmente o potencial e, de seguida, reverte a varredura, retornando ao potencial inicial. Durante a varredura, o potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado. Esses valores são usados para construir o voltamograma da corrente em função do

potencial aplicado (Figura 10. B), que mostra quatro informações importantes: a altura do pico catódico (I_{pc}), a altura do pico anódico (I_{pa}), o potencial do pico catódico (E_{pc}) e o potencial do pico anódico (E_{pa}). (Princeton Applied Research, 2019)

2.2.2.4 Voltametria de Onda Quadrada

A Voltametria de Onda Quadrada (SWV) permite contornar as correntes capacitivas e monitorizar apenas a corrente faradaica, aumentando assim a sensibilidade do sistema. (Scott, K., 2016)

Numa experiência SWV típica, o sinal de excitação consiste em pulsos simétricos repetitivos de onda quadrada com amplitude fixa. Tais pulsos são sobrepostos a uma *staircase wave* com um potencial fixo e com um período de pulso definido. Como resultado, o pulso adiantado da onda quadrada coincide com o degrau da *staircase wave*. (Figura 11) (Zhurauski, P., 2017)

Utilizando esse sistema, a corrente é calculada pelo sistema levando em consideração a diferença entre a corrente direta e a reversa. Esta corrente é calculada no final de cada meio ciclo, respetivamente. Usando um processo de subtração, a corrente de segundo plano é suprimida. Como resultado, a altura da corrente de pico obtida pode ser considerada como o resultado da reação redox (processo faradaico) que é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas. (Zhurauski, P., 2017)

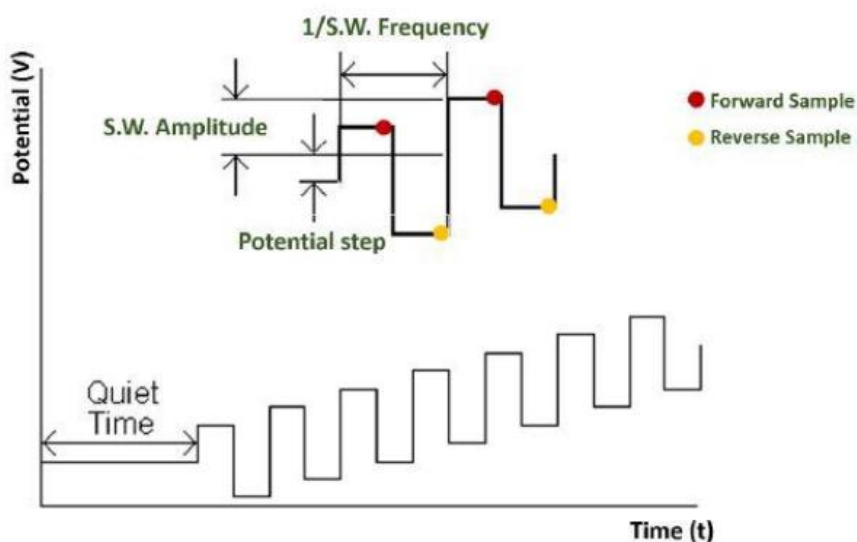


Figura 11. Forma de onda da variação de potencial da voltametria de onda quadrada. (Zhurauski, P., 2017)

Com esta forma de onda, a resposta atual é medida para a excitação potencial, uma vez em cada pulso para a frente e uma vez em cada pulso reverso. Usando essa técnica, três possíveis gráficos podem ser gerados: corrente direta em função do potencial, corrente reversa em função do potencial ou diferença atual em função do potencial, que é tipicamente utilizado para a maioria das

aplicações analíticas. O voltamograma resultante produz picos para cada espécie eletroativa presente, sendo a altura do pico proporcional à concentração das espécies na solução. (Scott, K., 2016)

Uma vantagem da SWV é o facto de ser uma técnica pulsada e, portanto, poder discriminar a corrente não-faradaica e eliminá-la, ao contrário da CV de varredura rápida que introduz uma grande corrente capacitiva de fundo. (Scott, K., 2016)

2.2.2.5 Voltametria de Pulso Diferencial

A Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) é uma técnica voltamétrica, semelhante à SWV, com uma discriminação aprimorada das correntes faradaicas (transferência de eletrões de e para um eléctrodo), onde o potencial aplicado, que consiste em pequenos pulsos, é sobreposto a uma forma de onda em escada. (Scott, K., 2016)

Nesta técnica, subtrai-se da corrente medida no final de uma etapa a corrente medida antes da etapa. Para isso, pulsos de potencial são sobrepostos a uma rampa *staircase*. (Figura 12) (Scholz, F., 2015)

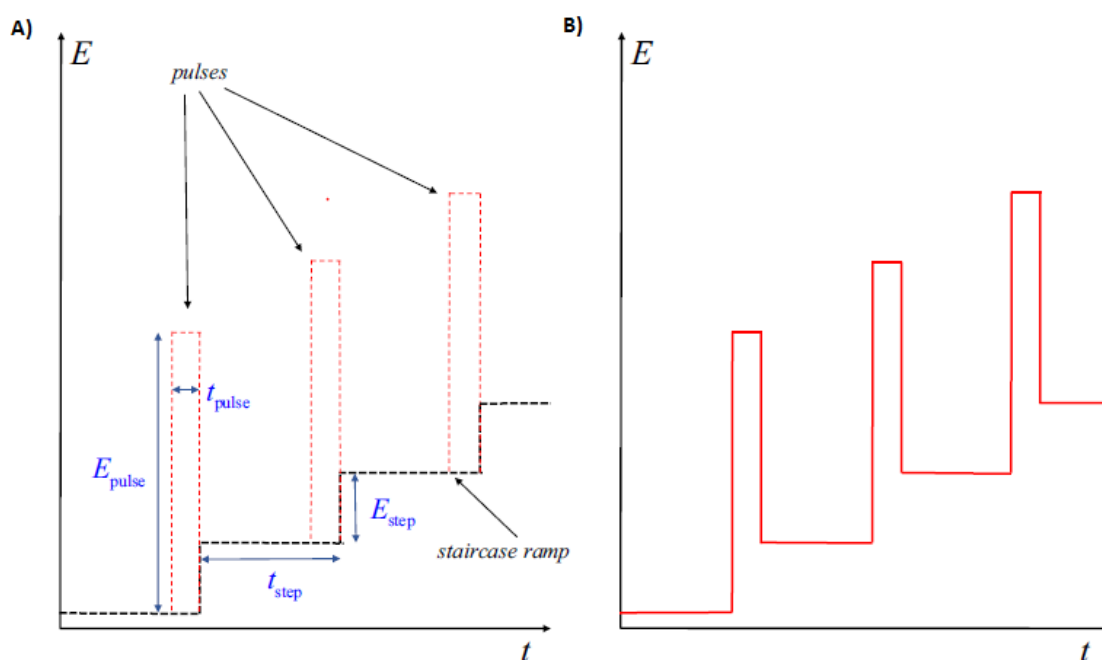


Figura 12. Voltametria de Pulso Diferencial A) Sobreposição de uma rampa *staircase* com pulsos de potencial. B) Gráfico do potencial em função do tempo resultante dessa sobreposição. (Scholz, F., 2015)

A DPV é uma técnica muito utilizada pois permite determinar compostos eletroativos numa gama de 10^{-7} - 10^{-8} mol L⁻¹.

2.3 Biomarcadores

Os biomarcadores são definidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pelo Instituto Nacional de Saúde e Bem-estar como uma característica que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. O biomarcador mostra uma característica física específica ou uma alteração mensurável biologicamente produzida pelo corpo, ligada a uma determinada doença ou a uma condição de saúde específica. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Medidas precisas desses biomarcadores têm vindo a ser propostas para facilitar a classificação de células tumorais que decifram as informações do prognóstico. Não obstante, o conhecimento aprofundado do tipo de cancro em questão é necessário para um possível diagnóstico, e responsável pela seleção de melhores tratamentos que maximizem a sua eficiência e minimizem os riscos e a mortalidade. (Mittal, S., et al, 2017)

Para o reconhecimento de um biomarcador, são utilizados elementos de reconhecimento chamados biorreceptores que interagem com os biomarcadores e produzem uma resposta dependente da dose relativa. Porém, é necessária uma seleção rigorosa do tipo de biotransdutor que depende do tipo de sinal bioquímico produzido pela interação do biorreceptor e do biomarcador. (Mittal, S., et al, 2017)

No campo da deteção de biomarcadores, novos sensores de bioafinidade têm sido extensivamente investigados e aplicados com sucesso como uma solução para vários problemas encontrados, tornando-se ferramentas analíticas úteis. Na verdade, os biossensores utilizados como transdutores-recetores integrados podem ultrapassar inúmeras dificuldades, fornecendo rápida e seletiva informação analítica. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Recetores biomoleculares (como anticorpos e enzimas) têm sido substituídos por elementos de reconhecimento artificiais, sendo estes maioritariamente tão seletivos como os naturais. Em particular, polímeros molecularmente impressos (*MIPs - Molecularly Imprinted Polymers*) são materiais sintéticos inteligentes capazes de imitar o reconhecimento biológico. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

2.3.1 Biomarcadores para o Carcinoma Hepatocelular

Como abordado anteriormente, o CHC é um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo, estando associado à deteção tardia da doença bem como à falta de terapias eficientes para estágios avançados da doença. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

Neste sentido, como a maioria dos casos de CHC surge de patologias anteriores, a utilização de biomarcadores em indivíduos de alto risco é uma abordagem essencial para a deteção precoce e melhoria dos resultados dos pacientes. São então urgentemente necessários biomarcadores mais sensíveis para reduzir a mortalidade causada pelo cancro no fígado. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

Embora muitos biomarcadores moleculares tenham sido associados ao CHC, poucos são os que tiveram impacto clínico para esta doença. Duas das técnicas mais utilizadas atualmente para identificar biomarcadores de CHC são a análise proteómica e a análise glicómica. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

A análise proteômica consiste na identificação de proteínas que são alteradas no sêrum dos pacientes com CHC. Uma das proteínas mais utilizadas atualmente como biomarcador é a AFP. Todavia, o uso desta proteína como biomarcador juntamente com o uso do US aumenta consideravelmente o seu potencial na detecção de CHC. Outra proteína também utilizada como biomarcador é a *desgamma carboxyprotbrombin* (DCP) e estudos sugerem que poderá ser um melhor biomarcador que a AFP para tumores de maiores dimensões assim como para tumores decorrentes de etiologia viral. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

Por outro lado, a análise glicômica baseia-se na identificação e caracterização de glicanos (estruturas de açúcar) ligados a moléculas maiores como proteínas. Existe uma grande variedade de estruturas glicanas que podem estar ligadas a proteínas, e há bastantes evidências que indicam que essas estruturas podem ser alteradas na presença de cancro. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

Relativamente à análise glicômica, vários estudos sugerem que a proteína AFP ligada a α 1,6 *core fucosylated glycan*, conhecida como AFP-L3, é um melhor biomarcador que a AFP por si só. Isto verifica-se uma vez que há evidências substanciais que sugerem que o aumento da fucosilação (que consiste numa alteração específica no CHC) ocorre diretamente no tumor e também que desempenha um papel fulcral no desenvolvimento do cancro. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

Muitos outros biomarcadores têm vindo a ser observados através destes dois métodos, mas poucos são aqueles que desempenham um papel clínico relevante na atualidade. (Black, A., e Mehta, A., 2018)

2.3.2 Alfa-fetoproteína

A Alfa-fetoproteína (AFP) é uma proteína oncofetal, com um peso molecular de cerca de 70 kDa, raramente encontrada em órgãos adultos saudáveis, mas é produzida pelos hepatócitos fetais imediatamente após o nascimento. O seu nível sérico diminui gradualmente e atinge o valor de 10 ng/mL em aproximadamente 300 dias. Vários estudos têm considerado a AFP como um marcador de diagnóstico específico para o carcinoma hepatocelular (CHC), e o seu nível de corte é de 20 ng/mL em pessoas com mais de 1 ano de idade. Deste modo, existe uma correlação direta entre a concentração de AFP e a progressão do CHC, desempenhando um papel fundamental na detecção, diagnóstico e prevenção de cancro no fígado. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Recentemente, foi também descoberto que o nível de AFP aumenta em mulheres grávidas, em pacientes com cancro da mama, trissomia 18 e trissomia 21. Portanto, para um diagnóstico específico do CHC, os registos médicos dos pacientes devem ser tidos em consideração. Para além disto, determinar o nível exato de AFP na gravidez é muito importante e é usado para determinar os distúrbios genéticos exatos do feto. (Heiat, M. e Negahdary, M., 2019)

