



Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para o diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio

MARIA JACINTA TEIXEIRA RICARDO

outubro de 2024

Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para diagnóstico do enfarte agudo do miocárdio

Maria Jacinta Teixeira Ricardo

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica**

Orientador: Felismina Moreira

Co-orientador: Gabriela Martins e Abel Duarte

Júri:

Presidente:

Joaquim Fernando Almeida Alves, Professor Adjunto, ISEP

Vogais:

Felismina Teixeira Coelho Moreira, Investigadora Júnior, ISEP

José Adolfo Ribeiro, Investigador, FCUP

Resumo

As doenças cardiovasculares (DCVs) integram um conjunto de patologias, entre as quais se destaca o enfarte agudo do miocárdio (AMI, do inglês, *Acute Myocardial Infarction*). As DCVs são a principal causa de morte no mundo e de morbidade na Europa. Deste modo, é fundamental melhorar os métodos de diagnóstico do AMI, para que sejam eficientes, rápidos, precisos e simples, diminuindo a mortalidade associada a esta doença.

O desenvolvimento de novos biossensores tem vindo a crescer nos últimos anos, com especial ênfase no diagnóstico de diversas doenças. No presente trabalho, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para o diagnóstico do AMI, caracterizado por ser de baixo custo, simples e rápido. Durante a construção deste material biomimético, o analito utilizado foi a mioglobina (Myo), uma vez que é um biomarcador cardíaco crítico para o diagnóstico de DCVs, tornando essencial a sua monitorização no local de prestação de cuidados (PoC, do inglês, *Point of Care*).

O material de suporte utilizado para o desenvolvimento deste biossensor consiste num eléctrodo impresso de platina (Pt-SPE, do inglês, *Screen-Printed Platinum Electrodes*). Foram adicionados nanocubos de *Prussian Blue* (PBNCs) sobre a superfície de Pt-SPE e em seguida, realizou-se a eletropolimerização (ELP) da orto-fenilenodiamina (o-PD, do inglês, *ortho-phenyldiamine*) na presença da Myo através da técnica de voltametria cíclica (CV, do inglês, *Cyclic Voltammetry*). A ELP foi realizada na gama de potencial de -0,2 V a +0,8 V, durante cinco ciclos a uma velocidade de 50 mV/s. Após a formação do polímero, o biossensor foi incubado a 37 °C numa estufa, com uma solução de tripsina durante a noite, resultando na formação de cavidades impressas compatíveis com o analito-alvo (Myo).

As propriedades estruturais e morfológicas do material foram analisadas através da microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês, *Scanning Electron Microscopy*) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*). A capacidade do material para religar a Myo foi avaliada através da técnica eletroquímica de voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, *Square Wave Voltammetry*). Nestes ensaios, os dispositivos sensores desenvolvidos apresentaram respostas lineares na gama de concentração entre 1×10^{-5} e $1 \times 10^{+5}$ ng/mL. Também foi utilizada a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*) para avaliar, novamente, a capacidade do material se ligar à Myo mas livre da solução *redox*.

Em contraste com as estratégias convencionais de biossensores, que requerem uma solução *redox* externa para avaliar o sinal, a configuração desenvolvida ao longo deste estudo permite monitorizar as alterações de corrente de forma direta e simples, sem a necessidade de introduzir uma solução *redox*. O sensor descrito no presente trabalho é uma potencial ferramenta para a triagem PoC de Myo, visto que é fácil de fabricar e de descartar, apresenta uma resposta rápida, é barato e possui boa sensibilidade e seletividade.

Palavras-chave: Polímeros de impressão molecular, Nanocubos de *Prussian Blue*, Eléttodos impressos, Biomarcador cardíaco, Mioglobina, deteção direta com *redox*, Eletroquímica.

Abstract

Cardiac diseases (DCVs) are part of a group of pathologies, particularly acute myocardial infarction (AMI). DCVs are the leading cause of death worldwide and a major cause of morbidity in Europe. Therefore, it is crucial to improve AMI diagnostic methods to make them efficient, rapid, accurate and simple, thereby reducing mortality from this disease.

The development of new biosensors has been growing in recent years, with special emphasis on the diagnosis of multiple diseases. In the present work, an electrochemical biosensor was developed for the diagnosis of AMI, characterized by being low-cost, simple, and fast. During the construction of this biomimetic material, the target molecule used was myoglobin (Myo), as it is a critical cardiac biomarker for the diagnosis of DCV, making its monitoring at the point of care (PoC) essential.

The support material used for this biosensor was a platinum screen printed electrode (Pt-SEP). *Prussian Blue nanocubes* (PBNCs) were added onto the Pt-SPE through drop casting and afterwards, electropolymerization (ELP) of ortho-phenylenediamine (o-PD) was carried out in the presence of Myo using cyclic voltammetry (CV). The ELP was performed in a potential range of -0.2 V to +0.8 V, over five cycles at a scan rate of 50 mV/s. After polymer formation, the biosensor was incubated at 37 °C with a trypsin solution overnight, resulting in the formation of printed cavities compatible with the target analyte (Myo).

The structural and morphological properties of the material were analysed using scanning electron microscopy (SEM). The material's ability to rebind Myo was assessed using square wave voltammetry (SWV). In these tests, the devices showed linear responses between 1×10^{-5} and $1 \times 10^{+5}$ ng/mL. The differential pulse voltammetry (DPV) was also used to further assess the material's ability to bind Myo, but this time without the *redox* solution.

In contrast to conventional biosensor strategies that require an external *redox* solution to assess the signal, the developed configuration allows for the monitoring of current changes in the *redox*-active PBNCs without the *redox* solution. The sensor described in this study is a potential tool for PoC screening of Myo, as it is easy to fabricate and dispose of, provides a rapid response, is inexpensive, and has good sensitivity and selectivity.

Keywords: Molecularly imprinted polymers, Prussian Blue nanocubes, Screen-printed electrodes, Cardiac biomarker, Myoglobin, Liquid *redox* free, Electrochemical.

Agradecimentos

A dissertação que aqui se apresenta só foi possível devido aqueles que me apoiaram e guiaram tanto no meu percurso académico como pessoal. Assim, não posso de deixar de prestar o meu reconhecimento.

Primeiramente, agradeço às minhas orientadoras Doutora Felismina Moreira e Doutora Gabriela Martins, por me terem acompanhado desde o início, pela paciência de me ensinarem e me transmitirem os seus conhecimentos, por toda a dedicação e carinho.

De seguida, a toda a equipa do LabRISE que me recebeu, sou grata pela maneira gentil com que me acolheram, particularmente a: Cristina e Raquel Vaz. Gostaria de agradecer, de uma forma especial, à Daniela Oliveira e à Inês Vinagre que desde o primeiro dia me acompanharam e sempre se mostraram disponíveis para me ajudar em tudo o que eu precisasse.

A todos os meus amigos que sempre me acompanharam e que vivenciaram o meu trabalho e percurso nestes últimos anos, em especial à Daniela, à Adriana, à Carol, à Liane e ao Hugo. Ao Francisco, o meu profundo agradecimento, por toda a motivação e apoio que me deu nesta fase.

Por último, mas mais importante, agradeço aos meus pais e irmã, pelo apoio que me deram ao longo de todo o meu percurso académico e por nunca me deixarem baixar os braços nos momentos mais difíceis.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento.....	1
1.2	Questão e objetivos de investigação	2
1.3	Metodologia	3
1.4	Estrutura do documento.....	3
1.5	Comunicações de poster em congresso e jornada	3
2	Revisão de Literatura	5
2.1	Doenças cardiovasculares	5
2.1.1	Enfarte agudo do miocárdio	5
2.1.2	Biomarcadores cardíacos	9
2.2	Biossensores.....	15
2.2.1	Estrutura de um biossensor	16
2.2.2	Características de um biossensor	17
2.3	Elementos de biorreconhecimento	18
2.3.1	Anticorpos	19
2.3.2	Aptâmeros.....	21
2.3.3	Polímeros de impressão molecular	21
2.4	Transdutores	26
2.4.1	Óticos	27
2.4.2	Piezoelétricos.....	27
2.4.3	Eletroquímicos.....	28
3	Procedimento experimental	41
3.1	Material e Equipamento	41
3.2	Soluções	42
3.3	Síntese dos PBNCs	44
3.4	Medições eletroquímicas	45
3.5	Desenho do anticorpo plástico no Pt-SPE	45
3.6	Avaliação analítica do desempenho	46
3.6.1	Curva de calibração em PBS	46
3.6.2	Curva de calibração em soro	47
4	Resultados e discussão	49
4.1	Construção do biossensor	49
4.2	Otimização dos parâmetros.....	52
4.3	Estudos de caracterização	53
4.3.1	SEM.....	53

4.3.2	FTIR	53
4.4	Estudos do desempenho do sensor.....	54
4.4.1	Desempenho do sensor em PBS	54
4.4.2	Efeito dos PBNCs	55
4.5	Estudo de seletividade	57
4.6	Desempenho do sensor em soro.....	58
4.6.1	Calibração dos elétrodos baseados em PBNCs com <i>redox</i> em meio líquido....	58
4.6.2	Calibração dos elétrodos baseados em PBNCs na ausência da <i>redox</i> em meio líquido	59
5	Conclusão	61
	Referências.....	63

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do AMI, demonstra o dano no tecido de um coração devido ao bloqueio da artéria. Imagem adaptada de (Reyes-Retana & Duque-Ossa, 2021).	6
Figura 2. Alterações no segmento ST num eletrocardiograma, ao longo do tempo, em pacientes com enfarte do miocárdio com elevação do segment ST. Imagem retirada de (Vogel et al., 2019).	6
Figura 3. Taxa bruta de mortalidade em Portugal, no ano de 2019, devido ao AMI, por 100 mil habitantes, dividido por grupos etários. Imagem retirada de (Instituto nacional de estatística, 2021).	7
Figura 4. Número de mortes em Portugal, associado a DCVs, dividido por fatores de risco, em 2021. Imagem adaptada de (Our World in Data, 2021).....	8
Figura 5. Esquema com os diferentes tipos de biomarcadores com os respetivos objetivos. Imagem adaptada de (García-Gutiérrez et al., 2020).	10
Figura 6. Gráfico com o surgimento dos biomarcadores cardíacos no sangue ao longo do tempo após o início dos sintomas do AMI. Pico A, libertação precoce da Myo. Pico B, TnT cardíaco após AMI. Pico C, Isoenzima Creatina Quinase com subunidades B e M (CK-MB, do inglês, <i>Creatine Kinase Isoenzyme with B and M subunits</i>) após AMI. Pico D, troponina T cardíaca após angina instável. Os dados são apresentados numa escala relativa, onde 1,0 é definido como concentração limite para o IM (Coven et al., 2020).	13
Figura 7. Estrutura 3D da molecula Myo. Imagem retirada de (Crystallography365, 2014).	14
Figura 8. Esquema com as áreas de aplicação dos biossensores. Imagem adaptada de (Bhalla et al., 2016).	15
Figura 9. Classificação dos biossensores. Imagem adaptada de (Karunakaran et al., 2015).	15
Figura 10. Representação dos componentes de um biossensor. Imagem adaptada de (Bhalla et al., 2016).....	16
Figura 11. Esquema com as características ideais de um biossensor. Imagem adaptada de (Bhalla et al., 2016).	17
Figura 12. Esquema com as vantagens e desvantagens de cada elemento de biorreconhecimento. Imagem adaptada de (Morales & Halpern, 2018).	18
Figura 13. Estrutura básica de um anticorpo. Imagem adaptada de (Merck, 2014).	20
Figura 14. Principais formatos de imunoensaio. (A) formato indireto competitivo; (B) formato direto competitivo; (C) nenhum ensaio competitivo.....	20
Figura 15. Esquema da técnica de SELEX. Imagem adaptada de (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016).	21
Figura 16. Representação esquemática da síntese dos recetores artificiais biomiméticos: (A) técnica de MIP e (B) técnica de NIP. Imagem adaptada de (Herrera-Chacón et al., 2021).	23
Figura 17. Esquema da preparação de um MIP na superfície de um elétrodo. Imagem adaptada de (Moreira Gonçalves, 2021).	26
Figura 18. Esquema geral de um biossensor ótico. Imagem adaptada de (Seymour et al., 2023).	27

Figura 19. Esquema de comparação dos diferentes sistemas de biossensores. Imagem adaptada de (Li et al., 2024).....	29
Figura 20. Representação esquemática de (A) uma célula eletroquímica convencional e (B) de um SPE. Imagem adaptada de (D. C. Moreira et al., 2024).....	30
Figura 21. Voltamograma típico para um sistema reversível.....	31
Figura 22. Avaliação do potencial aplicado ao elétrodo de trabalho com o tempo na voltametria cíclica. E_i – potencial inicial; E_f – potencial final; E_{min} – potencial mínimo; $E_{máx}$ – potencial máximo; t_1 – tempo de comutação. Imagem adaptada de (Simões & Xavier, 2017).	32
Figura 23. Voltamograma cíclico (A) forma de onda reversível, (B) forma de onda quase reversível e (C) forma de onda irreversível para uma reação <i>redox</i> típica. Imagem adaptada de (Wijeratne, 2018).	33
Figura 24. (A) Aplicação de potenciais na SWV e (B) Esquema do voltamograma de onda quadrada, onde está representado um processo <i>redox</i> de um sistema reversível. Imagem adaptada de (Kaliyaraj Selva Kumar et al., 2020).....	34
Figura 25. (A) Diagrama da aplicação de pulsos na técnica de DPV e (B) Resposta típica de um voltamograma no DPV. Imagem adaptada de (Simões & Xavier, 2017).....	34
Figura 26. Resposta de corrente sinusoidal num sistema linear após aplicação de uma tensão alternada. Imagem adaptada de (Em et al., 2013).....	35
Figura 27. Gráfico de <i>Nyquist</i> que ilustra componentes reais (Z') e componentes imaginárias (Z'') da impedância em cada ω . Imagem adaptada de (Karunakaran et al., 2015).....	36
Figura 28. Gráficos típicos do módulo de <i>Bode</i> (linha reta vermelha) e da fase de <i>Bode</i> (linha tracejada azul) de uma constante de tempo equivalente de circuito elétrico (Em et al., 2013).	36
Figura 29. A - Potencióstato/Galvanostato da <i>Metrohm Autolab</i> ; B – Caixa conectora da BioTid.....	41
Figura 30. Esquema da preparação das soluções de MIP e de NIP.....	43
Figura 31. Representação esquemática da preparação das soluções padrão utilizadas para a construção da curva de calibração.....	43
Figura 32. Representação esquemática da preparação das soluções padrão utilizadas para o estudo da seletividade. A) Solução de Myo; B) Interferente 1 – BSA; C) Interferente 2 – cTnT; D) Interferente 3 – glucose.....	44
Figura 33. Síntese do sensor de impressão molecular pela metodologia A e B.....	46
Figura 34. CV durante a EPL da o-PD (A) sem PBNCS e (B) com PBNCS.	49
Figura 35. Metodologia A (A1 a C1): Seguimento EIS da montagem MIP e NIP no elétrodo baseado em PBNCS a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. Metodologia B (A2 a C2): Seguimento EIS do elétrodo baseado na montagem MIP e NIP a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. A1 – adição dos PBNCS; A2 – limpeza eletroquímica; B1 e B2 – polimerização; C1 e C2 – remoção.....	50
Figura 36. Metodologia A (A1 a C1): Seguimento CV da montagem MIP e NIP no elétrodo baseado em PBNCS a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. Metodologia B (A2 a C2): Seguimento CV do elétrodo baseado na montagem MIP e NIP a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. A1 – adição dos PBNCS; A2 – limpeza eletroquímica; B1 e B2 – polimerização; C1 e C2 – remoção.	51

Figura 37. Análise SEM obtida para os materiais MIP e os nanocubos de PB, a diferentes ampliações.	53
Figura 38. Espectros de ATR-FTIR. Vermelho - Pt-SPE; azul - Pt-SPE/PBNCs; amarelo – Pt-SPE/PBNCs/MIP e verde - Pt-SPE/PBNCs/NIP.	54
Figura 39. A: Medição SWV de MIP em $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_4[Fe(CN)_6]$ com diferentes concentrações de Myo em PBS. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.	55
Figura 40. A: Medição SWV de MIP em $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_4[Fe(CN)_6]$ com diferentes concentrações de Myo em PBS. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.	56
Figura 41. A: Medição DPV de MIPS com diferentes concentrações de Myo em PBS, sem <i>redox</i> probe. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.	57
Figura 42. Gráfico representativo dos resultados do teste de seletividade para as espécies interferentes: BSA, troponina e glucose.	58
Figura 43. A: Medição de SWV MIPS em $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_4[Fe(CN)_6]$ com diferentes concentrações de Myo em PBS, com <i>redox</i> probe. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.	59
Figura 44. A: Medição de DPV MIPS com diferentes concentrações de Myo em PBS, sem <i>redox</i> probe. B: curvas de calibração correspondentes do MIP.	59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais ferramentas de diagnóstico para avaliação cardíaca e as respectivas funções (Kogularasu et al., 2024).....	9
Tabela 2. Lista dos biomarcadores cardíacos primários utilizados clinicamente, destacando os respectivos valores de corte (Qureshi et al., 2012).	11
Tabela 3. Diferentes tipos de biossensores com a capacidade de detetar a Myo.....	38
Tabela 4. Lista de reagentes utilizados com a sua respetiva origem.	42

Acrónimos

Lista de Acrónimos

AMI não-ST	<i>Acute Myocardial Infarction Without ST-Segment</i>
AMI	Enfarte Agudo do Miocárdio
BAW	<i>Bulk Acoustic Wave</i>
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CC	Corrente contínua
CE	<i>Counter electrode</i>
CK	<i>Creatine Kinase</i>
CK-MB	<i>Creatine Kinase Isoenzyme with B and M subunits</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
CV	<i>Cyclic Voltammetry</i>
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPV	<i>Differential pulse voltammetry</i>
ECG	Eletrocardiograma
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>
ELP	Eletropolimerização
H	Cadeia pesada
I	Corrente
IF	<i>Imprinting Factor</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D

IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina D
KCL	Cloreto de Potássio
L	Cadeia Leve
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LoD	<i>Limit of Detection</i>
MAA	<i>Methacrylic Acid</i>
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
Myo	<i>Myoglobin</i>
NC	Nanocubos
NIP	<i>Non-Imprinted Polymers</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
o-PD	<i>Ortho-phenyldiamine</i>
PBNCs	Nanocubos de <i>Prussian Blue</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PoC	<i>Point of Care</i>
Pt-SPE	<i>Screen-Printed Platinum Electrodes</i>
R_{ct}	Resistência à transferência de carga
RCV	Risco cardiovascular
RE	<i>Reference electrode</i>
RM	Reconhecimento molecular
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	Rotações por minuto
SAW	<i>Surface Acoustic Wave</i>

SELEX	<i>Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
STEMI	<i>Acute Myocardial Infarction With ST-Segment Elevation</i>
SWV	<i>Square Wave Voltammetry</i>
Tn	Troponina
UE	União Europeia
URL	Limite superior de referência
WE	<i>Working Electrode</i>

1 Introdução

No presente capítulo é apresentada uma breve introdução ao problema populacional abordado e qual a sua importância para aumentar a qualidade de vida da população com problemas cardíacos. São também descritos os principais objetivos do presente estudo, a metodologia escolhida e uma breve descrição do centro de investigação onde foi executado o estudo experimental. Por último, é descrita a estrutura adotada no trabalho.

1.1 Enquadramento

As doenças cardiovasculares (DCVs) são uma das principais causas de morte em todo o mundo (Timmis et al., 2020). O AMI uma das doenças pertencentes às DCVs, causa a necrose no músculo cardíaco, levando à libertação de algumas biomoléculas no sangue, como por exemplo a mioglobina (Myo, do inglês, *myoglobin*), cujos níveis aumentam entre 1h a 3h após o início dos sintomas (Wu, 2019; Vílchez et al., 2014). O limiar de Myo em indivíduos saudáveis é aproximadamente 100 ng/mL no soro (Matveeva et al., 2005).

O diagnóstico precoce do AMI é crucial, pois quanto mais rápido for, menor será o risco de danos a outras partes do corpo e menor será o número de mortes associadas a esta doença. Para diminuir o risco de ter um AMI, esta doença requer uma atenção especial ao estilo de vida, como ter uma alimentação saudável, praticar atividade física regularmente e evitar o stress (Timmis et al., 2020, 2022). De igual modo, é urgente melhorar os meios de diagnóstico do AMI, o que permitirá diminuir o número de mortes, atuar mais rapidamente e proporcionar uma melhor qualidade de vida.

O desenvolvimento de sensores simples, de rápida resposta e de fácil manuseamento, podem ser uma solução para este problema. A determinação de Myo no ponto de atendimento (PoC, do inglês, *point-of-care*) é uma alternativa promissora para o diagnóstico do AMI devendo os testes apresentar um tempo de resposta curto e ser económicos para uso rotineiro. O método

analítico a utilizar deve fornecer dados fiáveis para os valores da Myo normais e anormais, sem a necessidade de etapas complexas de pré-tratamento das amostras.

Os anticorpos plásticos são uma solução para a determinação da Myo. Estes materiais são produzidos pelo crescimento de uma estrutura polimérica sólida em torno de um composto alvo, criando locais que são complementares à molécula impressa, tanto em tamanho como em interações eletrostáticas. Em seguida, estes locais criados podem tornar a ligar o analito de forma semelhante aos anticorpos naturais.

Os biossensores eletroquímicos são uma alternativa promissora aos métodos convencionais de análise bioquímica. De uma forma geral, os biossensores permitem uma análise no PoC devido aos seus tempos de resposta rápidos, portabilidade e requisitos simples de equipamento. Os biossensores eletroquímicos são constituídos por um elemento de biorreconhecimento, que interage de forma sensível e seletiva com o composto alvo durante a incubação da amostra. A interação resultante pode ser monitorizada diretamente se o alvo for eletroativo, ou indiretamente através de uma solução *redox*, para detetar alterações nas propriedades elétricas resultantes da interação. Assim sendo, neste trabalho foi desenvolvido um biossensor eletroquímico utilizando como elemento de biorreconhecimento os anticorpos plásticos, funcionalizados na superfície de Pt-SPEs.

1.2 Questão e objetivos de investigação

A presente dissertação tem como objetivo o desenvolvimento e otimização de um biossensor eletroquímico com base em polímeros de impressão molecular (MIPs, do inglês, *molecularly imprinted polymers*), para a deteção de um biomarcador cardíaco, a Myo, que está associada ao desenvolvimento de AMI permitindo um diagnóstico precoce desta doença. Pretende-se que este sensor seja seletivo, de custo reduzido, simples e o menos invasivo possível.

De modo a atingir os objetivos pretendidos, foram estudadas duas metodologias diferentes. Na Metodologia A, a superfície do elétrodo de trabalho é previamente funcionalizada com nanocubos de PB (PBNCs, do inglês, *Prussian Blue Nanocubes*), enquanto na Metodologia B, não é adicionado nenhum nanomaterial no elétrodo. A metodologia escolhida para prosseguir os estudos nesta dissertação foi a Metodologia A. Deste modo, esta será utilizada para avaliar o desempenho do sensor em tampão e em soro, com e sem líquido *redox*. Os diferentes materiais preparados ao longo deste estudo foram caracterizados química e morfológicamente por microscópio eletrónico de varredura (SEM, do inglês, *Scanning Electron Microscopy*) e por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Para este estudo são utilizados elérodos impressos descartáveis de platina (Pt-SPE, do inglês, *Screen-Printed Platinum Electrodes*).

1.3 Metodologia

Para o desenvolvimento do sensor eletroquímico foi desenvolvida a seguinte metodologia:

1. Utilização de plataformas condutoras do tipo Pt-SPEs, limpeza eletroquímica dos eléctrodos e adição dos nanomateriais de PBNs por *drop-casting*;
2. Eletropolimerização do monómero orto-fenilodiamina (o-PD, do inglês, *ortho-phenyldiamine*), na presença do analito Myo, na superfície do Pt-SPE, com e sem os PBNs.
3. Avaliação do desempenho analítico do biossensor através de técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica, através de curvas de calibração, estudo de seletividade e análise com amostras de soro.

1.4 Estrutura do documento

Esta dissertação está organizada em 6 capítulos. No primeiro capítulo, é descrita uma breve introdução ao tema abordado, com o objetivo de contextualizar a escolha da metodologia desenvolvida. No capítulo 2, são apresentadas considerações teóricas relativas às doenças cardiovasculares, em particular, ao AMI. São abordados aspetos como o desenvolvimento da doença, a epidemiologia, fatores de risco, comportamentos individuais a adotar para prevenir esta doença, entre outros. Para além disso, são também abordados os biomarcadores cardíacos, sendo escolhida a mioglobina para o desenvolvimento do biossensor. Este capítulo foca-se também nos biossensores, incluindo uma descrição dos seus componentes e dos diversos elementos de biorreconhecimento. Entre os diferentes tipos de elementos, os polímeros de impressão molecular foram escolhidos para o desenvolvimento do biossensor. Também são descritos conceitos teóricos sobre os transdutores disponíveis. Para o estudo do biossensor na presente dissertação, foi utilizado o modo de transdução eletroquímico.

No capítulo 3 é descrito o procedimento experimental e analítico para o desenvolvimento do biossensor. No capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo das diferentes etapas do desenvolvimento do biossensor. Por último, no capítulo 5, são abordadas as considerações finais sobre todo o trabalho desenvolvido assim como as perspetivas futuras.

1.5 Comunicações de poster em congresso e jornada

2024, 14 junho

Jacinta Ricardo, Gabriela V. Martins, Felismina T.C. Moreira, “Plastic Antibody for the diagnosis of acute myocardial infarction”, II Jornada IBEROS+ “Instituto de Biofabricación en Red para el Envejecimiento Saludable”, Porto, Portugal.

