



Desenvolvimento de um sensor ótico para a deteção do biomarcador de cancro MMP7

PEDRO MIGUEL CARNEIRO OLIVEIRA

março de 2025

Desenvolvimento de um sensor ótico para a deteção do biomarcador de cancro MMP7

Pedro Miguel Carneiro Oliveira

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

Orientador: Professora Doutora Maria Arcelina Marques

Coorientador: Doutora Ana Margarida Loureiro Piloto Cerqueira

Júri:

Presidente:

Joaquim Fernando Almeida Alves, Professor Adjunto, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Vogais:

Abel José Assunção Duarte, Professor Adjunto, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Ana Margarida Piloto Cerqueira, Investigador, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Resumo

A doença oncológica tem mostrado uma tendência crescente nas últimas décadas, tornando-se um problema de saúde pública. A falta de meios práticos e clinicamente confiáveis para a monitorização do cancro representa um desafio no acompanhamento da doença em pacientes que sofrem ou já sofreram desta condição. Para preencher essa lacuna, há a necessidade de se desenvolverem novas estratégias sensoras para a deteção de biomarcadores associados a esta doença. Um dos biomarcadores selecionado para o desenvolvimento deste trabalho, foi a metaloproteinase de matriz 7 (MMP7, do inglês *matrix metalloproteinase 7*), conhecida por ser expressa no cancro de pâncreas.

Neste contexto, desenvolveu-se um sensor biomimético denominado MIP@PQs, que consiste na conjugação de polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês, *molecularly imprinted polymers*), com pontos quânticos (PQs). A construção do sensor utilizou PQs de telureto de cádmio com emissão alaranjada, funcionalizados com ácido 3-mercaptopropiónico (CdTe@MPA), que foram conjugados aos MIPs e utilizados na deteção do biomarcador MMP7 em soro humano liofilizado diluído a 1% em PBS (do inglês, *phosphate buffer saline*). Os MIP@PQs apresentaram uma ampla faixa de deteção abaixo do valor de corte clínico para MMP7, boa praticidade e seletividade em amostras de soro diluídas, o que indica o seu potencial para várias aplicações biológicas.

Considerando o desempenho promissor do sensor biomimético em solução, planeia-se fazer a sua deposição em suporte sólido e avaliar a resposta analítica ao biomarcador MMP7, constituindo uma potencial linha de investigação para a continuação deste estudo.

Palavras-chave: Polímeros de impressão molecular; pontos quânticos, sensor ótico biomimético; MIP@PQs; cancro do pâncreas, biomarcador MMP7.

Abstract

Oncological disease has shown a rising trend over the past decades, becoming a major public health concern. The lack of practical and clinically reliable methods for cancer monitoring presents a challenge in tracking the disease in patients currently affected or who have had this condition. To address this gap, it is necessary to develop new sensing strategies for the detection of biomarkers associated with cancer. One of the biomarkers selected for this work was matrix metalloproteinase 7 (MMP7), known for its expression in pancreatic cancer.

In this context, a biomimetic sensor was developed based on molecularly imprinted polymers (MIPs) combined with quantum dots, referred to as MIP@PQs. The sensor construction utilized orange-emitting cadmium telluride quantum dots functionalized with 3-mercaptopropionic acid (CdTe@MPA), which were conjugated with MIPs and used in detecting the biomarker MMP7 in lyophilized human serum 1% diluted in phosphate buffer saline, PBS. The MIP@PQs exhibited a broad detection range below the clinical cutoff for MMP7, demonstrating excellent practicality and selectivity in diluted serum samples, indicating its potential for various biological applications

Given the promising performance of the biomimetic sensor in solution, the next step involves its deposition onto a solid support to evaluate its analytical response to the MMP7 biomarker. This approach opens a potential avenue for future research to continue this study.

Keywords: Molecularly imprinted polymers; quantum dots; biomimetic optic sensor; MIP@PQs; pancreatic cancer, MMP7 biomarker.

Agradecimentos

A concretização deste trabalho só foi possível graças à colaboração e apoio de várias pessoas, a quem gostaria de expressar a minha profunda gratidão.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Doutora Maria Arcelina Marques, pelo seu acompanhamento constante durante a elaboração desta tese, pelo conhecimento que partilhou e pela confiança que depositou em mim para a realização deste projeto.

Quero expressar o meu profundo agradecimento à minha coorientadora, Doutora Ana Margarida Loureiro Piloto Cerqueira, por ter estado ao meu lado durante toda esta jornada académica. A sua orientação diária excecional, os conhecimentos que partilhou e a confiança que depositou em mim foram fundamentais para a realização deste trabalho. Além disso, a sua paciência e disponibilidade para responder a todas as questões e ideias que surgiram ao longo do processo foram verdadeiramente valiosas. Apesar do agradecimento é importante reconhecer que as palavras são insuficientes para demonstrar a minha gratidão.

À equipa do LabRISE, o meu sincero agradecimento pelo conhecimento partilhado e pelo tratamento que me dispensaram durante todo o meu percurso. Um agradecimento especial à Ana Xu, Eduarda Rodrigues e Daniela Oliveira, que sempre estiveram disponíveis para partilhar ideias e ajudar-me no dia a dia.

Deixo uma palavra de agradecimento aos meus amigos Pedro Brito, Catarina Moreira e André Pereira, que nunca saíram do meu lado e me apoiaram ao longo de toda a esta jornada académica.

Por fim, mas não menos importante, um profundo agradecimento aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram de forma incondicional durante todo o meu percurso académico, sendo eles a minha maior fonte de inspiração.

Índice

1	Introdução	1
1.2	Objetivos	3
1.3	Estrutura da tese	3
2	Revisão Bibliográfica	6
2.1	O cancro pancreático	7
2.2.1	A metaloproteínas de matriz 7 (MMP7)	9
2.3	Biossensores	9
2.3.1	Transdução do sinal	11
2.3.2	Elementos de bioreconhecimento	12
3	Procedimento Experimental	33
3.1	Materiais	34
3.2.	Equipamentos e Técnicas de Caracterização	34
3.2.1.	Espetroscopia de fluorescência	34
3.2.2.	Espetroscopia UV-Vis	35
3.2.3.	Espetroscopia de FTIR	36
3.2.4.	Espetroscopia de SEM e EDS	36
3.3.	Metodologias	37
3.3.1.	Síntese dos PQs de CdTe@MPA	37
3.3.2.	Síntese dos MIP@PQs	38
3.3.3.	Calibração dos MIP@PQs em solução aquosa	39
3.3.4.	Estudos de Estabilidade dos PQs e dos MIP@PQs	40
3.3.5.	Estudos de Seletividade dos MIP@PQs	40
4.	Resultados e Discussão	41
4.1.	Caracterização dos PQs de CdTe@MPA	42
4.1.1.	Análise Espectral de Fluorescência	42
4.1.2.	Estudos de Estabilidade dos PQs	42
4.1.3.	Efeito da Temperatura	44
4.1.4.	Efeito da Diluição	44
4.2.	Caracterização dos MIP@PQs	45

4.2.1.	Análise espectral de UV-Vis	45
4.2.2.	Ajuste das condições de impressão do biomarcador	46
4.2.3.	Ajuste das condições de polimerização	47
4.2.4.	Ajuste das condições de lavagem	48
4.3.	Análise estrutural dos PQs de CdTe@MPA	50
4.3.1.	Análise FTIR	50
4.3.2.	Análise SEM e EDS	52
4.4.	Calibração dos MIP@PQs	53
4.4.1.	Calibração em PBS	53
4.4.2.	Calibração em Soro	57
4.5.	Estudos de seletividade dos MIP@PQs	60
5.	Conclusões e perspectivas futuras	62
5.1.	Conclusões Finais	62
5.2.	Perspetivas futuras	62