Existem vários métodos capazes de detetar AFP, destacando-se a eletroforese, ressonância de plasma de superfície (RPS), ensaios enzimáticos, colorimetria, quimiluminescência, métodos de fluorescência, espectroscopia Raman intensificada por superfície (*SERS - Surface-enhanced Raman Spectroscopy*), e imunoensaios eletroquímicos. No entanto, a maioria destas abordagens são dispendiosas, demoradas ou exigem instrumentos altamente sofisticados. Neste sentido, é de extrema importância encontrar formas de monitorizar os biomarcadores do cancro no fígado, que tragam também benefícios a nível económico e social a longo prazo. (Heiat, M. e Negahdary, M., 2019)

2.4 Polímeros Molecularmente Impressos

A impressão molecular é uma abordagem simples e flexível para a construção de recetores artificiais com capacidade de reconhecimento específico para determinadas moléculas alvo. (Karfa, P. et al, 2016)

Este processo, representado na Figura 13, envolve a formação de um complexo entre uma dada molécula alvo (*template*) e monómeros funcionais, incluindo ou não um *crosslinking*, por meio de interações covalentes ou não covalentes, que são então submetidas à polimerização para formar uma espécie de molde. A remoção subsequente do *template* leva à formação de cavidades no polímero que possuem a forma e a orientação exatas dos grupos funcionais para permitir o reconhecimento seletivo das espécies impressas. O resultado final é um MIP, ou seja, um polímero molecularmente impresso, com afinidade em relação ao modelo, seja pelos seus locais de ligação disponíveis ou pelo formato e tamanho das cavidades. (Lopes, D., 2017)

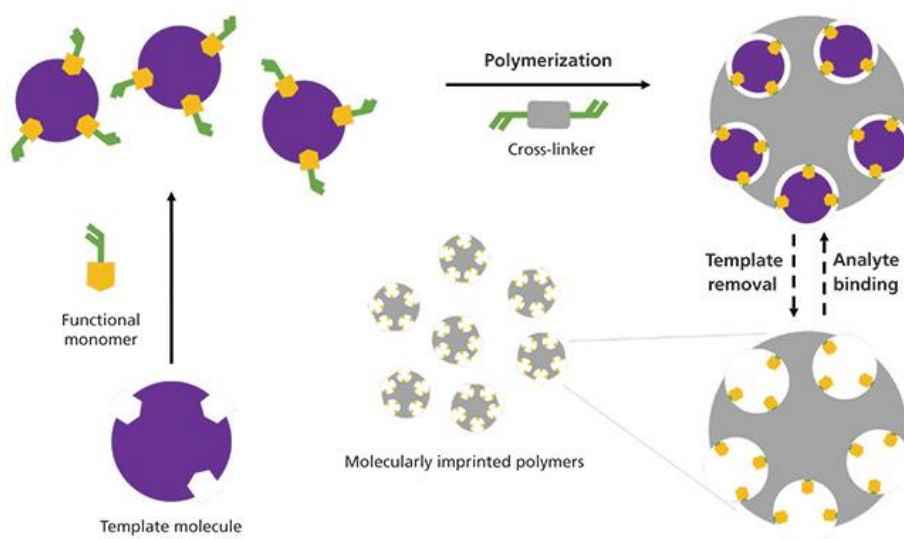


Figura 13. Representação esquemática da impressão molecular.

(Bitas, D. e Samandiou, V., 2018)

A forma como os monómeros se ligam ao *template* (ligações covalentes ou não covalentes) tem as suas vantagens e desvantagens. Nas ligações covalentes, existe uma maior homogeneidade nas ligações, menos locais não específicos e permite uma maior variedade de condições de polimerização. No entanto, resulta em maiores dificuldades na remoção do *template* e os processos de ligação e remoção são mais lentos. Estas ligações resultam numa melhor qualidade de impressão. (Pacheco, J., 2017).

Por sua vez, nas ligações não covalentes (feitas por pontes de hidrogénio, forças de Van der Waals, interações iónicas ou hidrofóbicas entre monómero e *template*), têm uma maior facilidade de remoção do *template*, processos de ligação rápidos e não necessitam de síntese de ligação covalente prévia. Contudo, cria uma maior heterogeneidade de locais de ligação, mais locais não específicos e exige mais cuidados nas condições de polimerização. Esta é, no entanto, o tipo de ligação mais utilizada. (Pacheco, J., 2017)

Uma vez que o objetivo de um MIP é detetar e reconhecer a molécula alvo, após a polimerização, esta é removida por procedimentos de lavagem com solventes adequados, sendo eles orgânicos ou inorgânicos.

Concluído o processo de impressão, a eficiência da impressão pode ser avaliada por dois parâmetros principais: capacidade de adsorção (Q , $\mu\text{g mg}^{-1}$) (equação 1), que determina a quantidade de moléculas adsorvidas por peso de polímero; e eficiência de impressão ou fator de impressão (IF) (Equação 2), que corresponde à razão entre as capacidades de adsorção de polímero com impressão molecular (MIP) e de polímero sem impressão (NIP – *Non Imprinted Polymer*). (Lopes, D., 2017)

$$Q = \frac{(C_i - C_f)V}{W} \quad 1$$

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad 2$$

Na equação 1, C_i e C_f correspondem, respetivamente, à concentração inicial e final da solução *template* ($\mu\text{g mL}^{-1}$), V representa o volume da solução *template* (mL) e W corresponde ao peso do MIP ou NIP (mg). Através desta equação, verifica-se que a capacidade de adsorção é inversamente proporcional ao peso do MIP. (Lopes, D., 2017)

Na equação 2, Q_{MIP} e Q_{NIP} correspondem respetivamente à capacidade de adsorção do MIP e NIP. O fator de impressão será tão maior quanto menor for capacidade de adsorção do NIP e quanto maior for a capacidade de adsorção do MIP. (Lopes, D., 2017)

Para além destes parâmetros, o limite de deteção (*LOD – Limit of Detection*) e o limite de quantificação (*LOQ – Limite of Quantitation*), devem ser levados em especial atenção. O primeiro (LOD), consiste na concentração mais baixa de um analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, nas condições definidas do ensaio. O LOQ é a concentração mais baixa de um analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições definidas do ensaio. (Shrivastava, A. e Gupta, V., 2011)

Estes parâmetros podem ser determinados através da equação 3:

$$LOD/LOQ = F * \frac{SD}{m} \quad 3$$

Nesta equação, F corresponde a um fator de 3.3 para o LOD e 10 para o LOQ. SD corresponde ao desvio padrão da regressão linear e “ m ” corresponde ao declive da reta. (Shrivastava, A. e Gupta, V., 2011)

Os MIPs podem ser preparados para qualquer tipo de substância, como proteínas, iões inorgânicos, medicamentos, ácidos nucleicos, entre outras. Possuem várias vantagens em comparação com as biomoléculas naturais, uma vez que são estáveis, específicas, de baixo custo, fáceis de preparar e miniaturizar. Todas estas características tornam os MIPs alternativas promissoras aos biorreceptores naturais usados na tecnologia de sensores. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Estes são frequentemente compostos por monómeros acrílicos e metacrílicos, que geralmente produzem polímeros com capacidade superior de ligação e reconhecimento. Isto deve-se, em grande parte, à sua flexibilidade em selecionar as funcionalidades apropriadas (devido à grande quantidade de compostos polimerizáveis disponíveis comercialmente) e protocolo de polimerização. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Outros grupos químicos atualmente usados na preparação de MIPs são poliácridamidas, poliuretanos, siloxanos e polímeros conjugados como polianilina e polipirrol. Existem também exemplos de MIPs produzidos a partir de óxidos inorgânicos. Tu, X. et al. 2016 sintetizaram uma série de MIPs de alto desempenho através da impressão molecular por afinidade fotolitográfica por boronato para imunoenaios de glicoproteínas em amostras reais complexas. Uma lista dos monómeros funcionais usados em sensores baseados em MIP para análise de marcadores de cancro é relatada na Tabela 1. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Tabela 1. Monómeros mais comuns e procedimentos de polimerização usados em sensores MIP para a análise de biomarcadores de cancro. Adaptada de Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017

Monómeros	Cross Linker	Processo de Polimerização	Biomarcador
MAA	EGDMA	UV	PSA
Dopamina	-	Eletroquímica	PSA
AAm	MBAAm	Radical	PSA, AFP
Ácido Itacónico	EGDMA	Térmica	PSA
NIPA Am	BAAm	Térmica	AFP
APA+NIPAAm+silane@CDs	MBAAm	Térmica	AFP
Pirrol	-	Eletroquímica	CEA, AFP
	-	Ultrassom	Bilirubin
Fenol	-	Eletroquímica	CA-125, nucleosídeos modificados
Etileno+Alcool vinil	-	Térmica	NMP22
AAHPhPA	EGDMA	Térmica	Calcitonin
MATrp+HEMA	-	UV	Bilirubin
BTBA+CEBTMB	HTBT	Eletroquímica	Neopterin
AAm+DMAEM	-	UV	Modified nucleosides

A crescente necessidade de materiais estáveis e de baixo custo no fabrico de dispositivos integrados para testes no local de atendimento (*POCT - point-of-care testing*) levou a um crescente interesse pela aplicação de MIPs como elemento de reconhecimento molecular em sensores, explorando as suas características de ligação seletivas. A ligação do analito alvo ao MIP pode ser detetada por uma alteração na massa de sensores acústicos, por uma alteração no índice de refração nos sensores de ressonância plasmónica de superfície (*SPR - Surface Plasmon Resonance*) ou por EIS em sensores eletroquímicos. No entanto, muitos analitos que não possuem propriedades óticas ou eletroquímicas também podem ser detetados explorando a capacidade dos MIPs de gerar sinais óticos ou eletroquímicos em resposta à ligação do *template* aos grupos funcionais no local de impressão. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Uma outra limitação associada ao desenvolvimento de sensores MIP é a dificuldade em integrá-los em transdutores. A forma mais direta e inteligente de superar esse obstáculo é a eletropolimerização, na qual o MIP pode ser sintetizado *in situ* numa superfície do eletrodo,

simplesmente controlando a espessura da camada pela quantidade de carga que o atravessa. Esta abordagem é particularmente útil para o fabrico de pequenos dispositivos para diagnóstico clínico, controle ambiental e para as indústrias farmacêuticas. (Selvolini, G. e Marrazza, G., 2017)

Relativamente às suas aplicações, durante muito tempo, os MIPs eram utilizados com mais frequência em separações baseadas em afinidade para pré-tratamento e cromatografia de amostras. Entretanto, passaram a ser também amplamente utilizados em sensores e biossensores. (Chen, L. et al, 2016)

Ultimamente, os MIPs têm sido aplicados em diversos campos, destacando-se o ambiental, alimentar, biológico e médico. Embora tenham benefícios significativos e diversas aplicações, ainda existem inúmeros desafios a superar. (Chen, L. et al, 2016)

2.4.1 Técnicas de Impressão

Existem diferentes técnicas para imprimir um determinado *template*, como esquematizado na Figura 14.

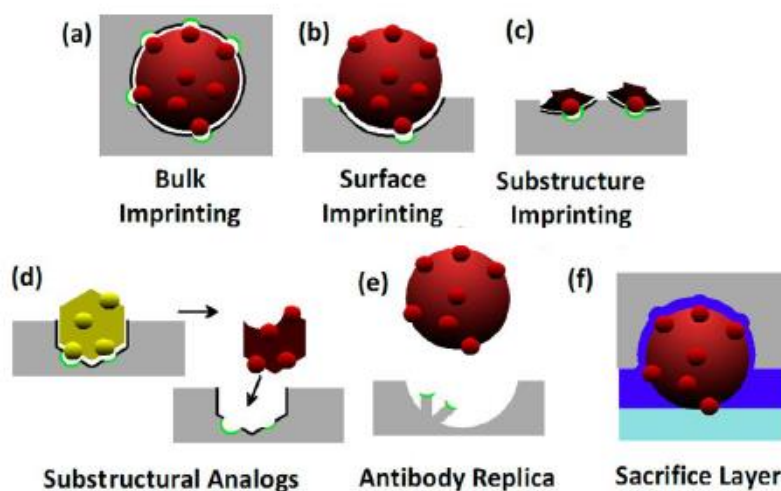


Figura 14. Técnicas de impressão para a construção de um MIP. (Lopes, D., 2017)

Na técnica *Bulk Imprinting* (Figura 14.a), quando uma molécula modelo é adicionada ao polímero, as cavidades seletivas são distribuídas por todo o volume dentro das camadas internas do polímero. Esta abordagem pode representar um problema para concluir a remoção do *template*, já que as moléculas alvo com tamanhos grandes são mais difíceis de remover. (Lopes, D., 2017)

A técnica *Surface Imprinting* (Figura 14.b) envolve apenas a impressão na superfície de um material. Este tipo de impressão em superfície tem sido o objetivo de muitos investigadores, devido à maior facilidade com que a molécula alvo é removida, comparada à impressão em *Bulk*. (Lopes, D., 2017)

Por sua vez, a técnica *Substructure Imprinting* (também conhecida por *Epitope Imprinting*) (Figura 14.c), é uma alternativa que não envolve toda a macromolécula como *template*, mas apenas domínios

relevantes (epítomos). Estes são usados no processo e o polímero pode reconhecer toda a proteína. (Lopes, D., 2017)

Os restantes métodos representados (Figura 14. d, e, f) não utilizam o *template* diretamente.