2024, 3 e 5 julho

Jacinta Ricardo, Gabriela V. Martins, Felismina T. C. Moreira, "*Plastic Antibody for the diagnosis of acute myocardial infarction*", Encontro Ciência 2024 - +Ciência para uma só saúde e bem-estar global", Porto, Portugal.

2 Revisão de Literatura

2.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte no mundo e de morbidade na Europa (Timmis et al., 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as DCVs pertencem ao grupo de doenças não transmissíveis e afetam tanto o coração como os vasos sanguíneos. As DCVs incluem a doença cardíaca coronária, a doença cardíaca reumática, o enfarte agudo do miocárdio, entre outras. Segundo a OMS, estima-se que, em 2019, aproximadamente 17,9 milhões (32%) do total de mortes em todo o mundo estejam associadas a DCVs, sendo que mais de três quartos dessas mortes ocorrem nos países de médio e baixo (World Health Organization, 2021). No mesmo ano, de acordo com *European Society of Cardiology*, na União Europeia (UE), quase 49 milhões de pessoas viviam com DCVs, o que se traduz em custos elevados para a economia da UE, mais precisamente, cerca de 210 mil milhões de euros por ano. Em 2017, a incidência de DCVs em Portugal foi de 912 por 100 000 habitantes (Timmis et al., 2020). A presente dissertação aborda as DCVs, em particular, o AMI.

2.1.1 Enfarte agudo do miocárdio

O AMI é das principais causas de mortes associadas às DCVs em todo o mundo (Aydin et al., 2019). Tal como se pode observar na Figura 1, o AMI corresponde a um evento de necrose miocárdica, ou seja, há uma perda repentina de fluxo sanguíneo e de oxigénio no músculo cardíaco, devido à oclusão de uma artéria coronária (Wu, 2019).

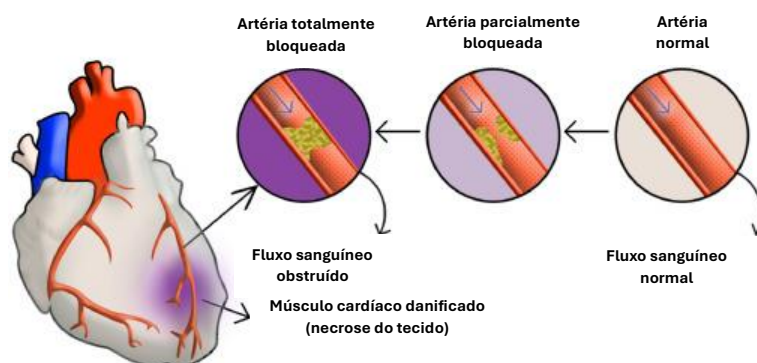


Figura 1. Esquema do AMI, demonstra o dano no tecido de um coração devido ao bloqueio da artéria. Imagem adaptada de (Reyes-Retana & Duque-Ossa, 2021).

O AMI pode ser classificado de duas formas, primeiro, com base na presença ou ausência de elevação do segmento ST na eletrocardiograma (ECG), ou seja, indivíduos com AMI com elevação do segmento ST (STEMI, do inglês, *Acute Myocardial Infarction With ST-Segment Elevation*) ou indivíduos com AMI sem elevação do segmento ST (AMI não-ST, do inglês, *Acute Myocardial Infarction Without ST-Segment Elevation*). A Figura 2 demonstra a evolução da alteração do segmento ST em pacientes com AMI. A segunda forma de classificação é com base na etiologia e/ou circunstância em que o AMI ocorre, podendo ser dividido em 6 tipos (Anderson & Morrow, 2017):

- Tipo 1: Enfarte devido a aterotrombose coronária.
- Tipo 2: Enfarte devido a uma incompatibilidade entre a quantidade necessária e a oferta de oxigênio no coração.
- Tipo 3: Enfarte que causa a morte cardíaca inesperada e súbita.
- Tipo 4a: Enfarte relacionado a uma intervenção coronária percutânea.
- Tipo 4b: Enfarte devido à trombose de um stent coronário.
- Tipo 5: Enfarte relacionado à cirurgia de revascularização do miocárdio.

Geralmente, o STEMI ocorre quando um indivíduo sofre um coágulo sanguíneo totalmente oclusivo; enquanto o AMI não-ST resulta da oclusão parcial, ou oclusão na presença de circulação colateral (Anderson & Morrow, 2017).



Figura 2. Alterações no segmento ST num eletrocardiograma, ao longo do tempo, em pacientes com enfarte do miocárdio com elevação do segment ST. Imagem retirada de (Vogel et al., 2019).

Em Portugal, no ano de 2019, cerca de 3,8% da mortalidade total foi devida ao AMI, atingindo mais os homens do que as mulheres, com uma relação de 133,2 óbitos de homens por 100 óbitos de mulheres. Neste mesmo ano e devido ao AMI, 81,2 anos foi a idade média de óbito para as mulheres e 73,2 anos correspondia à idade média de óbito dos homens. Do número total de mortes devido a esta doença, as pessoas com 65 anos ou mais, apresentam uma taxa de mortalidade de 81,4%; para as pessoas com 75 ou mais anos, era de 63,3%. Estes resultados podem ser observados na Figura 3 (Instituto nacional de estatística, 2021).

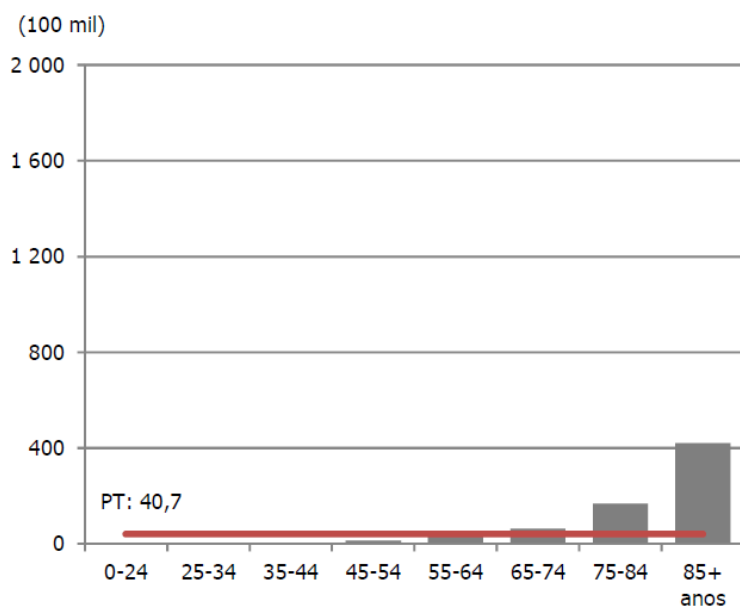


Figura 3. Taxa bruta de mortalidade em Portugal, no ano de 2019, devido ao AMI, por 100 mil habitantes, dividido por grupos etários. Imagem retirada de (Instituto nacional de estatística, 2021).

O comportamento de um indivíduo pode aumentar o risco associado à ocorrência do AMI. Existem comportamentos de risco que podem ser modificados, tais como, má alimentação, estilo de vida sedentária, obesidade, stress, consumo de tabaco e de álcool. Existem outros fatores como o género, a idade, que podem causar as DCVs e não estão diretamente associadas ao comportamento do indivíduo. Cerca de 70% das mortes por AMI, são atribuídas à oclusão por parte das placas ateroscleróticas. Assim, é importante prevenir esta oclusão que também está associada à inatividade física, hipertensão, níveis elevados de colesterol, em particular o LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Timmis et al., 2020)(Timmis et al., 2022). Na Figura 4 está representado o número de mortes em Portugal, no ano de 2021, devido às DCVs, dividido pelo fator de risco associado.

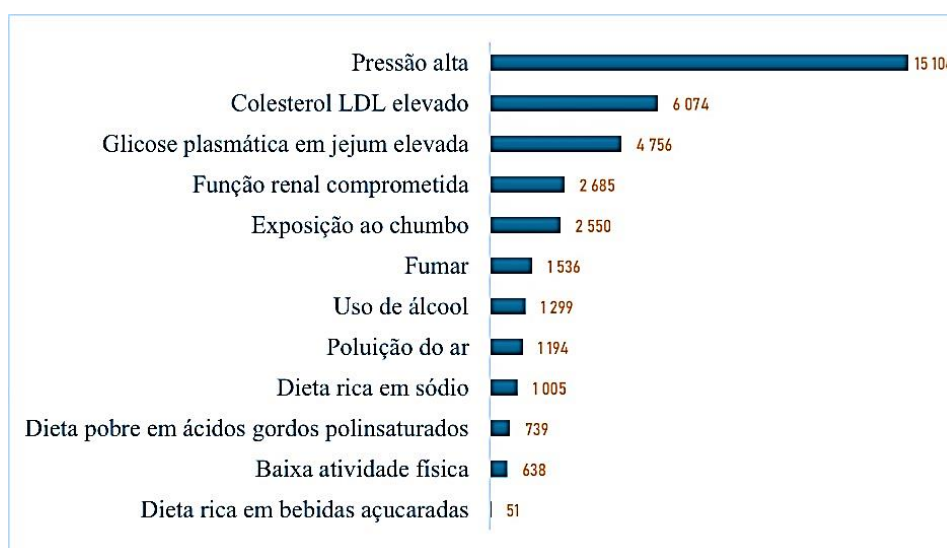


Figura 4. Número de mortes em Portugal, associado a DCVs, dividido por fatores de risco, em 2021. Imagem adaptada de (Our World in Data, 2021).

As DCVs podem apresentar alguns sintomas como dor no peito, falta de ar, fadiga ou diminuição da capacidade de realizar exercício físico. Em alguns indivíduos, a contratilidade do coração parece ser adequada em repouso; no entanto, problemas relacionados com a estrutura ou as funções da circulação coronária, o músculo cardíaco, as válvulas ou mesmo o sistema elétrico podem afetar a resposta do coração durante a prática de exercício. Também pode haver restrições a indivíduos que, apesar de serem fisicamente capazes de praticar exercício físico, enfrentam risco de arritmia súbita com risco de vida ou outro colapso físico, como, por exemplo, a cardiomiopatia hipertrófica avançada (*Advances in the Diagnosis and Evaluation of Disabling Physical Health Conditions*, 2023).

Para prevenir o desenvolvimento ou ocorrência das DCVs, é importante que haja esforços tanto a nível individual como populacional. É crucial ter em atenção os fatores de risco associados às DCVs como, por exemplo, a obesidade ou a hipertensão, mantendo uma alimentação saudável e uma atividade física ativa (Cardiovascular Disease, 2022).

O papel fundamental para prevenir as mortes por DCVs passa também pelo diagnóstico precoce. Atualmente, o diagnóstico pode ser realizado por vários métodos, como o ECG, a monitorização por Holter, o ecocardiograma ou a análise de biomarcadores (Cardiovascular Disease, 2022). Apenas 57% dos indivíduos com AMI revelam alterações no ECG (Figura 2). Este valor indica que quase metade dos pacientes com AMI apresentam ECG normais, tornando este método insuficiente para diagnosticar corretamente os indivíduos com AMI. Assim, a medição dos níveis de biomarcadores no plasma é uma estratégia aplicada para auxiliar no diagnóstico desta doença (Reyes-Retana & Duque-Ossa, 2021). Na Tabela 1 estão resumidas as principais ferramentas de diagnóstico para avaliação cardíaca com as respetivas aplicações.

Tabela 1. Principais ferramentas de diagnóstico para avaliação cardíaca e as respectivas funções (Kogularasu et al., 2024).

Tipo de diagnóstico	Função
Eletrocardiograma	Informações em tempo real sobre a frequência cardíaca e ritmo. Pode detetar arritmias, isquemia e enfarte do miocárdio
Ecocardiografia	Informações estruturais e funcionais sobre o coração em tempo real
Testes de stress (ECG de esforço, ecocardiograma)	Avalia a resposta do coração ao stress ou ao exercício, ajudando a detetar isquemia ou arritmias
Ultrassom intravascular	Utilização de ondas sonoras que produzem imagens internas das artérias coronárias
Tomografia de coerência ótica	Fornecer imagens de alta resolução das artérias coronárias, permitindo caracterizar a natureza das placas ateroscleróticas
Biossensores	Ferramenta de diagnóstico rápida, económica e sensível para os diversos biomarcadores

O tratamento para as DCVs irá depender da causa e do dano cardíaco causado. Uma parte crucial no tratamento da doença é adotar um estilo de vida saudável, como seguir uma dieta com baixo teor de gordura e de sal, praticar regularmente exercício físico, dormir bem, não fumar, entre outros. Caso não seja suficiente, é possível recorrer a medicação que, por exemplo, dilate as artérias ou previna os coágulos sanguíneos. Pode ainda ser necessário recorrer a uma cirurgia, para a colocação de um *stent* nas artérias do coração (Cardiovascular Disease, 2022).

Atualmente, a tecnologia de biossensores baseada no *lab-on-a-chip* tem sido estudada para a deteção de marcadores cardíacos. Os dispositivos PoC continuam a ser desenvolvidos e melhorados, sendo portáteis e capazes de realizar com alta sensibilidade e rapidamente as medições de quantificação de biomarcadores cardíacos. Estes dispositivos permitem um diagnóstico mais rápido, diminuem o tempo dos indivíduos nos pontos de atendimento e permitem a sua utilização em contexto não hospitalar, podem ser utilizados num veículo de emergência (Savonnet et al., 2021). A deteção precoce de biomarcadores associados ao AMI apresenta uma alternativa de diagnóstico precoce para esta doença. Deste modo, na presente dissertação, foi estudado um biomarcador cardíaco para detetar o AMI.

2.1.2 Biomarcadores cardíacos

Como referido anteriormente, as DCVs podem desenvolver-se por diversas causas, o que torna o diagnóstico clínico mais complexo. As diversas doenças associadas às DCVs afetam diferentes partes do corpo, por exemplo, na doença arterial coronária ocorre o estreitamento dos vasos sanguíneos no coração, enquanto que a insuficiência cardíaca está relacionada com problemas

nas funções de bombeamento/relaxamento do coração; já a doença arterial periférica visa problemas com os vasos sanguíneos dos braços, pernas ou órgãos abdominais (Cardiovascular Disease, 2022).

Um biomarcador é uma molécula biológica, que pode ser encontrada no sangue, em fluidos corporais ou nos tecidos, e que serve como indicador de um processo normal ou anormal, ou mesmo de uma condição ou doença (Biomarker, n.d.). Os biomarcadores cardíacos são substâncias endógenas libertadas na corrente sanguínea quando o músculo cardíaco é danificado ou stressado (Patibandla et al., 2024). Estes biomarcadores são muito importantes para identificar pessoas com elevado risco e diagnosticar condições de doença de forma rápida, confiável e eficaz (Thupakula et al., 2022). Um biomarcador ideal deve apresentar várias características, tais como: (a) elevada sensibilidade e especificidade clínica, (b) libertação rápida no fluido corporal possibilitando um diagnóstico precoce, (c) capacidade de manter níveis elevados durante mais tempo no fluido e (d) capacidade de ser medido quantitativamente (Qureshi et al., 2012).

Dependendo do tipo de aplicação a que o biomarcador se destina, estes podem proporcionar informações adicionais sobre uma determinada doença ou a intervenção necessária. Podem ser identificados em diversos eventos, desde a patogénese, início das primeiras manifestações clínicas até o resultado do tratamento ou mesmo a recuperação. Assim, os biomarcadores podem ser classificados de acordo com a sua aplicação clínica: diagnóstico, monitorização, farmacodinâmicos, preditivos, prognóstico, segurança e de risco (Figura 5) (García-Gutiérrez et al., 2020).

Tipo de biomarcador	Definição
Diagnóstico	Deteta ou confirma a presença de uma doença, subtipos da doença ou condição médica.
Monitorização	Monitorizar o estado de uma doença e a resposta à intervenção
Farmacodinâmicos	Avaliar a resposta a uma condição médica ou intervenção clínica
Preditivo	Prever a probabilidade de desenvolver qualquer efeito como consequência de uma intervenção clínica
Prognóstico	Identificar a probabilidade de desenvolver um evento clínico em doentes com uma doença ou condição clínica
Segurança	Avaliar a probabilidade de desenvolver sinais de toxicidade como evento adverso da intervenção
Risco	Medir o risco de um indivíduo desenvolver uma doença ou condição médica

Figura 5. Esquema com os diferentes tipos de biomarcadores com os respetivos objetivos. Imagem adaptada de (García-Gutiérrez et al., 2020).

Na Tabela 2 estão listados vários biomarcadores cardíacos específicos para a doença coronariana.

Tabela 2. Lista dos biomarcadores cardíacos primários utilizados clinicamente, destacando os respectivos valores de corte (Qureshi et al., 2012).

Biomarcador cardíaco	Doenças detetadas pelo biomarcador	Níveis de corte	Especificidade	MW (kDa)	Aumento inicial	Hora do pico	Tempo para voltar ao normal	Teste PoC disponível
Mieloperoxidase (MPO)	Deteção de inflamação	Pacientes com níveis elevados de MPO; > 350 ng/mL	Médio	150	ND	ND	ND	Sim
Proteína de ligação a ácidos gordos do coração (H-FABP)	Necrose miocárdica	Níveis de H-FABP \geq 6 ng/mL risco de estratificação	Baixo	15	2-3 h	8-10 h	18-30 h	Sim
TNF - α	Inflamação/fator de risco cardíaco	< 0,0036 ng/mL baixo risco \geq 0,0036 ng/mL alto risco	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Interleucina-6 (IL-6)	Inflamação/fator de risco cardíaco	Baixo < 0,0013 ng/mL Médio 0,00138 – 0,002 ng/mL Alto > 0,002 ng/mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Troponina I (TnI)	Deteção do AMI	0,01 – 0,1 ng/mL	Alto	23.5	4-6 h	12-24 h	6-8 dias	Sim
Troponina T (TnT)	Deteção do AMI	0,05 – 0,1 ng/mL	Alto	37	4-6 h	12-24 h	7-10 dias	Sim
Mioglobina (Myo)	Deteção precoce AMI	70 – 200 ng/mL	Baixo	18	1-3 h	6-12 h	24-48 dias	Sim

Tabela 2. Continuação.

Biomarcador cardíaco	Doenças detetadas pelo biomarcador	Níveis de corte	Especificidade	MW (kDa)	Aumento inicial	Hora do pico	Tempo para voltar ao normal	Teste PoC disponível
Proteína C-Reativa (CRP)	Deteção precoce de inflamação/fator de risco cardíaco	< 103 ng/mL Baixo risco 1 – 3×10 ³ ng/mL Risco intermediário >3 – 15 ×10 ³ ng/mL alto risco (não definitivo)	Alto	125	ND	ND	ND	Sim
Subforma MB de creatina quinase (CK-MB)	Deteção precoce de AMI	10 ng/mL	Médio	85	4-6 h	12-24 h	3-4 days	Sim
Peptídeo natriurético tipo B (BNP)	Síndromes coronarianas agudas/diagnóstico de insuficiência cardíaca/sobrecarga ventricular		Alto	3.4	ND	ND	ND	Sim
Peptídeo natriurético tipo pró-B N-terminal (NT-proBNP)	Síndromes coronarianas agudas/diagnóstico de insuficiência cardíaca/sobrecarga ventricular	0.25 – 2 ng/mL	Alto	8.5	ND	ND	ND	Sim

Durante o AMI, a concentração dos diferentes biomarcadores cardíacos específicos presentes no sangue, variam ao longo do tempo, como é possível verificar pela Figura 6. Assim, existe uma variedade de biomarcadores que podem ser potencialmente analisados em simultâneo para que haja um diagnóstico mais preciso desta doença (Savonnet et al., 2021).

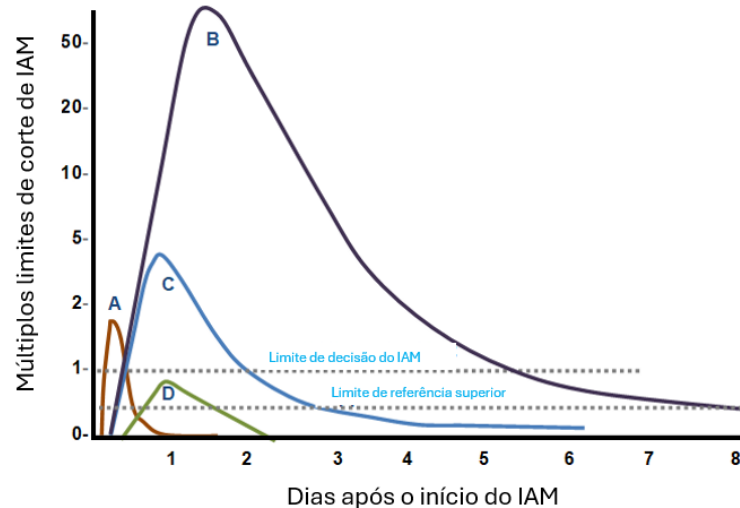


Figura 6. Gráfico com o surgimento dos biomarcadores cardíacos no sangue ao longo do tempo após o início dos sintomas do AMI. Pico A, libertação precoce da Myo. Pico B, TnT cardíaco após AMI. Pico C, Isoenzima Creatina Quinase com subunidades B e M (CK-MB, do inglês, *Creatine Kinase Isoenzyme with B and M subunits*) após AMI. Pico D, troponina T cardíaca após angina instável. Os dados são apresentados numa escala relativa, onde 1,0 é definido como concentração limite para o IM (Coven et al., 2020).

Nos últimos anos, o estudo dos biomarcadores associados aos mecanismos de desenvolvimento e rutura da placa aterosclerótica tem tido particular interesse (Martín-Ventura et al., 2009). Entre estes biomarcadores, destaca-se a proteína C-reativa (CRP, do inglês, *C-Reactive Protein*), uma vez que este tem sido o mais frequentemente estudado para o risco cardiovascular (RCV). O risco de desenvolver DCVs isquémicas varia com os níveis séricos de CRP: é baixo quando os níveis são inferiores a 1 mg/L; médio quando estão entre 1 e 2 mg/L, e alto quando são superiores a 2 mg/L. Os pacientes com níveis basais elevados de CRP apresentam um maior risco de desenvolver as DCVs, diabetes *mellitus* do tipo 2 e hipertensão sistémica (Banait et al., 2022).

Ao longo dos últimos anos, os biomarcadores que avaliam a necrose miocárdica têm sido alvo de uma atenção especial. O aspartato aminotransferase, primeiro biomarcador utilizado para o diagnóstico do AMI, e o lactato desidrogenase são biomarcadores que atualmente já não são utilizados visto que ambos não são altamente específicos para o coração. Estes biomarcadores foram ultrapassados com o desenvolvimento de novos ensaios para a CK e, especialmente, a troponina (Tn) cardíaca (Aydin et al., 2019). A Myo, comparativamente à Tn, é um biomarcador menos sensível, no entanto é dos primeiros biomarcadores a ser libertado e a surgir na corrente sanguínea após o início do AMI (Chan & Ng, 2010).

Quando um indivíduo começa a ter sintomas de AMI, a Myo é o primeiro biomarcador a ser libertado após o dano ocorrer nas células musculares do miocárdio, tal como está representado na Figura 6. Este biomarcador aumenta significativamente dentro de 1 a 3 horas, atinge o pico entre 9 a 12 horas e desaparece em 24 horas. As troponinas aumentam dentro de 4 a 9 horas após o AMI atingindo o valor máximo dentro de 12 a 24 horas e permanece durante 8 dias. Após a lesão do miocárdio, o aumento inicial da CK-MB ocorre de 4 a 9 horas e retorna aos valores basais dentro de 48 a 72 horas (Vílchez et al., 2014). Desta forma, a deteção precoce destes biomarcadores é fundamental para prevenir, diagnosticar, tratar e fornecer informações prognósticas para condições patológicas, diminuindo a morbidade e a mortalidade (Omran et al., 2022). Nesta dissertação, com o objetivo de detetar o AMI precocemente, o biomarcador selecionado é a Myo.

De seguida, são apresentadas algumas características importantes da Myo, o biomarcador cardíaco escolhido para o diagnóstico do AMI.

2.1.2.1 Myo

A Myo é uma proteína heme, que está presente no músculo cardíaco e esquelético (Bakirhan et al., 2018). Tem como função armazenar oxigénio nos músculos (Vanek & Kohli, 2024). A Myo tem um peso molecular de 17,8 KDa. Quando ocorre algum dano no coração, esta proteína pode ser encontrada na corrente sanguínea. A Myo é libertada na corrente, entre 1 a 3 h, após o início do AMI e o seu nível pode subir até 900 ng/mL, sendo que o seu valor normal é de 30 a 90 ng/mL (Bakirhan et al., 2018). Dentro de 4 a 12 horas atinge o seu pico, e retorna ao normal dentro de 24 a 36 horas (Dasgupta et al., 2014). Durante um IAM, a AMI é dos primeiros biomarcadores a ser libertado. Em indivíduos saudáveis, o nível de Myo no soro encontra-se entre 0,008 a 0,98 ug/mL e em indivíduos onde ocorreu uma lesão muscular, a Myo aumenta para 79,9 ug/mL (Bakirhan et al., 2018). Na Figura 7 está representada a estrutura 3D da molécula da molécula Myo.

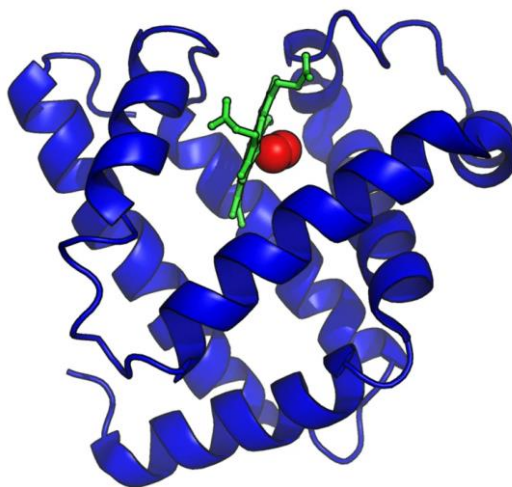


Figura 7. Estrutura 3D da molécula Myo. Imagem retirada de (Crystallography365, 2014).