Lista de Figuras

Figura 1- Biossensores e classificação dos mesmos, adaptado de (Shavanova et al., 2016).	10
Figura 2- Princípios de funcionamento de um biossensor, adaptado de (Shavanova et al., 2016).	10
Figura 3- Representação esquemática geral do processo de síntese de MIPs, adaptado de (Shen et al., 2013).	13
Figura 4 - Estruturas químicas dos monómeros mais comumente utilizados, adaptado de (Cormack & Elorza, 2004).	14
Figura 5 - Estruturas químicas dos agentes de reticulação, adaptado de (Cormack & Elorza, 2004).	15
Figura 6 - Estruturas químicas dos iniciadores radicalares, adaptado de (Cormack & Elorza, 2004).	16
Figura 7 - O mecanismo de polimerização por radiação livre do monómero de cloreto de vinilo com o iniciador radical AIBN, adaptado de (Abo Dena et al., 2020).	19
Figura 8 - Esquema ilustrativo do tipo de condução de materiais e classificação consoante a distancia entre a banda de condução e a banda de valência.	21
Figura 9 - Metodologias de top-down e bottom-up usadas na síntese de nanopartículas.	22
Figura 10 - Distribuição de pontos quânticos de diferentes tamanhos, e respetiva ilustração de energia de transição necessária à emissão de energia em diferentes comprimentos de onda.	25
Figura 11 - Estrutura cristalina wurtzita do telureto de cádmio, CdTe.	25
Figura 12 - Processos de perda de energia de uma molécula excitada, adaptado de (Valeur & Berberan-Santos, 2012).	27
Figura 13 - Diagrama de Perrin-Jablonski com exemplos de métodos de absorção e dissipação radiativa. S0, S1 e S2 - estados electrónicos singletos; T1, T2 - estados electrónicos tripletos; IC - conversão interna; ISC - cruzamento intersistemas (Therézio, 2009).	28
Figura 14- Espetrómetro de fluorescência Lumina da Thermo Scientific.	35
Figura 15- Espetrómetro de ultravioleta-visível Evolution 220.	35
Figura 16- Espetrómetro de FTIR com ATR, Nicolet iS10	36
Figura 17- Microscópio Eletrónico de Varrimento SEM modelo FEI Quanta 400 FEG nas instalações do laboratório CENTRO DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE DO PORTO (CEMUP)	36
Figura 18- Esquema de equipamento utilizado durante a síntese dos PQs CdTe@MPA. (1) Placa de aquecimento com agitação, (2) Balão de fundo redondo com três gargalos, (3) Termómetro e (4) Condensador Dimroth.	37
Figura 19- Preparação do precursor de hidrogenotelureto de sódio (NaHTe) e posterior adição ao balão de fundo redondo onde decorre a síntese dos PQs CdTe@MPA.	38
Figura 20- Representação esquemática da construção dos MIP@PQs para a proteína MMP7. Incubação da proteína MMP7 à superfície dos PQs (1); Polimerização na presença do monómero e do agente reticulante (2); Remoção da proteína MMP7 da matriz polimérica, com formação das cavidades impressas (3); Reconhecimento da proteína MMP7 às cavidades dos MIP@PQs (4).	39

Figura 21- Espectros de excitação (linha preta) e de emissão de fluorescência (linha laranja) de uma suspensão de CdTe@MPA preparada a 5 mg mL ⁻¹ em PBS 0,01 M pH 7,4.	42
Figura 22- Estudos de estabilidade de suspensões de PQs de CdTe@MPA a 5 mg mL ⁻¹ , em PBS, MES e TRIS, meios tampão com 0,01 M de força iônica e em água ultrapura a pH 5,6.	43
Figura 23- Efeito da temperatura nas suspensões de PQs CdTe@MPA, em PBS 0,01 M pH 7,4. (B) Valores médios de intensidade para cada valor de temperatura registrado.	44
Figura 24- Efeito da diluição de uma suspensão de PQs a 5 mg mL ⁻¹ pela adição de um volume equivalente de PBS, correspondente ao volume do padrão utilizado para a calibração e a diminuição da intensidade relativa de fluorescência (I0/I)	45
Figura 25- Espectro UV-Vis de uma suspensão de PQs CdTe@MPA a 5 mg mL ⁻¹ (linha laranja contínua), de uma solução de proteína MMP7 a 1 ug mL ⁻¹ (linha roxa contínua), de uma suspensão de MIP@PQs (linha amarela tracejado fino) e dos seus controlos NIP@PQs (linha verde tracejado fino), após lavagem com tampão carbonato/bicarbonato pH 9,2, dos sobrenadantes dos MIP@PQs (linha laranja tracejado grosso) e dos seus controlos NIP@PQs (linha verde tracejado grosso), após ressuspensão em PBS 0,01 M pH 7,4.	46
Figura 26- Emissão de fluorescência obtida durante a síntese dos sensores biomiméticos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs em PBS 0,01 M pH 7,4, para uma impressão de MMP7 a 1 mg/mL e 30 minutos de polimerização.	46
Figura 27- Efeito das razões (monómero: reticulante) usadas na síntese dos MIP@PQs por FRP em PBS 0,01 M pH 7,4, para diferentes tempos de polimerização. Razão (monómero:reticulante) (1:1) (A); razão (monómero:reticulante) (1:5) (B).	48
Figura 28- Ajuste das condições de lavagem dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs.	49
Figura 29- Espectros de FTIR de amostras dos PQs CdTe@MPA com emissão no laranja (linha violeta), dos MIP@PQs (linha azul-escura) e dos seus controlos NIP@PQs (linha roxa) após o passo da remoção da proteína.	51
Figura 30- Espectros de SEM e respetiva análise EDS, de suspensões de PQs CdTe@MPA com emissão no laranja a) e zi); dos MIP@PQs b) e zii); e dos seus controlos não impressos NIP@PQs c) e ziii), após remoção da proteína.	52
Figura 31- Espectros de emissão de fluorescência dos MIP@PQs (A) e dos seus controlos NIP@PQs (B), após calibrações com padrões de MMP7 em PBS 0,01M, pH 7,4. Os MIP@PQs foram previamente preparados por impressão em superfície de MMP7 a 1 µg mL ⁻¹ em PBS, com uma concentração de 2 mg mL ⁻¹ .	54
Figura 32- Espectros de emissão de fluorescência dos MIP@PQs (A) e dos seus controlos NIP@PQs (B), após calibrações com padrões de MMP7 em PBS 0,01M, pH 7,4. Os MIP@PQs foram previamente preparados por impressão em superfície de MMP7 a 1 µg mL ⁻¹ em PBS, com uma concentração de 5 mg mL ⁻¹ .	56
Figura 33- Espectros de emissão de fluorescência dos MIP@PQs (A) e dos seus controlos NIP@PQs (B), após calibrações com padrões de MMP7 em soro humano diluído a 100 vezes. Os MIP@PQs foram previamente preparados por impressão em superfície de MMP7 a 1 µg mL ⁻¹ em PBS, com uma concentração de 2 mg mL ⁻¹ .	58
Figura 34 – Estudos de seletividade dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs, na presença de MMP7 a 10 ng mL ⁻¹ (A) e na ausência de MMP7 (B), para quatro interferentes, CA 19-9 a 10	

U mL⁻¹, CEA a 4 ng mL⁻¹, creatinina a 0,06 µg mL⁻¹ e HSA a 0,4 mg mL⁻¹, em PBS 0,01 M pH 7,4.

60

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estado da arte de alguns sensores com capacidade de detecção de MMP7.	20
Tabela 2 - Tempos padronizados para processos de absorção e decaimento, adaptado de (Valeur & Berberan-Santos, 2012)	28
Tabela 3 – Lista de reagentes e devida origem comercial.	34
Tabela 4- Interferentes utilizados nos estudos de seletividade e as presentes concentrações iniciais (Ci), volume inicial (Vi), concentração final (Cf) e volume final (Vf). Padrões de diluição preparados através da solução mãe e do PBS com a respetiva concentração final.	40
Tabela 5- Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, k_{sv} e IF, para as calibrações dos MIP@PQs, dos seus controlos e dos PQs com emissão na região laranja, a 2 mg mL^{-1} , com MMP7 no intervalo de concentrações $[0,1 \text{ a } 500] \text{ g mL}^{-1}$ em PBS $0,01 \text{ M}$, pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.	55
Tabela 6- Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, k_{sv} e IF, para as calibrações dos MIP@PQs, dos seus controlos e dos PQs com emissão na região laranja, a 5 mg mL^{-1} , com MMP7 no intervalo de concentrações $[0,1 \text{ a } 500] \text{ ng mL}^{-1}$ em PBS $0,01 \text{ M}$, pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.	57
Tabela 7- Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, k_{sv} e IF, para as calibrações dos MIP@PQs, dos seus controlos e dos PQs com emissão na região laranja, a 2 mg mL^{-1} , com MMP7 no intervalo de concentrações $[0,1 \text{ a } 500] \text{ ng mL}^{-1}$ em soro humano diluído a 100 vezes em PBS $0,01 \text{ M}$, pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.	59

Acrónimos

Lista de Acrónimos

3-MPA	<i>3-mercaptopropionic acid</i>
AAm	Acrilamida
ACID	Ácido 4,4'-azo(4-cianoalérico)
ADVN	Azobisdimetilvaleronitrila
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ASCP	Carcinoma adenoescamoso
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
ATRP	<i>Atom transfer radical polymerization</i>
CA 125	<i>Carbohydrate antigen 125</i>
CA 19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
CA 242	<i>Carbohydrate antigen 242</i>
CA 72-4	<i>Carbohydrate antigen 72-4</i>
CBB	<i>Carbonate-bicarbonate buffer</i>
CdS	<i>Cadmium sulphide</i>
CdSe	<i>Cadmium selenide</i>
CdTe	<i>Cadmium telluride</i>
CdTe@MPA	<i>Quantum dots Cadmium telluride functionalized with 3-mercaptopropionic acid</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CP	Cancro do pâncreas
CQDs	<i>Carbon quantum dots</i>
CRP	<i>Controlled radical polymerization</i>
CTA	<i>Chain transfer agent</i>

CVD	<i>Chemical vapour deposition</i>
CYS	<i>Cysteine</i>
DOS	Densidade de estados eletrónicos
EDS	<i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
EGDMA	<i>Ethylene glycol dimethacrylate</i>
ESMO	Sociedade Europeia de Oncologia Médica
FDA	Administração de Alimentos e Drogas dos EUA
FRP	<i>Free radical polymerization</i>
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
GSH	Glutathiona
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IF	<i>Imprinting factor</i>
IPMN	Neoplasia mucinosa papilar intraductal
LOD	<i>Limit of detection</i>
LSPR	<i>Localized surface plasmon resonance</i>
MBAm	N,N'-metilenobis(acrilamida)
MCN	Neoplasia cística mucinosa
MIPs	<i>Molecularly imprinted polymers</i>
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP7	<i>Matrix Metalloproteinase 7</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NIPs	<i>Non-imprinted polymers</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático

PET	<i>Positron emission tomography</i>
PNETs	Tumores neuroendócrinos
PoCTs	<i>Point of Care Tests</i>
PQs	Pontos quânticos
RAFT	<i>Reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
RM	Ressonância magnética
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
SERS	<i>Surface enhanced Raman spectroscopy</i>
SIPs	<i>Surface-Imprinted Polymers</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SPT	Tumor sólido pseudopapilar do pâncreas

1 Introdução

Neste capítulo será apresentado o tema desta tese, a criação de um sensor ótico baseado em pontos quânticos para a deteção do biomarcador metaloproteinase de matriz 7, MMP7, associado ao cancro do pâncreas, utilizando polímeros molecularmente impressos. Inicia-se com uma breve contextualização e motivação para o desafio da monitorização e diagnóstico precoce do cancro do pâncreas. Em seguida, serão delineados os principais objetivos deste estudo e a metodologia adotada. Por fim, será descrita a estrutura do trabalho. Esta tese com componente prática, enquadra-se na unidade curricular do presente Mestrado de Engenharia Biomédica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, e foi realizada no Centro de Investigação em Engenharia e Tecnologia Industrial (CIETI) na unidade de investigação o Laboratório para Investigação e Inovação em Sensores, LabRISE.

1.1 Contextualização e Motivação

O pâncreas é um órgão com funções endócrinas e exócrinas com alto relevo fisiológico humano, é responsável pela produção da hormona responsável pela regulação da glicose no sangue, a insulina (Valente et al., 2024). O cancro do pâncreas (CP) está a tornar-se um problema de saúde grave. Está a tornar-se mais prevalente entre as neoplasias. Devido à sua natureza assintomática, este cancro é frequentemente identificado numa fase tardia, o que torna a terapia um desafio (Partyka et al., 2023). A falta de procedimentos de diagnóstico e de tratamento representam uma lacuna fulcral para o combate deste flagelo que é o cancro do pâncreas. O aparecimento de novas técnicas e tratamentos desta doença ficam aquém, sendo assim necessário explorar e combinar técnicas existentes, de forma a melhorar a expectativa de vida dos pacientes (Stoffel et al., 2023). O caso mais recorrente das neoplasias malignas é o adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), é o tipo de cancro que, nos seres humanos, apresenta o maior número de casos bem como uma elevada percentagem de doentes em fase tardia da doença, levando a uma baixa esperança média de vida, após diagnóstico (Partyka et al., 2023). Apesar de ser o mais frequente, o PDAC não é a única forma de cancro associado ao pâncreas. Este tem vários subtipos histológicos pouco comuns, incluindo a neoplasia mucinosa papilar intraductal (IPMN), o tumor neuroendócrino pancreático (PNETs), o carcinoma adenoescamoso (ASCP), a neoplasia cística mucinosa (MCN) invasiva o carcinoma de células acinares (ACC), o carcinoma de células escamosas (SCC) e o tumor pseudopapilar sólido (SPT) invasivo (Luo et al., 2019).

A utilização de biomarcadores como proteínas (Lino et al., 2022) e ácidos nucleicos (Eksin & Erdem, 2023) possibilita distinguir e monitorizar alguns processos tumorais. No caso do cancro do pâncreas, há um biomarcador atualmente reconhecido pela FDA (do inglês: Food and Drug Administration) e pela NCCN (do inglês: National Comprehensive Cancer Network), que é o antigénio carbohidrato 19-9 (do inglês: carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9) (Tempero et al., 2021). No entanto, segundo a European Society for Medical Oncology (ESMO), o CA 19-9 serve como um importante fator de prognóstico, mas não é útil para triagem do CP porque é indetetável em pacientes negativos para o antigénio de Lewis e é elevado apenas em estágios avançados da doença (Conroy et al., 2023).

Desta forma, a monitorização e precisão do prognóstico do CP são uma necessidade, bem como a avaliação da evolução da reposta ao tratamento. Estudos mais recentes evidenciaram que o uso combinado do CA 19-9 com outros biomarcadores associados ao CP aumenta a eficácia do diagnóstico e monitorização em amostras de soro, aumentando a capacidade de previsão e de discriminação do CP (Stoffel et al., 2023). Neste trabalho foi escolhido um desses biomarcadores coadjuvantes da monitorização do CP, a metaloproteinase de matriz 7 (MMP7).

Como solução inovadora, destacou-se a utilização de polímeros molecularmente impressos (do inglês, Molecularly Imprinted Polymers, MIPs) em conjunto com pontos quânticos (PQs) de telureto de cádmio para a deteção do biomarcador alvo. Esta abordagem combina a especificidade dos MIPs, para o reconhecimento seletivo da molécula-alvo, com as propriedades óticas únicas dos PQs. Concretamente, através da criação de cavidades moldadas no polímero, aliada à preservação da estrutura tridimensional e da funcionalidade química da molécula alvo, permite o seu reconhecimento seletivo. Por sua vez, os PQs detentores de elevada fluorescência e estabilidade em solução aquosa, mediante a funcionalização adequada da sua superfície, conseguem ser sensíveis a baixas concentrações da molécula alvo, conferindo-lhes elevada sensibilidade para a mesma. A integração de MIPs com PQs resulta em sistemas mais eficazes, permitindo o desenvolvimento de plataformas de deteção altamente sensíveis. Esta sinergia é ideal para aplicações em "testes de diagnóstico no local de atendimento", conhecidos em inglês como *Point of Care Tests* (PoCTs). Tais sistemas não apenas aumentam a acessibilidade ao diagnóstico, como também agilizam o processo, permitindo a deteção rápida e precisa de doenças em ambientes clínicos ou até mesmo fora dos laboratórios tradicionais. Esta inovação é especialmente promissora em áreas do diagnóstico e da monitorização precoce de doenças graves como cancro do pâncreas, para melhorar os resultados dos pacientes (Xu et al., 2021).

1.2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um sensor ótico biomimético para a monitorização eficiente de um biomarcador diretamente associado ao cancro do pâncreas. O sensor desenvolvido apresenta-se como uma alternativa rápida, seletiva e não invasiva e ao mesmo tempo economicamente acessível e simples de usar como POCT. Para atingir esse objetivo, O primeiro passo envolve a seleção do biomarcador a detetar sendo a MMP7 um biomarcador amplamente reconhecido pela sua associação com o cancro pancreático. A metodologia adotada foi a seguinte:

- Síntese e aplicação dos MIPs como matriz de reconhecimento seletivo do biomarcador alvo MMP7, após conjugação com pontos quânticos, os quais proporcionam a base da deteção ótica do biomarcador em estudo.
- Síntese e caracterização dos pontos quânticos de telureto de cádmio funcionalizados com ácido 3-mercaptopropiônico (CdTe@MPA).
- Conjugação dos MIPs aos PQs como sensores biomiméticos MIP@PQs, e dos seus controlos NIP@PQs.
- Avaliação dos sensores biomiméticos e dos seus controlos por espectroscopia de fluorescência em tampão aquoso e em soro HN liofilizado diluído em tampão, recorrendo a curvas de calibração com padrões do biomarcador alvo, preparados em cada meio.
- Avaliação da seletividade dos sensores biomiméticos MIPs@PQs sintetizados, na presença e na ausência de MMP7, para quatro interferentes, em tampão aquoso.

1.3 Estrutura da tese

Este documento está estruturado em cinco capítulos, cada um dos quais aborda de forma detalhada os diferentes aspetos deste trabalho. O primeiro capítulo oferece uma introdução abrangente, na qual o problema do diagnóstico e monitorização do cancro do pâncreas é contextualizado. São discutidas as principais motivações que impulsionaram a realização deste estudo, enfatizando a relevância do desenvolvimento de soluções inovadoras e acessíveis para a monitorização precoce deste tipo de cancro. Também são apresentados os objetivos gerais e específicos que se pretendem alcançar ao longo da investigação.

O segundo capítulo consiste num levantamento extenso do estado da arte, cobrindo uma revisão crítica dos métodos e das tecnologias existentes que são pertinentes para as diversas fases do estudo. Este capítulo abrange tópicos fundamentais como a biologia e as características do cancro do pâncreas, atuais métodos de monitorização e diagnóstico, partículas sensoras utilizadas em deteção biomédica, e abordagens de funcionalização de superfícies com elementos que apresentam capacidades de biorechecimento. Adicionalmente explora algumas técnicas óticas com destaque para aquelas que permitem uma deteção rápida e precisa do biomarcador alvo em estudo proposto neste estudo.