O método de réplica de anticorpos (*Antibody Replica*) foi realizado por Schirhagl, R. et al. 2009, os quais desenvolveram um polímero modelado com imunoglobulina para projetar réplicas plásticas reais do anticorpo inicial. O grupo constatou que o reconhecimento molecular com base na ligação não covalente, como ligações de hidrogénio ou interações hidrofóbicas, ocorre e é um comportamento esperado para o reconhecimento imune que geralmente ocorre num local definido do recetor do antigénio respetivo. Os materiais impressos resultantes reproduziram claramente a forma da imunoglobulina humana e os detalhes dos locais de ligação específicos a nível molecular.

O método da camada de sacrifício (*Sacrifice Layer*) foi estudado por Agarwal, R. et al. 2012, que decidiram enfrentar os desafios no fabrico de *nanocarriers*, desenvolvendo uma camada de libertação de sacrifício baseada em biopolímeros em combinação com um material melhorado de *nanocarriers*. Concluíram então que a camada de sacrifício melhorou a escalabilidade e a facilidade de modificação da superfície de impressão devido à sua solubilidade comutável através da simples troca de iões entre catiões monovalentes e bivalentes. Esse processo pode possibilitar a realização da bio-nanoimpressão eficiente e em larga escala. (Lopes, D., 2017)

No entanto, todas estas técnicas de impressão enfrentam vários obstáculos, nomeadamente no que se refere à polimerização.

2.4.2 Técnicas de Polimerização

A polimerização é definida como a ligação de pequenas moléculas funcionais para criar uma longa rede 3D que pode ser produzida pela aplicação de diferentes estímulos externos, incluindo calor, luz, carga e produtos químicos. (Uzun, L. e Turner, A., 2015)

Estudos afirmam que apenas uma pequena parte de todos os sensores eletroquímicos MIPs eram inicialmente produzidos por eletropolimerização, enquanto que a maioria era obtida por polimerização por radicais livres padrão. A eletropolimerização possui inúmeras vantagens sobre os métodos tradicionais de preparação, como aderência superior à superfície do transdutor, velocidade de preparação, possibilidade de preparação aquosa, bem como controle da espessura e morfologia da camada. No entanto, há áreas em que são necessários avanços na eletropolimerização. Isso inclui a remoção de modelos impressos e a incapacidade de otimizar simultaneamente as condições de impressão e ligação, como a solubilidade e a minimização das interações entre o solvente, o alvo e o monómero. (Crapnell, R. et al, 2019)

Em geral, os métodos de polimerização aplicados para a produção de polímeros regulares podem ser modificados para criar MIPs sob as condições físico-químicas necessárias para o devido processo de impressão. Porém, como o espaço disponível não permite apresentar todas as abordagens de polimerização, apenas os exemplos mais importantes serão discutidos. (Uzun, L. e Turner, A., 2015)

A eletropolimerização é um procedimento baseado na deposição, no qual uma camada de polímero condutor é formada sobre o eletrodo na presença do *template* pretendido. Estes revestimentos eletroquímicos são criados com o auxílio de três eletrodos (WE, RE e AE) dentro de

uma solução contendo um monómero, um solvente e um eletrólito de suporte, todos os quais são vitais para a morfologia da superfície do filme polimérico. Esta técnica é conseguida através das técnicas voltamétricas referidas no capítulo 2.2.2. (Crapnell, R. et al, 2019)

Contudo, os biossensores baseados em MIP podem fornecer baixa qualidade de sinal devido à variação na distância das cavidades impressas da superfície do sensor. Para evitar esse problema e aprimorar o sinal, vários investigadores concentraram-se no desenvolvimento de filmes poliméricos ultrafinos na superfície do sensor. Ao reduzir a espessura do filme, a variação da distância da cavidade impressa numa rede 3D pode ser limitada. Uma solução alternativa para esse problema é colocar o iniciador na superfície do sensor, procedendo-se seguidamente à polimerização da superfície. (Uzun, L. e Turner, A., 2015)

Outro problema que afeta o desempenho de um MIP é a compatibilidade da solução da superfície do material. Superfícies incompatíveis podem causar limitações de difusão, levando a problemas relacionados com o tempo de resposta do sensor e de qualidade do sinal. (Uzun, L. e Turner, A., 2015)

A *reversible addition-fragmentation chain transfer* (RAFT) e a *atom transfer radical polymerisation* (ATRP), também conhecidas como polimerização viva, são ótimas técnicas para sintetizar polímeros impressos com o mesmo comprimento de cadeia e peso molecular (Pan et al., 2010; Peeters et al., 2014; Zhao et al., 2012). Essas técnicas permitem melhorar as propriedades do sensor, como homogeneidade da superfície, espessura, resposta e compatibilidade com a água. (Uzun, L. e Turner, A., 2015)

A deposição de vapor químico iniciada (*iCVD - initiated Chemical Vapour Deposition*) é uma interessante técnica de polimerização para sintetizar nanotubos poliméricos a partir de monómeros funcionais tradicionais, que também permite aos investigadores projetar polímeros funcionais para diversas aplicações, como aplicações de biossensores, revestimentos e bioafinidade. (Uzun, L. e Turner, A., 2015)

2.4.3 MIPs e Proteínas

Um dos desafios na utilização de MIPs que atualmente tem vindo a ser bastante discutido consiste na impressão molecular de bio-macromoléculas e, em particular, de proteínas, devido à sua complexidade.

Ao imprimir proteínas, há uma série de questões-chave a serem abordadas que estão ausentes quando se fala de pequenas moléculas, e estão relacionadas ao tamanho molecular, complexidade, flexibilidade conformacional e solubilidade:

- **Tamanho Molecular:** As camadas tradicionais de polímeros tendem a ser relativamente densas, dificultando a impressão ou extração de um *template* macromolecular. Essa ligação inadequada e aprisionamento permanente resultam num reconhecimento inadequado da macromolécula. A solução destes problemas geralmente exige a quebra e reconstrução das camadas do polímero, podendo levar à exposição dos locais de ligação e à sua danificação;

- **Complexidade:** Ao contrário das moléculas de menores dimensões, as proteínas apresentam um grande número de locais de reconhecimento de potencial numa área superficial relativamente grande. Diferentes regiões de uma proteína exibem propriedades físico-químicas distintas e, portanto, podem surgir problemas com o reconhecimento e a reatividade cruzada. Aceita-se que os MIPs exibam maior seletividade quando o número de pontos de interação é pequeno, mas as próprias interações são fortes. Interações fracas múltiplas são menos propensas a produzir um MIP altamente específico e tendem a favorecer ligações menos específicas;
- **Flexibilidade Conformacional:** Alguns problemas nas condições de polimerização podem surgir, ao serem aplicados procedimentos tradicionais de impressão de proteínas. As condições não fisiológicas frequentemente empregues durante a polimerização podem levar à desnaturação das proteínas ou forçá-las a conformações ou agregados que não são adequados à impressão. Essa flexibilidade pode afetar a seletividade, uma vez que uma proteína pode alterar a sua conformação para se ajustar a uma impressão formada para um modelo alternativo. Este efeito pode acontecer especialmente com famílias de proteínas ou com aquelas que foram modificadas seletivamente;
- **Solubilidade:** Um dos maiores desafios passa pela escolha limitada do solvente. A maioria das impressões moleculares ocorre em solventes orgânicos apolares, na tentativa de maximizar as interações eletrostáticas, como a ligação de hidrogénio, na qual muitos MIPs dependem do reconhecimento. No entanto, a baixa estabilidade e solubilidade da maioria das proteínas em solventes apolares limita o seu uso. Isso limita também a escolha de monómeros, pois muitos deles são insolúveis ou parcialmente solúveis em água. A água está longe do solvente ideal para a impressão molecular convencional, porque competirá e potencialmente interromperá qualquer local de ligação de hidrogénio no *template* e nos monómeros. (Turner W et al, 2006)

É evidente que o tamanho, complexidade das proteínas e seu comportamento em solução desempenharão um papel importante na impressão das moléculas. No entanto, os principais fatores que limitam este trabalho são os efeitos que os solventes orgânicos, normalmente usados para a impressão molecular, têm sobre a estrutura e as propriedades da superfície das proteínas.

3 Procedimento Experimental

Neste capítulo serão identificados os reagentes, soluções e equipamentos utilizados para a realização do trabalho de investigação desenvolvido.

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na execução do trabalho experimental, foram usados tal como foram recebidos, sem qualquer purificação ou tratamento adicional.

Hexacianoferrato (II) de potássio (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), hexacianoferrato (III) de potássio (Sigma-Aldrich, Puriss.p.a.), fosfato de potássio monobásico (Riedel-de Haën, puriss) hidrogenofosfato de di-potássio (Riedel-deHaën, puriss), ácido sulfúrico (Panreac 96% PA-ISOL), cloreto de potássio (VWR chemicals, 99.8%) , ácido acético glacial (VWR), dodecilo sulfato de sódio (SDS, Panreac).

A proteína AFP (1.57 mg/ml, Fitzgerald) foi obtida a partir de sêrum de cordão umbilical humano, fornecida na forma líquida em Tris (Trisaminametano), 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7.2, contendo 0.09% de azida de sódio (ou triniteto de sódio).

O polímero utilizado foi o pirrol (Sigma Aldrich, 98%).

3.2 Soluções

Para a realização das medições eletroquímicas prepararam-se soluções de tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, juntando as quantidades apropriadas de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 e acertando o pH até ao valor desejado. Foram também preparadas soluções diárias de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0.1M.

A solução padrão AFP foi mantida no frigorífico a 4°C. A partir destas soluções foram preparadas diluições diárias de diferentes concentrações em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 mantidas no frigorífico a 4° C durante o dia de trabalho.

Diferentes concentrações de polímero (pirrol) foram preparadas diariamente em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2, aos quais se adicionou diferentes concentrações de AFP para obtenção de soluções de polimerização.

Para a extração da AFP do MIP após polimerização foram preparadas semanalmente soluções aquosas de 1% SDS com 1% de ácido acético.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada (resistividade = 18.2 MΩ/cm) obtida a partir de um sistema de ultra purificação de água Millipore (Simplicity 185).

3.3 Equipamento

Todas as medições voltamétricas foram realizadas num potenciostato/galvanostato da marca Metrohm Autolab, EQ.PSTAT 8.

A análise da impedância eletroquímica espectroscópica (*EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopic*), foi feita num potenciostato da marca Metrohm Autolab, EQ.PSTAT 5.

Estes dois equipamentos acima referidos foram controlados a partir do *software* de eletroquímica NOVA da Metrohm Autolab, versões 1.11 e 1.6.

Foram usados elétrodos impressos de ouro (Au-SPE, da marca Metrohm DropSens, modelo DRP-C223BT), bem como de carbono (C-SPE, da marca Metrohm DropSens, modelo DRP-110).

Para a medição de líquidos e preparação de soluções utilizou-se material volumétrico de vidro como balões volumétricos de 20 mL e 50 mL e gobelés. Foram também utilizadas micropipetas Eppendorf Research plus de 10 μL , 200 μL e 1000 μL e micropipetas VWR 10 μL , 20 μL , 200 μL e 1000 μL .

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de 0.00001 g.

Para auxiliar a dissolução de algumas soluções utilizou-se o equipamento Banho Ultrassons-HD com aquecimento (5°C a 80°C), TP.ULSON.04. Foi também utilizado um termostato de bloco TEMBLOC, TB01.

3.4 Preparação do Polímero Molecularmente Impresso

A construção do sensor MIP foi realizada por eletropolimerização diretamente da superfície dos elétrodos Au-SPE.

Para isso, 50 μL de solução de polimerização (contendo pirrol e AFP) foram colocados no eléctrodo, procedendo-se de seguida a formação de um filme polimérico usando Voltametria Cíclica numa gama de potencial entre 0.0 e +1.0V, durante 20 ciclos com uma velocidade de varrimento de 100 mV/s.

Após a polimerização, os elétrodos foram lavados com água pura e posteriormente secos.

Seguidamente, colocou-se 50 μL de tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 em ambos os elétrodos e aplicou-se Voltametria de Pulso Diferencial, numa gama entre 0.0 e 1.2V.

Por último precedeu-se à extração da AFP impressa no filme polimérico usando um solvente de extração. Alíquotas de 10 μL foram sucessivamente colocadas no eléctrodo de trabalho durante 2h.

O mesmo procedimento foi aplicado na preparação de polímeros não impressos (NIP), sem colocar AFP na solução de polimerização.

3.5 Medições Eletroquímicas

Para o estudo do comportamento eletroquímico da AFP na superfície de elétrodos de C-SPE procedeu-se a estudos por CV de uma solução de AFP 5 µg/ml em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2, com uma gama entre -0.2 e +1.2V. Realizou-se ainda uma curva de calibração medindo-se o pico obtido por DPV entre 0.0 e +1.2V em função da concentração de AFP.