2.2 Biossensores

Os biossensores visam melhorar a qualidade de vida, detetando com alta sensibilidade e monitorizando com precisão alterações fisiológicas no corpo humano (Tetyana et al., 2021). Os biossensores são dispositivos analíticos que possuem um elemento de biorreconhecimento e um transdutor físico-químico. Este gera um sinal mensurável, que é proporcional à quantidade do analito em análise (Bakirhan et al., 2018).

Os biossensores apresentam uma vasta aplicabilidade, como demonstrado na Figura 8, desde o diagnóstico médico, a monitorização ambiental, o controlo de qualidade de alimentos, o desenvolvimento de medicamentos, ciências forenses, deteção de doenças, entre outros; que podem ser detetados em fluidos corporais, como no sangue, na urina, saliva ou suor (Bhalla et al., 2016).

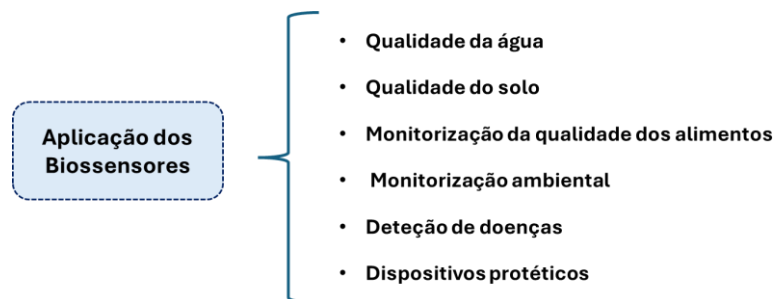


Figura 8. Esquema com as áreas de aplicação dos biossensores. Imagem adaptada de (Bhalla et al., 2016).

Os biossensores podem ser classificados por via dos seus elementos de biorreconhecimento ou pelo tipo de transdutor, tal como está demonstrado na Figura 9.

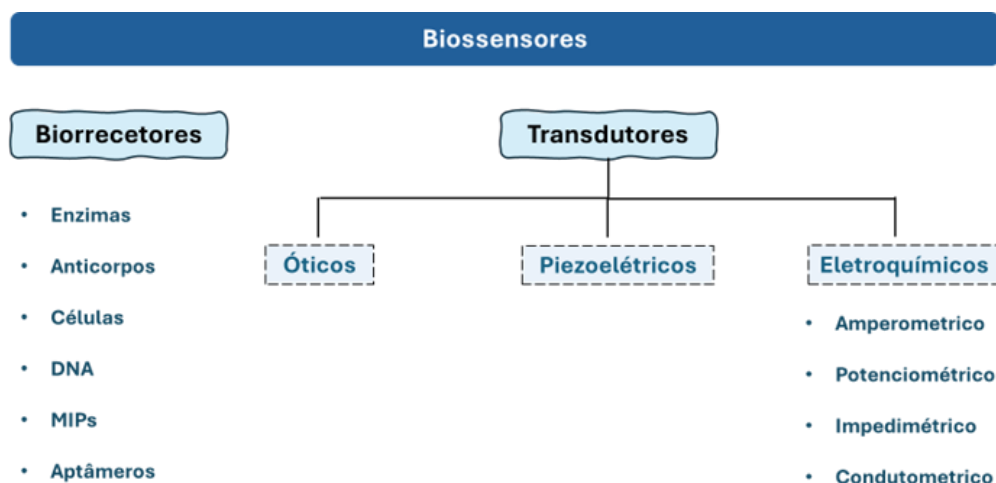


Figura 9. Classificação dos biossensores. Imagem adaptada de (Karunakaran et al., 2015).

2.2.1 Estrutura de um biossensor

Um biossensor é constituído pelo analito, biorrecetor, transdutor, sistema eletrónico e *display*. Na Figura 10 estão representados os componentes essenciais de um biossensor. Cada componente representado apresenta um objetivo distinto, tal como é possível verificar de seguida (Bhalla et al., 2016).

- **Analito** – substância de interesse que é detetada.
- **Biorrecetor** – elemento que reconhece o analito. Quando ocorre a interação do biorrecetor com o analito, este processo é denominado de biorreconhecimento.
- **Transdutor** – converte o evento de biorreconhecimento num sinal mensurável. Estes sinais, geralmente são proporcionais à quantidade de interações entre o analito e o biorrecetor. O processo de converter energia é denominado de sinalização.
- **Condicionamento do sinal** – componente do biossensor que processa o sinal traduzido e o prepara para posterior análise no *display*. Consiste em circuitos eletrónicos que condicionam o sinal, como a amplificação ou a conversão de sinais analógicos para sinais digitais.
- **Display** – Combinação do hardware e do software que fornecem os resultados do biossensor de uma forma perceptível ao utilizador final. O sinal de saída pode ser numérico, gráfico ou imagem.

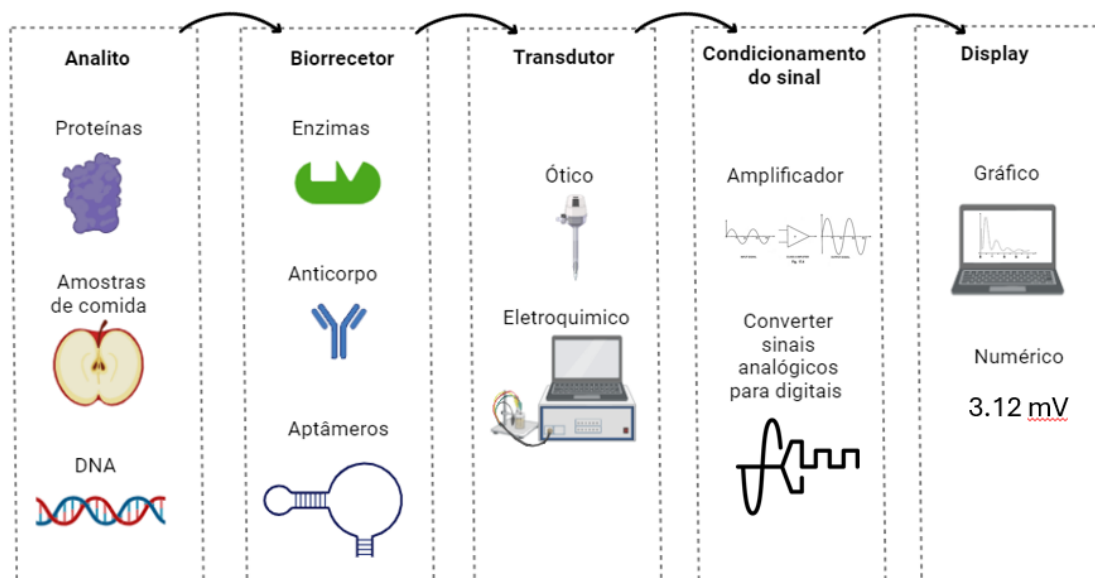


Figura 10. Representação dos componentes de um biossensor. Imagem adaptada de (Bhalla et al., 2016).

2.2.2 Características de um biossensor

Existem características e propriedades que todos os biossensores devem possuir, tais como, seletividade, reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade e linearidade. A otimização dessas mesmas propriedades afeta o desempenho final do biossensor. Na Figura 11 estão esquematizadas as características ideais de um biossensor e de seguida é apresentada a descrição de cada uma (Bhalla et al., 2016).

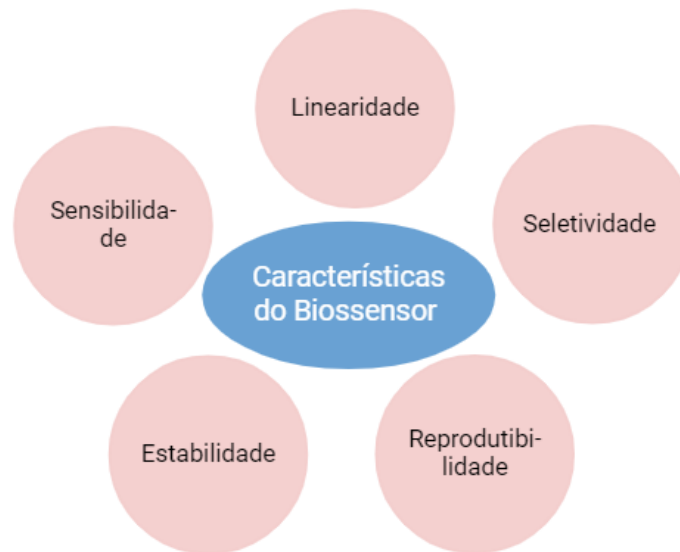


Figura 11. Esquema com as características ideais de um biossensor. Imagem adaptada de (Bhalla et al., 2016).

- **Seletividade** – capacidade do biorrecetor detetar o analito específico numa amostra contendo outras substâncias. A seletividade é das características mais importantes de um biossensor.
- **Reprodutibilidade** – capacidade do biossensor gerar respostas idênticas para uma configuração experimental duplicada. Esta é caracterizada pela precisão, aptidão do sensor fornecer resultados homogêneos sempre que uma mesma amostra é medida, e pela exatidão, capacidade do sensor proporcionar um valor médio próximo do valor verdadeiro quando uma amostra é medida mais do que uma vez; do transdutor e da eletrónica do biossensor. Sinais reprodutíveis proporcionam alta confiabilidade e robustez.
- **Estabilidade** – é caracterizado como sendo o grau de suscetibilidade a perturbações ambientais dentro e ao redor do sistema de biossensor; que podem causar desvios nos sinais de saída de um biossensor; possibilitando a causa de erros na concentração medida, afetando a precisão e a exatidão do biossensor. Biorrecetores com elevadas afinidades estimulam fortes ligações eletrostáticas do analito, fortalecendo a estabilidade do biossensor. A afinidade corresponde ao grau em que o analito se liga ao biorrecetor.

- **Sensibilidade/limite de detecção (LoD, do inglês, *Limit of Detection*)** corresponde à quantidade mínima de analito que pode ser detetada pelo biossensor. Para as aplicações de monitorização médica e ambiental, um biossensor é fundamental para detetar concentrações de analito tão baixas quanto ng/mL ou fg/mL de forma a confirmar a presença de vestígios de analitos numa amostra.
- **Linearidade** – atributo que apresenta a precisão da resposta medida, para um conjunto de medições com concentrações de analito distintas, numa linha reta, onde matematicamente é representada por $y=mc$, onde c corresponde à concentração do analito; y é o sinal de saída e m é a sensibilidade do biossensor. A linearidade do biossensor pode estar associada à resolução do biossensor, que corresponde à menor alteração na concentração do analito que provoque uma alteração na resposta do biossensor; e à faixa de concentração do analito em teste, que é definida como a faixa de concentrações do analito para a qual a resposta do biossensor muda linearmente com a concentração.

2.3 Elementos de biorreconhecimento

Tal como foi referido anteriormente, um elemento de biorreconhecimento, apresenta como principal objetivo fornecer especificidade relativamente ao analito. Existem inúmeras classes de elementos de biorreconhecimento, que dão origem a estruturas distintas que influenciam as características de desempenho do biossensor. Estes elementos podem ser de origem natural ou sintética. Os de origem natural podem ser os anticorpos ou as enzimas. Os de origem sintética são estruturas projetadas artificialmente desenvolvidas para reproduzir interações fisiologicamente definidas (Morales & Halpern, 2018). Na Figura 12 estão esquematizados os elementos de biorreconhecimento mais utilizados, com as respetivas vantagens e desvantagens. De seguida, são brevemente resumidos os elementos de biorreconhecimento.

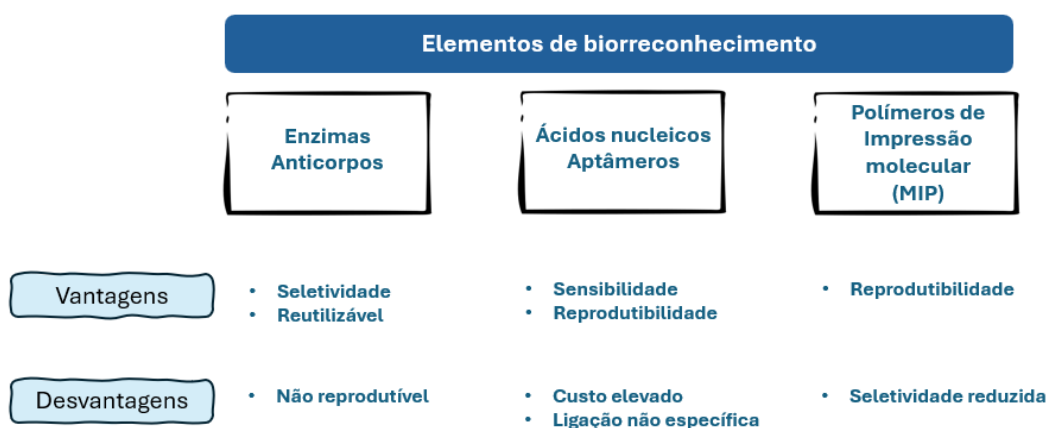


Figura 12. Esquema com as vantagens e desvantagens de cada elemento de biorreconhecimento. Imagem adaptada de (Morales & Halpern, 2018).

2.3.1 Anticorpos

O imunoensaio é uma técnica bioanalítica que funciona como resultado de uma resposta de um antígeno, ou seja, o analito, e um anticorpo; permitindo a quantificação de um analito. Um imunossensor é uma ferramenta analítica, que utiliza anticorpos ou fragmentos de anticorpos e é geralmente usada em diversos setores industriais, como na agricultura ou na farmacêutica, em análises clínicas e em diagnósticos, entre outros (Lim & Ahmed, 2019).

Um imunossensor utiliza um anticorpo, como biorrecetor para reconhecimento molecular específico de antígeno formando de seguida, um imunocomplexo estável. Os anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imunológico, mais precisamente pelos glóbulos brancos, com características de reconhecimento de antígeno, com forte afinidade e especificidade para os seus analitos alvo (Griffin & Stratis-Cullum, 2009; Sande et al., 2021). Os anticorpos compartilham uma tendência estrutural geral de uma conformação 3D, com forma de “Y”. As porções de ligação ao analito da molécula é a região variável de cadeia pesada (H) e a região variável de cadeia leve (L) (Griffin & Stratis-Cullum, 2009; Morales & Halpern, 2018). O local de um antígeno no qual um anticorpo complementar pode ser ligado especificamente é denominado de epítopo ou determinante antigénico (Merck, 2014). As regiões VH e VL estão conectadas através de ligações dissulfureto. A estrutura básica de um anticorpo está representada na Figura 13. As VL podem ser de dois tipos: κ (kappa) ou λ (lambda). Cada anticorpo possui cadeias κ ou cadeias λ ; mas nunca uma de cada. A função efetora de um anticorpo é definida pela estrutura da cadeia pesada. As cadeias pesadas de anticorpos humanos podem ser um dos cinco isótopos: imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina D (IgD), imunoglobulina E (IgE), imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) (Janeway et al., n.d.).

Existem dois tipos de anticorpos: os monoclonais e os policlonais. Os anticorpos monoclonais têm origem num único clone celular e apresentam elevada especificidade ao se ligarem a apenas a um epítopo no antígeno alvo. Já os anticorpos policlonais surgem de múltiplos clones de células B, compreendem uma gama de reconhecimento de epítopos mais extensa, apresentando diversidade estrutural. Os anticorpos policlonais podem ser construídos mais rapidamente, com menor custo, como reconhecem múltiplos epítopos estes são mais tolerantes a pequenas alterações na natureza do antígeno. As principais vantagens dos anticorpos monoclonais são a sua homogeneidade e a consistência. A decisão entre utilizar anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais está dependente de uma vasta gama de fatores, a utilização pretendida e se o anticorpo está prontamente disponível nos fornecedores comerciais ou nos investigadores (Lipman et al., 2005; Singh et al., 2021).

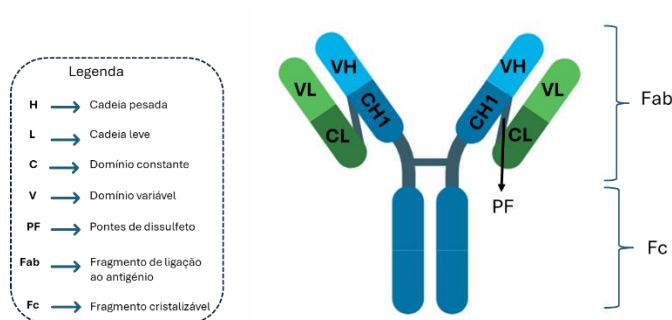


Figura 13. Estrutura básica de um anticorpo. Imagem adaptada de (Merck, 2014).

Os imunoenaios podem ser classificados em: competitivo e não competitivo; direto e indireto. Num imunoenasiao competitivo, os vários analitos são misturados simultaneamente, onde irão competir entre si pela ligação ao número limitado de locais de ligação ao anticorpo. Num imunoenasiao não competitivo os antígenos deveram possuir pelo menos dois epítomos para o seu anticorpo específico. Neste formato, os antígenos da amostra são capturados por um anticorpo imobilizado, que está disponível em excesso, e é exposto a um excesso de anticorpo marcado. Num imunoenasiao direto, o anticorpo ou o antígeno é diretamente imobilizado na superfície do suporte de ensaio após um período de incubação com um anticorpo ou antígeno marcado com um marcador para detecção. O imunoenasiao indireto o anticorpo primário não é medido diretamente nem marcado, no entanto um outro anticorpo é colocado no sistema de ensaio que pode vir a reconhecer o anticorpo ou o antígeno primário (Lim & Ahmed, 2019). Na Figura 14, estão esquematizados os tipos de imunoenasiao referidos anteriormente.

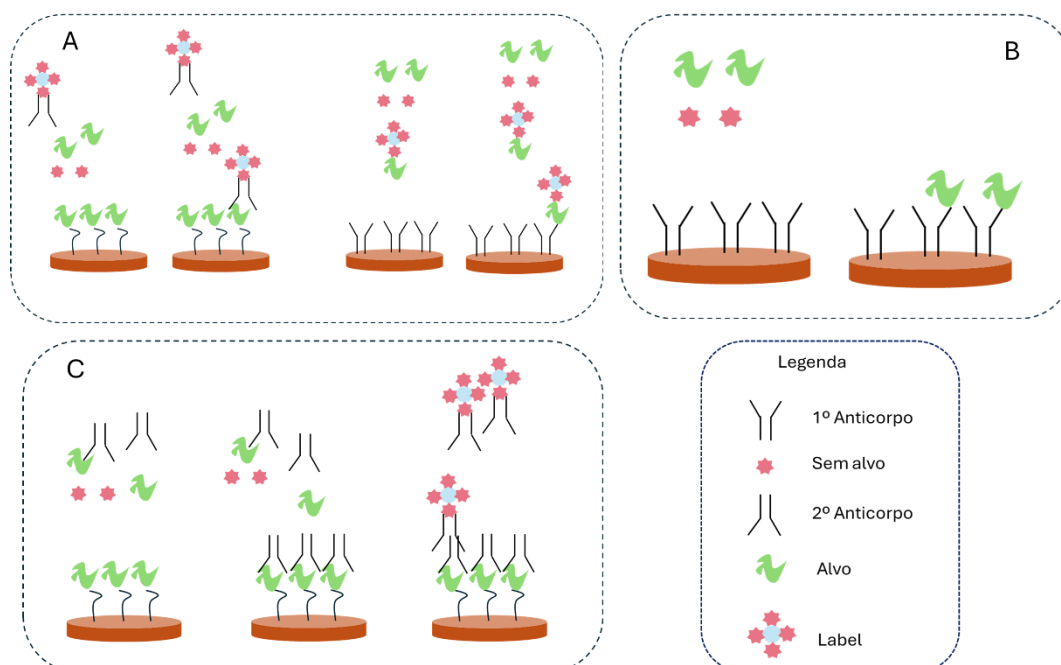


Figura 14. Principais formatos de imunoenasiao. (A) formato indireto competitivo; (B) formato direto competitivo; (C) nenhum ensaio competitivo.

2.3.2 Aptâmeros

Os aptâmeros são sequências oligonucleotídicas de ácido ribonucleico (RNA, do inglês, *ribonucleic acid*) e de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês, *deoxyribonucleic acid*) de fita simples, que são altamente seletivas e se ligam a determinados alvos, facilitando a sua detecção eficiente (Singh et al., 2021). Os aptâmeros fornecem uma ampla gama de aplicações de biossensores com a capacidade de atingir vários bioanalitos, como os iões metálicos, moléculas pequenas e proteínas. Os aptâmeros são obtidos através de um processo de seleção combinatoria denominado de Evolução Sistêmica de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX, do inglês, *Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). SELEX é um processo iterativo, que pesquisa uma biblioteca de sequências de oligonucleotídeos, assegurando um par de interação forte e seletivo. Tal como é possível verificar pela Figura 15, a biblioteca de oligonucleotídeos contém todas as potenciais sequências de aptâmeros, assim o ciclo SELEX começa com a incubação do bioanalito alvo com a respetiva biblioteca. São retidas apenas as sequências de aptâmeros ligados para posterior amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e os não ligados são removidos. A biblioteca de oligonucleotídeos é regenerada e reinicia o próximo ciclo de SELEX. Uma desvantagem deste método é o seu custo, exigindo múltiplas iterações usando uma grande biblioteca de oligonucleotídeos de cada vez (Morales & Halpern, 2018). Os aptassensores são os biossensores em que o elemento de biorreconhecimento utilizado é um aptâmero. Na literatura, existem três diferentes metodologias para construir um aptassensor: modo troca de estrutura, modo de reciclagem assistido por enzima e modo baseado em aptâmero dividido (Ning et al., 2020).

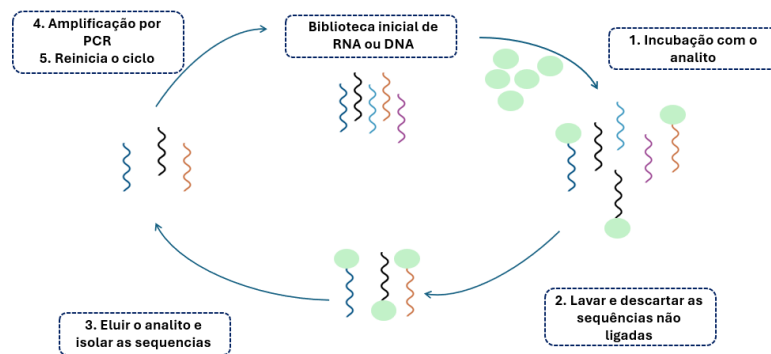


Figura 15. Esquema da técnica de SELEX. Imagem adaptada de (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016).

2.3.3 Polímeros de impressão molecular

O reconhecimento molecular surge como uma alternativa promissora, desafiadora e inovadora aos materiais naturais, desempenhando um papel fundamental nos diversos processos da vida. Tais processos como a seletividade e atividade de enzimas, ou a interação precisa de recetores e anticorpos com os seus alvos específicos. Os recetores de fontes naturais tais como as enzimas e anticorpos são uma ferramenta valiosa em diversas áreas tais como na investigação biológica e farmacêutica, no diagnóstico, na terapia e administração de medicamentos (Em et al., 2013;

Parisi et al., 2022). O reconhecimento molecular (RM) é a capacidade de uma molécula “reconhecer” outra, através de interações de ligação ou de geometria (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016). O RM nos recetores naturais apresenta algumas desvantagens como a estabilidade química e física, por vezes o isolamento e a purificação da natureza ou a síntese bioquímica são dispendiosos, demorados e trabalhosos e a estabilidade das biomoléculas é limitada. Assim, é crucial investigar sistemas sintéticos mais estáveis que imitam processos de reconhecimento altamente seletivos e sensíveis (Em et al., 2013; Parisi et al., 2022).

A impressão molecular é uma técnica inspirada na natureza, e é definida como um processo de formação de polímero induzida por um estímulo, que possui locais de reconhecimento específicos, onde existe um posicionamento e orientação dos componentes estruturais do material (Piletsky & Turner, 2006). Para isso, são utilizados monómeros, na presença de uma molécula alvo, que são polimerizados. Após a polimerização, a molécula alvo é removida, gerando na matriz polimérica cavidades de reconhecimento específicas da molécula alvo utilizada, ou seja, com tamanho, forma e funcionalidades químicas complementares a ele. Estes são denominados de MIP (Ostrovidov et al., 2023), considerado como recetores artificiais biomiméticos (Herrera-Chacón et al., 2021). Esta técnica está representada na Figura 16. A utilização dos MIPs apresenta várias vantagens, tais como: facilidade em fabricar em grandes quantidades, são económicos, apresentam uma vida útil prolongada, podendo ser fabricados para praticamente qualquer molécula alvo. Além disso, as propriedades podem ser facilmente ajustadas devido aos inúmeros monómeros disponíveis, apresentam alta afinidade e seletividade (Ostrovidov et al., 2023). Os polímeros não impressos (NIP, do inglês, *Non Imprinted Polymers*) são sintetizados da mesma forma que os MIPs, no entanto, na etapa de eletropolimerização, eles são sintetizados sem a presença da molécula alvo, não havendo o processo de arranjo, nem cavidades. Assim, a síntese dos NIPs é importante para fins de comparação, demonstrando que existe um efeito de impressão no polímero sintetizado, ou seja, no MIP. Comparando o desempenho do NIP relativamente ao MIP, é possível determinar a força de afinidade ou a resposta do sensor, que é definida como fator de impressão (IF, do inglês, *Imprinting Factor*). Quanto maior o valor do IF do MIP, melhor será o desempenho do sensor. Para valores próximos de 1, o efeito da impressão é quase insignificante, indicando que a interação MIP-analito não é específica (Herrera-Chacón et al., 2021).