O terceiro capítulo foca-se na componente experimental do trabalho. Nele, são detalhadamente descritas as metodologias empregadas para a realização das experiências, desde a preparação dos materiais até à execução dos ensaios de calibração. Este capítulo inclui uma caracterização completa dos materiais e reagentes utilizados, além de uma descrição das técnicas de síntese e funcionalização das superfícies, necessárias para a obtenção dos sensores biomiméticos. Também é apresentada a escolha das variáveis experimentais e as razões que sustentam a adoção das abordagens selecionadas.

No quarto capítulo, são apresentados e analisados de forma sistemática os resultados obtidos ao longo da investigação. Este capítulo é fundamental para a interpretação dos dados experimentais, pois discute a eficácia das metodologias aplicadas, as propriedades de detecção dos sensores desenvolvidos e a sua relação com os biomarcadores de interesse. São discutidos ainda eventuais desvios ou inconsistências encontradas e possíveis causas para tais resultados. Finalmente, o quinto capítulo sintetiza todo o trabalho realizado, fornecendo uma descrição detalhada das conclusões principais obtidas ao longo da investigação. São destacadas as contribuições mais significativas do estudo, incluindo os seus sucessos e limitações. Adicionalmente, são propostas perspectivas para futuras investigações, com foco na otimização dos sensores biomiméticos MIP@PQs sintetizados. Também é avaliado o seu potencial para integração em PoCTs que possam ser usados na monitorização precoce do cancro do pâncreas.

2 Revisão Bibliográfica

Nas últimas décadas, o cancro tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública a nível global. Sendo a segunda principal causa de morte no mundo, esta doença é responsável por cerca de 10 milhões de óbitos anuais, representando um sexto de todas as mortes globais (Bray et al., 2024). Este facto tem um impacto direto na vida do indivíduo, bem como na vida dos seus familiares e amigos, desestabilizando-os e fazendo com que desenvolvam um forte carácter social emocional, coerente com a evolução humana. O cancro tem partilhado historicamente espaço de debate social e médico junto com a peste branca, a tuberculose, desde o século XIX até meados do século XX, altura em que os primeiros passos no desenvolvimento de tecnologias de saúde permitiram reduzir drasticamente as mortes por tuberculose pulmonar. O cancro foi assim elevado à categoria de doença com uma dimensão simbólica, tornando-se um problema complexo e incontornável.

Nos últimos anos, o conhecimento das relações e dos processos biológicos e moleculares tem proporcionado uma nova perspetiva e compreensão do cancro, resultando no desenvolvimento de tecnologia que permite uma melhor prevenção, deteção e tratamento. O cancro refere-se a neoplasias malignas e/ou tumores. Trata-se de um conjunto de doenças que se distinguem por uma proliferação celular aberrante e descontrolada que pode ocorrer em qualquer tecido do corpo, resultando na produção de uma massa anormal de tecido aglomerado. Quando este desenvolvimento progride para a malignidade, tem a capacidade de metastizar. A metástase é o processo pelo qual se espalha e invade outras partes do corpo através do sistema circulatório ou linfático, infiltrando-se e interferindo com o funcionamento normal do órgão e/ou tecido corporal. Por conseguinte, qualquer processo maligno começa na unidade fundamental da vida e tem o poder de se desenvolver sem sintomas evidentes. Além disso, o cancro não é uma

doença homogénea. Os tumores são compostos por uma variedade de células com características genéticas e fenotípicas distintas, fenómeno conhecido como heterogeneidade intratumoral (Mas et al., 2021). Esta variabilidade é um dos maiores obstáculos para o tratamento eficaz do cancro, pois algumas células podem desenvolver resistência a determinados tratamentos, como a quimioterapia ou a imunoterapia, enquanto outras são eliminadas. Esta resistência celular, somada à presença de um microambiente tumoral hostil que inclui células imunitárias, fibroblastos e matriz extracelular, cria uma barreira adicional ao sucesso terapêutico (Buckley & O'Reilly, 2024). O cancro é por isso uma das doenças mais desafiadoras atualmente, exigindo abordagens multidisciplinares e uma investigação contínua para o desenvolvimento de estratégias de tratamento mais personalizadas e eficazes.

O diagnóstico precoce do cancro é fundamental para melhorar as taxas de sobrevivência, no entanto, é um dos maiores desafios enfrentados pela medicina moderna. Muitos tipos de cancro permanecem assintomáticos nas fases iniciais, o que atrasa o diagnóstico e reduz significativamente as hipóteses de sucesso terapêutico (Partyka et al., 2023). Os tratamentos tradicionais, como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, permanecem como pilares no combate ao cancro. No entanto, esses tratamentos podem ser agressivos, provocando efeitos colaterais severos, como danos a tecidos saudáveis, fadiga, perda de cabelo, e uma gama de complicações sistémicas. As estratégias emergentes incluem terapias-alvo, imunoterapias, e o desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico precoce, baseadas em biomarcadores específicos e tecnologias de ponta. São exemplo disso a bioengenharia de polímeros e o desenvolvimento de novas nanopartículas, áreas de intensa pesquisa científica (Hong et al., 2023). No entanto, a sua complexidade e gravidade mantêm-no como uma prioridade na medicina, impulsionando a busca constante por inovações que melhorem o diagnóstico precoce, a monitorização e o tratamento, visando uma resposta mais eficaz e adaptada às necessidades individuais dos pacientes.

2.1 O cancro pancreático

O pâncreas é um órgão que se situa transversalmente na parte superior do abdómen, entre o duodeno e o baço, que combina as funções endócrinas e exócrinas. A função endócrina está garantida pela estrutura denominada ilhotas de Langerhans. As ilhotas de Langerhans são altamente vascularizadas e inervadas e são responsáveis pela produção de hormonas com função regulatória como a insulina. As células alfa presentes nos ilhéus produzem a glicagina, uma hormona com um efeito contrarregulador da insulina, garantindo um balanço da glicose ao nível sanguíneo e o equilíbrio energético corporal.

As neoplasias do pâncreas interferem diretamente no estado nutricional dos doentes, afetando diretamente a qualidade de vida durante a progressão da doença, criando problemas adicionais associados a desnutrição.

O cancro do pâncreas manifesta-se predominantemente como PDAC, um tumor maligno que se origina nas células epiteliais das estruturas glandulares, especificamente nas células dúcteis pancreáticas, conforme indicado pelo seu nome (Schepis et al., 2023). Estima-se que o PDAC represente cerca de 90% dos casos de cancro pancreático, apresentando uma tendência de crescimento nos últimos anos (Stoffel et al., 2023). O CP é um grave problema de saúde que afeta um grande número de portugueses, é a décima primeira neoplasia mais comum com 1.275 novos casos/ano, 7,6 novos casos/100.000 habitantes (Despacho n.º 13227/2023, de 27 de dezembro, 2023). A incidência do CP aumentou nos últimos 25 anos, com as taxas mais elevadas na América do Norte, na Europa e na Austrália, e os especialistas preveem que até 2030, a mortalidade por CP será superior à do cancro do colorretal (Rahib et al., 2021). O CP é

a sétima principal causa de mortes relacionadas com o cancro a nível mundial, com diagnósticos crescentes e potencial para se tornar a segunda principal causa nos países ocidentais. Nos países com um elevado Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), a incidência de PDAC é aproximadamente 5 vezes superior à dos países em desenvolvimento, com a Europa Ocidental e a América do Norte a registarem 8,5 e 8,0 casos por 100 000 habitantes, respetivamente (Stoffel et al., 2023). Prevê-se que a melhoria da saúde a nível mundial e o aumento da esperança de vida aumentem a incidência do CP. Em 2012, 8% da população mundial que tinha mais de 65 anos constitui-se o grupo de maior risco. Prevê-se que esta proporção duplique para 16,7% nos próximos 30 anos, sobretudo na Ásia, Austrália, Europa e América Latina. Mesmo em África, onde as taxas de CP permanecem baixas devido ao acesso limitado aos cuidados de saúde. Juntam-se a estas previsões a de que a proporção da população com mais de 65 anos duplique nas próximas décadas (Klein, 2019).

2.2 Biomarcadores tumorais

Os biomarcadores podem ser descritos como “uma característica definida que é medida como um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas a uma exposição ou intervenção” (Group, 2018). O objetivo principal da deteção precoce no CP é garantir o melhor cuidado possível para os pacientes. Existem atualmente novas modalidades de diagnóstico, como os biomarcadores e que podem ser utilizadas para apoiar os clínicos na deteção do cancro pancreático. Dado os desafios inerentes à triagem e deteção precoce, os biomarcadores podem servir como uma ferramenta valiosa para alcançar o sucesso no diagnóstico inicial. Os biomarcadores do cancro podem ser encontrados em fluidos corporais ou tecidos, fornecendo informações cruciais sobre processos normais e anormais no corpo. Existem diferentes tipos de biomarcadores que podem ser utilizados tanto para compreender os estágios da doença como para monitorizar o tratamento. A variedade de biomarcadores para a deteção precoce do cancro do pâncreas e as estratégias associadas têm evoluído rapidamente. No entanto, persiste a falta de um padrão ouro universal para o diagnóstico precoce (O’Neill & Stoita, 2021). Atualmente, o antigénio carboidrato 19-9 (CA 19-9) é recomendado como um teste complementar, mas é insuficiente para o diagnóstico precoce do CP (Takaori et al., 2016). Ainda não foi identificado e recomendado um marcador tumoral específico para a deteção precoce do cancro pancreático. Uma possível explicação para o facto do CA 19-9 não ser específico para tumores pancreáticos está relacionada com a sua própria natureza, já que se trata de um tetrassacarídeo expresso na superfície de várias células cancerosas. O CA 19-9 também pode estar presente em casos de cancro gástrico, do cólon e do trato biliar. Este biomarcador é até agora, o marcador tumoral mais utilizado para o PDAC. Estudos recentes indicam que a utilização de uma abordagem multimodal, combinando CA 19-9 com outros biomarcadores, pode proporcionar melhores resultados no diagnóstico precoce e na monitorização do CP. Vários biomarcadores têm sido propostos para a deteção do cancro pancreático, como o antigénio carcinoembrionário (CEA), o antigénio carboidrato 125 (CA 125), os microRNAs e a MMP7, entre outros (Desai & Guddati, 2023). Desta forma, o diagnóstico e a monitorização do PC podem ser melhoradas por análise combinada com outros marcadores, potencialmente aumentando a especificidade e a sensibilidade do diagnóstico.