As interações entre a proteína AFP e o NIP e MIP, foram avaliadas através de medições indiretas, usando para isso o sinal eletroquímico de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0,1M. Usando esta solução, precedeu-se à medição do sinal de redução por DPV de +0.4 a -0.2V. De seguida, o MIP ou NIP foram lavados com água ultrapura e secos. 5 µL de AFP foram então colocados nos elétrodos por um período de 20 min ao fim do qual os elétrodos foram de novo lavados com água ultrapura e secos. Por fim realizou-se uma nova DPV em $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0.1M. O sinal obtido corresponde à diferença entre o pico inicial e o pico após incubação.

Para caracterizar o NIP e o MIP durante a construção dos sensores e de todo o processo de otimização de resultados, foram ainda usadas técnicas voltamétricas como a CV e EIS, usando sempre como solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em KCl 0,1M.

4 Resultados Obtidos e Discussão

Neste capítulo serão referidos todos os resultados obtidos, procedendo-se também à discussão desses mesmos resultados.

4.1 Caracterização do comportamento eletroquímico da AFP

Inicialmente procedeu-se ao estudo do comportamento eletroquímico da AFP, de forma a avaliar se a proteína seria ou não eletroativa.

Como o objetivo final do trabalho é o desenvolvimento de um sensor para a realização de testes rápidos, de uma forma simples, com fácil utilização e que possa ser descartável, optou-se por executar o trabalho em elétrodos comerciais denominados “*screen printed (SPE)*”. Uma das principais vantagens da utilização destes elétrodos é o seu tamanho reduzido, permitindo que o volume da amostra seja baixo, cerca de 30 a 40 μL . Esta característica é importante quando se pretende analisar amostras biológicas. Além disso a sua integração em dispositivos eletrónicos portáteis é fácil, sendo indicados para o desenvolvimento de aplicações de testes rápidos.

Para estudar o comportamento eletroquímico da AFP usou-se elétrodos de carbono (C-SPE).

4.1.1 Estudo por Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico de uma solução de AFP 10 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 foi estudado por voltametria cíclica. Os resultados obtidos estão representados na Figura 15.

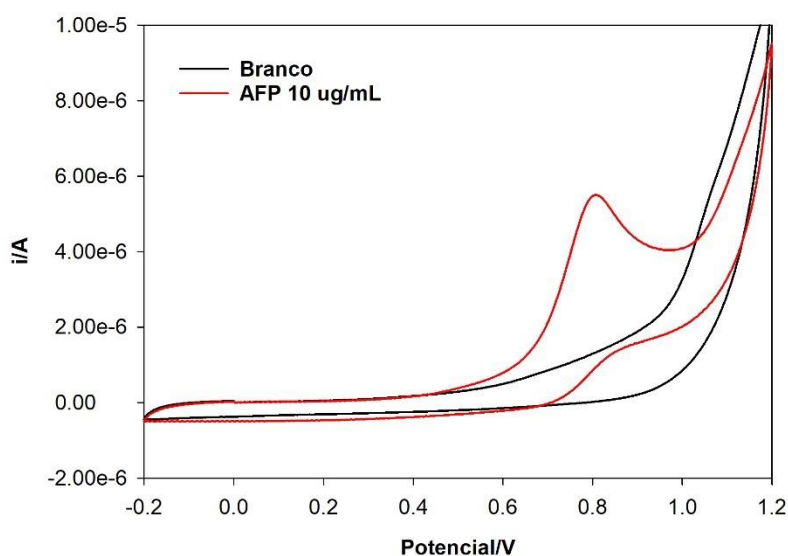


Figura 15. Comportamento eletroquímico da AFP 10 $\mu\text{g/mL}$ por voltametria cíclica em tampão fosfato 0.1M pH 7.2 em elétrodos C-SPE. Velocidade de varrimento de 100 mV/s

Como se pode observar existe uma diferença entre o sinal branco (controlo) contendo apenas tampão fosfato (pH 7.2), e o sinal contendo a solução de proteína na gama de potenciais entre -0.2 e +1.2V. Nesta gama verifica-se um pico de oxidação aos +0.8V. Nenhum pico de redução foi observado. Nenhum outro pico foi observado para uma gama de potencial mais alargada usado a mesma concentração de AFP. Por pesquisa na literatura não se encontrou nenhum mecanismo de oxidação para a AFP.

Quando se realizam ciclos consecutivos os sinais eletroquímicos da AFP no eléctrodo de carbono tornam-se consecutivamente menores (Figura 16), sugerindo que a superfície do eléctrodo pode ser bloqueada pela adsorção da AFP e/ou evidenciando um comportamento irreversível da oxidação da proteína.

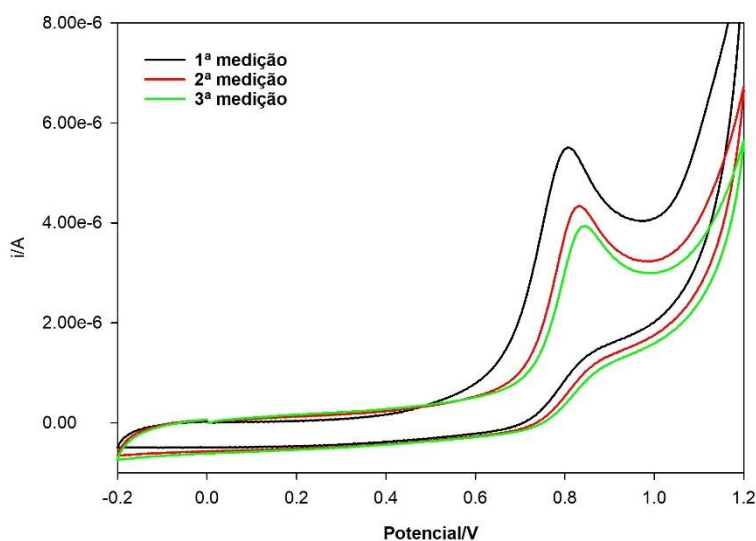


Figura 16. Voltamogramas cíclicos consecutivos para uma solução AFP 10 µg/mL em tampão fosfato 0.1M pH 7.2 em eléctrodos C-SPE. Velocidade de varrimento de 100 mV/s

Estes resultados indicam a necessidade de lavar ou descartar os eléctrodos após a 1ª medição da AFP. Deste modo, nos ensaios seguintes precedeu-se à análise do primeiro voltamograma, sendo que cada nova medição foi realizada após a lavagem do eléctrodo com água ultrapura.

Uma vez que estudar e identificar o mecanismo de oxidação de uma proteína é um procedimento demorado e complexo que vai muito além do objetivo deste trabalho, não se avançou com esse tipo de estudos

4.1.2 Influência do Tempo de Equilíbrio

Em estudos eletroquímicos onde a interação entre a espécie eletroativa e a superfície do eléctrodo possa ter uma influência grande na qualidade do sinal analítico, é importante fixar um tempo de equilíbrio.

Para o estudo da influência do tempo de equilíbrio, foram realizadas medições de 5 e 100 segundos. Os resultados demonstraram que esse tempo não teve qualquer influência no valor do pico de oxidação obtido. Deste modo foi usado o menor tempo de equilíbrio.

4.1.3 Influência da velocidade de varrimento

A dependência do potencial de pico, E_p , bem como da corrente de pico, i_p , na velocidade de varrimento, v , foram estudadas numa gama de 5 a 150 mVs^{-1} . Na Figura 17 estão representados os resultados obtidos.

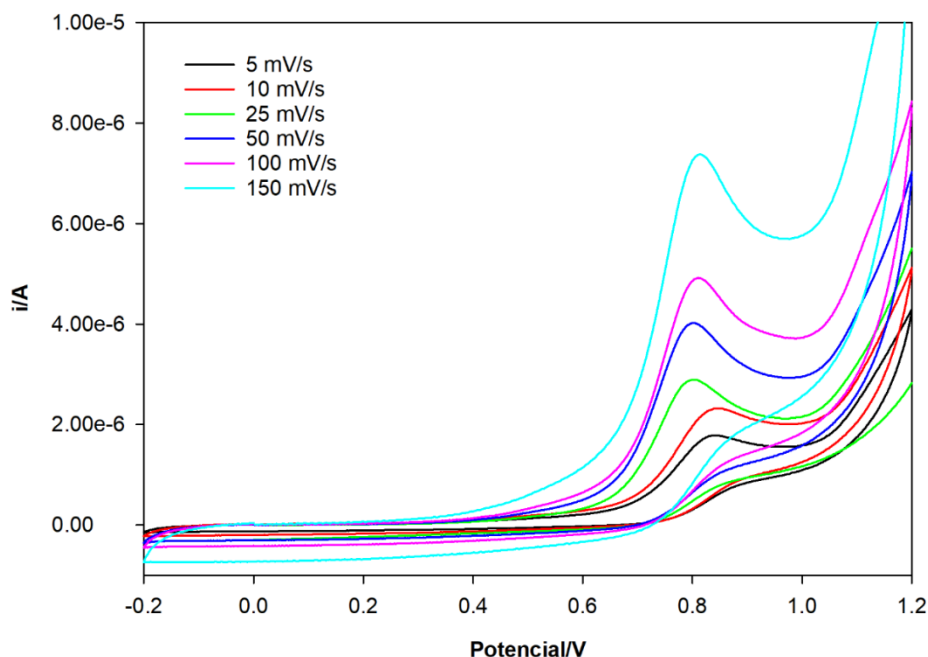


Figura 17. Voltamogramas cíclicos para uma solução de AFP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão fosfato 0.1M pH 7.2, para diferentes velocidades de varrimento

Observa-se um aumento da intensidade de corrente do pico de oxidação à medida que se aumenta a velocidade de varrimento na gama de velocidades estudadas. Para maiores velocidades de varrimento não se observaram alterações significativas na intensidade do pico. Esta característica influencia, portanto, o comportamento eletroquímico da AFP. Não se verificou nenhuma tendência de mudança de potencial de oxidação para a direita ou esquerda em função da velocidade de varrimento.

Por sua vez, analisando i_p em função de \sqrt{v} , Figura 18, verifica-se uma linearidade no gráfico obtido ($y = 3.00 \cdot 10^{-8}x + 2.00 \cdot 10^{-7}$, $R^2 = 0.9988$). Já a relação entre i_p em função de v não foi linear.

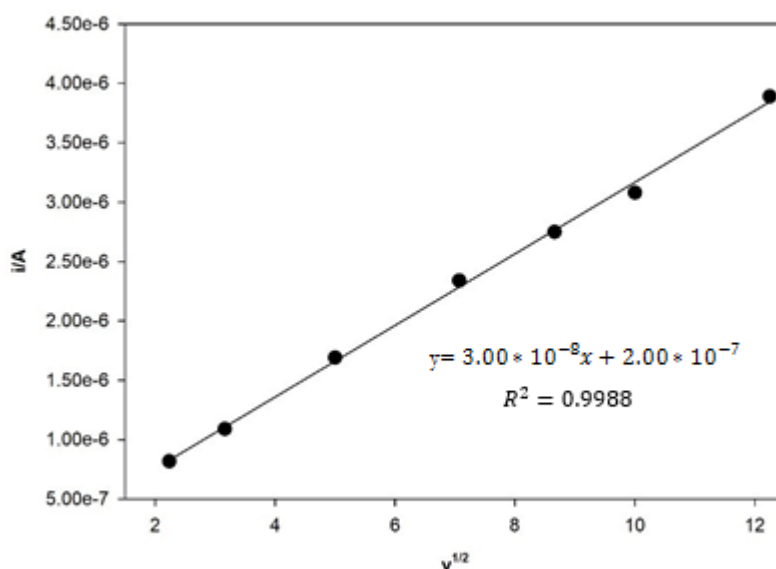


Figura 18. Gráfico de i_p em função de \sqrt{v} .

Estes resultados parecem indicar que o processo de oxidação da AFP é irreversível e controlado por difusão. Para além disso, a linearidade observada na relação entre $\log(i_p)$ e $\log(v)$, representada na Figura 19, com um declive de cerca de 0.46, é indicativa mais uma vez de um fenómeno de difusão.