Existem principalmente três tipos de interações entre os analitos e os monómeros: as covalentes, não covalentes e as semicovalentes. A interação covalente ocorre quando há a combinação de moléculas alvo e monómeros funcionais por meio de ligações covalentes reversíveis. Na interação não covalente os monómeros funcionais e as moléculas alvo são organizados previamente por *self-assembly* por meio de ligações não covalentes, como ligação de hidrogénio, para se formar o modelo. Na interação semicovalente há uma combinação da interação covalente, que ocorre no processo de impressão; com a interação não covalente, que decorre na religação dos monómeros com a molécula alvo (Dong et al., 2021). Na Figura 16 estão representadas as sínteses do MIP e do NIP.

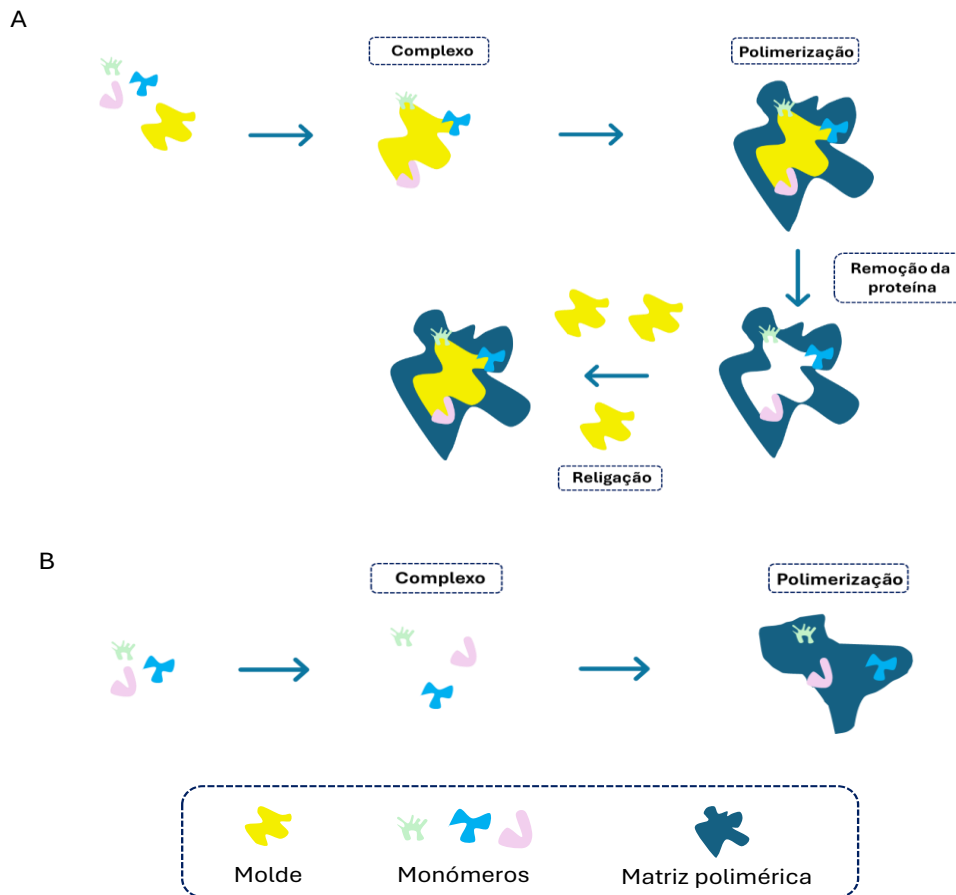


Figura 16. Representação esquemática da síntese dos recetores artificiais biomiméticos: (A) técnica de MIP e (B) técnica de NIP. Imagem adaptada de (Herrera-Chacón et al., 2021).

2.3.3.1 Síntese do MIP

A impressão molecular é uma técnica muito benéfica para incorporar locais específicos de reconhecimento de substratos em polímeros (Puoci et al., 2010). Durante a síntese dos MIPs, existem parâmetros que devem ser avaliados, uma vez que estes podem influenciar a morfologia, as propriedades físico-químicas e o desempenho dos polímeros. Para obter MIPs funcionais eficientes, a escolha dos reagentes químicos é importante. Existem várias moléculas alvo que podem ser usadas, tais como, aminoácidos, fármacos, proteínas, coenzimas, entre outros (Vasapollo et al., 2011). A escolha do analito é crucial para a seleção e organização dos grupos funcionais em torno dos monómeros funcionais. Na polimerização de radicais livres, os analitos devem ser quimicamente inertes (Sajini & Mathew, 2021).

A escolha do monómero é de extremamente importante, uma vez que este irá criar cavidades altamente específicas que são projetadas para o analito. Existem inúmeros monómeros que podem ser utilizados, como ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, entre outros (Vasapollo et al., 2011). O ácido metacrílico (MAA, do inglês, *Methacrylic Acid*), é um ácido carboxílico que tem sido vastamente utilizado devido às suas características de estabelecer ligações de hidrogénio,

e a dimerização do MAA pode aumentar o efeito de impressão (L. Chen et al., 2016). Para selecionar o melhor monómero para a síntese, é importante considerar a força e a natureza das interações analito-monómero (Vasapollo et al., 2011). Na presente dissertação, o monómero escolhido foi a o-PD.

Para produzir um MIP com as propriedades desejadas, é importante escolher a técnica mais adequada de polimerização. Para a síntese dos MIPs, a polimerização é uma etapa fundamental. Isto é, quando ocorre uma reação de polimerização rápida e descontrolada, o polímero gerado pode apresentar cavidades inapropriadas à religação. Esta etapa pode ser ajustada adaptando as concentrações/escolhas dos reagentes, dos monómeros, do método ou fonte de iniciação, a superfície, entre outros (Herrera-Chacón et al., 2021). Existem diferentes técnicas de polimerização, e estas podem ser divididas em dois mecanismos: polimerização de radicais livres e polimerização por processos de sol-gel (Sajini & Mathew, 2021). O primeiro mecanismo, inclui polimerização em *bulk*, por emulsão, por precipitação, por suspensão e em superfície. Na polimerização por radicais livres, as mais utilizadas são a polimerização em *bulk*, que é considerada mais tradicional, e a polimerização de superfície. Deste modo, de seguida é apresentada uma breve descrição destes dois métodos, sendo que na presente dissertação foi selecionado o método de impressão de superfície, utilizando a técnica de eletropolimerização (Martins et al., 2023).

Impressão *bulk*

A impressão *bulk* foi das primeiras tecnologias a ser utilizadas na impressão molecular e atualmente é das mais utilizadas. Para o seu uso, é necessário preparar uma solução que contenha a molécula alvo, o monómero funcional, o agente de reticulação e o iniciador. Os polímeros de impressão de *bulk* são obtidos através de moagem mecânica e peneira (Shen et al., 2023). Esta técnica é aplicada com maior eficiência a modelos de moléculas de menores dimensões, visto que os modelos com dimensões maiores são mais difíceis de remover (Kryscio & Peppas, 2012). Este método é rápido e de simples execução. No entanto, a sua utilização apresenta algumas limitações tais como: 1) as partículas obtidas apresentam um tamanho e formato altamente irregulares e durante a moagem, alguns locais de interação são destruídos, levando a uma menor capacidade de carga dos MIPs, relativamente aos valores teóricos, 2) o procedimento de moagem e de peneiramento leva a perdas de polímero útil, que pode ser estimada entre 50 e 75% comparativamente à quantidade inicial do material (Yan & Row, 2006).

Impressão de superfície

De modo a combater as limitações da impressão *bulk*, surge a impressão de superfície. Nesta etapa, para preparar os complexos de pré-polimerização, mistura-se a molécula alvo com o monómero funcional. A polimerização é gerada na superfície de um substrato sólido, por exemplo de sílica, tendo presentes os iniciadores e os agentes de reticulação. Através de métodos físicos ou químicos, é removida a molécula alvo da camada polimérica, formando-se as cavidades na superfície do substrato sólido (Metwally et al., 2021).

Este método apresenta inúmeras vantagens, como ser fácil de preparar e aplicar, permitir o controlo do tamanho e da forma, possuir locais de ligação altamente seletivos, além de apresentar uma grande área de superfície e ser reprodutivos (Metwally et al., 2021).

Na impressão de superfície existem diferentes abordagens para preparar os sensores. Uma das técnicas utilizadas é a litografia suave, que usa padrões em escala micro e nano e o modelo é formado por “self-assembly”. Existem muitas outras técnicas como a imobilização domolécula alvo, impressão de micro-contacto; impressão de superfície via enxerto; polimerização em emulsão e ELP (Ertürk & Mattiasson, 2017). Na presente dissertação, o método utilizado na etapa de polimerização é a ELP. De seguida, apresenta-se uma breve descrição desta técnica.

Eletropolimerização

Para a síntese de polímeros, um método amplamente utilizado é a polimerização desencadeado por um estímulo elétrico, permitindo o desenvolvimento de diversos biossensores e de sensores químicos (Gavrilă et al., 2022). A ELP foi realizada pela primeira vez em 1999, por Malitesta et al., que utilizou a o-PD como monómero e teve como finalidade detetar a glucose (Florea et al., 2019). Esta técnica consiste na eletrodeposição de uma camada de polímero que cresce na superfície do elétrodo (Gavrilă et al., 2022).

Na ELP, o polímero cresce na superfície do elétrodo de trabalho, sem ser necessário uma etapa de imobilização. Neste caso, durante a polimerização, é fornecida energia eletroquímica ao sistema, o fluxo de eletrões transforma os monómeros que estão em volta do analito formando um filme, na superfície do elétrodo de trabalho. Posteriormente o analito é removido, deixando cavidades no polímero. Em seguida, ocorre o processo de incubação ou religação do analito nas cavidades formadas pela sua remoção. Por fim, o sinal pode ser medido, consoante o modo de transdução do sinal escolhido. Na Figura 17 está esquematizado este processo (Moreira Gonçalves, 2021). A ELP pode ser realizada por dois métodos: por oxidação ou redução, sendo a oxidação o mais utilizado. A ELP anódica implica a oxidação do monómero, obtendo radicais catiónicos, o que levam à formação do polímero na superfície do elétrodo (Gavrilă et al., 2022).

Através da modificação da corrente é possível controlar, a nível nanométrico, a espessura e morfologia dos filmes poliméricos. Esta é uma técnica rápida e fácil de reproduzir (Florea et al., 2019; Seguro et al., 2022). Para o processo de ELP, é fundamental otimizar a composição e concentração da mistura de polimerização, escolher o método e os parâmetros de ELP mais adequados, assim como selecionar o método de remoção do analito mais eficaz (Gavrilă et al., 2022).

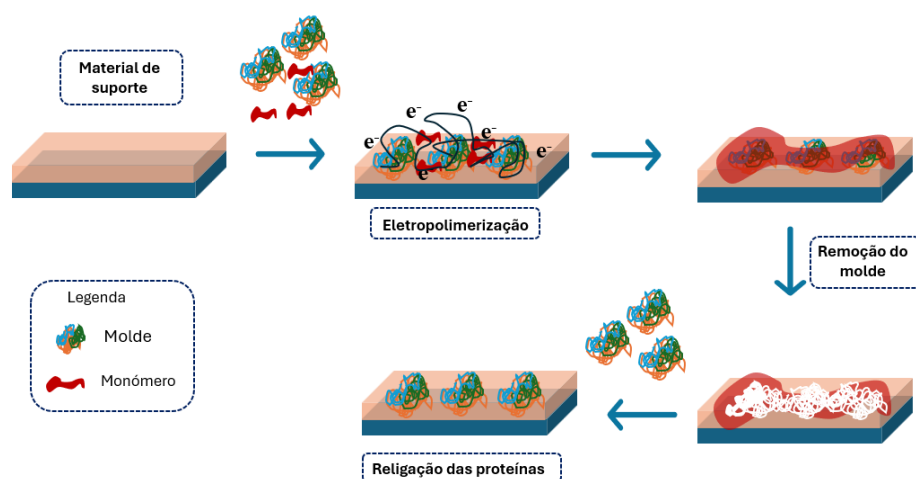


Figura 17. Esquema da preparação de um MIP na superfície de um eletrodo. Imagem adaptada de (Moreira Gonçalves, 2021).

A utilização da ELP para o fabrico dos MIPs apresenta algumas vantagens, tais como, ser mais rápida do que a polimerização *bulk*, pode ser realizada *in situ*, ou seja na superfície do eletrodo de trabalho, a corrente que é aplicada pode ser regulada, o que permite controlar a espessura do filme, facilitando a reprodutibilidade dos MIPs. No entanto, existem algumas dificuldades neste processo, especialmente na etapa de remoção do analito, uma vez que esta pode não ocorrer ou pode ocorrer de forma a danificar o MIP, sendo, por norma, uma etapa demorada (Moreira Gonçalves, 2021).

2.4 Transdutores

O material dos transdutores é essencial para o desempenho da metodologia eletroquímica (Bakirhan et al., 2018). Como referido anteriormente, o papel do transdutor é converter a resposta biológica obtida num sinal mensurável, que pode ser amplificado e medido. Assim, os sensores podem ser: de afinidade (quando o bioelemento se liga ao analito), metabólicos (o bioelemento e o analito dão origem a uma alteração química e esta pode ser utilizada para medir a concentração de um substrato) ou catalíticos (o bioelemento combina com o analito, não altera quimicamente, mas converte num substrato auxiliar). Os transdutores podem ser eletroquímicos (potenciometria, condutometria, impedimetria, amperometria, voltametria), óticos (colorimétricos, fluorescência, luminescência, interferometria), calorimétricos, piezoelétricos ou de natureza magnética. Os sensores eletroquímicos são fáceis de serem transportados, são simples e fáceis de usar, económicos e, em muitos casos, descartáveis. Em comparação com os sensores óticos ou piezoelétricos, os sensores eletroquímicos apresentam uma elevada sensibilidade (Karunakaran et al., 2015).

2.4.1 Óticos

Os biossensores óticos (Figura 18) têm sido uma forte ferramenta de investigação e de desenvolvimento principalmente na área da saúde, em aplicações ambientais e na indústria biotecnológica (Damborský et al., 2016). Um biossensor ótico é um dispositivo analítico que contém um elemento sensor biológico, integrado ou conectado a um sistema transdutor ótico e que tem como objetivo produzir um sinal eletrônico que seja proporcional à concentração do analito (Dey & Goswami, 2011). Os biossensores óticos podem ser divididos em duas categorias: *label-based* ou *label-free*. No modo *label-free* o sinal que é detetado é gerado diretamente pela interação do material analisado com o transdutor. No modo *label-based*, é necessário utilizar um “*label*” e o sinal é gerado por um dos seguintes métodos: colorimétrico, fluorescente ou luminescente (Damborský et al., 2016).

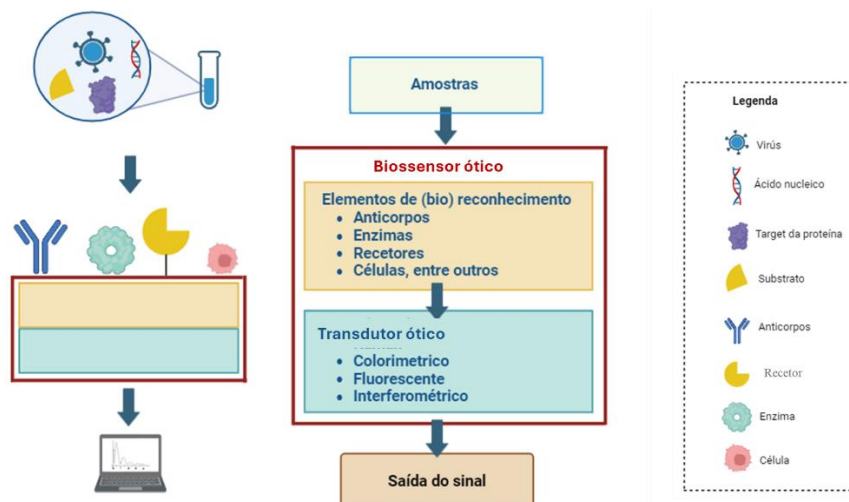


Figura 18. Esquema geral de um biossensor ótico. Imagem adaptada de (Seymour et al., 2023).

2.4.2 Piezoeletrônicos

Os biossensores piezoeletrônicos são baseados na piezoeletricidade, que corresponde à diferença de potencial criada em determinados materiais devido à aplicação de um stress mecânico. Devido às interações existentes entre o biorreceptor e o analito, estes biossensores são baseados no princípio de medição de mudanças de frequência de ressonância do cristal oscilante. O cristal oscila a uma determinada frequência, que pode ser alterada pelo meio envolvente. O material dos biossensores tem de ser revestido de um material piezoeletrico e o transdutor tem de ser feito com um material piezoeletrico, por exemplo, o quartzo. Quando é aplicada alguma pressão sobre estes materiais, ocorre uma conversão do stress mecânico num sinal elétrico. Este método é altamente sensível, permitindo chegar a níveis de deteção de picograma. Existem dois principais tipos de sensores piezoeletrônicos: onda acústica de superfície (SAW, do inglês, *Surface Acoustic Wave*) e onda acústica de massa (BAW, do inglês, *Bulk Acoustic Wave*). Estes

biossensores têm sido utilizados especialmente para a instrumentação médica, aeroespacial, nuclear e telecomunicações (Karunakaran et al., 2015).

2.4.3 Eletroquímicos

Devido à necessidade de um método sensível e fácil para detetar diversos biomarcadores, surgem os métodos eletroquímicos. Estes métodos apresentam algumas vantagens como elevada sensibilidade, seletividade, rapidez, especificidade, baixo custo e simplicidade (Bakirhan et al., 2018). Estes biossensores medem a corrente produzida, com base nas reações de oxidação e redução. São capazes de converter diretamente um evento biológico num sinal elétrico, baseando-se na deteção de uma propriedade elétrica, como a resistência, a corrente, o potencial, capacitância ou a impedância, que é detetada e medida por diferentes métodos, tais como a voltametria, potenciometria, amperometria ou condutometria. Uma medição eletroquímica é baseada num valor referente ao analito, que é medido em comparação ao eléctrodo de referência. Deste modo, a resposta eletroquímica irá depender da atividade das espécies do analito, uma vez que as reações químicas podem retirar/acrescentar eletrões, alterando as propriedades elétricas da solução. Estas alterações podem ser detetadas e utilizadas como parâmetros de medição (Karunakaran et al., 2015). Durante a reação de *redox* da molécula, que ocorre na superfície do eléctrodo, os eletrões são transferidos do eléctrodo de trabalho para o analito ou do analito para o eléctrodo (*Biosensors_Fundamentals and Applications*, n.d.).

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com a sua natureza de deteção em: amperométricos, potenciométricos, voltamétricos, impedimétricos e condutométricos (Karunakaran et al., 2015).

Estes biossensores apresentam algumas vantagens na sua utilização, como alta sensibilidade, preparação simples de amostras, tempos de resposta rápidos, potencial para miniaturização e baratos (Gerdan et al., 2024; Pal & Khan, 2019). Os biossensores amperométricos medem continuamente a corrente que é gerada durante as reações de oxidação e redução num determinado processo. Os biossensores de impedância são de natureza não destrutiva. Estes permitem uma análise rápida de uma ampla gama de analitos, desde moléculas de menor tamanho até células. Existem ainda os biossensores condutimétricos, que medem a capacidade de conduzir uma corrente elétrica entre eléctrodos numa solução e/ou eléctrodos de referência. Os biossensores potenciométricos determinam a diferença de potencial entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência, indicando informações sobre a atividade iónica na reação eletroquímica (Gerdan et al., 2024).

De seguida, é apresentado um esquema, Figura 19, onde são resumidas as vantagens e desvantagens dos sensores óticos, piezoelétricos e eletroquímicos.



Figura 19. Esquema de comparação dos diferentes sistemas de biossensores. Imagem adaptada de (Li et al., 2024).

2.4.3.1 Células eletroquímicas

As células eletroquímicas podem ser constituídas por um conjunto de três elétrodos: o elétrodo de trabalho (WE, do inglês, *Working Electrode*), o elétrodo de referência (RE, do inglês, *Reference electrode*) e o contra elétrodo (CE, do inglês, *Counter electrode*). Na presente dissertação as células eletroquímicas utilizadas são os elétrodos serigrafados (SPE, do inglês, *Screen-printed Electrodes*) (Bakirhan et al., 2018). A utilização destes dispositivos permite reduzir o tamanho dos mesmos, diminuindo o volume de amostra necessário, reduzindo o custo de produção e permitindo personalizar o dispositivo de acordo com a aplicação pretendida (Stan et al., 2022). O material dos elétrodos irá influenciar o desempenho do método eletroquímico. Os materiais condutores mais utilizados neste tipo de elétrodos incluem o carbono, platina e ouro. Para selecionar o tipo de elétrodo a utilizar, é importante ter em atenção fatores como a gama de potencial, a condutividade elétrica, reprodutibilidade, as propriedades mecânicas e os custos. Os elétrodos de platina e de ouro apresentam um mecanismo rápido de transferência de eletrões. Para além disso, a superfície dos elétrodos pode ser modificada para alterar a seletividade e a sensibilidade do biossensor (Bakirhan et al., 2018).

No WE é onde ocorre a reação de interesse. Dependendo da reação no elétrodo de trabalho ser uma redução ou uma oxidação, o elétrodo pode ser denominado de catódico ou anódico, respetivamente. O material do elétrodo de trabalho é extremamente importante porque irá influenciar o desempenho das medidas eletroquímicas. O RE produz o potencial constante na

célula eletroquímica. O potencial pode ser alterado com a passagem da corrente no eletrodo. O CE é usado para fechar o circuito de corrente na célula eletroquímica. O CE não participa na reação eletroquímica. A corrente flui entre o WE e o CE, a área de superfície total do CE é superior à área do WE, para que não seja um fator limitante na cinética do eletroquímico (Karunakaran et al., 2015).

Na Figura 20 A e 20 B está esquematicamente representado uma célula eletroquímica convencional e um SPE, respetivamente.

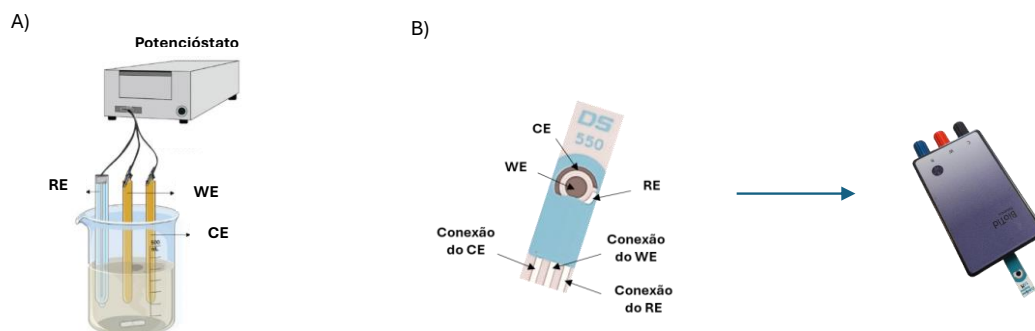


Figura 20. Representação esquemática de (A) uma célula eletroquímica convencional e (B) de um SPE. Imagem adaptada de (D. C. Moreira et al., 2024).

2.4.3.2 Sensores amperométricos

Os sensores amperométricos determinam a variação da corrente que resulta do processo *redox* de uma determinada espécie eletroativa enquanto está a ser aplicado um potencial constante. A concentração do analito irá variar a corrente. Durante o processo de *redox*, os eletrões são transferidos do analito para o WE e as propriedades do analito irão comandar o fluxo dos eletrões. Na reação de redução, o WE é levado a um potencial negativo, já que na reação de oxidação é levado a um potencial positivo (Karunakaran et al., 2015).

2.4.3.3 Sensores voltamétricos

Na eletroquímica, a técnica de voltametria é das mais versáteis; tanto a corrente como o potencial podem ser medidos. Quando é analisada a corrente, a posição do pico desta corresponde à substância em análise, já a densidade de corrente do pico, é proporcional à concentração das espécies correspondentes (Karunakaran et al., 2015). De seguida são descritas três técnicas dos sensores voltamétricos: voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e a voltametria de pulso diferencial.

A. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é um método eficaz e básico que permite analisar o processo de *redox* numa ampla gama de potencial e estudar a atividade eletroquímica de analitos nas superfícies dos eletrodos. Para que ocorra o processo de transferência de eletrões, é aplicado ao eletrodo um potencial cíclico (tensão) repetido ou não, permitindo registar a corrente. O processo de

oxidação é considerado no pico de elevados potenciais e o processo de redução é nos potenciais baixos. A corrente do pico aumenta com o aumento da concentração (Lin et al., 2021). Na Figura 21 está representado um voltamograma, que ilustra a resposta de um processo *redox* reversível durante um único ciclo de potencial. O eixo dos x representa o potencial que é aplicado ao sistema e o eixo dos y corresponde à resposta, ou seja, é a medição da corrente resultante.

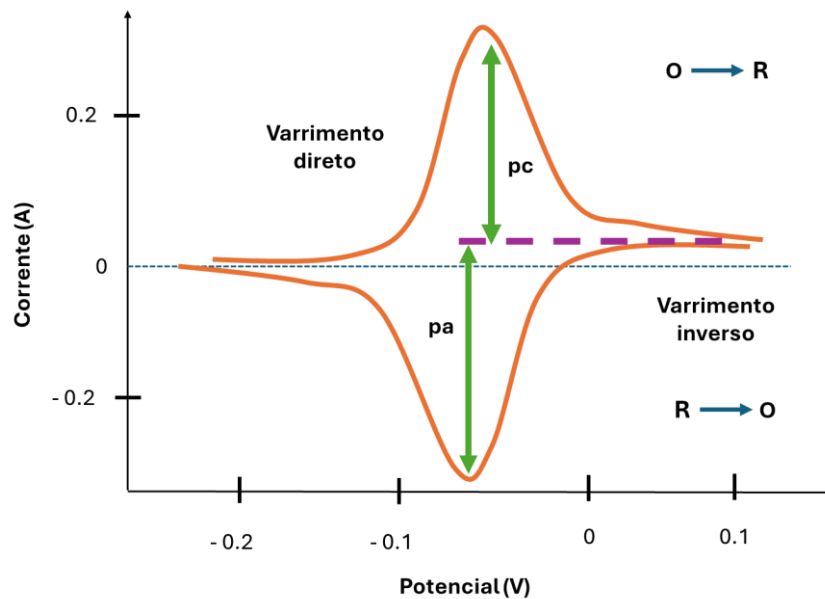


Figura 21. Voltamograma típico para um sistema reversível.