2.2.1 A metaloproteínas de matriz 7 (MMP7)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) tornaram-se um foco importante no desenvolvimento de biossensores, sendo amplamente estudadas nas últimas décadas devido ao seu papel em patologias relacionadas com o cancro (Peng et al., 2023). Entre as MMPs, a MMP7, também conhecida como matrilisina, é uma protease extracelular dependente de cálcio e contendo zinco que ganhou proeminência como biomarcador para a deteção precoce do cancro pancreático (CP). A MMP7 é um dos membros mais pequenos da família das MMPs, consistindo numa pré-proenzima com um peso molecular de cerca de 19,13 kDa. Distingue-se pelo facto de não possuir um domínio de hemopexina, que está normalmente envolvido na especificidade do substrato e na interação com os inibidores tecidulares de metaloproteinases (Van Doren, 2022). Níveis séricos elevados de MMP7 estão associados a doença em doentes com PDAC, mesmo quando os exames radiográficos pré-operatórios se apresentam favoráveis. Especificamente, um estudo descobriu que níveis séricos elevados de MMP7 no pré-operatório (>13,5 ng/mL) foram altamente preditivos de doença irresssecável, envolvimento nodal e outras características patológicas agressivas, como invasão vascular e perineural. Os doentes com níveis muito elevados de MMP7 tiveram uma sobrevida mediana sem recidiva de apenas 5,0 meses, em comparação com 9,9 meses para os doentes com níveis mais baixos, demonstrando o seu papel na previsão de maus resultados (Wang et al., 2016). A relevância da MMP7 reside na sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular, facilitando a invasão tumoral e promovendo a disseminação metastática. A sua expressão elevada em diversos tipos de cancro, incluindo o PDAC, torna-o um alvo promissor para o desenvolvimento de novos biossensores, os quais podem oferecer diagnósticos mais rápidos, precisos e menos invasivos, permitindo um acompanhamento contínuo e mais eficaz da evolução da doença. Além disso, ao ser um marcador associado à inflamação pancreática, a MMP7 também pode auxiliar na distinção entre condições benignas e malignas, proporcionando uma ferramenta valiosa para a monitorização clínica e a personalização do tratamento, o que poderia melhorar significativamente o prognóstico e a taxa de sobrevivência dos pacientes com CP. Assim, a MMP7 não apenas desempenha um papel central no diagnóstico precoce do CP, como também apresenta um potencial significativo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de monitorização da progressão do tumor. Desta forma consolida-se como uma ferramenta essencial na abordagem moderna do CP.

2.3 Biossensores

Um biossensor é um tipo de sensor químico que a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) define como “um dispositivo integrado autónomo capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semiquantitativa específica, utilizando um elemento de reconhecimento biológico mantido em contacto direto com um elemento de transdução eletroquímica” (Thévenot et al., 2001). O seu objetivo é fornecer informações rápidas, em tempo real, precisas e fiáveis sobre a substância a analisar, respondendo idealmente de forma contínua, reversível e sem danificar a amostra. No entanto, a conversão de processos biológicos em informação constitui um desafio e muitas vezes uma barreira à integração destes sistemas. Os biossensores permitem responder a esta necessidade estabelecendo uma cadeia de processamento para um dispositivo capaz de reconhecer um analito e gerar sinais de forma a quantificar a sua presença no meio de leitura. Os avanços tecnológicos melhoraram a

sensibilidade, a seletividade e a capacidade de multiplexagem dos biossensores modernos desde a invenção do sensor de elétrico de oxigénio de Clark (Perumal & Hashim, 2014). Os sensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo que lhes confere especificidade. Um biossensor pertence a um subgrupo de sensores químicos que incorporam um elemento sensor biológico ou biomimético. Os biossensores podem ser classificados consoante o sistema transdutor ou a natureza da técnica de deteção (Figura 1).

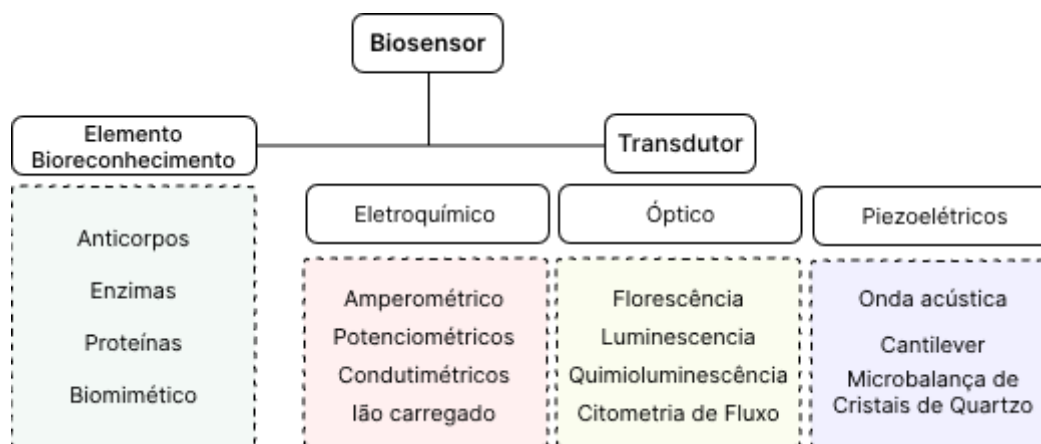


Figura 1- Biossensores e classificação dos mesmos, adaptado de (Shavanova et al., 2016).

Tanto os biossensores como os métodos convencionais para o diagnóstico de cancro (por exemplo biópsias, imagiologia por ultrassonografia e análises clínicas ao sangue), são frequentemente utilizados para monitorizar a evolução da doença e avaliar a eficácia dos tratamentos, os biossensores oferecem uma alternativa promissora para a análise de biomarcadores. Mostram-se mais vantajosos do que os métodos convencionais incluindo um desempenho superior, maior facilidade de operação, maior portabilidade, elevada reprodutibilidade e análise da amostra em tempo real (Pulumati et al., 2023). Para além disso, oferecem alta sensibilidade e especificidade (Lino et al., 2022). Nos últimos anos, o desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico precoce do cancro tem despertado um interesse crescente, principalmente pela capacidade de identificar biomarcadores em concentrações extremamente baixas (Wu et al., 2022). Podemos exemplificar de uma forma prática as várias etapas de funcionamento de um biossensor. Primeiramente ocorre a interação seletiva do analito da amostra com o recetor imobilizado na superfície do sensor. Posteriormente, ocorre a deteção, por parte do transdutor, devido à variação de alguma propriedade física ou química do sistema provocada pela reação de reconhecimento seletivo, e finalmente dá-se o processamento do sinal com a obtenção dos resultados (Figura 2).

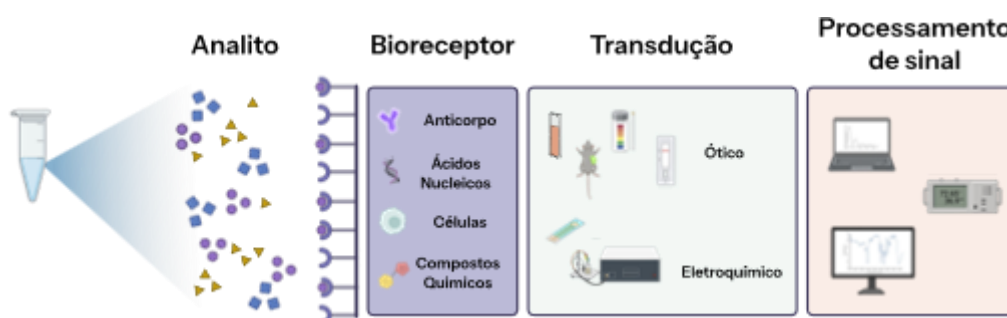


Figura 2- Princípios de funcionamento de um biossensor, adaptado de (Shavanova et al., 2016).

Detalham-se seguidamente os componentes responsáveis pelo biorreconhecimento e os mecanismos de transdução de sinais.