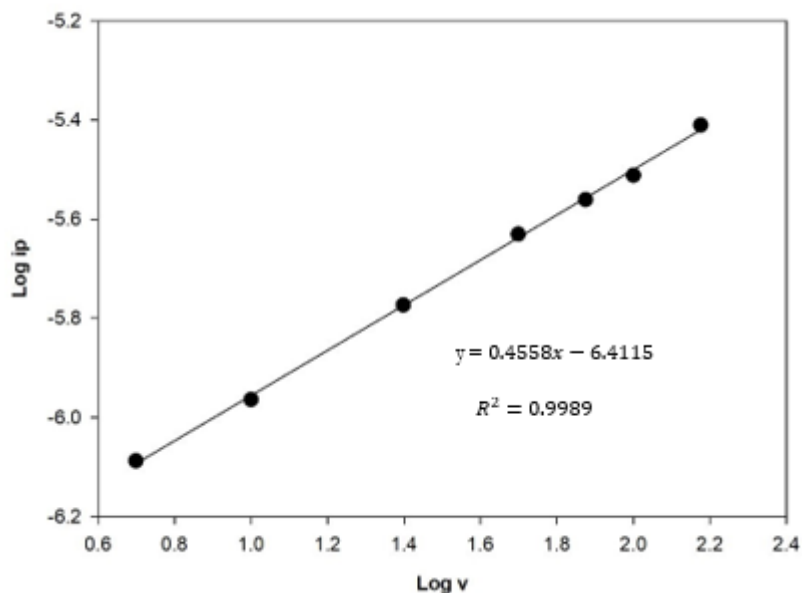


Figura 19. Gráfico de $\log(i_p)$ em função de $\log(v)$.

Tal como descrito na literatura um declive próximo de 0.5 indica um processo de difusão enquanto que um declive próximo de 1 indica um fenómeno de adsorção.

4.1.4 Curva de Calibração

De modo a estudar a linearidade da resposta analítica da AFP, foi feita uma curva de calibração.

Esta foi estabelecida aplicando-se DPV a várias concentrações de AFP: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL e 50 µg/mL. O voltamograma obtido e respetiva curva de calibração estão representados na figura seguinte.

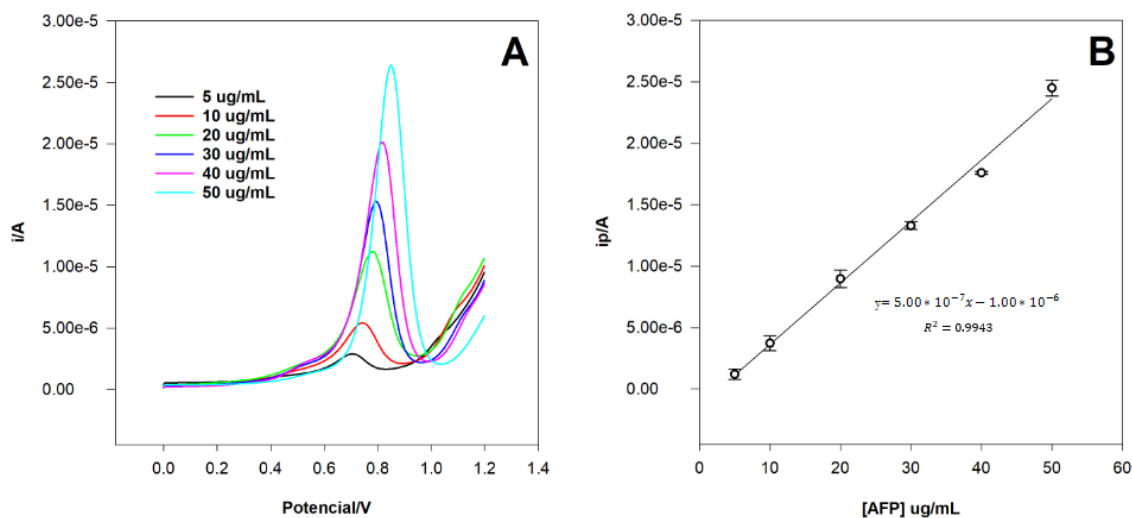


Figura 20. DPV aplicada à AFP. A) Voltamograma para diferentes concentrações de AFP. B) Curva de calibração

Através do gráfico A da Figura 20, verifica-se que quanto maior a concentração de AFP, maior o pico de oxidação obtido. A curva de calibração ($y = 5.00 \times 10^{-7}x - 1.00 \times 10^{-6}$, $R^2 = 0.9943$), gráfico B da Figura 20, mostra uma relação linear da corrente em função da concentração de AFP.

4.2 Desenvolvimento de um sensor seletivo para a AFP

Um das partes fundamentais de um sensor é o elemento de reconhecimento, que vai permitir que exista seletividade para o analito que pretendemos analisar. Neste trabalho utilizou-se a tecnologia de impressão molecular de forma a preparar um sensor seletivo para a AFP.

A técnica de preparação foi “*surface imprinting*” por eletropolimerização. Esta é uma técnica com bons resultados para a impressão de proteínas. Além disso, permite imprimir diretamente na superfície dos elétrodos, permite controlar facilmente a espessura do polímero e a sua morfologia, ajustando as condições eletroquímicas. Este controlo da espessura é particularmente importante quando se “*imprime*” uma proteína, de modo a garantir condições em que a proteína não fique impressa irreversivelmente (dificuldades de a extrair posteriormente). Esta técnica permite também que a impressão e comunicação direta entre o polímero obtido e a superfície do transdutor se realizem num único passo, garantindo maior repetibilidade no processo.

Tendo por base esta técnica e a possibilidade de oxidação da AFP, foram inicialmente realizados estudos de impressão molecular com polímeros condutores tentando analisar os picos de oxidação da proteína. Contudo, não foi possível a obtenção de resultados positivos. Ou a AFP

poderá ter um comportamento eletroquímico diferente na presença desses polímeros, ou então nenhum deles foi eficaz na impressão desta molécula.

Assim, optou-se por estudar a impressão com polímeros não condutores, e medição indireta da AFP usando um par redox. Para isso usaram-se elétrodos de Au, pois permitem mais facilmente formar camadas poliméricas não condutoras. Após o teste de vários polímeros, o pirrol mostrou ser o único eficaz dentro dos testados.

A construção e funcionamento do sensor estão representados na Figura 21.

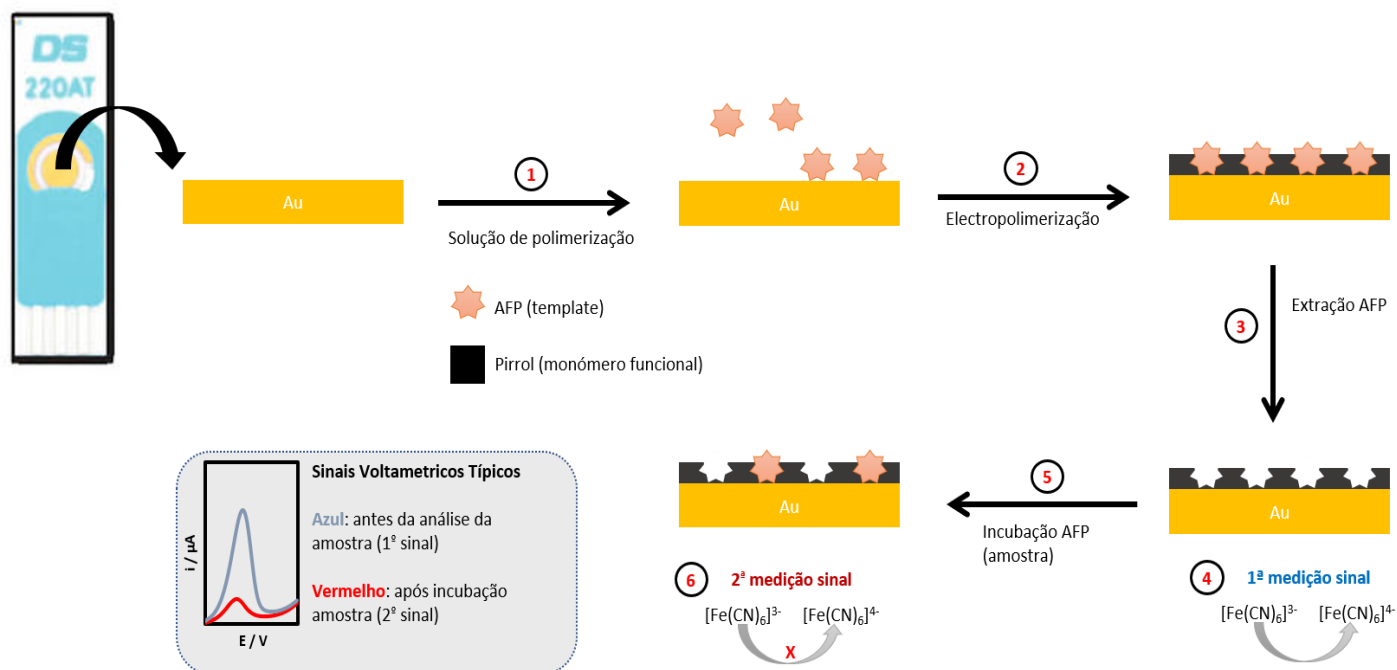


Figura 21. Esquema de construção e funcionamento do sensor.

Adaptado de Pacheco, J. 2017

Tal como ilustrado neste esquema, a construção do sensor envolve 3 etapas:

- 1) Preparação da solução de polimerização;
- 2) Eletropolimerização de um polímero à volta da proteína previamente adsorvida;
- 3) Extração da proteína, criando um filme polimérico com “cavidades” específicas.

Tendo-se optado por uma medição indireta, a análise voltamétrica foi realizada utilizando [Fe(CN)₆]^{3-/4-} como solução para estudar a oxidação-redução à superfície dos elétrodos. Desta forma, será possível medir as diferenças entre os sinais antes e depois da ligação da proteína de uma forma indireta. Tendo isto em consideração o funcionamento do sensor envolve as seguintes etapas:

- 4) Medição do sinal eletroquímico com “as cavidades livres” usando [Fe(CN)₆]^{3-/4-};
- 5) Incubação por tempo definido de AFP;
- 6) Medição do sinal eletroquímico com “as cavidades parcialmente ocupadas” usando [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

4.2.1 Impressão Molecular

A impressão molecular da AFP na superfície de elétrodos Au-SPE, foi realizada por eletropolimerização de uma solução contendo 2.5 mM de pirrol e 10 µg/mL de AFP em tampão fosfato 0.1M pH 7.2. A eletropolimerização foi feita por voltametria cíclica, realizando-se 20 ciclos entre 0.0 e +1.0 V. Deste modo, foi criada uma camada de pirrol com moléculas de AFP impressas, formando assim um MIP.

Foi também criado um NIP de controlo, com uma solução contendo 2.5 mM de pirrol em tampão fosfato sem a presença da proteina.

A Figura 22, mostra o voltamograma registado durante a polimerização de um MIP, bem como o primeiro ciclo de polimerização de um MIP e de um NIP.

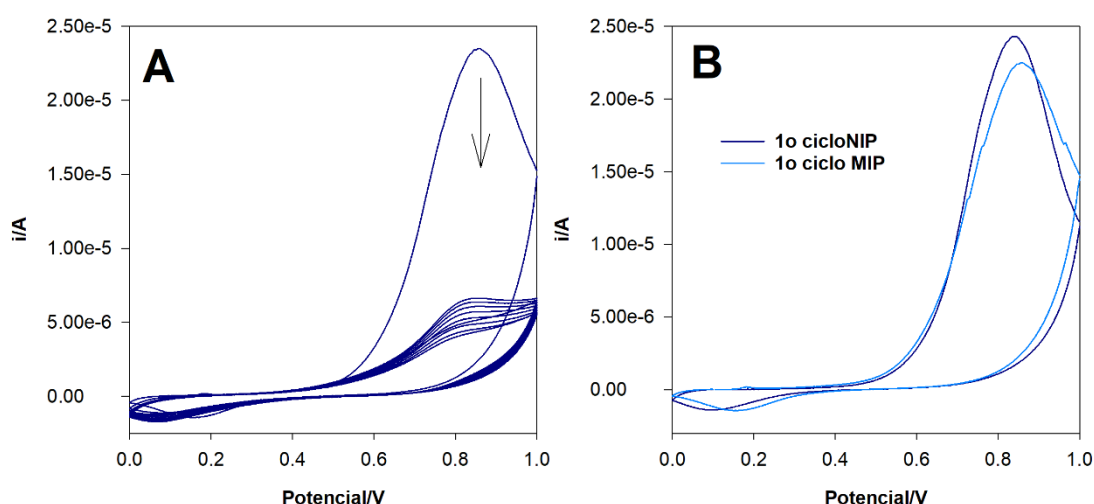


Figura 22. Voltamogramas registados durante a polimerização por CV. A) Voltamogramas da polimerização de um MIP por CV; B) Primeiro ciclo de polimerização de um MIP e de um NIP por CV

O processo redox típico irreversível do pirrol foi observado no gráfico A da Figura 22. Verifica-se que o aumento no número de varrimentos reduz a intensidade da corrente de oxidação, indicando que a quantidade de polímero formado na superfície do elétrodo aumenta formando-se nestas condições polipirrol não condutor. Após o 1º pico de oxidação do pirrol, nos seguintes ciclos há uma clara diminuição desse pico provando a formação de uma camada não condutora.