A CV consiste na aplicação de um varrimento linear de potencial (E) no elétrodo de trabalho, que é um potencial que aumenta ou diminui linearmente com o tempo entre os limites E_{\min} (potencial mínimo) e E_{\max} (potencial máximo). A aplicação de um varrimento de potencial ao elétrodo de trabalho é controlada em relação a um elétrodo de referência. Na CV, ao atingir $t=t_1$, a direção da varredura é invertida e é alterada até atingir o E_{\min} . Quando atinge o potencial mínimo é novamente invertida e alterada para E_{\max} . Deste modo, são gerados ciclos com várias varreduras (Simões & Xavier, 2017). Na Figura 22 está representado o potencial aplicado em função do tempo na voltametria cíclica.

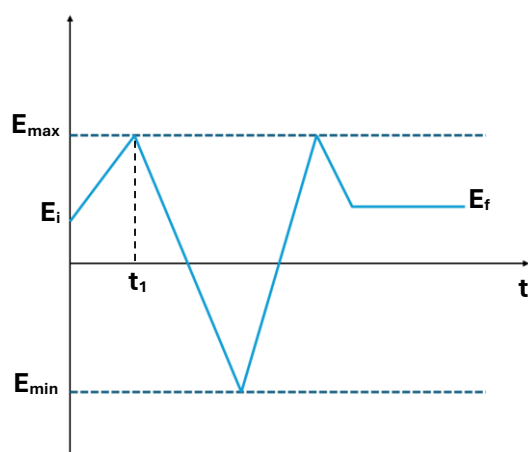


Figura 22. Avaliação do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho com o tempo na voltametria cíclica. E_i – potencial inicial; E_f – potencial final; E_{min} – potencial mínimo; E_{max} – potencial máximo; t_1 – tempo de comutação. Imagem adaptada de (Simões & Xavier, 2017).

Para processos reversíveis, Figura 23 A, o voltamograma cíclico apresenta um potencial de pico de oxidação (E_p^{Ox}) e o de redução (E_p^{Red}) próximos, e o potencial *redox* (E_f^0) da molécula *redox* está a meio ou próximo de meio entre os potenciais E_p^{Red} e E_f^0 . Uma reação é totalmente reversível quando: i) a separação entre os picos de oxidação e redução é dada por $\frac{58\text{ mV}}{n}$, onde n é o número de eletrões; ii) a separação dos picos é independente do *scan rate*; iii) a corrente de pico de *redox* aumenta com o *scan rate* e é linearmente proporcional à raiz quadrada do *scan rate* para o processo limitado por difusão; iv) a relação da corrente de pico de oxidação e redução é igual a um e é independente do *scan rate* (Wijeratne, 2018). As concentrações da forma reduzida do composto em comparação com a sua forma oxidada na superfície do eletrodo podem ser determinadas com base no potencial aplicado, através da equação de Nernst, Equação 1 (WESTBROEK, 2005):

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{oxi}}{C_{red}} \quad (1)$$

onde E_0 é o potencial de equilíbrio, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, n é o número de eletrões transferidos por ião, F é a constante de Faraday, C_{oxi} é a concentração de oxidação e C_{red} é a concentração de redução (Karunakaran et al., 2015; Simões & Xavier, 2017).

Para os processos quase reversíveis, Figura 23 B, o E_f^0 da molécula não se encontra próximo do meio entre o pico de oxidação e o de redução. A forma do CV é semelhante aos processos reversíveis, no entanto, a taxa de transferência de eletrões não é suficientemente rápida para manter o equilíbrio de Nernstiano. Para estes processos: i) a corrente do pico é menor comparativamente com os processos totalmente reversíveis; ii) a separação do pico varia com o *scan rate*; iii) a corrente do pico não é linearmente proporcional à raiz quadrada do *scan rate* (Wijeratne, 2018).

Nos processos irreversíveis, Figura 23 C, observam-se um pequeno pico de corrente de oxidação. Nestes processos, é necessário um potencial elevado para impulsionar a transferência de eletrões (Wijeratne, 2018).

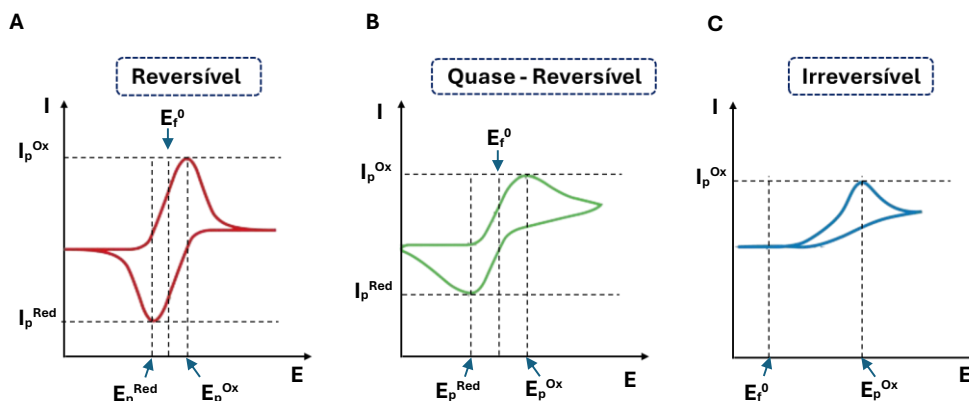


Figura 23. Voltamograma cíclico (A) forma de onda reversível, (B) forma de onda quase reversível e (C) forma de onda irreversível para uma reação *redox* típica. Imagem adaptada de (Wijeratne, 2018).

B. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, *Square Wave Voltammetry*) é das técnicas de voltametria de pulso mais rápidas e mais sensíveis. A forma da curva, na SWV, depende da aplicação da amplitude do pulso (ΔE), que varia consoante o step do potencial (E_{step} , em mV) e da duração τ (período). As correntes elétricas são medidas no final dos pulsos direto (I_1) e no pulso reverso (I_2), obtendo a intensidade da corrente diferencial resultante (ΔI). A largura do pulso ($\tau/2$) é denotada por t , e a frequência de aplicação do pulso é denominada por f , sendo dada por $1/t$ (Bakirhan et al., 2018; WESTBROEK, 2005). Na Figura 24 A e B estão representados os potenciais aplicados à onda SWV e um voltamograma típico de uma onda quadrada, respetivamente.

A SWV pode ser utilizada para detetar contaminantes alimentares, estudar o mecanismo da cinética enzimática, desenvolvimento de novos métodos para melhorar as superfícies dos nanomateriais. Esta técnica tem demonstrado ser uma solução popular para a criação de dispositivos de diagnóstico e de monitorização ambiental ou alimentar, com elevada sensibilidade e seletividade para estudos enzimáticos (Simões & Xavier, 2017; WESTBROEK, 2005).

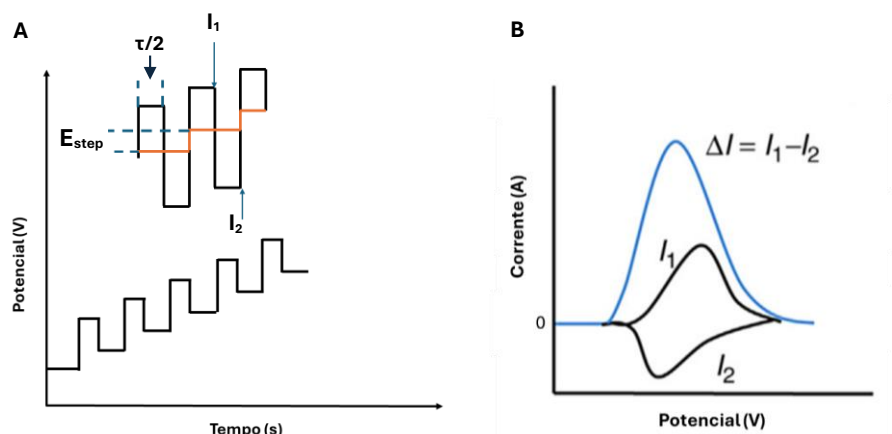


Figura 24. (A) Aplicação de potenciais na SWV e (B) Esquema do voltamograma de onda quadrada, onde está representado um processo *redox* de um sistema reversível. Imagem adaptada de (Kaliyaraj Selva Kumar et al., 2020).

C. Voltametria de pulso diferencial

Na voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês, *Differential pulse voltammetry*), são aplicados pulsos curtos ($t = 10 - 100$ ms) com um determinado potencial e amplitude ($\Delta E = 1 - 100$ mV) numa rampa linear. É escolhido um potencial base que será aplicado no elétrodo. Este potencial aumenta entre os pulsos com incrementos iguais. A corrente é medida antes da aplicação do pulso (I_1) e no final do pulso (I_2), sendo registada a diferença entre estes dois pontos. Esta diferença corresponde à corrente do impulso de potencial. Na DPV há a formação de um pico quando existe um processo de *redox*. O potencial do pico pode ser aproximadamente identificado como o potencial de meia onda, que corresponde ao máximo da diferença entre I_2 e I_1 . Assim, o potencial de pico presente no DPV é idêntico ao potencial de meia onda da reação de *redox* prevista. Se a irreversibilidade aumentar, o potencial do pico desvia do potencial de meia onda, conforme a base do pico se alarga e a altura diminui. Na Figura 25 A está representado o diagrama de aplicação de pulsos nesta técnica e na Figura 25 B está esquematizada a resposta típica de um voltamograma na DPV (Simões & Xavier, 2017; WESTBROEK, 2005).

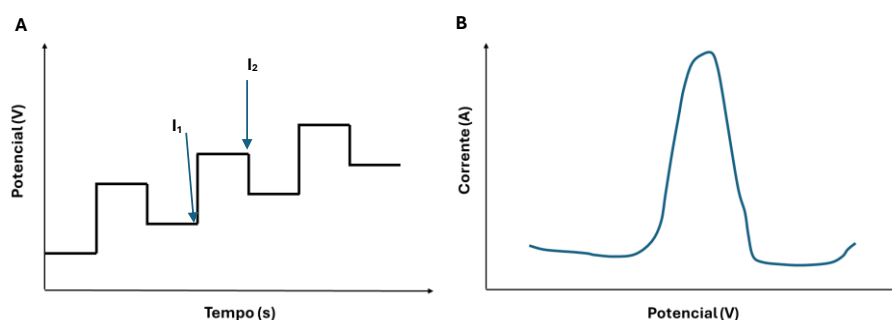


Figura 25. (A) Diagrama da aplicação de pulsos na técnica de DPV e (B) Resposta típica de um voltamograma no DPV. Imagem adaptada de (Simões & Xavier, 2017).

2.4.3.4 Sensores impedimétricos

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) é uma técnica utilizada na análise de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução eletrolítica. Esta técnica permite identificar e determinar parâmetros a partir de um modelo elaborado com base na resposta em frequência do sistema eletroquímico em estudo (Simões & Xavier, 2017).

Na impedância, a abordagem fundamental, consiste na aplicação de um pequeno sinal de excitação senoidal no eletrodo de trabalho. Na EIS, a aplicação de uma excitação potencial senoidal resulta numa resposta de sinal de corrente alternada a esse potencial. O sinal de corrente pode ser analisado como uma soma de funções senoidais (uma série de Fourier). O potencial e a corrente mudam com o tempo e são geralmente representados por uma função senoidal. A Figura 26 mostra um gráfico típico que ilustra a relação entre dois sinais senoidais relacionados, como sinais de corrente alternada (I) e tensão (E) girando na mesma frequência angular (ω) (Em et al., 2013).

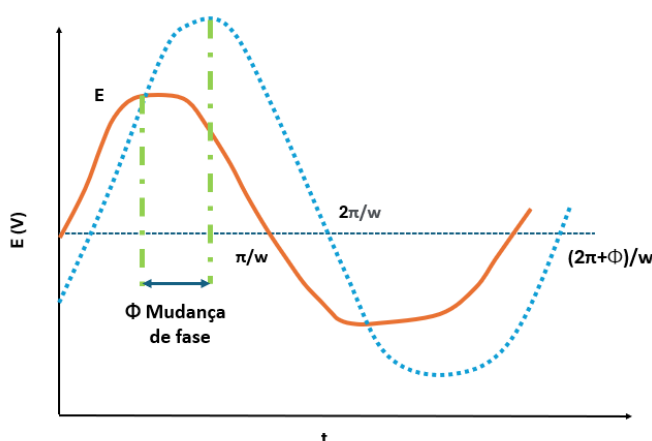


Figura 26. Resposta de corrente sinusoidal num sistema linear após aplicação de uma tensão alternada. Imagem adaptada de (Em et al., 2013).

A resistência elétrica é a capacidade de um determinado elemento opor-se à passagem do fluxo de corrente elétrica. A impedância difere da resistência, visto que a resistência é característica dos circuitos de corrente contínua (CC) e obedecem diretamente à lei de Ohm ($R=V/I$). Na resposta da célula eletroquímica, uma mudança de fase pode ser adquirida enquanto a resposta de corrente a um potencial sinusoidal é uma senoide na frequência aplicada (Em et al., 2013).

A impedância complexa, representada pelo vetor $z(\omega)$, é resultado da variação do sinal alternado ω . O módulo $Z_0 = E_0/I_0$ e o ângulo de fase (ϕ) podem ser calculados para determinar os valores de impedância real e os da imaginária, tal como demonstrado na Figura 27. Neste gráfico, como a parte real é mostrada no eixo X e a parte imaginária é no eixo Y, é obtido um gráfico de *Nyquist*. Cada ponto corresponde à impedância numa ω específica. Um gráfico de *Nyquist* contém informação sobre a interface eletrificada e a reação de transferência de eletrões. Este gráfico contém duas regiões, uma que é a porção do semicírculo, seguida de uma

linha reta. A primeira, com frequências mais elevadas, corresponde ao processo limitado pela transferência de eletrões. A parte linear, é característica de frequências mais baixas e representa o processo de difusão eletroquímico. Quando a transferência de eletrões é muito lenta, a região do semicírculo é maior. O diâmetro do semicírculo é a resistência à transferência de eletrões, R_{ct} . A interceção do semicírculo com o eixo Z' a altas frequências corresponde à resistência da solução, R_s . Nos gráficos de *Nyquist*, a impedância pode ser representada como um vetor de comprimento $|z|$. O ângulo entre este vetor e o eixo, é denominado de ângulo de fase e é definido como $\phi = \arg Z$. Como indicado na Figura 27, os dados de baixa frequência estão no lado direito do gráfico e as frequências mais altas estão à esquerda (Em et al., 2013; Karunakaran et al., 2015).

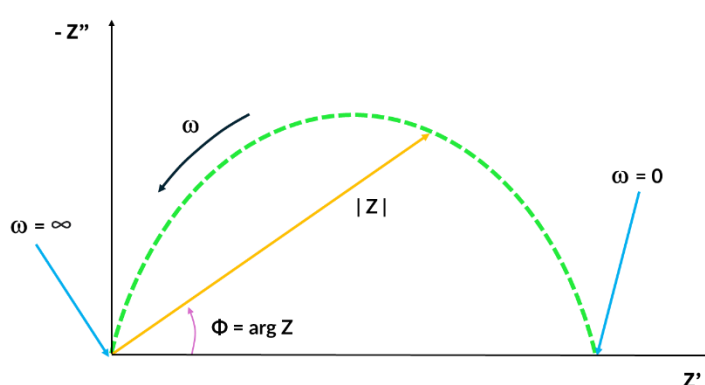


Figura 27. Gráfico de *Nyquist* que ilustra componentes reais (Z') e componentes imaginárias (Z'') da impedância em cada ω . Imagem adaptada de (Karunakaran et al., 2015).

Outra forma de expressar os resultados da impedância, é utilizar o diagrama de *Bode*. Este diagrama compreende dois diagramas logarítmicos distintos: magnitude ($\log |Z|$) vs. frequência ($\log \omega$) e ϕ vs. $\log \omega$. Na Figura 28 está esquematizado um diagrama típico do diagrama de *Bode* (Magar et al., 2021).

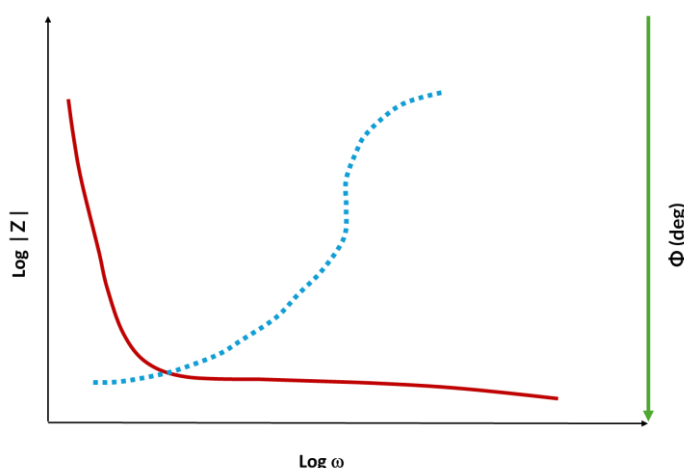


Figura 28. Gráficos típicos do módulo de *Bode* (linha reta vermelha) e da fase de *Bode* (linha tracejada azul) de uma constante de tempo equivalente de circuito elétrico (Em et al., 2013).

A espectroscopia de impedância é frequentemente utilizada para estudar filmes depositados nos elétrodos, uma vez que permite distinguir diferentes processos de condutividade que ocorrem no material (Simões & Xavier, 2017). Na Tabela 3 estão descritos alguns dos biossensores que existem na literatura, capazes de detetar a Myo, com os respetivos limites de deteção obtidos.

Tabela 3. Diferentes tipos de biossensores com a capacidade de detetar a Myo.

Ref.	Ano	Tipo de biossensor	Caracterização	Limites de deteção
(J. Chen et al., 2019)	2019	Biossensor fluorescente	Deteção a Myo com base na utilização de <i>carbon dots</i> combinados com o mecanismo de amplificação de sinal da desoxirribonuclease I.	20 pg/mL
(F. T. C. Moreira et al., 2013)	2013	Biossensor eletroquímico	Desenvolvimento de um MIP para detetar a Myo, utilizando SPE com o eléctrodo de trabalho de ouro (Au-SPE) com uma camada de poli (cloreto de vinila) carboxilado. Foi seleccionado o monómero AAM. Para realizar as leituras eletroquímicas foi utilizada uma solução <i>redox</i> .	2,25 µg/mL
(Ribeiro et al., 2017)	2017	Biossensor eletroquímico	Desenvolvimento de um MIP para detetar a Myo através da polimerização de fenol utilizando Au-SPE. Para realizar as leituras eletroquímicas foi utilizada uma solução <i>redox</i> .	PBS: 2,1 pg/mL Soro: 14 pg/mL
(Sharma et al., 2020)	2020	Aptassensor eletroquímico	Desenvolvimento de um sensor eletroquímico baseado em aptâmeros de DNA de fita simples, para detetar a Myo através de filmes finos de óxido de grafeno funcionalizados com polietilenimina. Para as leituras eletroquímicas é necessária uma solução <i>redox</i> .	PBS: 0,97 pg/mL Soro humano: 2,1 pg/mL

Tabela 3. Continuação.

Ref.	Ano	Tipo de biossensor	Caracterização	Limites de detecção
(Umar et al., 2022)	2013	Biossensor eletroquímico	Desenvolvimento de um biossensor que deteta a Myo através da utilização de nanoestruturas de dióxido de titânio puro (TiO ₂) dopado com cobre. Foram testadas 3 densidades atômicas distintas do cobre. Foram utilizados Au-SPE para construir o biossensor. Para as leituras eletroquímicas é necessária uma solução <i>redox</i> .	S1 (TiO ₂ dopado com 13×10 ¹⁷ átomos/cm ³): 14 pM
(Al Fatease et al., 2022)	2022	Biossensor eletroquímico	Desenvolvimento de um biossensor que deteta a Myo, utilizando nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) dopadas com cromo. Foram testadas 3 densidades atômicas distintas do cobre. Para as leituras eletroquímicas é necessária uma solução <i>redox</i> .	S1 (ZnO dopado com 13×10 ¹⁷ átomos/cm ³): 0,150 nM
(Beliaev et al., 2023)	2023	Biossensor ótico	Utilização de uma estrutura High-contrast gratings (HCGs), como esquema de detecção refratométrica. Para detetar a Myo, foram utilizados ensaios com anticorpo-antigénio. Foram estudados dois tipos de HCGs: semi-enterrados e pedestal.	HCGs semi-enterrados: 35,7 ng/mL HCGs pedestal: 38,5 ng/mL

3 Procedimento experimental

Neste capítulo, serão descritos de forma pormenorizada todos os equipamentos, materiais, reagentes e procedimentos experimentais envolvidos na síntese e construção do biossensor eletroquímico, bem como a avaliação analítica dos dispositivos obtidos através da incubação da Myo na superfície do biossensor.

3.1 Material e Equipamento

Para realizar as medições eletroquímicas foi utilizado um potencióstato da *Metrohm Autolab*/PGSTAT302N, que se encontra representado na Figura 29 A. Este apresenta um módulo FRA2 e é controlado pelo software Nova 2.1.6. A conexão dos elétrodos com o Autolab foi realizada a partir de uma caixa da BioTid, Figura 29 B. Os Pt-SPEs são da DROPSSENS (DRP-550AT), sendo estes constituídos por um elétrodo de trabalho de platina (diâmetro de 4 mm), um contra elétrodo de platina, um elétrodo de referência de Ag/AgCl e os contactos elétricos em prata. A área dos elétrodos é de 3,4 x 1,0 x 0,05 cm e o substrato do material é feito em cerâmica (Screen- Printed Platinum Electrode, n.d.). Para a realização dos ensaios eletroquímicos os SPEs foram colocados numa caixa conectora da BioTid, conectando os contactos eléctricos do Pt-SPE com as ligações elétricas do potencióstato.



Figura 29. A - Potencióstato/Galvanostato da *Metrohm Autolab*; B – Caixa conectora da BioTid.

Foram utilizadas micropipetas da *Gilson* (modelo *Pipetman*) de volume ajustável (0,2-2 mL; 1-10 mL; 20-200 mL; 100-1000 mL; 500-5000 mL) para preparar as diferentes soluções, com

volumes inferiores a 10 mL. Para os volumes superiores, as soluções foram preparadas com o auxílio de balões volumétricos de 20 mL e 100 mL, com precisão de $\pm 0,04$ e $\pm 0,10$ mL. A pesagem dos reagentes foi realizada com recurso a uma balança da RADWAG (modelo XA 110/X), a qual apresenta uma precisão de 0,01 mg. Em algumas situações, foi necessário recorrer à utilização de um ultrassom da SELECTA de modo a homogeneizar a solução do NIP, no entanto para homogeneizar a solução dos PBNCs foi utilizado um agitador de líquidos de baixa tensão superficial da *Fisherbrand* e para a solução do MIP, foi utilizado um agitador magnético (*IKA, big squid white*). Para a etapa da cura com temperatura, após deposição das camadas dos PBNCs, foi necessário recorrer a uma *Mufra da Nabertherm*. Relativamente à etapa de remoção do analito Myo, foi utilizada uma estufa da SELECTA.

Na Tabela 4 estão descritos todos os reagentes utilizados e a sua origem comercial.

Tabela 4. Lista de reagentes utilizados com a sua respetiva origem.

Reagentes	Origem
Hexacianoferrato (II) de Potássio, ($K_4[Fe(CN)_6]$)	Riedel-de Haen
Hexacianoferrato (III) de Potássio, ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Riedel-de Haen
Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)	Sigma Aldrich
Phosphate-buffered saline (PBS)	VWR
Orto-fenilenodiamina	Amresco
Myo	Sigma Aldrich
Cloreto de Potássio (KCL)	Normapur
Tripsina	Sigma
Porteínase K	Sigma Aldrich
Soro bovino fetal	Sigma
Soro Cormay	PZ CORMAY S.A.

3.2 Soluções

A solução tampão utilizada nesta dissertação foi o tampão fosfato salino (PBS, do inglês, *phosphate-buffered saline*) cuja preparação consistiu na diluição de 1 pastilha de PBS em 100 mL de água ultrapura, apresentando um valor de pH 7,4.

Para realizar a medição eletroquímica, foi necessário preparar uma solução padrão redox, composta por hexacianoferrato (II) de potássio e hexacianoferrato (III) de potássio, cada uma com uma concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

A solução de ácido sulfúrico, com uma concentração de 0,5 mol/L, foi preparada em 100 mL de água ultrapura, ou seja, água que é purificada através do sistema Milli-Q. Também foi preparada uma solução de cloreto de potássio, com uma concentração de 0,1 mol/L. A solução do nanomaterial, neste caso dos PBNCs, foi preparada com uma concentração de 5 mg/mL de KCl. Para o estudo do soro, este foi diluído 100 vezes (soro fetal bovino) e 1000 vezes (soro cormay humano) na solução tampão. Para a solução de NIP foi utilizado monómero o-PD, com uma

concentração de 0,001 mol/L, preparada numa solução tampão PBS. Para a solução de MIP, utilizou-se a mesma concentração de o-PD e adicionou-se Myo, com uma concentração de 1×10^{-4} mol/L. Na Figura 30 está representado o esquema da preparação destas soluções.