2.3.1 Transdução do sinal

O transdutor é um componente essencial de um biossensor e desempenha o papel crucial de captar e medir as mudanças ocorridas na interação entre o analito e o recetor biológico. A resposta analítica é depois convertida num sinal que possa ser quantificado (Bhalla et al., 2016). Dependendo da tecnologia utilizada, o sinal gerado pode ser piezoelétrico, eletroquímico, ótico ou térmico. Embora os transdutores térmicos não sejam tão comuns, são utilizados na medição das variações de temperatura decorrentes da interação entre a molécula alvo e o elemento biológico.

Os biossensores piezoelétricos funcionam a partir da ligação entre o bioelemento e um material piezoelétrico, geralmente um cristal de quartzo revestido com elétrodos de ouro ou prata (Lino et al., 2022). Esses dispositivos são capazes de detetar mudanças mecânicas ou elétricas, provocadas pela interação com a molécula alvo, que resultam em alterações na massa, condutividade ou elasticidade do material. O uso de biossensores piezoelétricos em medicina tem sido amplamente estudado, sendo valorizados pela sua rapidez, baixo custo de fabricação e alta sensibilidade (Yunus et al., 2023).

Já os biossensores eletroquímicos utilizam um transdutor para monitorizar as alterações na superfície do elétrodo, causadas pelas interações entre o analito e a biomolécula (M. Li et al., 2022). Eles são classificados em quatro tipos: amperimétricos, que registam variações na corrente elétrica; potenciométricos, que medem alterações no potencial; de condutividade, que avaliam mudanças na condutância; e menos comuns termométricos, que medem alterações de temperatura (Lino et al., 2022). Estes biossensores são particularmente eficazes em detetar pequenas mudanças nas propriedades dos analitos, graças à sua elevada sensibilidade.

Por último, os biossensores óticos utilizam luz para medir alterações como absorvância, transmitância, refletância ou luminescência e detetar mudanças nas propriedades óticas que ocorrem durante a interação entre o analito e o bioelemento (Mummareddy et al., 2021). Com tecnologias avançadas, como a ressonância plasmónica de superfície (SPR, (do inglês, *Surface Plasmon Resonance*), a ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, (do inglês, *Localized Surface Plasmon Resonance*) e a espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS, do inglês, *Surface Enhanced Raman Scattering*), estes dispositivos proporcionam uma alta especificidade e uma resposta rápida. Quando combinados com sondas fluorescentes ou quimioluminescentes, os biossensores expandem ainda mais as suas possibilidades para alcançarem uma deteção sensível (Eksin & Erdem, 2023), sendo amplamente aplicados no diagnóstico médico pelas suas vantagens em precisão, seletividade e desempenho comparativamente às técnicas analíticas convencionais (Singh et al., 2023).

No capítulo três será discutido com detalhe a aplicação dos MIP@PQs desenvolvidos neste trabalho como sensores óticos biomiméticos para o biomarcador de cancro em estudo, a MMP7.

2.3.2 Elementos de bioreconhecimento

Os elementos de bioreconhecimento desempenham um papel fundamental nos biossensores, sendo responsáveis pela detecção precisa do analito-alvo. A eficácia desses elementos depende de sua capacidade de apresentar uma afinidade elevada com a substância a ser analisada, garantindo assim uma elevada seletividade e sensibilidade no processo de detecção (Lino et al., 2022).

Existem várias categorias de elementos de bioreconhecimento usados na criação de biossensores, que podem ser divididos em dois grupos principais: os biológicos e os sintéticos. No grupo dos biológicos encontram-se os ácidos nucleicos, anticorpos, enzimas, células e proteínas. Já no grupo dos sintéticos, também chamados de biomiméticos, incluem-se os MIPs, os aptâmeros e os nanomateriais artificiais (Wu et al., 2022).

Na seleção dos elementos de bioreconhecimento, é crucial garantir que o elemento seja altamente específico para o analito-alvo e tenha um custo acessível, especialmente para produção em larga escala. A estabilidade e a facilidade de armazenamento também são fundamentais para preservar as propriedades funcionais do biossensor, mesmo em condições variáveis, como mudanças de temperatura ou pH. Esses fatores asseguram um bom desempenho e longa vida útil ao biossensor (Bhalla et al., 2016).

2.4 Polímeros molecularmente impressos

2.4.1 Enquadramento histórico

A noção de impressão molecular é fortemente baseada nas primeiras teorias de interações enzima-substrato e ligação antígeno-anticorpo, que serviram como base para a compreensão do reconhecimento molecular seletivo. A analogia de chave/fechadura de Emil Fischer introduzida no final do século XIX, serve como base para os procedimentos de impressão molecular. O modelo de Fischer demonstra como as enzimas se ligam preferencialmente a certos substratos, sendo um conceito que tem sido usado para explicar o funcionamento dos MIPs e as suas interações biológicas (L. Chen et al., 2016).

A tecnologia de impressão molecular consiste na criação de polímeros sintéticos dotados de sítios de reconhecimento específicos que são complementares a uma molécula alvo, de forma análoga à interação entre enzimas e substratos. Este processo é caracterizado pela formação de sítios de ligação que são adaptados em termos de forma, dimensão e funcionalidade química para corresponderem à molécula alvo (Ertürk & Mattiasson, 2017).

2.4.2 Princípios de bioreconhecimento

Os MIPs são redes poliméricas reticuladas, criadas na presença de uma molécula alvo, também conhecida como molde ou *template*. O objetivo central é garantir a maior afinidade possível entre o polímero e o molde durante a síntese. Nesse processo, o molde interage com um monómero funcional, formando um complexo ativo que é estabilizado na presença do solvente (ou porogénio), dos iniciadores de polimerização radicalar e dos agentes reticulantes (Figura 3). A interação do molde com os monómeros ocorre de maneira que estes últimos se organizam em torno da molécula alvo, sendo fixados por copolimerização com monómeros reticulantes, resultando numa matriz porosa sólida com macroporos e microcavidades cuja estrutura tridimensional é moldada à molécula alvo. A remoção do molde é feita por meio de lavagens com solventes adequados, resultando na revelação dos sítios de ligação no interior das cavidades impressas, com afinidade para o molde. Estas cavidades adquirem então a complementaridade funcional e conformacional ao molde original. Assim, o polímero final

consegue reconhecer e ligar-se seletivamente ao molde. A funcionalidade das cavidades impressas varia conforme o tipo de interação estabelecida durante a polimerização, o que também serve de critério para classificar diferentes tipos de impressão molecular (Vasapollo et al., 2011).

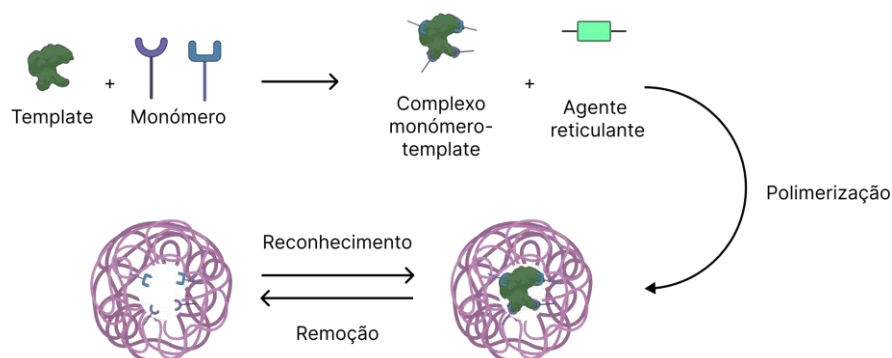


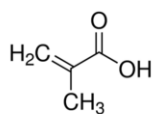
Figura 3- Representação esquemática geral do processo de síntese de MIPs, adaptado de (Shen et al., 2013).

Atualmente, a tecnologia de impressão de polímeros foi ampliada a ponto de ser possível aplicar a grandes moldes (células, vírus, etc.) no processo de impressão. O mesmo princípio de reconhecimento dos MIPs mantém-se, sendo os polímeros resultantes designados de polímeros de impressão de superfície (SIPs, do inglês *surface imprinted polymers*). Os SIPs permitem a detecção específica de grandes entidades como células, vírus e bactérias, dependendo não apenas das interações moleculares que se estabelecem (ligações de hidrogênio, atração eletrostática, forças de van der Waals, etc.), como do formato, tamanho e funcionalidades da membrana celular exterior que reveste estas entidades. Exemplos de materiais usados como substratos dos SIPs são chips, microesferas e membranas celulares. Até ao momento, os SIPs têm amplas aplicações em diagnóstico/detecção de cancro, degradação fotocatalítica, sensores óticos, separação cromatográfica, recetores/anticorpos artificiais e detecção de vírus e bactérias, por detecção eletroquímica (Abo Dena et al., 2020). Estas vantagens tornam os SIPs adequados para o desenvolvimento de sistemas de teste *point-of-care* (Eersels et al., 2016). No presente trabalho referimo-nos aos MIPs como polímeros impressos preparados na superfície dos PQs de CdTe@MPA, os quais por se encontrarem sob a forma de agregados em solução, acabam por mimetizar uma superfície maior, sobre a qual se sintetizaram os MIPs, atuando assim como substratos em suspensão.