No gráfico B da Figura 22, é evidente a diferença entre o 1º ciclo de polimerização do MIP e do NIP, sendo que o NIP tem um pico de corrente ligeiramente mais alto que o MIP. Além disso o pico de oxidação do pirrol no 1º ciclo de polimerização está ligeiramente mais deslocado para a direita no caso do MIP. Isto indica uma maior dificuldade de oxidação do pirrol que pode estar relacionado com a presença da AFP na solução e pela possível criação de uma interação entre o monómero e a proteína. Verificou-se ainda (dados não mostrados) que se o monómero e a proteína ficassem em contacto algum tempo antes da polimerização, não se verificava praticamente pico de oxidação do pirrol, impossibilitando até a formação de um filme de polipirrol. Por um lado, estes dados indicam uma boa capacidade de interação entre AFP e pirrol, sendo isso positivo para a

preparação de um MIP com boa seletividade. Por outro lado, a polimerização deve ser realizada no mais curto espaço de tempo após a preparação da solução de polimerização.

Posteriormente procedeu-se à análise por DPV dos filmes obtidos, usando uma solução de 1mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2). De seguida procedeu-se à extração da proteína usando uma solução de 1%SDS e 1 % ácido acético, durante 2h, e analisou-se por DPV usando a solução anterior. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 23.

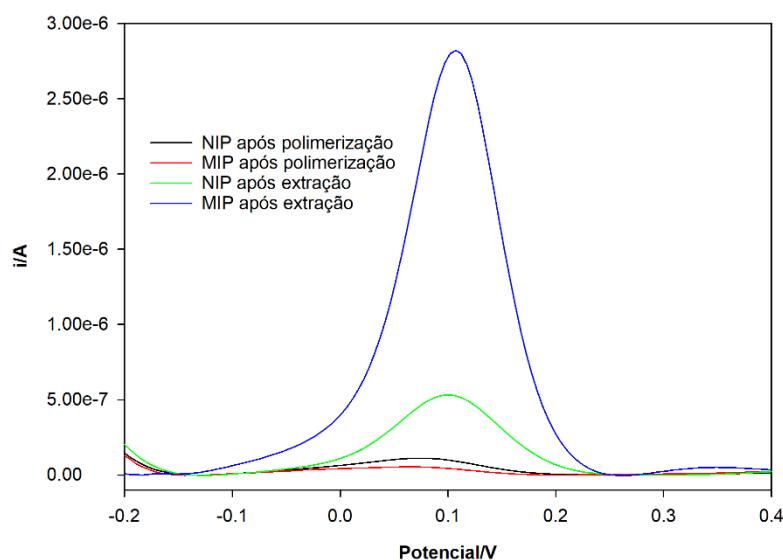


Figura 23. Voltamogramas DPV do MIP e NIP, após a polimerização e após a extração.

Analisando esta figura é possível observar uma clara diferença entre o MIP e o NIP tanto após polimerização como após extração. Após polimerização, embora ambos os sinais estejam baixos devido à formação de um filme não condutor, o sinal do MIP é ligeiramente mais baixo, provando o sucesso da impressão da AFP. Após extração, existe uma pequena subida do sinal do NIP, devido aos efeitos do solvente, no entanto o aumento no MIP é muito mais significativo. Estes resultados mostram que foi possível extrair com sucesso a AFP impressa, formando cavidades no polímero, aos quais o ferro consegue aceder na altura da medição do sinal.

4.2.2 Otimização das Condições de Polimerização

Na preparação de MIPs por eletropolimerização existem vários parâmetros que podem ser otimizados de modo a garantir uma resposta mais eficaz.

Desta forma, foram estudadas as condições de polimerização, nomeadamente o estudo da concentração de pirrol, da concentração de AFP, do número de ciclos de polimerização, do tempo de extração e incubação. Os resultados são apresentados como a diferença entre a intensidade de corrente de pico após a extração inicial de AFP e a intensidade da corrente de pico após a incubação com AFP, sendo definida como Δi_p , usando medições por DPV de uma solução 1mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2).

4.2.2.1 Concentração de Pirrol (Py)

Foram testadas diferentes concentrações do monómero pirrol na solução de polimerização (1, 2.5, 5, 10 e 20 mM)

Na Figura 24, está representado o gráfico correspondente à otimização da concentração de pirrol.

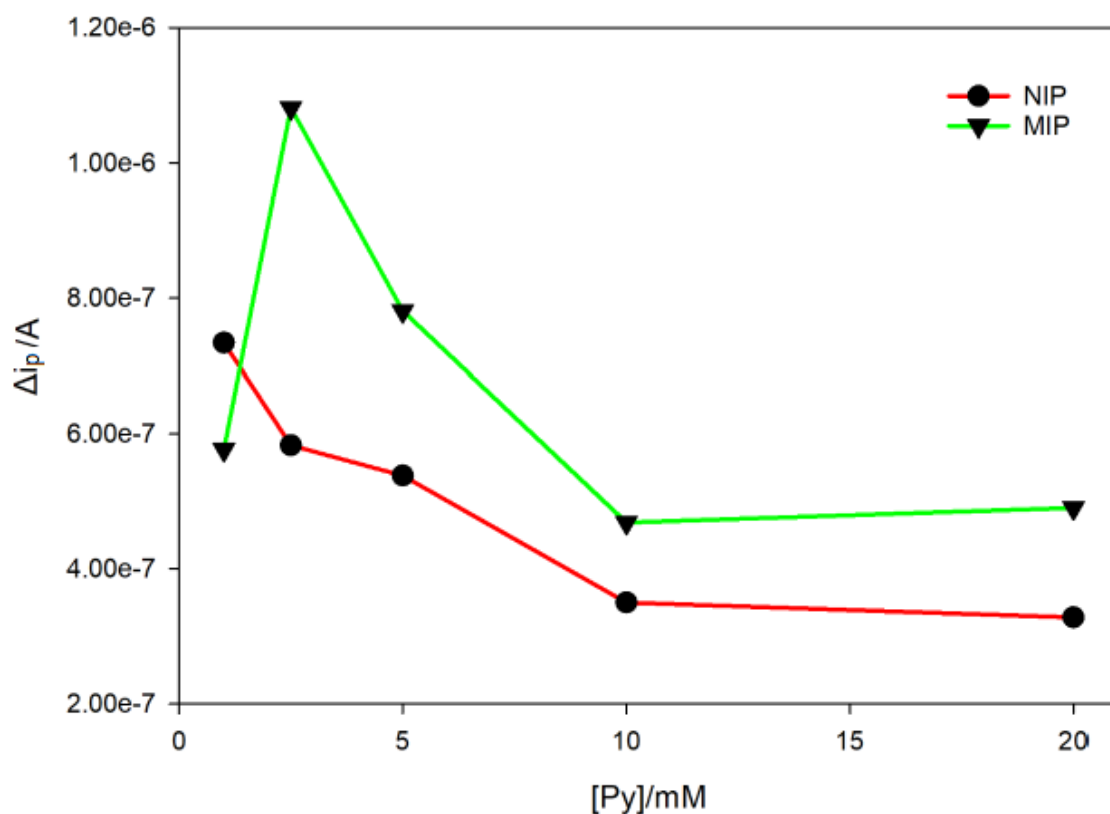


Figura 24. Variação do Δi_p em função de concentração de pirrol, no NIP e MIP

No gráfico, relativamente ao MIP, é notória uma subida acentuada de Δi_p entre 1 e 2.5 mM, seguindo-se uma descida gradual até 20 mM.

Por sua vez, verifica-se que o NIP teve uma descida gradual até aos 10 mM, mantendo-se praticamente constante dos 10 mM até aos 20 mM.

Para a concentração mais baixa, o sinal do NIP é até superior ao MIP. Deste modo a concentração de monómero, que permite não só um sinal maior para o MIP como também uma maior diferença de sinal MIP e NIP, é de 2.5 mM.

4.2.2.2 Concentração de AFP

Relativamente à concentração ótima de AFP, foram também testadas várias concentrações (0.1, 1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Na Figura 25, estão ilustrados os resultados obtidos correspondentes à otimização da concentração de AFP.

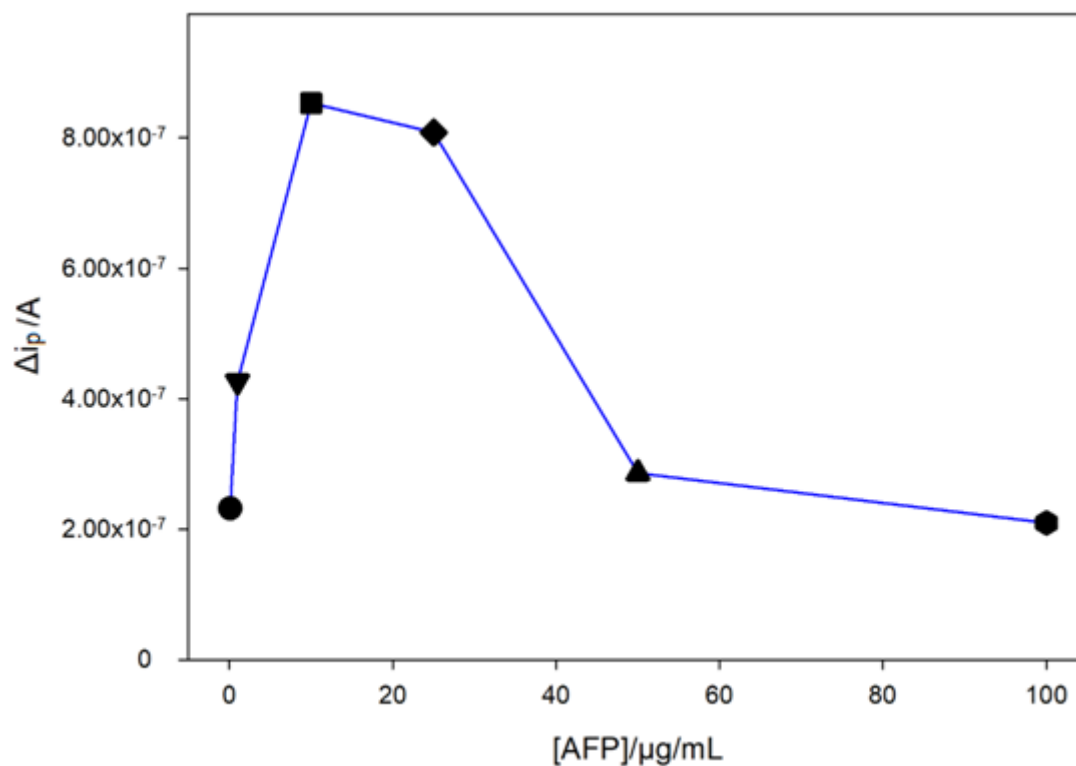


Figura 25. Variação do Δi_p em função da concentração de AFP, no MIP

Através do gráfico acima representado, é possível determinar que a concentração ótima de AFP é de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. É evidente uma subida acentuada entre 0.1 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguindo-se de um decréscimo até 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Assim sendo, para as concentrações mais baixas de AFP, quantidades menores da proteína foram impressas no polímero, levando a menos cavidades e menores valores de Δi_p . Por outro lado, para uma concentração superior a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o valor de Δi_p diminuiu, provavelmente devido à dificuldade de extrair a proteína da matriz polimérica, levando também a um número menor de cavidades formadas e a valores de Δi_p mais baixos.

4.2.2.3 Número de Ciclos

Na eletropolimerização, é possível controlar a espessura do polímero, controlando o número de ciclos de varrimento. Assim sendo, foram então testados diferentes números de ciclos CV (5, 10, 15, 20 e 30 ciclos). Os resultados estão representados na Figura 26.