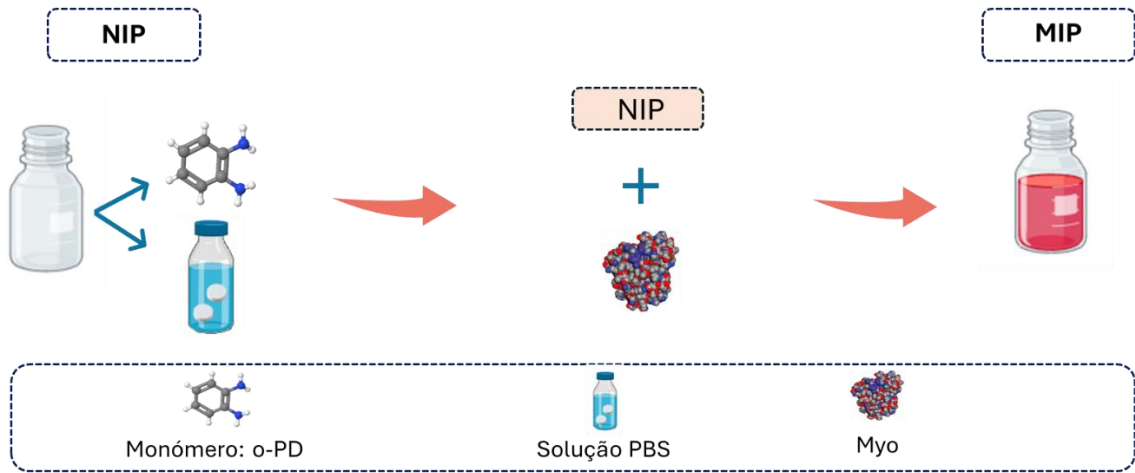


Figura 30. Esquema da preparação das soluções de MIP e de NIP.

Relativamente às curvas de calibração, foram preparadas 7 soluções padrão, por diluições sucessivas a partir de uma solução mãe de Myo, com uma concentração de 10,0 mg/mL. Em cada eppendorf foi adicionado 0,990 mL de PBS. Na Figura 31 está esquematizado este procedimento.

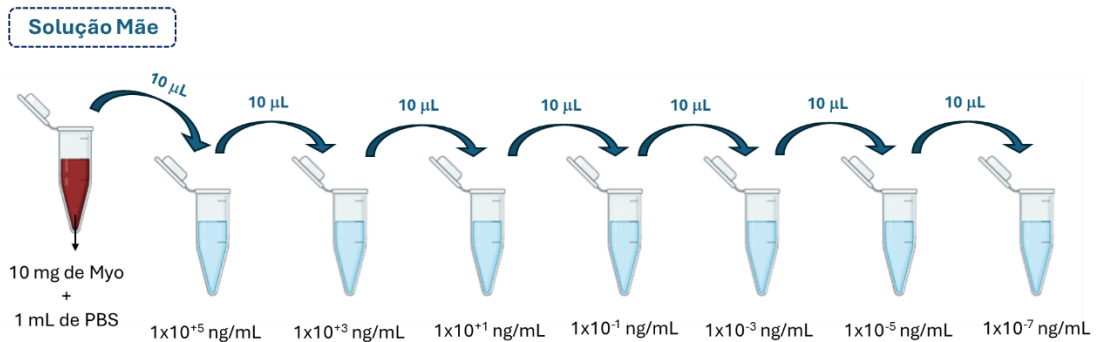


Figura 31. Representação esquemática da preparação das soluções padrão utilizadas para a construção da curva de calibração.

Para o estudo da seletividade, foram utilizados três interferentes: a BSA (6 mg/mL), a troponina (0,05 µg/mL) e a glucose (2,8 mg/mL). As soluções preparadas para este estudo estão representadas na Figura 32.

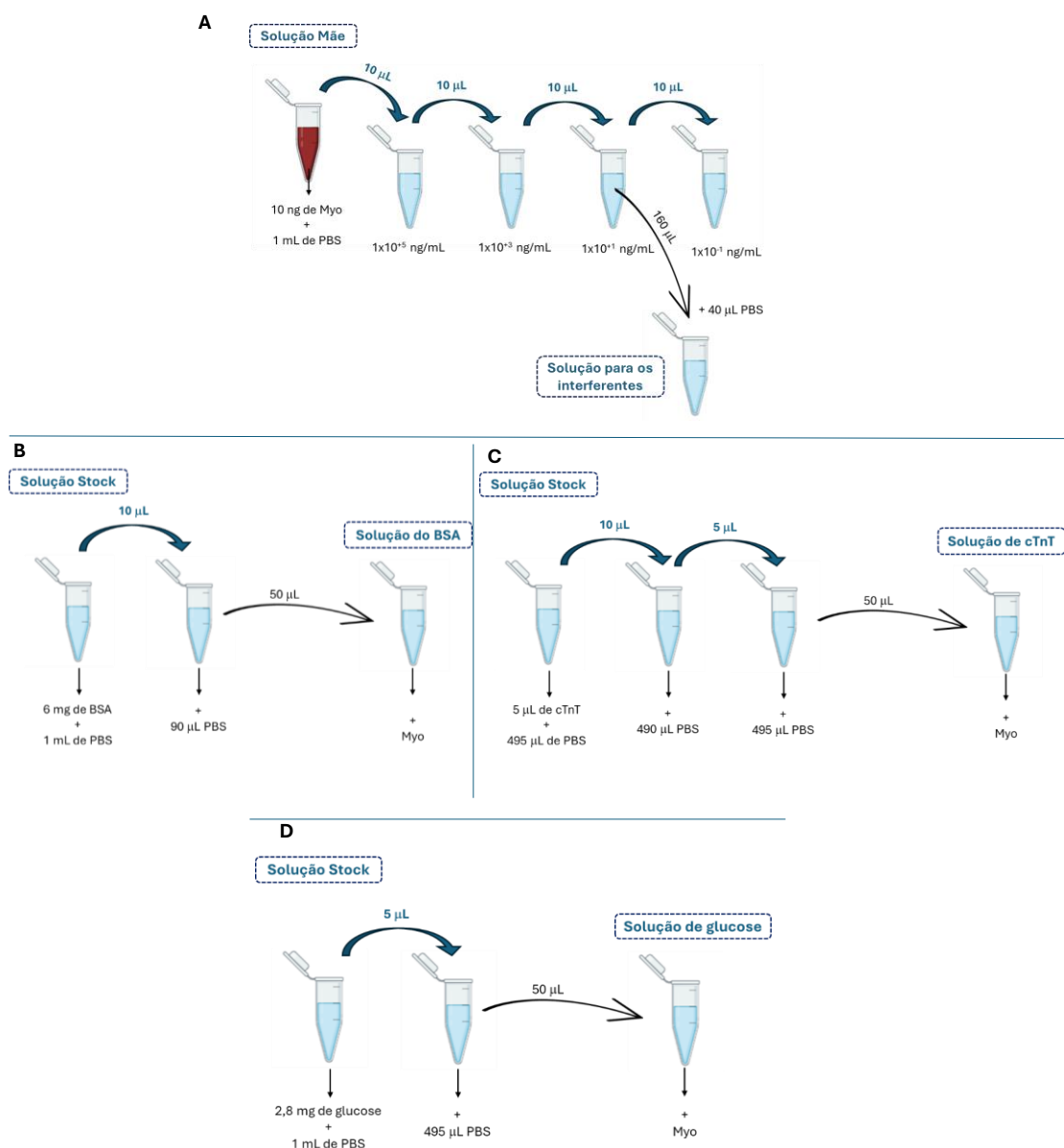


Figura 32. Representação esquemática da preparação das soluções padrão utilizadas para o estudo da seletividade. A) Solução de Myo; B) Interferente 1 – BSA; C) Interferente 2 – cTnT; D) Interferente 3 – glucose.

3.3 Síntese dos PBNCs

A síntese dos PBNCs foi realizada de acordo com o método de Dong's, segundo o artigo (Cao et al., 2010). Começou-se por, com agitação constante, preparar 10 mL de solução de catião ferro III (5 mM, pH 1,1), 1 mL de polietilenoimina (PEI, do inglês, *polyethyleneimine*) (3%) e 10 mL de complexo hexacianoferro III (5 mM, pH 1,1). De seguida, a mistura resultante foi aquecida e mantida sob refluxo a 120 °C durante 4 h. Observou-se que houve uma alteração da cor da mistura que passou de amarelo para azul-escuro, demonstrando a formação do nanomaterial.

Posteriormente a mistura foi centrifugada 3 vezes com água ultrapura, com 5000 rpm durante 20 min. O produto obtido foi colocado na mufla a secar a 60 °C durante a noite.

3.4 Medições eletroquímicas

Para os resultados obtidos ao longo da presente dissertação, foram utilizadas várias técnicas eletroquímicas já mencionadas anteriormente. As medições de CV e de SWV foram realizadas a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L de complexos hexacianoférrico e hexacianoferroso, preparado com a solução PBS, pH 7,4. Para os estudos de CV o potencial analisado foi entre -0,3 V e +0,6 V, a 0,05 V/s e durante 3 ciclos. Para os ensaios de SWV, os potenciais aplicados foram entre -0,1 V e +0,4 V, a 0,025 V/s; com um step a 0,005 V e uma frequência de 5 Hz. Relativamente ao estudo de DPV, as medições foram realizadas com a solução tampão, sem solução *redox*, onde a gama de potenciais otimizados foi entre -0,3 V e +0,5 V; a 0,010 V/s e com um *step* de 0,005 V. Os estudos de EIS foram realizados com a mesma solução de *redox* mencionada anteriormente e a frequência aplicada é entre 1×10^5 Hz até 0,1 Hz, com um número de frequência igual a 50.

3.5 Desenho do anticorpo plástico no Pt-SPE

No presente estudo foram desenvolvidas duas abordagens distintas. Na primeira abordagem, foi desenvolvido um anticorpo plástico diretamente no elétrodo Pt-SPE após a sua limpeza eletroquímica e ativação. Por outro lado, a segunda abordagem envolveu uma pré-modificação do elétrodo com os PBNCs por *drop casting* e, posteriormente, o fabrico do anticorpo plástico nessa superfície modificada.

A superfície de platina do elétrodo de trabalho foi ativada com o tratamento eletroquímico em solução aquosa de ácido sulfúrico, com concentração de (2680 μ L por 100 mL de água) através de 5 ciclos de CV, entre -0,1 V a +0,1 V; com um *scan rate* de 0,05 V/s e um *step* de 0,003 (Figura 33 (1A e 1B)). Posteriormente, os PBNCs foram depositados na superfície do elétrodo, com duas camadas de 2 μ L e foram posteriormente colocados na mufla a 60 °C durante 1 h (Figura 33 (2A e 2B)). De seguida, o material impresso foi obtido por ELP de uma solução do monómero o-PD (1×10^{-3} mol/L) em PBS na superfície de PBNCs /Pt-SPE (Figura 33 (3A e 3B)). A polimerização foi realizada através de CV, numa gama de potencial entre -0,2 V e +0,9 V, durante 5 ciclos, a um *scan rate* de 0,025 V/s e um *step* de 0,00244 V. Através da incubação da solução de tripsina, na estufa a 37 °C durante a noite, foi possível remover a Myo da matriz polimérica (Figura 33 (4A e 4B)). Por último, o filme polimérico foi limpo electroquimicamente com tampão PBS para remover fragmentos de proteína e de tripsina adsorvida, sendo finalmente lavado com água desionizada. Em simultâneo foram produzidos os controlos negativos, que excluem a presença da Myo do procedimento, sendo estes designados por materiais não impressos (NIPs).

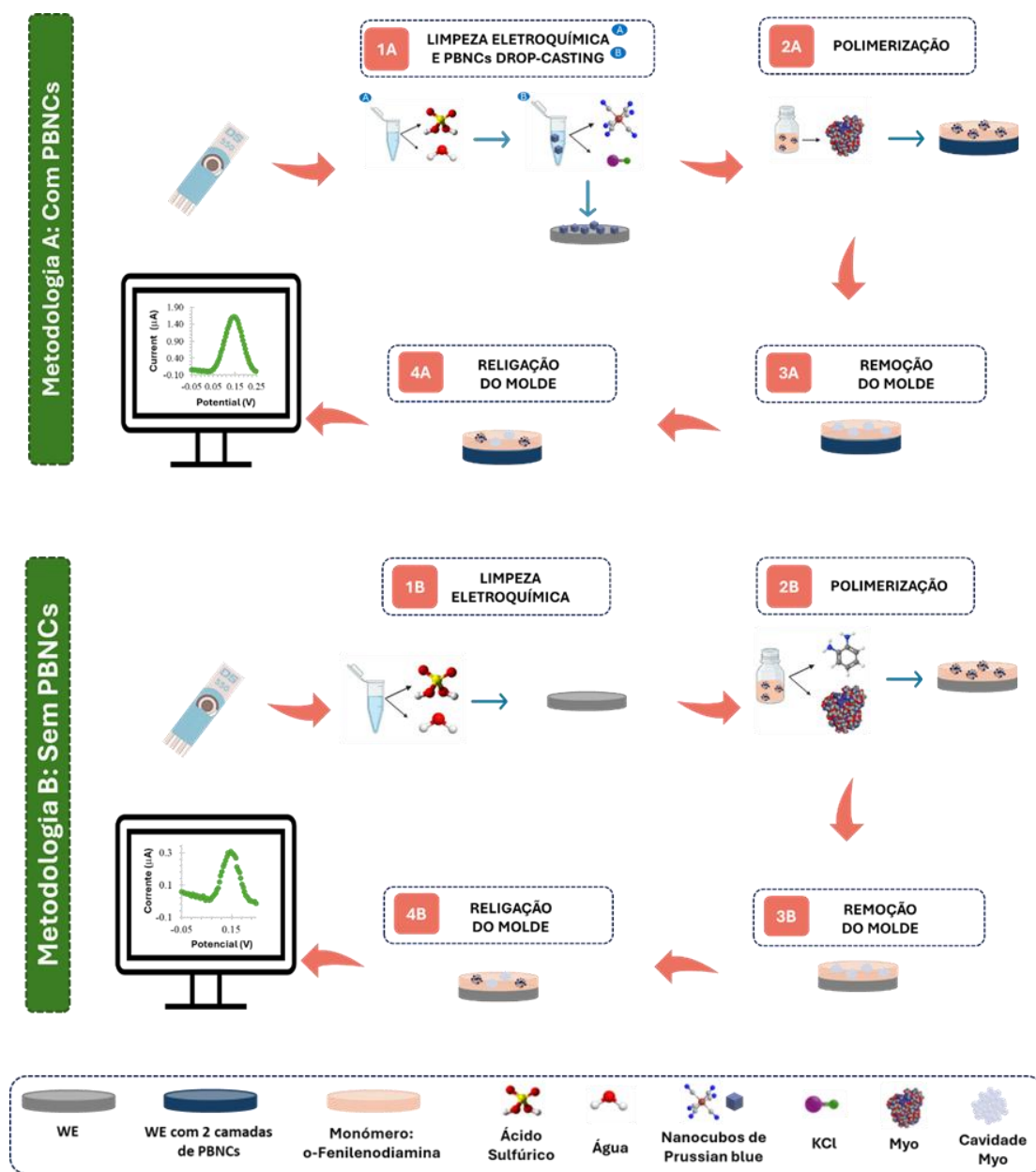


Figura 33. Síntese do sensor de impressão molecular pela metodologia A e B.

3.6 Avaliação analítica do desempenho

3.6.1 Curva de calibração em PBS

Para avaliar o desempenho do biossensor, foram construídas curvas de calibração utilizando (1) a técnica de SWV e a solução *redox*, assim como (2) a técnica de DPV, apenas com uma solução tampão PBS. A gama de concentração da Myo variou entre 1×10^{-7} ng/mL e 1×10^5 ng/mL. Em ambos os ensaios foram incubados 5 µL de cada padrão, na superfície do eletrodo de trabalho do Pt-SPE, durante 20 min, antes da respetiva medição eletroquímica.

3.6.2 Curva de calibração em soro

Para as calibrações em soro foram utilizados 2 tipos de soro: soro fetal bovino para o estudo com solução *redox* e o soro Cormay filtrado para o estudo sem solução *redox*. Para ambos os estudos, o soro foi diluído 1000 vezes. Foram realizadas medições eletroquímicas por DPV e SWV para a Myo, numa gama de concentração de 10 pg/mL a 10 µg/mL em soro. Foram incubados 5 µL de cada padrão durante 20 min na superfície de trabalho do Pt-SPE.

4 Resultados e discussão

Na presente secção, serão descritos de forma pormenorizada os resultados obtidos na construção do biossensor, bem como a otimização de parâmetros do biossensor, os estudos de caracterização, terminando com os resultados do desempenho analítico do biossensor.

4.1 Construção do biossensor

A imobilização de filmes orgânicos nas superfícies metálicas resulta em alterações significativas nas propriedades elétricas do mediador *redox* sólido. Estas modificações podem ser medidas observando as variações nas capacidades de transferência de eletrões do sistema *redox* bem conhecidas, como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Billah et al., 2010). Uma etapa crucial no desenvolvimento do biossensor eletroquímico é a polimerização. Na Figura 36 A e B estão representados os CV durante a ELP da o-PD na ausência e presença dos PBNCs, respetivamente.

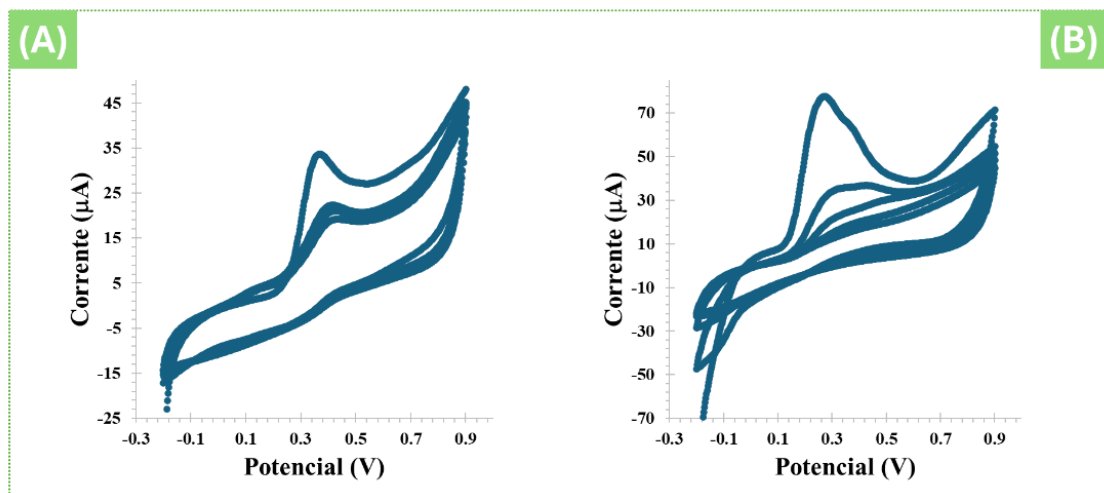


Figura 34. CV durante a ELP da o-PD (A) sem PBNCs e (B) com PBNCs.

Ambas as metodologias revelam um pico de oxidação do monômero de aproximadamente a + 0,3 V. Após o segundo ciclo, observa-se uma diminuição no valor da corrente, o que é previsível, uma vez que o polímero de o-PD é isolante, resultando assim numa diminuição da corrente. Ao compararmos as Figuras 34 A e 34 B, nota-se que o pico de oxidação na presença dos PBNCs apresenta um valor de corrente superior. Esse aumento pode ser atribuído ao fato de que os nanomateriais são condutores e possuem uma alta área superficial, o que favorece a passagem de elétrons.

Neste estudo, foi introduzido um novo conceito onde a *redox* em meio líquido convencional é substituída por PBNCs sólidos (Figura 35). Foram realizados estudos EIS para monitorizar as alterações no Pt-SPE após cada modificação química. O circuito equivalente de *Randle*, que normalmente é aplicado para interpretação de sistemas eletroquímicos simples; foi utilizado para modelar os processos físico-químicos na superfície do eletrodo modificado Pt-SPE (Figura 35).

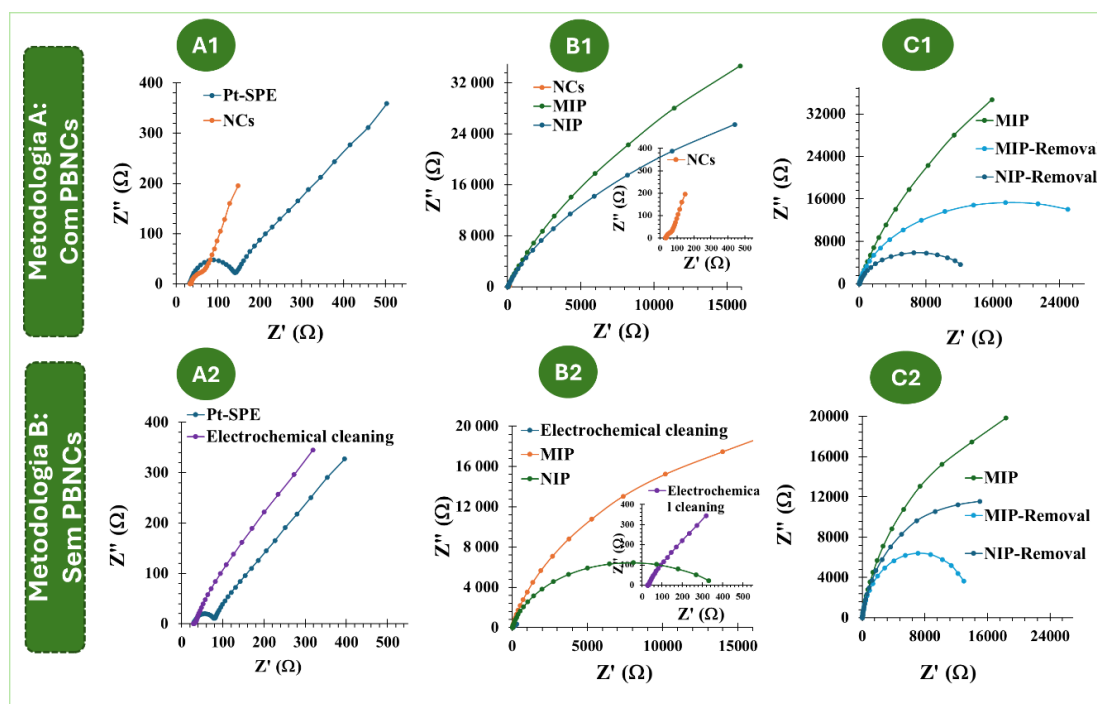


Figura 35. Metodologia A (A1 a C1): Seguimento EIS da montagem MIP e NIP no eletrodo baseado em PBNCs a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. Metodologia B (A2 a C2): Seguimento EIS do eletrodo baseado na montagem MIP e NIP a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. A1 – adição dos PBNCs; A2 – limpeza eletroquímica; B1 e B2 – polimerização; C1 e C2 – remoção.

Na Metodologia A, os MIPs e NIPs foram desenvolvidos na presença dos PBNCs para compreender o seu efeito no desempenho eletroquímico do biossensor. Para o desenvolvimento do biossensor, foram adicionadas 2 camadas de $2 \mu\text{L}$ de PBNCs. Foi utilizada uma temperatura de cura de 60°C durante 1 h. Analisando a Figura 35 A1, verifica-se que a deposição dos PBNCs na superfície do eletrodo resultou numa diminuição da resistência à transferência de carga (R_{ct}), significando que o nanomaterial aumenta a transferência de

elétrões e reduz a resistência, demonstrando boas capacidades eletroquímicas. Após a ELP do monômero o-PD, na presença e ausência da Myo (Figura 35 B1), observou-se um aumento significativo do valor de R_{ct} , consistente com a natureza isolante do polímero. Ao compararmos a R_{ct} do MIP com a do NIP após a ELP, observamos que a resistência do MIP é superior. Esse aumento pode estar relacionado à presença da proteína no interior da matriz polimérica. Após o tratamento de remoção (Figura 35 C1), utilizando tripsina, observou-se uma diminuição significativa do valor da R_{ct} nos MIPs, o que pode ser atribuída à remoção da proteína da matriz polimérica e à formação das cavidades impressas na superfície do polímero.

Na Metodologia B, verificou-se que o comportamento relativamente à construção do biossensor é semelhante. Após a polimerização de ambos, MIP e NIP, como esperado, o valor de R_{ct} também aumenta, mas, neste caso, menos do que na metodologia anterior, o que resultará da ausência dos nanomateriais. Isto deve-se possivelmente ao facto de o elétrodo com PBNCs apresentar características mais condutoras, o que facilita o transporte de carga, permitindo uma reação mais rápida e consequentemente o monômero é mais facilmente oxidado. Com menor resistência, esses elétrodos promovem um fluxo de corrente eficiente e suportam uma maior densidade de corrente, resultando em uma polimerização mais rápida.

Ao compararmos R_{ct} do MIP com a do NIP, observamos que o MIP apresenta uma resistência superior. Assim como ocorre na metodologia A, essa maior resistência está relacionada à presença da proteína na matriz polimérica. Após a remoção da Myo, existe uma diferença substancial na resistência devido à ausência da proteína.