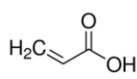
2.4.3 Monómero funcional

O monómero funcional é o principal responsável pelas interações nos sítios de reconhecimento dos MIPs. Da sua polimerização resultam a formação de macromoléculas ou estruturas em cadeia lineares, que são solúveis e compatíveis com uma ampla variedade de solventes. Na Figura 4, encontram-se as estruturas químicas dos monómeros mais utilizados.

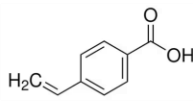
Ácidos



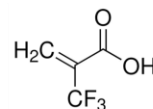
Ácido Metacrílico (MAA)



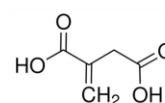
Ácido acrílico (AA)



Ácido p-Vinilbenzóico

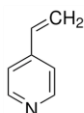


Ácido Acrílico-2-
(trifluorometil)
(TFMAA)

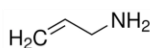


Ácido Itaconico

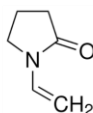
Básicos



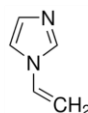
4-Vinilpiridina (4-VP)



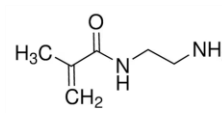
Alilamina



N-vinilpirrolidona

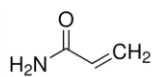


1-Vinilimidazol

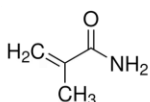


N-(2-aminoetil)
metacrilamida

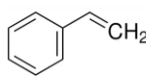
Neutros



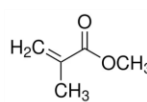
Acrilamida



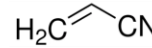
Metacrilamida



Estireno



Metacrilato (MMA)



Acrilonitrilo (AN)

Figura 4 - Estruturas químicas dos monómeros mais comumente utilizados, adaptado de (Cormack & Elorza, 2004).

Em geral, a quantidade de monómero utilizada é usada em maior quantidade em relação à quantidade de molécula molde, de modo a otimizar a formação das cavidades de reconhecimento. Para moldes de baixo peso molecular (< 100 kDa), a proporção mais comum de monómero funcional para molde é de 1:4, mas é importante notar que o uso de proporções excessivas de monómero pode levar ao aumento de interações não específicas, comprometendo a seletividade dos MIPs (SPIVAK, 2005).

2.4.4 Molécula alvo ou molde

As características e as funcionalidades da molécula molde são essenciais na produção de MIPs, pois influenciam a interação entre a molécula alvo e os grupos funcionais dos monómeros usados na impressão. De um modo geral, para que o molde seja eficaz, ele deve: (i) estar disponível em grandes quantidades e a um custo acessível, (ii) ser solúvel nas condições de impressão e (iii) permitir a formação de sítios que demonstrem alta reatividade cruzada com o analito alvo. É importante notar que, em técnicas de polimerização por radicais livres, o molde deve ser quimicamente inerte. O uso de moléculas de baixo peso molecular como moldes — incluindo pesticidas, aminoácidos, esteroides, fármacos e alguns peptídeos e açúcares — é uma prática bem estabelecida na síntese de MIPs. Moléculas com maior peso molecular como algumas proteínas, células, bactérias e vírus, apresentam desafios significativos na síntese de MIPs devido à sua conformação tridimensional. Essas moléculas tendem a dificultar a formação de sítios de ligação bem definidos durante a impressão. Além disso, a sua remoção após a polimerização é complicada e elas têm dificuldade em penetrar na rede polimérica durante a

etapa de religação, o que pode danificar sua estrutura original e reduzir a seletividade dos MIPs para essas moléculas. Para contornar essas dificuldades, a técnica de impressão em superfície é frequentemente utilizada, permitindo a impressão eficaz de moldes maiores.

2.4.5 Agentes de reticulação

Durante a síntese de MIPs, é essencial a presença de um agente de reticulação, para estabelecer uma estrutura polimérica firme e entrelaçada ao redor da molécula molde. Este agente fixa os monómeros funcionais, formando uma rede polimérica robusta que mantém a sua integridade mesmo após a remoção do molde. O agente de reticulação desempenha três funções principais durante o processo de impressão: (i) define a estrutura da rede polimérica, seja em forma de macroporos ou microgéis, (ii) estabiliza os sítios de ligação formados (iii) e proporciona resistência mecânica à rede polimérica. A escolha e a quantidade do agente de reticulação são cruciais, pois afetam diretamente a capacidade de ligação e a seletividade do MIP. Agentes de reticulação comuns, como acrilatos e acrilamidas, são frequentemente utilizados devido à sua eficácia na impressão molecular, como ilustrado na Figura 5.

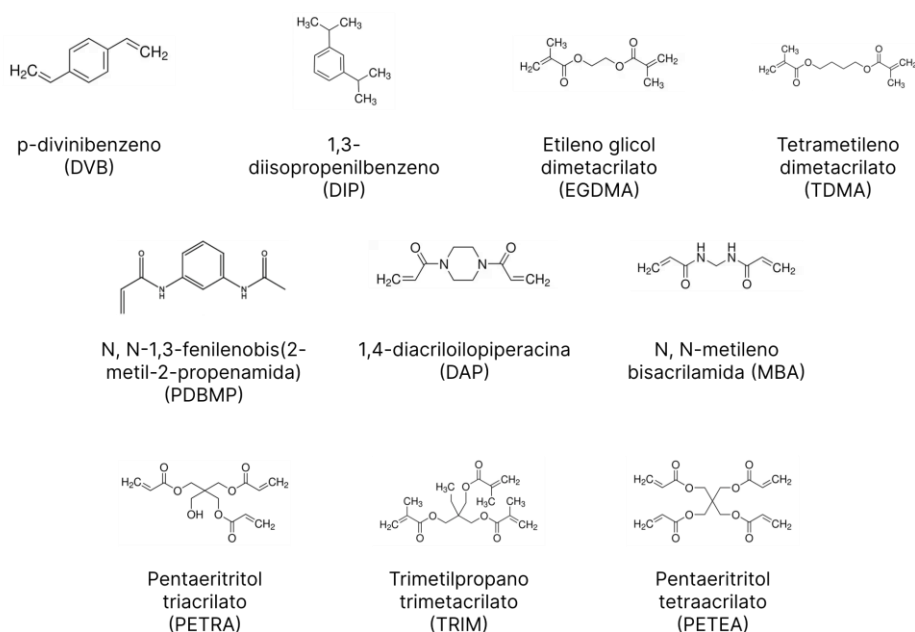


Figura 5 - Estruturas químicas dos agentes de reticulação, adaptado de (Cormack & Elorza, 2004).

Alguns destes agentes têm a capacidade de formar complexos com as moléculas molde, funcionando também como monómeros funcionais. Uma quantidade insuficiente de agente de reticulação pode resultar numa rede polimérica instável, devido ao baixo grau de reticulação. Por outro lado, uma quantidade excessiva pode reduzir o número de sítios de reconhecimento disponíveis, diminuindo a eficácia dos MIPs.

2.4.6 Iniciadores

Consideram-se três métodos principais de síntese dos MIPs: polimerização radicalar livre (FRP, do inglês, *Free Radical Polymerization*), eletropolimerização e fotopolimerização. Diversos compostos são usados como iniciadores no processo de FRP, o qual pode ser iniciado por via fotoquímica ou térmica. Entre os iniciadores mais usados estão os peróxidos e os derivados azo. Exemplos comuns de iniciadores à base de azo incluem o azobisdimetilvaleronitrilo (ADV), o azobisisobutironitrilo (AIBN) e o ácido 4,4'-azo(4-cianovalérico) (ACID) (Cormack & Elorza, 2004) (Figura 5).

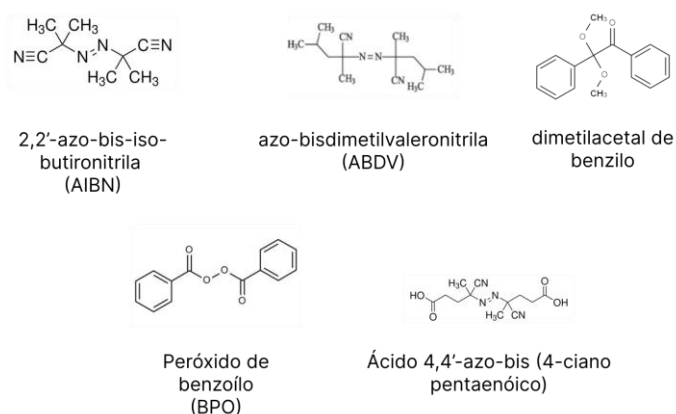


Figura 6 - Estruturas químicas dos iniciadores radicalares, adaptado de (Cormack & Elorza, 2004).

O AIBN é um iniciador que pode ser ativado por fotólise (usando UV) ou termólise, resultando na formação de radicais carbonilo estabilizados que iniciam a polimerização de monómeros vinílicos. Esses radicais são eficazes para iniciar a polimerização em temperaturas de decomposição que variam entre 50 °C e 70 °C. Para assegurar a eficiência da polimerização, é crucial eliminar o oxigênio dissolvido nas soluções, pois ele pode interferir na reação. Essa remoção pode ser feita por ultrassonicação ou através da introdução de gases inertes na solução, como nitrogênio ou argônio.