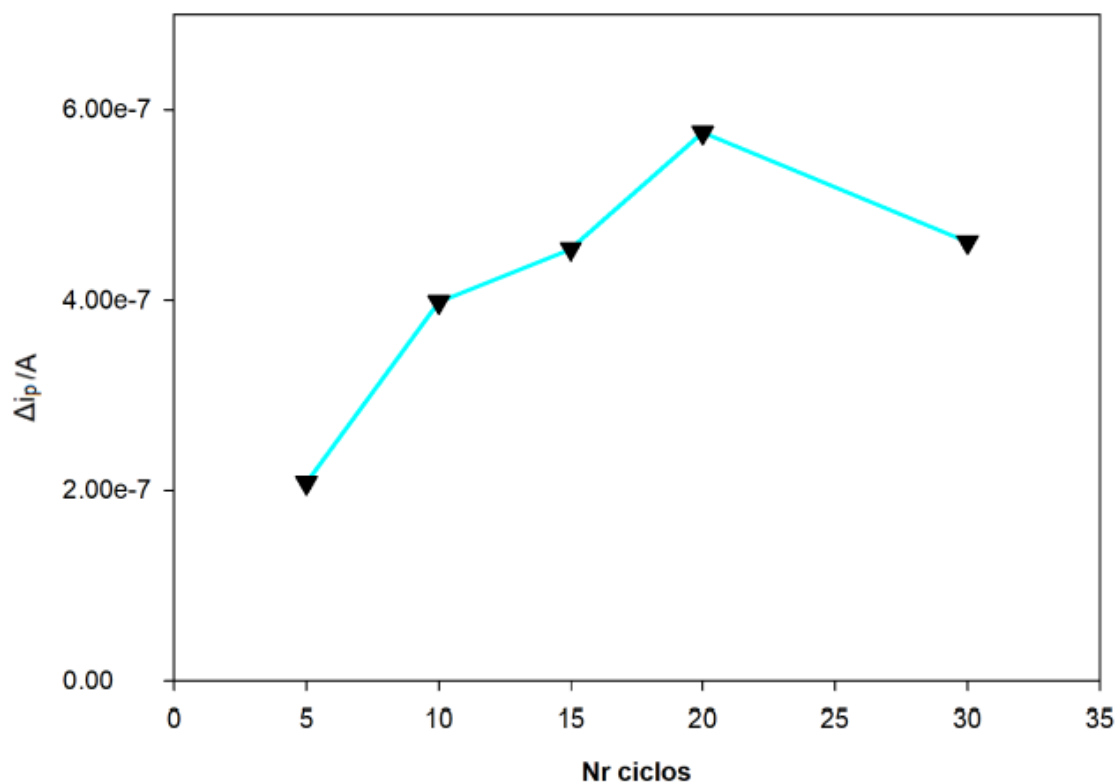


Figura 26. Variação do Δi_p em função da do número de ciclos, no MIP

A partir destes resultados, verifica-se que o Δi_p aumentou dos 5 até aos 20 ciclos, seguindo-se uma diminuição dos 20 para os 30 ciclos. Esta diminuição deve-se à formação de um polímero mais espesso (não condutor), que dificulta a transferência de eletrões na superfície do eletrodo.

Por este motivo, foram escolhidos 20 ciclos de polimerização para as etapas de otimização subsequentes.

4.2.2.4 Tempo de Extração

A remoção da proteína da matriz polimérica é um processo fundamental na preparação de um MIP. Deste modo este é um parâmetro importante de estudar.

Foram então testados diferentes tempos de extração, de 30 min até 4h horas. Verificou-se que a resposta do sensor não variou significativamente após um 2h de extração. Deste modo este tempo foi o utilizado ao longo do trabalho

4.2.2.5 Tempo de Incubação

Foram testados diferentes tempos de incubação, de 5 min até 30 min, tendo-se verificado que a resposta ideal foi obtida para 15 min de incubação, sendo este o tempo utilizado nas fases seguintes do trabalho.

4.2.3 Caracterização do Sensor

Foi realizada uma caracterização passo a passo da construção e utilização do sensor desenvolvido. A caracterização do sensor foi realizada através da medição da CV e da medição da impedância eletroquímica espectroscópica (EIS - *Electrochemical Impedance Spectroscopic*), utilizando uma solução de 1mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2), e medindo o sinal após cada etapa de construção e funcionamento do sensor.

Os resultados obtidos da CV e EIS estão representados na Figura 27.

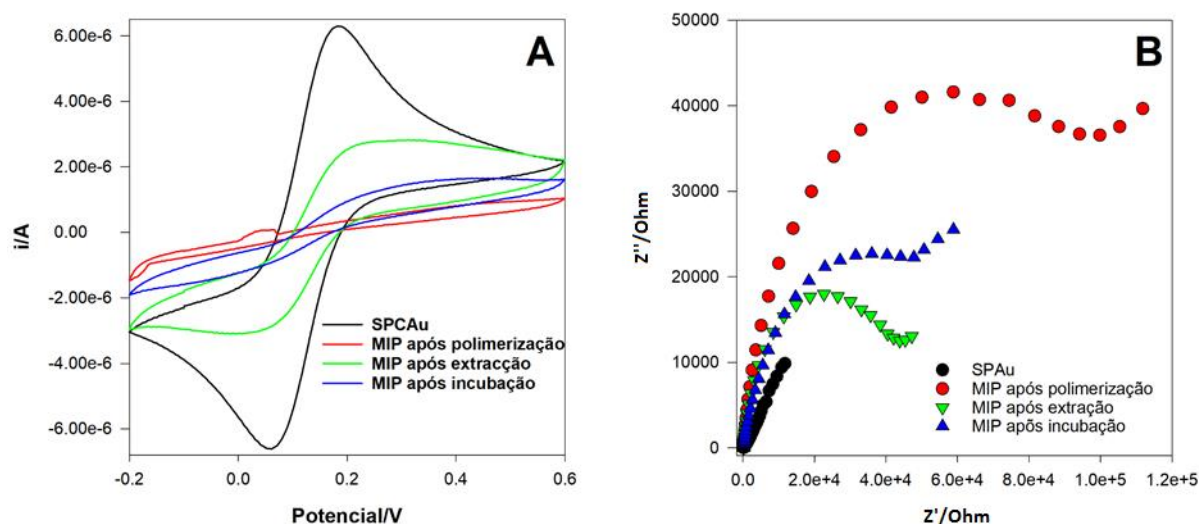


Figura 27. Caracterização da construção passo a passo do sensor MIP Au-SPE. A) Voltamograma CV. B) Diagrama de Nyquist EIS

Como se pode observar, no voltamograma cíclico da Figura 27 (A), há dois picos redox bastante evidentes que correspondem ao eletrodo não modificado Au-SPE. Após a polimerização, esse pico diminui consideravelmente, deixando de existir picos redox, resultado do bloqueio da transferência de elétrons por parte do polímero. Após a extração, os picos redox voltam a aparecer, indicando uma boa remoção da proteína. Nesta fase são criadas cavidades no polímero e a porosidade do MIP aumenta, facilitando a difusão do ferro até à superfície do eletrodo e possibilitando a reação redox. É possível observar, contudo, que este sinal ainda se encontra distante do sinal para um eletrodo não modificado. Este dado mostra que a extração não remove o polímero da superfície do eletrodo, permitindo apenas a extração da proteína. Por sua vez, após a incubação com a proteína, os picos redox voltam a diminuir consideravelmente. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto das moléculas de AFP preencherem as cavidades do polímero, diminuindo assim do sinal do ferro.

Analogamente, na Figura 27 (B), está representado o diagrama de Nyquist EIS, cujas características são semelhantes ao voltamograma CV. Neste, a curva observada para frequências elevadas corresponde ao processo de transferência de elétrons e a parte linear que precede a curva corresponde à difusão. A pequena linha reta preta corresponde ao eletrodo não modificado Au-SPE e representa um processo de difusão com rápida transferência de elétrons típico de um eletrodo condutor. Após a polimerização, a curva atinge um pico de impedância mais elevado, indicando uma redução da transferência de elétrons e num aumento da resistência ao fluxo de elétrons, devido à camada de polímero criada na superfície do eletrodo contendo a proteína. Depois da extração da proteína, observa-se uma diminuição da impedância que pode ser explicada pela formação de cavidades, facilitando a difusão do ferro pela camada polimérica e, conseqüentemente, a transferência de elétrons. Por último, depois da incubação da proteína, verifica-se um ligeiro aumento da impedância por parte da curva, indicando mais uma vez que as moléculas de proteína preencheram as cavidades do polímero.

É importante ressaltar que tanto a análise EIS como a CV demonstram grandes diferenças entre o eletrodo não modificado Au-SPE e o MIP Au-SPE depois da extração.

4.2.4 Resposta Analítica

Após a construção do sensor, pretendeu-se avaliar a qualidade da resposta analítica para diferentes concentrações de AFP. Com essa finalidade testou-se a resposta de um MIP a diferentes concentrações da proteína entre 0 e 50 ng/mL. Após incubação em cada uma das soluções de diferente concentração, registou-se o voltamograma (DPV) para cada um dos sensores., como se observa na Figura 28.

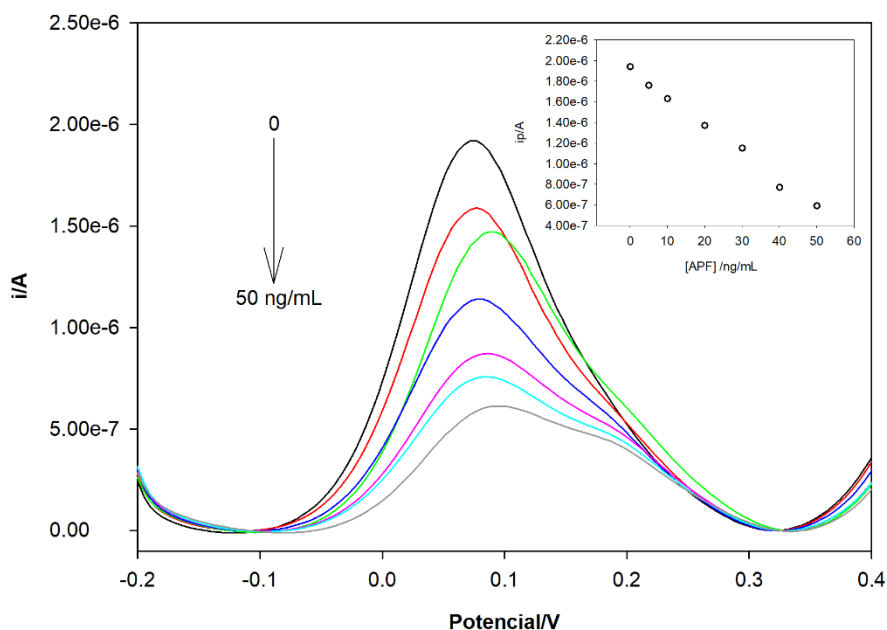


Figura 28. Resposta do MIP a diferentes concentrações de AFP

Analisando os resultados, verifica-se que existe uma diminuição da intensidade de corrente do pico com o aumento da concentração da proteína, comprovando-se que o sensor apresenta uma resposta à concentração.

Com base nestes dados construiu-se uma curva de calibração. Para isso, as variações das intensidades de corrente dos picos entre a resposta sem proteína e após incubação com várias concentrações foram representadas em função da concentração (Figura 29).

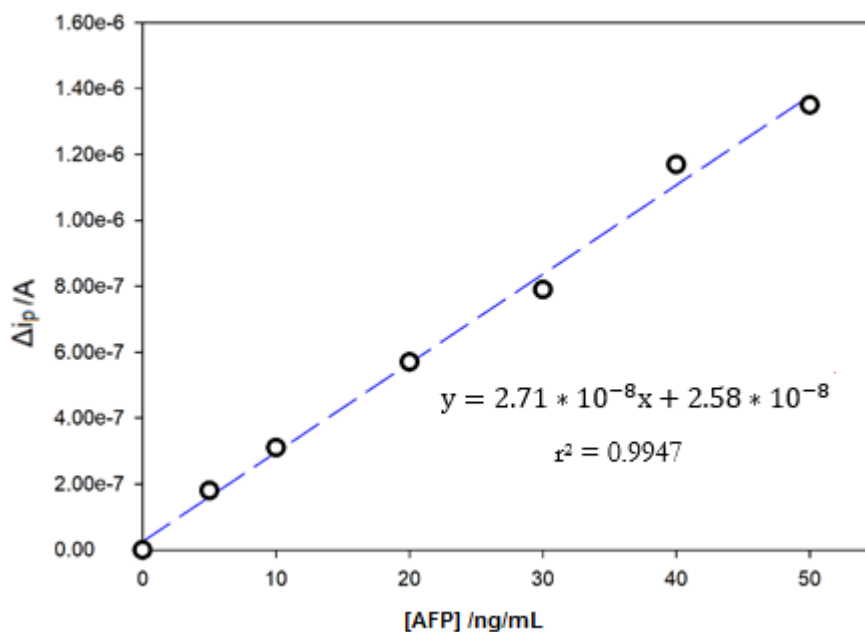


Figura 29. Curva de calibração com o sensor MIP.

O sensor mostra um comportamento linear entre a Δi_p e a concentração na gama testada, com uma equação da reta $y = 2.71 * 10^{-8}x + 2.58 * 10^{-8}$ e um $r^2 = 0.9947$.

Com estes dados estimaram-se limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) de 2.4 e 7.9 ng/mL, respetivamente.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Pela revisão da literatura, conclui-se que as últimas décadas têm vindo a testemunhar um crescimento nos métodos terapêuticos contra o CHC bem como um interesse cada vez maior na detecção de AFP, sendo esta um bom biomarcador para esta doença oncológica.

Do mesmo modo, os MIPs têm-se mostrado como elementos sensores promissores para a detecção desta proteína. Estes combinam a alta afinidade por moléculas alvo, um baixo custo na sua produção, estabilidade e maior flexibilidade na escolha dos monómeros e das técnicas de polimerização. A junção destes elementos de reconhecimento com materiais em nanoescala oferece um aprimoramento na seletividade, bem como na sensibilidade, contribuindo para uma melhoria no desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico altamente versáteis e capazes de realizarem análises clínicas diretamente ao lado do paciente.