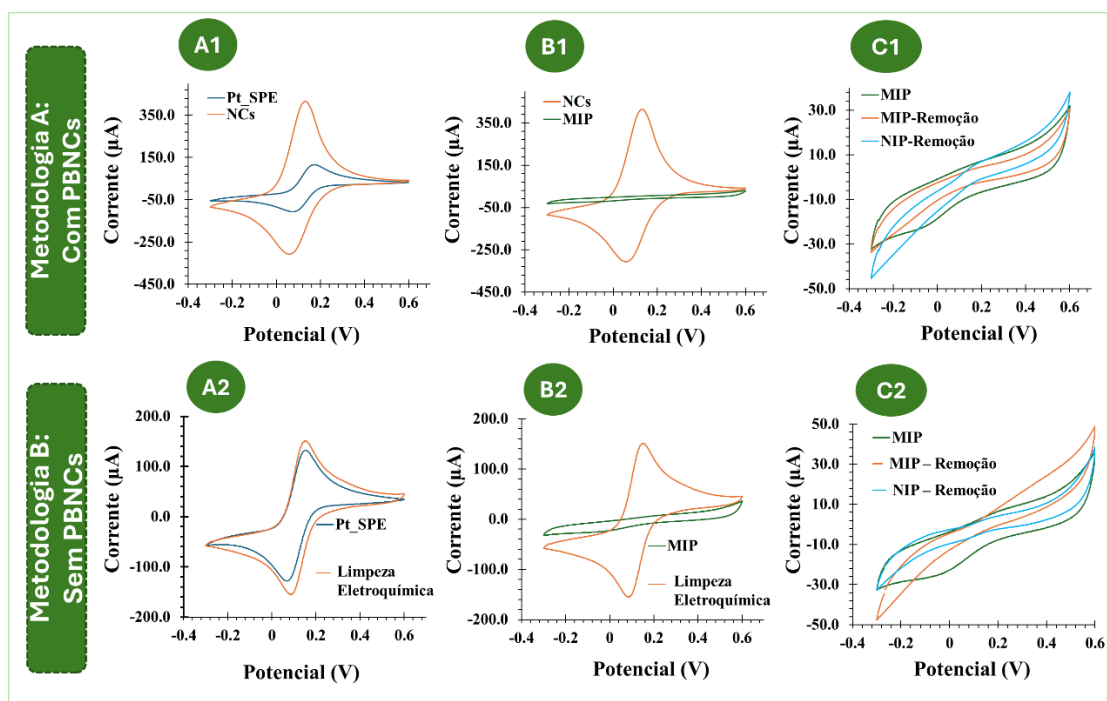


Figura 36. Metodologia A (A1 a C1): Seguimento CV da montagem MIP e NIP no elétrodo baseado em PBNCs a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. Metodologia B (A2 a C2): Seguimento CV do elétrodo baseado na montagem MIP e NIP a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$

³ mol/L $K_4[Fe(CN)_6]$ em eletrólito PBS. A1 – adição dos PBNCs; A2 – limpeza eletroquímica; B1 e B2 – polimerização; C1 e C2 – remoção.

Em paralelo com as medições de EIS, utilizou-se a técnica de CV para avaliar cada uma das modificações introduzidas na superfície dos elétrodos (Figura 36). Após a incorporação dos PBNCs na superfície dos Pt-SPEs (Figura 36 A1) observou-se um processo altamente reversível com uma separação de picos muito baixa ($\Delta V < 0,1$ V), indicando que há uma transferência de elétrons muito rápida. Após o processo de ELP (Figura 36 B1), verificou-se o desaparecimento dos picos de oxidação e redução, sendo este resultado consistente com a natureza isolante do polímero.

O comportamento na metodologia B é semelhante ao da Metodologia A. Após a formação do MIP e NIP, não foram observados picos *redox* e, após a remoção do molde, o valor de corrente é superior no MIP o que é expectável devido à ausência de proteína no meio polimérico. No entanto, a técnica CV é pouco sensível para detetar pequenas alterações na interface elétrodo/solução, sendo a técnica EIS ideal para monitorizar superfícies. Enquanto a técnica CV é útil para estudar reações *redox* e os seus mecanismos, a EIS mede a resposta em várias frequências, permitindo detetar fenómenos como resistência à transferência de carga, capacitância e difusão em diferentes escalas de tempo. Por esta razão as diferenças do CVs antes e depois da remoção da proteína não são tão evidentes.

Estes resultados indicam que a introdução dos PBNCs torna a superfície do elétrodo mais condutora, traduzindo-se numa taxa de transferência de elétrons muito elevada. Para além disso, em ambas as abordagens utilizadas, o comportamento do polímero é bastante isolante.

4.2 Otimização dos parâmetros

Ao longo do presente trabalho, foi necessário otimizar alguns parâmetros de modo a obter os melhores resultados.

Inicialmente foi utilizado 1×10^{-2} mol/L de o-PD, no entanto verificou-se que o polímero obtido era bastante isolante, o que poderia afetar o desempenho do biossensor. Assim, passou-se a utilizar uma concentração de monómero 10x mais baixa.

Relativamente à etapa de remoção, o primeiro agente a ser testado foi a proteinase K e posterior remoção de péptidos que tenham ficado retidos na superfície do elétrodo por CV em tampão PBS com 20 ciclos de -0,1 a 0,6 V. No entanto, não foram observadas diferenças significativas em termos de EIS e CV antes e depois da remoção da proteína, pelo que o agente de remoção foi alterado, passando a ser a tripsina. De seguida, o agente de remoção passou a ser a tripsina. A tripsina ficou a atuar durante 1h30 à temperatura ambiente. Procedeu-se analogamente ao procedimento com proteinase k com remoção por CV de vestígios de péptidos que possam ter ficado na superfície do elétrodo, mas aplicaram-se apenas 5 ciclos de CV.

4.3 Estudos de caracterização

4.3.1 SEM

A análise morfológica do material de PBNCs foi realizada através de medidas de SEM, tal como está demonstrado na Figura 37. É possível observar a formação dos nanocubos na Figura 37 B, com um tamanho médio que varia entre 50 a 100 nm. No caso dos MIPs, embora a presença do polímero nos PBNCs não seja muito evidente devido à não homogeneidade dos nanocubos, a Figura 37 A2 demonstra áreas de elevado brilho. Este brilho é provavelmente indicativo da presença do polímero. Além disso, a matriz composta parece mais densa quando comparada com a Figura 37 B2.

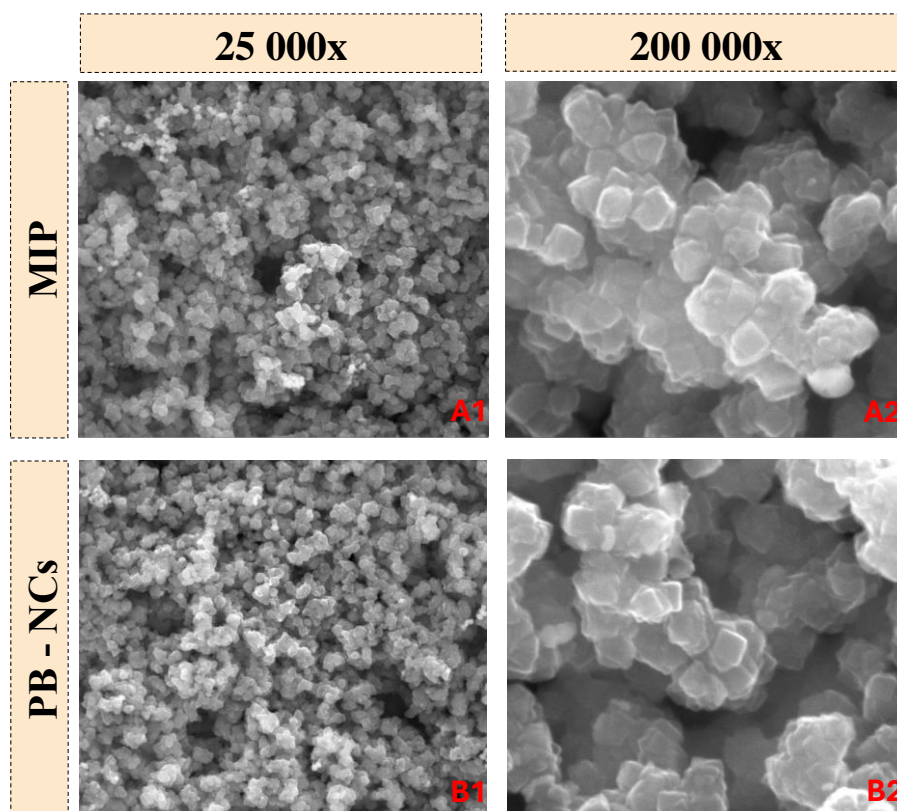


Figura 37. Análise SEM obtida para os materiais MIP e os nanocubos de PB, a diferentes ampliações.

4.3.2 FTIR

As medições de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) utilizaram um espectrômetro Nicolet 6700FTIR, acoplado a um acessório de refletância total atenuada (ATR, do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) à base de diamante.

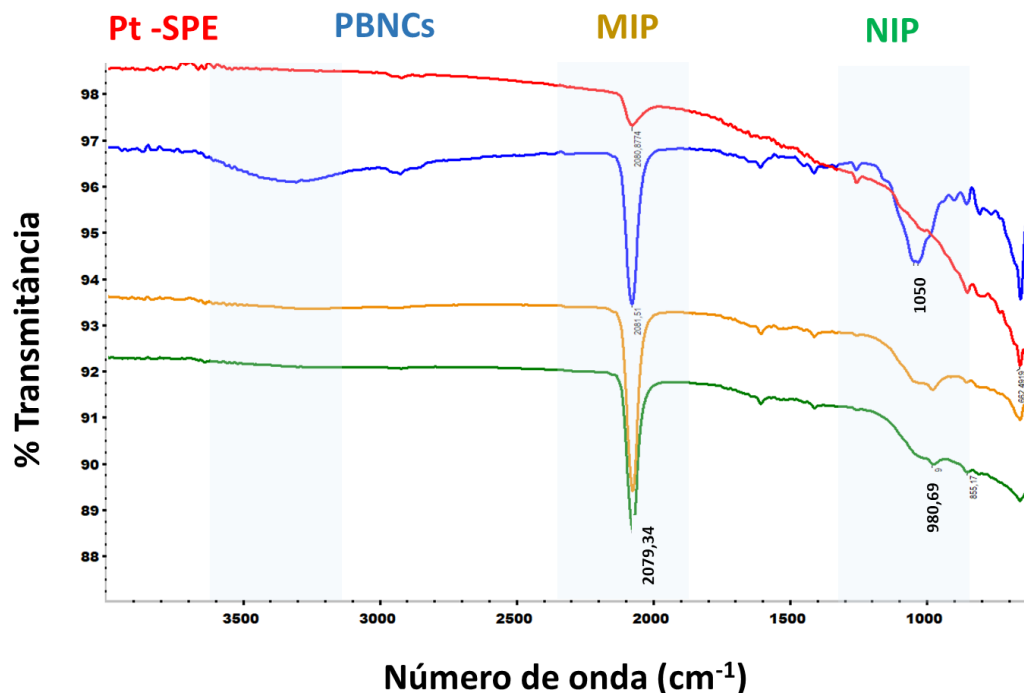


Figura 38. Espectros de ATR-FTIR. Vermelho - Pt-SPE; azul - Pt-SPE/PBNCs; amarelo – Pt-SPE/PBNCs/MIP e verde - Pt-SPE/PBNCs/NIP.

A Figura 38 apresenta espectros ATR-FTIR para (i) Pt-SPE; (ii) Pt-SPE/PBNCs; (iii) Pt-SPE/PBNCs/MIP e (iv) Pt-SPE/PBNCs/NIP. No espectro dos PBNCs é possível verificar uma banda forte em torno de $2061,5 \text{ cm}^{-1}$, sendo esta característica da vibração de estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$, indicando a presença de grupos de cianeto (Muslu et al., 2022). A banda larga centrada em aproximadamente 3250 cm^{-1} corresponde ao estiramento O-H, sugerindo a presença de água intersticial no interior da camada do filme. A banda em torno dos 980 cm^{-1} observada tanto nos sensores MIP como NIP está associada à flexão C=C, confirmando a presença de uma matriz polimérica. No entanto, não é possível distinguir entre os materiais MIP e NIP apenas com base nos espectros de FTIR. Estes espectros apenas confirmam a presença do polímero.

4.4 Estudos do desempenho do sensor

4.4.1 Desempenho do sensor em PBS

O desempenho analítico dos biossensores desenvolvidos para a detecção da Myo, na ausência e presença do nanomaterial PBNC, foi avaliado através da obtenção de curvas de calibração. A técnica de SWV foi selecionada em detrimento de outros métodos voltamétricos devido à sua elevada sensibilidade às reações dos elétrodos, assim como as suas capacidades de detecção adequadas e tempo de resposta rápido.

4.4.1.1 Curva de calibração sem PBNCs

Como se pode observar na Figura 39 A, a intensidade do pico de corrente aumenta à medida que a concentração de Myo incubada aumenta. Os gráficos B-C da Figura 39 correspondem à curva de calibração obtida a partir do valor médio das medições (triplicado), tanto para o MIP como para o NIP, respetivamente.

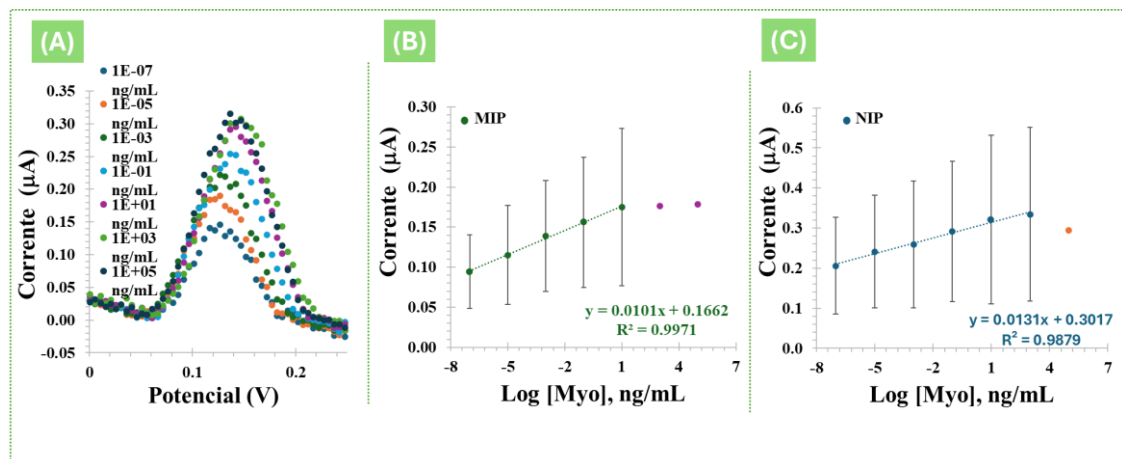


Figura 39. A: Medição SWV de MIP em $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ com diferentes concentrações de Myo em PBS. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.

De acordo com a Figura 39 A, a corrente aumenta com a concentração de Myo. Geralmente, o comportamento esperado seria o oposto pois, considerando o alto peso molecular da proteína, esperar-se-ia um aumento da resistência na superfície do eletrodo devido ao preenchimento das cavidades do MIP. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do ponto isoelétrico da proteína (entre 7,1 e 7,3) estar muito próximo do pH da solução tampão (7,4) (Essa et al., 2007). Isso faz com que a proteína tenha uma carga próxima da neutralidade, permitindo que alguns aminoácidos carregados positivamente fiquem expostos e interajam com a solução *redox* negativa, resultando em um aumento na corrente à medida que a concentração da proteína aumenta.

Da análise das Figuras 39 B e C pode-se concluir que os sensores apresentam linearidade desde a concentração de 0,1 aM. No entanto este não apresenta reprodutibilidade tendo desvios padrões bastante elevados embora os erros dos NIP sejam superiores aos MIPs.

4.4.2 Efeito dos PBNCs

4.4.2.1 Calibração dos eletrodos com PBNCs e com *redox* em meio líquido

Tal como referido acima, a presença da Myo aquando da sua incubação no biossensor, provoca um aumento da corrente do pico (Figura 40 A). O gráfico B da Figura 40 corresponde à média das medições em triplicado, tanto para o MIP como para o NIP.

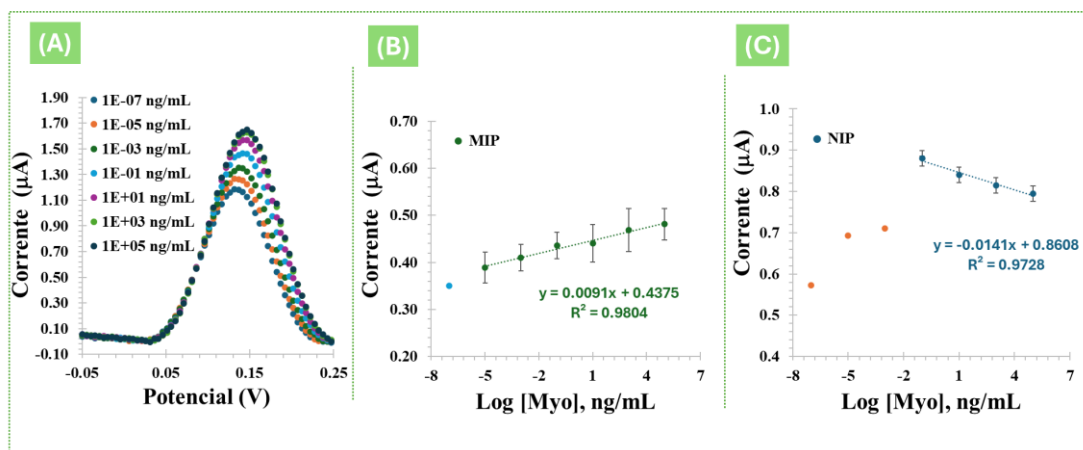


Figura 40. A: Medição SWV de MIP em $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ com diferentes concentrações de Myo em PBS. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.

Em termos de desempenho analítico do biossensor (MIP), foi possível observar que a incorporação dos PBNCs conferiu maior reprodutibilidade (barras de erro menores) na detecção da Myo, na gama de concentrações testadas, variando entre 1×10^{-5} ng/mL e $1 \times 10^{+5}$ ng/mL, com um declive (ou sensibilidade) de $0,0091 \mu\text{A}/\text{Dec}$ e um R^2 de $0,9804$ (Figura 40 B). Estes resultados parecem indicar que as cavidades específicas à molécula alvo foram formadas com sucesso. Paralelamente, nota-se que o controlo NIP não responde nas concentrações mais baixas de MYO e, para as mais altas, apresenta um comportamento decrescente (contrário ao do MIP), o que pode indicar adsorção não específica da proteína na superfície do eletrodo.

4.4.2.2 Calibração dos eletrodos baseados em PBNCs na ausência da *redox* em meio líquido

Após avaliar o comportamento da Myo com os PBNCs na superfície do eletrodo na presença de uma solução *redox* líquida, avançou-se para o estudo equivalente, mas agora sem a utilização desta sonda *redox* adicional. Para tal foi utilizada a técnica de DPV. Neste estudo, verificou-se novamente que a presença da Myo no polímero impresso causava um aumento da corrente do pico medida por DPV (Figura 41 A). O gráfico B da Figura 41 corresponde à média das medições em triplicado, tanto para o MIP como para o NIP.

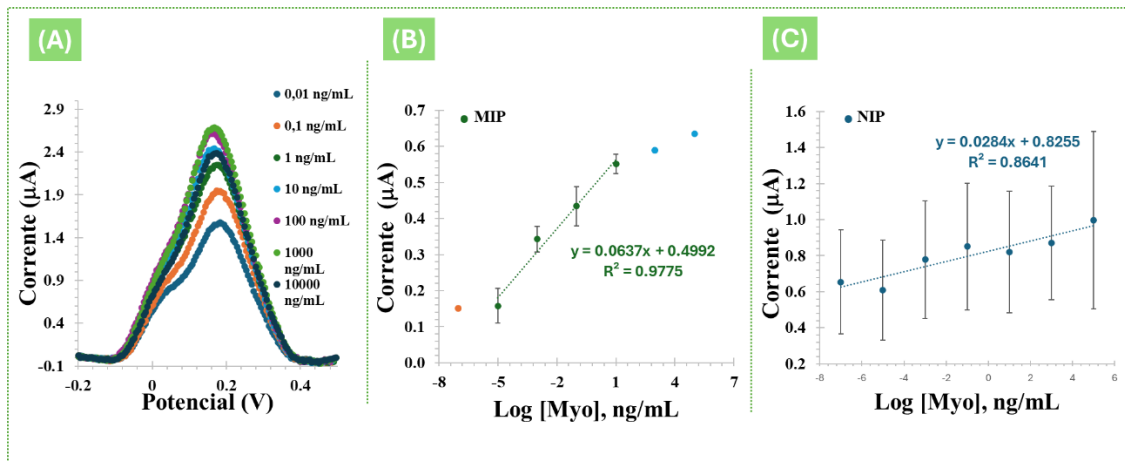


Figura 41. A: Medição DPV de MIPS com diferentes concentrações de Myo em PBS, sem *redox* probe. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.

Em termos de desempenho analítico, foi possível observar que este efeito da Myo foi consistente para todas as concentrações testadas, variando entre 1×10^{-5} ng/mL a $1 \times 10^{+1}$ ng/mL, com uma inclinação de 0,0637 mA/Dec, com uma gama linear entre 1×10^{-5} ng/mL a $1 \times 10^{+1}$ ng/mL e R^2 de 0,9775. O desvio padrão no MIP é inferior a 10% (Figura 40 B). Estes resultados indicam que possivelmente as cavidades foram formadas corretamente e são complementares. Em contraste, os NIPs apresentam aleatoriedade sem formação de uma linha reta, o que pode ser devido à adsorção não específica à superfície do polímero.

4.5 Estudo de seletividade

Para avaliar a capacidade do sensor de distinguir a Myo de outras moléculas interferentes e presentes em amostras biológicas, foram realizados testes de seletividade ao biossensor. Para este estudo, foram realizados ensaios competitivos entre a Myo, na concentração de 10 mg/mL e outras espécies de interferentes. Os interferentes selecionados para este estudo foram: a BSA (6 mg/mL), a glucose (2,8 mg/mL) e a troponina (5 µg/mL). As concentrações referidas anteriormente são as encontradas no sangue, as quais foram diluídas 100 vezes.

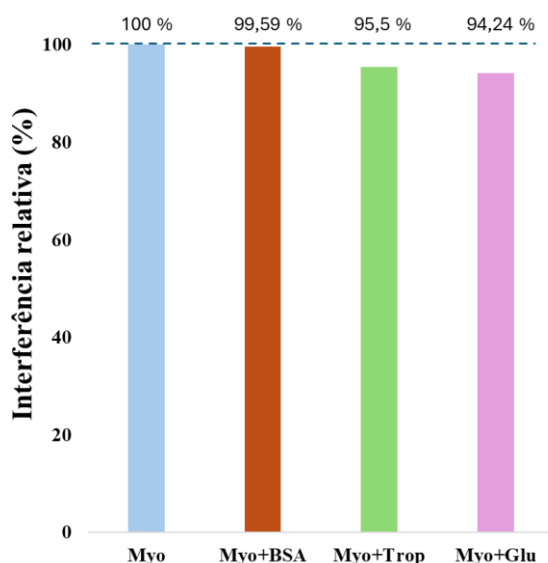


Figura 42. Gráfico representativo dos resultados do teste de seletividade para as espécies interferentes: BSA, troponina e glucose.

A Figura 42 demonstra o estudo de seletividade para o caso em que cada composto ou mistura é incubado na superfície do eletrodo de trabalho por 20 minutos. Verificou-se que o efeito da presença dos respectivos interferentes foi pouco significativo, sendo este de 5,76 % para a glucose; 4,5 % para a troponina, e de 0,41 % para a BSA.

Apesar de terem sido apenas utilizados três interferentes, os resultados demonstram que o biossensor é seletivo para detetar Myo. Assim, este biossensor demonstra-se muito promissor para a deteção de Myo em amostras biológicas reais.

4.6 Desempenho do sensor em soro

4.6.1 Calibração dos eletrodos baseados em PBNCs com *redox* em meio líquido

Com o objetivo de avaliar o comportamento do biossensor no contexto realista, foram realizados ensaios com a preparação de soluções padrão da Myo em soro. Começou-se por avaliar o comportamento da Myo, na presença dos PBNCs e com a solução de *redox* (Figura 43). Para este estudo, o soro fetal bovino é diluído 100 vezes. O gráfico B da Figura 43 corresponde à média das medições em triplicado, tanto para o MIP como para o NIP.

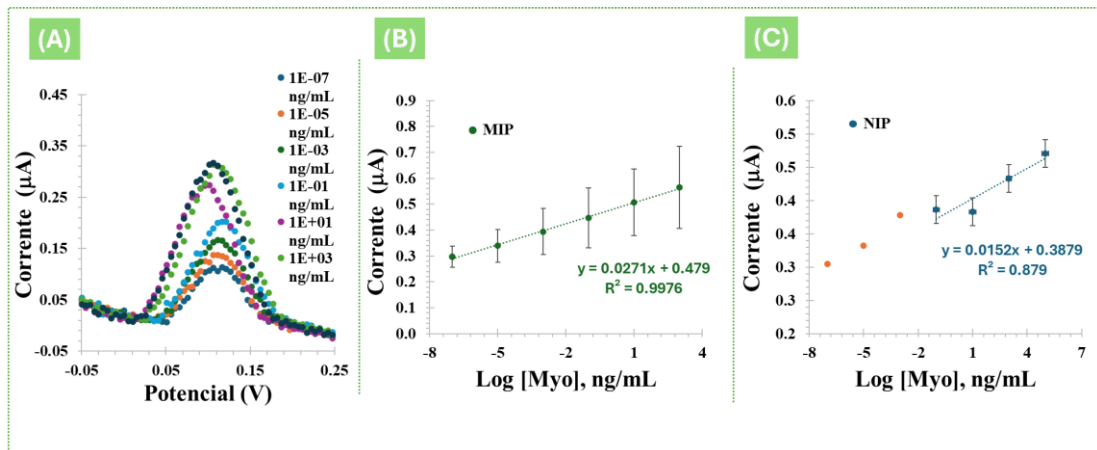


Figura 43. A: Medição de SWV MIPS em $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L $k_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ com diferentes concentrações de Myo em PBS, com *redox* probe. B: Curva de calibração correspondente ao MIP. C: Curva de calibração correspondente ao NIP.

Neste sentido, é possível observar que na generalidade a presença da Myo no soro, diluído em PBS, aumenta a sua corrente de pico típica (Figura 43 A). O MIP apresenta maior linearidade do que o NIP. O MIP apresenta uma resposta linear entre o padrão de concentração 1×10^{-7} ng/mL a $1 \times 10^{+5}$ ng/mL, com um declive médio de 0,0257 mA/Dec e R^2 de 0,9976.

4.6.2 Calibração dos elétrodos baseados em PBNCs na ausência da *redox* em meio líquido

O comportamento da MYO em soro humano (*Cormay Serum HN*) foi avaliado na presença dos PBNCs e sem a solução *redox*. Na Figura 44 B, são apresentados os resultados apenas para um elétrodo. É de salientar que o soro foi filtrado e diluído 1000 vezes.

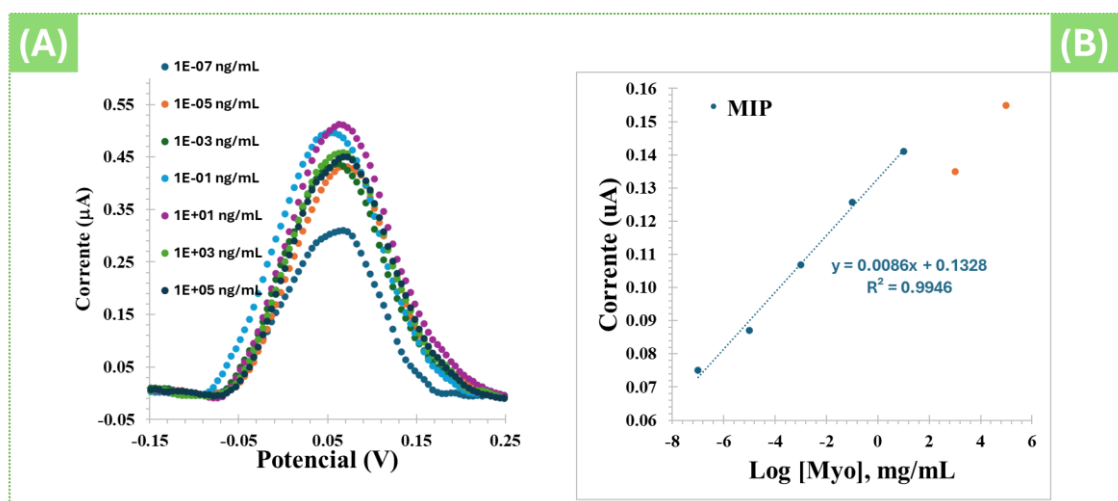


Figura 44. A: Medição de DPV MIPS com diferentes concentrações de Myo em PBS, sem *redox* probe. B: curvas de calibração correspondentes do MIP.

Deste modo, na generalidade a presença da Myo no soro aumenta a corrente do pico típica (Figura 44 A). O MIP apresentou uma resposta linear entre o padrão 1×10^{-7} ng/mL a $1 \times 10^{+1}$ ng/mL, com um declive de $0,0086 \mu\text{A}/\text{Dec}$ e R^2 de $0,9946$.

5 Conclusão

As DCVs representam uma das principais causas de morte em todo mundo. O AMI, uma das doenças pertencentes às DCVs, é um dos principais responsáveis pelo elevado número de mortes. Neste sentido, é urgente desenvolver estratégias eficientes, eficazes e rápidas para o diagnóstico do AMI, diminuindo assim o número de mortes e, aumentando a qualidade de vida dos indivíduos.

Atualmente, existem inúmeras técnicas de diagnóstico e monitorização das DCVs, no entanto estas metodologias não são suficientemente práticas e simples para um uso rotineiro. Assim, de forma a tornar o diagnóstico do AMI mais simples, prático e barato, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para detecção da Myo, um dos primeiros biomarcadores cardíacos a ser libertado quando começam os sintomas de um AMI. Para tal, foi utilizado um Pt-SPE como plataforma condutora, posteriormente este foi funcionalizado com um nanomaterial, PBNCS, possibilitando a utilização deste biossensor sem necessidade de adicionar uma sonda *redox* líquida.

Foram utilizadas várias técnicas para analisar o comportamento do sensor. A técnica de CV foi utilizada para remover possíveis contaminantes na superfície do eletrodo e promover o aparecimento de grupos funcionais através da oxidação. Observou-se que os picos de oxidação-redução característicos do par *redox* utilizado aumentaram de intensidade após esta limpeza. Em seguida, o eletrodo de trabalho foi modificado através, da imobilização de um nanomaterial, os NCPBs, num total de duas camadas, à temperatura de 60 °C. Observou-se que a implementação deste nanomaterial na superfície do eletrodo de platina causou uma diminuição do valor de R_{ct} e, conseqüentemente, um aumento da intensidade de corrente.

Na impressão molecular, a seleção do monómero é crucial, visto que os grupos funcionais irão interagir com os locais específicos da proteína. A o-PD foi o monómero escolhido devido à presença dos grupos amina. Foi utilizada a técnica de CV para a etapa da ELP. Posteriormente, a remoção da proteína foi realizada com recurso à tripsina. Esta conseguiu remover a proteína, dando origem às cavidades que foram formadas.

O desempenho analítico do biossensor foi investigado através da incubação de concentrações sucessivas da Myo, seguidas por medições eletroquímicas de SWV (na presença da solução *redox* líquida) e DPV (na ausência da solução *redox* líquida). O biossensor desenvolvido apresentou características de seletividade adequadas para aplicação prática e respostas rápidas (tempo máximo de incubação de 20 min). Verificou-se que, os limites de resposta do biossensor desenvolvido foi na gama do atogramas por mL, o que torna este biossensor ultrasensível. Deste modo, o desenvolvimento deste biossensor, através de anticorpos plásticos demonstrou ser simples e sensível, tornando o seu desenvolvimento promissor para testes em PoC.

Em suma, o biossensor com os PBNCs e na ausência da *redox* em meio líquido foi o que apresentou resultados mais promissores, apresentando uma sensibilidade 7 vezes superior ao biossensor com PBNCs com a *redox* em meio líquido.

Como perspetivas futuras, será necessário realizar mais estudos em amostras de soro sem a utilização de *redox probe* líquida, de forma a comprovar a reprodutibilidade do biossensor desenvolvido em matrizes complexas.

Referências

- Advances in the Diagnosis and Evaluation of Disabling Physical Health Conditions*. (2023). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/26941>.
- Al Fatease, A., Haque, M., Umar, A., Ansari, S. G., Mahnashi, M. H., Alhamhoom, Y., & Ansari, Z. A. (2022). Fabrication and Characterization of Acute Myocardial Infarction Myoglobin Biomarker Based on Chromium-Doped Zinc Oxide Nanoparticles. *Biosensors*, *12*(8), 585. <https://doi.org/10.3390/bios12080585>.
- Anderson, J. L., & Morrow, D. A. (2017). Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, *376*(21), 2053–2064. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1606915>.
- Aydin, S., Ugur, K., Aydin, S., Sahin, İ., & Yardim, M. (2019). Biomarkers in acute myocardial infarction: Current perspectives. In *Vascular Health and Risk Management* (Vol. 15, pp. 1–10). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S166157>.
- Bakirhan, N. K., Ozcelikay, G., & Ozkan, S. A. (2018). Recent progress on the sensitive detection of cardiovascular disease markers by electrochemical-based biosensors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *159*, 406–424. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.021>.
- Banait, T., Wanjari, A., Danade, V., Banait, S., & Jain, J. (2022). Role of High-Sensitivity C-reactive Protein (Hs-CRP) in Non-communicable Diseases: A Review. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.30225>.
- Beliaev, L. Yu., Kim, S., Nielsen, B. F. S., Evensen, M. V., Bunea, A.-I., Malureanu, R., Lindvold, L. R., Takayama, O., Andersen, P. E., & Lavrinenko, A. V. (2023). Optical Biosensors Based on Nanostructured Silicon High-Contrast Gratings for Myoglobin Detection. *ACS Applied Nano Materials*, *6*(13), 12364–12371. <https://doi.org/10.1021/acsnm.3c01997>.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- Billah, Md. M., Hodges, C. S., Hays, H. C. W., & Millner, P. A. (2010). Directed immobilization of reduced antibody fragments onto a novel SAM on gold for myoglobin impedance immunosensing. *Bioelectrochemistry*, *80*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2010.08.005>.
- Biomarker. National Cancer Institute. Obtido a partir de: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker>. Acesso em: 15 de abril de 2024.
- Biosensors Fundamentals and applications*. (2019). (n.d).
- Cao, L., Liu, Y., Zhang, B., & Lu, L. (2010). In situ Controllable Growth of Prussian Blue Nanocubes on Reduced Graphene Oxide: Facile Synthesis and Their Application as Enhanced Nanoelectrocatalyst for H₂O₂ Reduction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *2*(8), 2339–2346. <https://doi.org/10.1021/am100372m>.
- Cardiovascular Disease. Cleveland Clinic. 2022. Obtido a partir de: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/21493-cardiovascular-disease>. Acesso em: 10 de abril de 2024.

- Chan, D., & Ng, L. L. (2010). Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Medicine*, *8*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-34>.
- Chen, J., Ran, F., Chen, Q., Luo, D., Ma, W., Han, T., Wang, C., & Wang, C. (2019). A fluorescent biosensor for cardiac biomarker myoglobin detection based on carbon dots and deoxyribonuclease I-aided target recycling signal amplification. *RSC Advances*, *9*(8), 4463–4468. <https://doi.org/10.1039/C8RA09459D>
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016). Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, *45*(8), 2137–2211. <https://doi.org/10.1039/C6CS00061D>.
- Coven, D. L., Kalyanasundaram, A., Shirani, J., Windle, M. L., Yang, E.H. Acute Coronary Syndrome Workup. 2020. Obtido a partir de: <https://emedicine.medscape.com/article/1910735-workup?form=fpf#c1>. Acesso em: 15 de abril de 2024.
- Crivianu-Gaita, V., & Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, *85*, 32–45. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>.
- Crystallography365. Myoglobin: (Don't) hold your breath!. 24 de março de 2014. Obtido a partir de <https://crystallography365.wordpress.com/2014/03/24/myoglobin-dont-hold-your-breath>. Acesso em: 18 de setembro de 2024.
- Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 91–100. <https://doi.org/10.1042/EBC20150010>.
- Dasgupta, A., Wahed, A., & Grawany, A. L. (2014). *A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*. www.elsevierdirect.com/rights.
- Dey, D., & Goswami, T. (2011). Optical Biosensors: A Revolution Towards Quantum Nanoscale Electronics Device Fabrication. *BioMed Research International*, *2011*(1). <https://doi.org/10.1155/2011/348218>
- Dong, C., Shi, H., Han, Y., Yang, Y., Wang, R., & Men, J. (2021). Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique. *European Polymer Journal*, *145*, 110231. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110231>
- Em, M., Ciência, T., Alimentar, S., & Sustentável, Q. (2013). *Felismina Teixeira Coelho Moreira Fast screening for diagnostic of heart ischemic episodes Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Química Sustentável*. Obtido a partir de: https://run.unl.pt/bitstream/10362/11318/1/Moreira_2013.pdf. Acesso em: 8 de setembro 2024.
- Ertürk, G., & Mattiasson, B. (2017). Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors. *Sensors*, *17*(2), 288. <https://doi.org/10.3390/s17020288>.
- Essa, H., Magner, E., Cooney, J., & Hodnett, B. K. (2007). Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *49*(1–4), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.07.005>.
- Florea, A., Feier, B., & Cristea, C. (2019). *In situ analysis based on molecularly imprinted polymer electrochemical sensors* (pp. 193–234). <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.05.005>.
- García-Gutiérrez, M. S., Navarrete, F., Sala, F., Gasparyan, A., Austrich-Olivares, A., & Manzanares, J. (2020). Biomarkers in Psychiatry: Concept, Definition, Types and Relevance to the Clinical Reality. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00432>.
- Gavriliă, A.-M., Stoica, E.-B., Iordache, T.-V., & Sârbu, A. (2022). Modern and Dedicated Methods for Producing Molecularly Imprinted Polymer Layers in Sensing Applications. *Applied Sciences*, *12*(6), 3080. <https://doi.org/10.3390/app12063080>.
- Gerdan, Z., Saylan, Y., & Denizli, A. (2024). Biosensing Platforms for Cardiac Biomarker Detection. *ACS Omega*, *9*(9), 9946–9960. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06571>.
- Griffin, G. D., & Stratis-Cullum, D. N. (2009). Biosensors. In *Encyclopedia of Microbiology* (pp. 88–103). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00168-1>.
- Herrera-Chacón, A., Cetó, X., & del Valle, M. (2021). Molecularly imprinted polymers - towards electrochemical sensors and electronic tongues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *413*(24), 6117–6140. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03313-8>.
- Instituto Nacional de Estatística. 1 de março de 2021. DestaqueINE_COD2019_20210301. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=458515689&DESTAQUESmodo=2.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (n.d.). *Immunobiology*, 5th ed.

- Kaliyaraj Selva Kumar, A., Zhang, Y., Li, D., & Compton, R. G. (2020). A mini-review: How reliable is the drop casting technique? *Electrochemistry Communications*, *121*, 106867. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2020.106867>.
- Karunakaran, Chandran., Bhargava, Kalpana., & Benjamin, Robson. (2015). *Biosensors and bioelectronics*. Elsevier.
- Kogularasu, S., Lin, W.-C., Lee, Y.-Y., Huang, B.-W., Chen, Y.-L., Chang-Chien, G.-P., & Sheu, J.-K. (2024). Advancements in electrochemical biosensing of cardiovascular disease biomarkers. *Journal of Materials Chemistry B*, *12*(26), 6305–6327. <https://doi.org/10.1039/D4TB00333K>.
- Kryscio, D. R., & Peppas, N. A. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*, *8*(2), 461–473. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.005>.
- Li, Y., Luo, L., Kong, Y., Li, Y., Wang, Q., Wang, M., Li, Y., Davenport, A., & Li, B. (2024). Recent advances in molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, *249*, 116018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116018>.
- Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2019). Introduction to Immunosensors. In *Immunosensors* (pp. 1–20). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788016162-00001>.
- Lin, C.-H., Lin, J.-H., Chen, C.-F., Ito, Y., & Luo, S.-C. (2021). Conducting polymer-based sensors for food and drug analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, *29*(4), 544–558. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3374>.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, *46*(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>.
- Magar, H. S., Hassan, R. Y. A., & Mulchandani, A. (2021). Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors*, *21*(19), 6578. <https://doi.org/10.3390/s21196578>.
- Martín-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L. M., Tuñón, J., Muñoz-García, B., Madrigal-Matute, J., Moreno, J. A., Vega De Céniga, M., & Egido, J. (2009). Biomarkers in Cardiovascular Medicine. In *Rev Esp Cardiol* (Vol. 62, Issue 6).
- Martins, G. V., Khan, M. A. R., Piloto, A. M. L., Guerreiro, J. R. L., Castaño-Guerrero, Y., Moreira, F. T. C., & Sales, M. G. F. (2023). Molecularly imprinted polymers in electrochemical sensing—A step closer to achieving technology readiness. In *Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)* (pp. 143–215). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91925-8.00017-X>.
- Matveeva, E. G., Gryczynski, Z., & Lakowicz, J. R. (2005). Myoglobin immunoassay based on metal particle-enhanced fluorescence. *Journal of Immunological Methods*, *302*(1–2), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.04.020>.
- Merck, C. M. (2014). *An introduction to Antibodies and their applications*. <https://www.researchgate.net/publication/280494428>.
- Metwally, M., Benhawry, A., Khalifa, R., El Nashar, R., & Trojanowicz, M. (2021). Application of Molecularly Imprinted Polymers in the Analysis of Waters and Wastewaters. *Molecules*, *26*(21), 6515. <https://doi.org/10.3390/molecules26216515>.
- Morales, M. A., & Halpern, J. M. (2018). Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconjugate Chemistry*, *29*(10), 3231–3239. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00592>.
- Moreira, D. C., Carvalho, D. N., Santos, E. C., Relvas, J. B., Neves, M. A. D., & Mendes Pinto, I. (2024). Multi-Parametric Decision System for Analytical Performance Assessment of Electrochemical (Bio)Sensors. *Advanced Materials Technologies*, *9*(13). <https://doi.org/10.1002/admt.202301464>.
- Moreira, F. T. C., Dutra, R. A. F., Noronha, J. P. C., & Sales, M. G. F. (2013). Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection. *Electrochimica Acta*, *107*, 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.06.061>.
- Moreira Gonçalves, L. (2021). Electropolymerized molecularly imprinted polymers: perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists. *Current Opinion in Electrochemistry*, *25*, 100640. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.09.007>.
- Muslu, E., Eren, E., & Oksuz, A. U. (2022). Prussian Blue-Based Flexible Thin Film Nanoarchitectonics for Non-enzymatic Electrochemical Glucose Sensor. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, *32*(8), 2843–2852. <https://doi.org/10.1007/s10904-022-02290-4>.

- Ning, Y., Hu, J., & Lu, F. (2020). Aptamers used for biosensors and targeted therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *132*, 110902. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110902>.
- Omran, F., Kyrrou, I., Osman, F., Lim, V. G., Randeve, H. S., & Chatha, K. (2022). Cardiovascular Biomarkers: Lessons of the Past and Prospects for the Future. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10), 5680. <https://doi.org/10.3390/ijms23105680>.
- Ostrovidov, S., Ramalingam, M., Bae, H., Orive, G., Fujie, T., Hori, T., Nashimoto, Y., Shi, X., & Kaji, H. (2023). Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for the Detection of Skeletal- and Cardiac-Muscle-Related Analytes. *Sensors*, *23*(12), 5625. <https://doi.org/10.3390/s23125625>.
- Our World in Data, Number of deaths from cardiovascular diseases by risk factor, Portugal, 2021. Obtido a partir de: <https://ourworldindata.org/grapher/cardiovascular-diseases-deaths-by-risk-factor?country=~PRT>. Acesso em: 20 de Agosto de 2024.
- Pal, M., & Khan, R. (2019). Biosensor platforms for detection of cardiovascular disease risk biomarkers. In *Functional Polysaccharides for Biomedical Applications* (pp. 397–431). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102555-0.00012-1>.
- Parisi, O. I., Francomano, F., Dattilo, M., Patitucci, F., Prete, S., Amone, F., & Puoci, F. (2022). The Evolution of Molecular Recognition: From Antibodies to Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) as Artificial Counterpart. *Journal of Functional Biomaterials*, *13*(1), 12. <https://doi.org/10.3390/jfb13010012>
- Patibandla, S., Gupta, K., & Alsayouri, K. (2024). National Library of Medicine. *Cardiac Biomarkers*. Obtido a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545216/>. Acesso em: 23 de junho de 2024.
- Piletsky, Sergey., & Turner, A. P. F. . (2006). *Molecular imprinting of polymers*. Landes Bioscience.
- Puoci, F., Giuseppe, Curcio, M., Iemma, F., Parisi, O. I., Spizzirri, U. G., & Picci, N. (2010). Molecularly Imprinted Polymers (PIMs) in Biomedical Applications. In *Biopolymers*. Sciyo. <https://doi.org/10.5772/10278>
- Qureshi, A., Gurbuz, Y., & Niazi, J. H. (2012). Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review. In *Sensors and Actuators, B: Chemical* (Vols. 171–172, pp. 62–76). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.077>
- Reyes-Retana, J. A., & Duque-Ossa, L. C. (2021). Acute Myocardial Infarction Biosensor: A Review From Bottom Up. In *Current Problems in Cardiology* (Vol. 46, Issue 3). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100739>
- Ribeiro, J. A., Pereira, C. M., Silva, A. F., & Sales, M. G. F. (2017). Electrochemical detection of cardiac biomarker myoglobin using polyphenol as imprinted polymer receptor. *Analytica Chimica Acta*, *981*, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.017>
- Sajini, T., & Mathew, B. (2021). A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting. *Talanta Open*, *4*, 100072. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100072>
- Sande, M. G., Rodrigues, J. L., Ferreira, D., Silva, C. J., & Rodrigues, L. R. (2021). Novel Biorecognition Elements against Pathogens in the Design of State-of-the-Art Diagnostics. *Biosensors*, *11*(11), 418. <https://doi.org/10.3390/bios11110418>
- Savonnet, M., Rolland, T., Cubizolles, M., Roupioz, Y., & Buhot, A. (2021). Recent advances in cardiac biomarkers detection: From commercial devices to emerging technologies. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 194). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113777>
- Screen-Printed Platinum Electrode. Metrohm. Obtido a partir de: <https://www.metrohm.com/en/products/550/550.html>. Acesso em: 16 de julho de 2024
- Seguro, I., Rebelo, P., Pacheco, J. G., & Delerue-Matos, C. (2022). Electropolymerized, Molecularly Imprinted Polymer on a Screen-Printed Electrode—A Simple, Fast, and Disposable Voltammetric Sensor for Trazodone. *Sensors*, *22*(7), 2819. <https://doi.org/10.3390/s22072819>
- Seymour, E., Ekiz Kanik, F., Diken Gür, S., Bakhshpour-Yucel, M., Araz, A., Lortlar Ünlü, N., & Ünlü, M. S. (2023). Solid-Phase Optical Sensing Techniques for Sensitive Virus Detection. *Sensors*, *23*(11), 5018. <https://doi.org/10.3390/s23115018>
- Sharma, A., Bhardwaj, J., & Jang, J. (2020). Label-Free, Highly Sensitive Electrochemical Aptasensors Using Polymer-Modified Reduced Graphene Oxide for Cardiac Biomarker Detection. *ACS Omega*, *5*(8), 3924–3931. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03368>
- Shen, Y., Miao, P., Liu, S., Gao, J., Han, X., Zhao, Y., & Chen, T. (2023). Preparation and Application Progress of Imprinted Polymers. *Polymers*, *15*(10), 2344. <https://doi.org/10.3390/polym15102344>

- Simões, F. R., & Xavier, M. G. (2017). Electrochemical Sensors. In *Nanoscience and its Applications* (pp. 155–178). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0.00006-5>
- Singh, A., Sharma, A., Ahmed, A., Sundramoorthy, A. K., Furukawa, H., Arya, S., & Khosla, A. (2021). Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*, *11*(9), 336. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>
- Stan, D., Mirica, A.-C., Iosub, R., Stan, D., Mincu, N. B., Gheorghe, M., Avram, M., Adiaconita, B., Craciun, G., & Bocancia Mateescu, A. L. (2022). What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? *Processes*, *10*(4), 723. <https://doi.org/10.3390/pr10040723>
- Tetyana, P., Morgan Shumbula, P., & Njengele-Tetyana, Z. (2021). Biosensors: Design, Development and Applications. In *Nanopores*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97576>
- Thupakula, S., Nimmala, S. S. R., Ravula, H., Chekuri, S., & Padiya, R. (2022). Emerging biomarkers for the detection of cardiovascular diseases. In *Egyptian Heart Journal* (Vol. 74, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s43044-022-00317-2>
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C. P., Torbica, A., Lettino, M., Petersen, S. E., Mossialos, E. A., Maggioni, A. P., Kazakiewicz, D., May, H. T., De Smedt, D., Flather, M., Zuhlke, L., Beltrame, J. F., Huculeci, R., Tavazzi, L., Hindricks, G., Bax, J., Casadei, B., ... Bardinnet, I. (2020). European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *European Heart Journal*, *41*(1), 12–85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz859>
- Timmis, A., Vardas, P., Townsend, N., Torbica, A., Katus, H., De Smedt, D., Gale, C. P., Maggioni, A. P., Petersen, S. E., Huculeci, R., Kazakiewicz, D., Rubio, V. de B., Ignatiuk, B., Raisi-Estabragh, Z., Pawlak, A., Karagiannidis, E., Treskes, R., Gaita, D., Beltrame, J. F., ... Achenbach, S. (2022). European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary. *European Heart Journal - Quality of Care and Clinical Outcomes*, *8*(4), 377–382. <https://doi.org/10.1093/ehjqcco/qcac014>
- Umar, A., Haque, M., Ansari, S. G., Seo, H.-K., Ibrahim, A. A., Alhamami, M. A. M., Algadi, H., & Ansari, Z. A. (2022). Label-Free Myoglobin Biosensor Based on Pure and Copper-Doped Titanium Dioxide Nanomaterials. *Biosensors*, *12*(12), 1151. <https://doi.org/10.3390/bios12121151>
- Vanek, T., & Kohli, A. (2024). National Library of Medicine. *Biochemistry, Myoglobin*. Obtido a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544256/>. Acesso em: 20 de junho de 2024.
- Vasapollo, G., Sole, R., Del, Mergola, L., Lazzoi, M. R., Scardino, A., Scorrano, S., & Mele, G. (2011). Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(9), 5908–5945. <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- Vílchez, J. A., Orenes-Piñero, E., Hernández-Romero, D., Valdés, M., & Marín, F. (2014). Biomarkers of Necrosis and Myocardial Remodeling. In *General Methods in Biomarker Research and their Applications* (pp. 1–24). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7740-8_42-1
- Vogel, B., Claessen, B. E., Arnold, S. V., Chan, D., Cohen, D. J., Giannitsis, E., Gibson, C. M., Goto, S., Katus, H. A., Kerneis, M., Kimura, T., Kunadian, V., Pinto, D. S., Shiomi, H., Spertus, J. A., Steg, P. G., & Mehran, R. (2019). ST-segment elevation myocardial infarction. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0090-3>
- WESTBROEK, P. (2005). Electrochemical methods. In *Analytical Electrochemistry in Textiles* (pp. 37–69). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845690878.1.37>
- Wijeratne, Kosala. (2018). *Conducting Polymer Electrodes for Thermogalvanic Cells*. Linkopings Universitet.
- World Health Organization, Cardiovascular diseases, 11 de junho 2021. Obtido a partir de: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 16 de maio de 2024.
- Wu, J. C. (2019). Acute Myocardial Infarction. In *Essential Echocardiography: A Companion to Braunwald's Heart Disease* (pp. 195-199.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39226-6.00018-7>
- Yan, H., & Row, K. H. (2006). Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, *7*(5), 155–178. <https://doi.org/10.3390/i7050155>