No presente trabalho, um eléctrodo de ouro SPE foi modificado com um polímero impresso para a detecção do biomarcador de cancro do fígado AFP.

No entanto, numa fase inicial, estudou-se o comportamento eletroquímico da AFP (por voltametria cíclica, em eléctrodos de carbono), de forma a avaliar se a proteína seria ou não eletroativa. Verificou-se um pico de oxidação aos +0.8V, mecanismo típico de difusão em eléctrodos de carbono. Contudo, a sensibilidade da detecção direta bem como a pouca especificidade da resposta não foram suficientes para a detecção de AFP nos níveis de detecção pretendidos.

Estudou-se também a influência do tempo de equilíbrio e da velocidade de varrimento. O primeiro estudo revelou que o tempo de equilíbrio não tem qualquer influência no valor de pico de oxidação obtido. Já o aumento da velocidade de varrimento, provoca um aumento da intensidade de corrente do pico de oxidação.

Através do estudo da corrente de pico em função da velocidade de varrimento, conclui-se que o processo de oxidação da AFP é irreversível e controlado por difusão.

Para além disso, estudou-se a linearidade da resposta analítica da AFP através de uma curva de calibração, aplicando-se DPV a várias concentrações de AFP. Os resultados demonstram uma relação linear da corrente em função da concentração de AFP, sendo que quanto maior a concentração, maior o pico de oxidação.

De seguida, procedeu-se ao desenvolvimento do sensor seletivo para a AFP, através da técnica “*surface imprinting*” por eletropolimerização.

Para tal, foram realizados estudos de impressão molecular com polímeros condutores, tentando analisar os picos da proteína. Porém, como a AFP poderá ter um comportamento eletroquímico diferente na presença desses polímeros, ou então nenhum deles foi eficaz na impressão desta molécula, não se obteve resultados positivos. Assim sendo, optou-se por estudar a impressão com polímeros não condutores, e medição indireta da AFP usando um par redox. O par redox utilizado foi o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como solução para estudar a oxidação/redução à superfície dos eléctrodos.

Os dados obtidos indicam uma boa capacidade de interação entre a AFP e o pirrol, sendo isso positivo para a preparação de um MIP com boa seletividade.

Foram então otimizadas as condições de polimerização e realizou-se uma caracterização do sensor obtido por voltametria cíclica e por espectroscopia de impedância eletroquímica.

Por fim, após a construção do sensor, avaliou-se a qualidade da resposta analítica para diferentes concentrações de AFP. Foi então estabelecida uma relação linear entre a intensidade de corrente de pico e a concentração de AFP entre 0 e 50 ng/mL, com um limite de detecção (LOD) de 2.4 ng/mL e um limite de quantificação (LOQ) de 7.9 ng/mL. Estes limites, estando abaixo dos níveis de corte usados em práticas clínicas, revelam-se promissores para um bom funcionamento deste sensor.

Porém, no decorrer deste trabalho surgiram algumas dificuldades relacionadas com a realização de sucessivas análises utilizando o mesmo sensor. Verificou-se que, após cada nova extração o sinal obtido era diferente, sendo difícil obter um sinal constante.

Para além disso, não foi possível proceder com os estudos de seletividade, exatidão e precisão, bem como a aplicação a amostras reais de, por exemplo, pacientes em tratamento. Estas são algumas sugestões para trabalhos experimentais futuros nesta área.

Deste modo, sugere-se que, futuramente, sejam realizados mais ensaios utilizando amostras reais. Esses ensaios deverão ser feitos com amostras contaminadas e, posteriormente, com amostras já com um diagnóstico prévio realizado através de técnicas convencionais. Assim, será melhorada a seletividade deste tipo de sensores.

Referências Bibliográficas

- Bitas, D. e Samandiou, V. 2018. "Molecular Imprinting for Sample Preparation". LCGC North America. Volume 36. Acedido em: 18/04/2019. Disponível em:
<http://www.chromatographyonline.com/molecular-imprinting-sample-preparation>
- Black, A. e Mehta, A. 2018. "The search for biomarkers of hepatocellular carcinoma and the impact on patient outcome". *Current Opinion in Pharmacology*. 41. pp. 74-78.
doi: 10.1016/j.coph.2018.04.002
- Brett, C., 2001. "Electrochemical sensors for environmental monitoring". *Pure and Applied Chemistry*. 73. pp. 1969-1977.
doi: 10.1351/pac200173121969
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X. e Li, J. 2016. "Molecular imprinting: perspectives and applications". *Chemical Society Reviews*. 8. pp. 2137-2196.
doi: 10.1039/c6cs00061d
- Ciobanu, M., Wilburn, J., Krim, M. e Cliffel, D. 2007. *Fundamentals. Handbook of Electrochemistry*. Elsevier. pp. 3-29.
doi: 10.1016/B978-044451958-0.50002-1
- Crapnell, R., Hudson, A., Foster, C., Eersels, K., Grinsven, B., Cleij, T., Banks, C. e Peeters, M. 2019. "Recent Advances in Electrosynthesized Molecularly Imprinted Polymer Sensing Platforms for Bioanalyte Detection". *Sensors*. 19. 1204.
doi: 10.3390/s19051204
- DropSens. 2019. "Screen-printed electrodes". DropSens. Acedido em: 27/09/2019. Disponível em:
http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html
- Dziąbowska, K., Czaczyk, E. e Nidzworski, D. 2017. "Application of Electrochemical Methods in Biosensing Technologies". *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*. pp. 151-171.
doi: 10.5772/intechopen.72175
- Faria, R., Heneine, L., Matencio, T. e Messaddeq, Y. 2019. "Faradaic and non-faradaic electrochemical impedance spectroscopy as transduction techniques for sensing applications". *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*. 5. pp. 29-31.
doi: 10.15406/ijbsbe.2019.05.00148
- Fu, Y., Xu, X., Huang, D., Cui, D., Liu, L., Liu, J., He, Z., Liu, J., Zheng, S. e Luo, Y. 2017. "Plasma Heat Shock Protein 90alpha as a Biomarker for the Diagnosis of Liver Cancer: An Official, Large-scale, and Multicenter Clinical Trial". *EBioMedicine*. 24. pp. 56-63.
doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.007
- Globocan. 2018. "Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, liver, both sexes, all ages". International Agency for Research on Cancer. Acedido em: 21/06/2019. Disponível em:
<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>
- GRAQ. 2019. "História". Acedido em: 18/04/2019. Disponível em:
<http://www.graq.isep.ipp.pt/index.php?page=historia>

Hammond, J. 2017. "Micro- and nanogap based biosensors". A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. University of Bath. p. 35. Acedido em: 23/10/2019. Disponível em: <https://researchportal.bath.ac.uk/en/studentTheses/micro-and-nanogap-based-biosensors>

Heiat, M. e Negahdary, M. 2019. "Sensitive diagnosis of alpha-fetoprotein by a label free nanoaptasensor designed by modified Au electrode with spindle-shaped gold nanostructure". *Microchemical Journal*. 148. pp. 456-466.
doi: 10.1016/j.microc.2019.05.004

Thevenot, D., Tóth, K., Durst, R. e Wilson, G. 1999. "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification". *Pure and Applied Chemistry*. 71. pp. 2333-2348.
doi:10.1351/pac199971122333

Journal of Hepatology, 2018. "EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma". *Journal of Hepatology*. 69. pp. 182-236.
doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.019

Kadara, O., Jenkinson, N. e Banks, E. 2009. "Screen printed recessed microelectrode arrays". *Sensors and Actuators B: Chemical*. 142. pp. 342-346.
doi: 10.1016/j.snb.2009.08.005

Karfa, P., Roy, E., Patra, S., Kumar, D., Madhuri, R. e Sharma, P. 2016. "A fluorescent molecularly-imprinted polymer gate with temperature and pH as inputs for detection of alpha-fetoprotein". *Biosensors and Bioelectronics*. 6. pp. 8238-8238.
doi: 10.1016/j.bios.2015.11.092

Lopes, D. 2017. "Molecular Imprinting as a tool for producing Molecularly Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering". Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Acedido em: 25/07/2019. Disponível em: <https://run.unl.pt/handle/10362/62922>

Lowinsohn, D. e Bertotti, M. 2006. "Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos". *Química Nova*. 29. pp. 1318-1325.
doi: 10.1590/S0100-40422006000600029

Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N. e Mantha, A. 2017. "Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies". *Biosensors and Bioelectronics*. 88. pp. 217-231.
doi: 10.1016/j.bios.2016.08.028

Pacheco, J. 2017. MIPs "Molecularly Imprinted Polymers". *Biossensores*. ISEP. Acedido em: 20/06/2019.

Princeton Applied Research. 2019. "A Review of Techniques for Electrochemical Analysis". Application Note E-4. Acedido em: 06/10/2019. Disponível em: <https://www.ameteki.com/library/application-notes/princeton-applied-research>

Princeton Applied Research. 2019. "Basics of Electrochemical Impedance Spectroscopy". Application Note AC-1. Acedido em: 06/10/2019. Disponível em: <https://www.ameteki.com/library/application-notes/princeton-applied-research>

Randviir, E. e Banks, C. 2013. "Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications". *Analytical Methods*. 5. pp. 1098-1115.
doi: 10.1039/C3AY26476A

- Rawla, P., Sunkara, T., Muralidharan, P. e Raj, J. 2018. "Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma". *Contemporary Oncology (Pozn)*. 22. pp. p141-150.
doi: 10.5114/wo.2018.78941
- REQUIMTE. 2019. "REQUIMTE – Rede de Química e Tecnologia". Acedido em: 18/04/2019. Disponível em:
<https://www.requimte.pt/>
- Saylan, Y., Yilmaz, F., Özgür, E., Derazshamshir, A., Yavuz, H. e Denizli, A. 2017. "Molecular Imprinting of Macromolecules for Sensor Applications". *Sensors*. 17. 898.
doi: 10.3390/s17040898
- Scholz, F. 2015. "Voltammetric techniques of analysis: the essentials". *ChemTexts*. pp. 1-17.
doi: 10.1007/s40828-015-0016-y
- Scot, K. 2016. "Electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems". *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*. pp. 29-66.
doi: 10.1016/B978-1-78242-375-1.00002-2
- Selvolini, G. e Marrazza, G. 2017. "MIP-Based Sensors: Promising New Tools for Cancer Biomarker Determination". *Sensors (Basel)*. 17. 714.
doi: 10.3390/s17040718
- Shen, X., Ma, Y., Zeng, Q., Tao, J., Huang, J. e Wang, L. 2016. "Molecularly imprinted electrochemical sensor for advanced diagnosis of alpha-fetoprotein". *Analytical Methods*. 40. pp. 7361-7368.
doi:10.1039/C6AY01922F
- Shrivastava, A. e Gupta, V. 2011. "Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods". *Chronicals of Young Scientists*. 2. pp. 21-25.
doi: 10.4103/2229-5186.79345
- Taleat, Z., Khoshroo, A. e Ardakani, M. 2014. "Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)". *Microchimica Acta*. 181. pp. 865-891.
doi: 10.1007/s00604-014-1181-1
- The Global Cancer Observatory, 2019. "Liver". Acedido em: 21/06/2019. Disponível em:
<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>
- Turner, N., Jeans, C., Brain, K., Allender, C., Hlady, V. e Britt, D. 2006. "From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins". *Biotechnological Progress*. 22. pp. 1474-1489. Acedido em: 30/10/2019. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666979/>
- University of Cambridge. 2019. "Linear Sweep and Cyclic Voltametry: The Principles". Department of Chemical Engineering and Biotechnology. Acedido em: 18/10/2019. Disponível em:
<https://www.ceb.cam.ac.uk/research/groups/rg-eme/Edu/linear-sweep-and-cyclicvoltametry-the-principles>
- Uzun, L. e Turner, A. 2015. "Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential". *Biosensors and Bioelectronics*. 76. pp. 131-144.
doi: 10.1016/j.bios.2015.07.013

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. e Adley, C. 2010. “An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors”. *Biotechnology Advances*. 28. pp. 232-254.

doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.12.004

Wilson J. 2005. “Sensor Technology Handbook”. Oxford: Elsevier. pp. 1-15. Acedido em: 30/10/2019. Disponível em:

<http://www.kelm.ftn.uns.ac.rs/literatura/si/pdf/Sensor%20Technology%20Handbook.pdf>

Zadeh, K. e Fry, B. 2008. “Nanotechnology-Enabled Sensors”. Nova Iorque: Springer science. Acedido em: 30/10/2019. Disponível em:

<https://www.google.pt/search?hl=pt-PT&tbm=bks&q=isbn:0387680233>

Zhurauski, P. 2017. “Electrochemical detection of cancer biomarkers”. University of Bath: A thesis submitted for the degree of Master of Philosophy. pp. 1-35. Acedido em: 21/06/2019. Disponível em:

<https://researchportal.bath.ac.uk/en/studentTheses/electrochemical-detection-of-cancerbiomarkers>