2.4.7 Solvente

Os solventes ou porogénios são essenciais na síntese dos MIPs, pois atuam como veículos de dispersão e criadores de poros durante a polimerização, induzindo à formação da estrutura macroporosa dos polímeros. Entre os solventes frequentemente utilizados estão o acetonitrilo, 2-metoxietanol, o metanol, o clorofórmio, o tetrahydrofurano, o dicloroetano, o tolueno e a dimetilformamida (Cormack & Elorza, 2004). Para que um solvente seja eficaz como porogénio na produção de MIPs, ele deve cumprir três requisitos principais: (i) deve ser capaz de solubilizar a molécula molde, o monómero, o iniciador e o agente de reticulação; (ii) deve promover a formação de poros de tamanho adequado; (iii) e deve ter baixa polaridade para reduzir as interferências durante a criação do complexo pré-polimerizado. Na impressão não covalente, solventes orgânicos com baixa polaridade, como o tolueno, o clorofórmio e o acetonitrilo, são frequentemente empregues para otimizar a eficácia do processo. A escolha desses solventes é

crucial, pois influencia diretamente a morfologia do polímero e as suas propriedades de adsorção, ajudando a alcançar uma impressão molecular mais eficiente.

2.4.8 Temperatura de polimerização

Estudos mostram que a polimerização realizada a temperaturas inferiores a 60 °C geralmente resulta em MIPs com maior seletividade do que aqueles sintetizados a temperaturas mais altas (SPIVAK, 2005). Esse efeito pode ser explicado pelo fato de que, a temperaturas elevadas, a reação de polimerização tende a ocorrer de forma muito rápida e menos controlada, o que compromete a reprodutibilidade dos MIPs. Em contraste, temperaturas mais baixas, combinadas com tempos de reação mais prolongados, favorecem uma polimerização mais controlada. Por essa razão, a polimerização à temperatura ambiente é mais utilizada para a síntese de MIPs.

2.5 Estratégias de síntese

A seleção de um protocolo adequado para a preparação de MIPs direcionados a moléculas biológicas, como proteínas, carboidratos e lípidos, é crucial para preservar a estrutura tridimensional da molécula molde e, conseqüentemente, a sua funcionalidade. A escolha do método de polimerização influencia diretamente a eficiência e especificidade dos MIPs. Nesta seção, apresentamos uma breve descrição dos métodos mais comuns utilizados para preparar MIPs.

2.5.1 Polimerização em solução e em massa

A polimerização em massa (do inglês, *bulk polymerization*) e a polimerização em solução são dois dos principais métodos na síntese de polímeros, aqui resumidas num único subtítulo, pois estão intimamente relacionadas entre si e a diferença entre elas é pouco significativa. A polimerização em massa ocorre geralmente na ausência de solventes, considerando apenas a mistura de monómeros funcionais e o iniciador. A reação de polimerização normalmente requer uma atmosfera inerte (como nitrogênio ou argônio) e temperaturas elevadas para que os monómeros entrem em reação. A polimerização em massa oferece várias vantagens em relação a outros métodos de polimerização, principalmente pela ausência de solvente. Uma dessas vantagens é a capacidade de produzir polímeros de alta pureza e de elevado peso molecular. Além disso, é considerada uma técnica ambientalmente amigável, uma vez que os polímeros produzidos não necessitam de etapas adicionais de purificação devido à alta pureza do produto. No entanto, as reações de polimerização em massa tendem a ser muito exotérmicas (especialmente nas etapas finais, quando a viscosidade da solução aumenta), o que dificulta o controle da temperatura, tornando a reação extremamente vigorosa. Outra desvantagem é que o aumento da viscosidade da solução durante a reação dificulta a remoção de subprodutos voláteis comuns de reações de condensação, como a água (Villa et al., 2021). Ao contrário, a polimerização em solução requer a presença de um solvente ou mistura de solventes nos quais o iniciador, os monómeros e o polímero resultante sejam solúveis. Geralmente, uma alta concentração de monómero ($\geq 70\%$), uma quantidade mínima de catalisador/iniciador, e um solvente com uma baixa constante de transferência de cadeia são necessários no início do processo de síntese. Posteriormente, mais solvente e catalisador/iniciador devem ser adicionados à mistura reacional para controlar a viscosidade da mistura e ajustar a taxa da

reação, pois a eficiência do iniciador diminui devido à diluição contínua do monómero. Na polimerização em solução, a presença do solvente, que atua como diluente, facilita a dissipação de calor e controla a viscosidade da mistura. Além disso, o iniciador não é mascarado pelo polímero resultante, facilitando sua remoção. Como resultado, a polimerização em solução pode ser adequada para a maioria dos monómeros, independentemente de sua reatividade/entalpia de polimerização) (Zhang et al., 2022). No contexto do nosso trabalho, a síntese de MIPs para a MMP7, cujo peso molecular médio é aproximadamente 19,13 kDa, a polimerização em solução revela-se como a opção mais adequada. Dentre os métodos radiculares, a FRP é a técnica mais amplamente utilizada, e será abordada com mais detalhe neste capítulo. Outros tipos de polimerização radicalar são a polimerização radicalar controlada (CRP, do inglês, *Controlled Radical Polymerization*), incluindo a polimerização por transferência de cadeia por adição-fragmentação reversível (RAFT, do inglês, *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*) e a polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP, do inglês, *Atom Transfer Radical Polymerization*). Para evitar uma introdução excessivamente detalhada, este trabalho focará principalmente na FRP, que foi a técnica utilizada na síntese dos MIPs, neste trabalho.

2.5.2 Mecanismo de polimerização FRP

A FRP pode ser considerada um subtipo de polimerização em massa ou em solução, dependendo da ausência ou da presença de solvente. A principal característica que caracteriza este tipo de polimerização é que o catalisador deve ser um iniciador de radicais livres, e o monómero deve ser um monómero vinílico. Os iniciadores mais comumente utilizados pertencem frequentemente a duas classes de compostos: peróxidos (inorgânicos, como persulfato de potássio, $K_2S_2O_8$, ou orgânicos, como hidroperóxido de terc-butilo e o peróxido de metiletilcetona, e composto azo (como 2,2'-azobis-isobutironitrilo, AIBN). A FRP é uma maneira econômica de obter o polímero desejado a partir de monómeros vinílicos, pois a pureza dos reagentes não é tão crítica. Além disso, a reação não requer uma exclusão rigorosa de ar, umidade e outras impurezas. Ilustra-se na Figura 4 o mecanismo FRP exemplificado para uma unidade estrutural simples como o cloreto de vinilo.

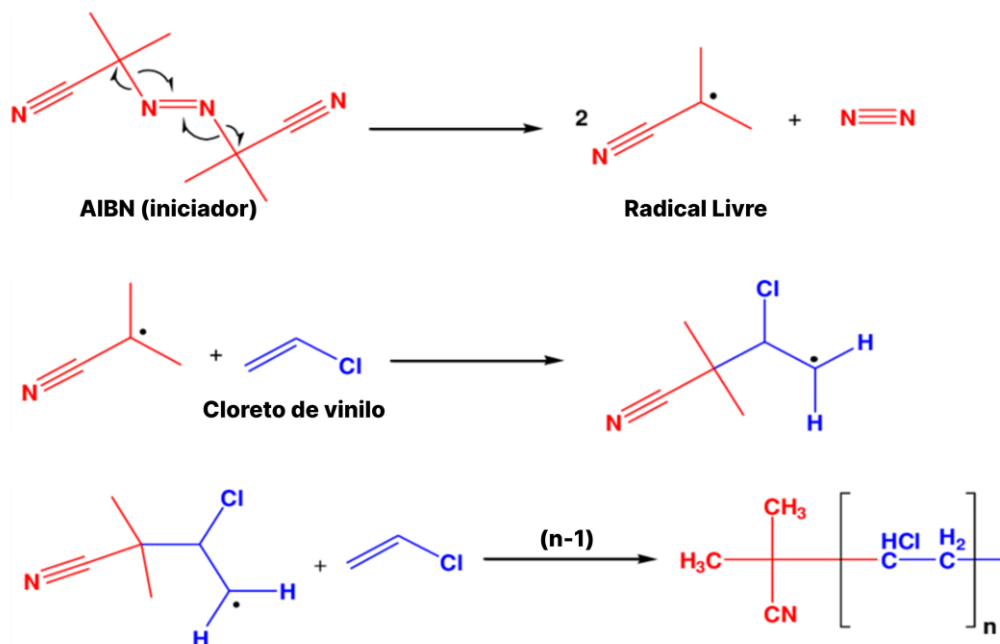


Figura 7 - O mecanismo de polimerização por radiação livre do monômero de cloreto de vinilo com o iniciador radical AIBN, adaptado de (Abo Dena et al., 2020).

A versatilidade e a facilidade sintética dos polímeros através da FRP tornam o processo o mais importante em escala industrial. Apesar dessas vantagens, a FRP tem a desvantagem de produzir materiais polidispersos, com controle limitado sobre o peso macromolecular e a arquitetura.

Na fase inicial, chamada de iniciação, ocorre a dissociação do iniciador, gerando radicais livres que são capazes de reagir com as moléculas de monômero. Na fase seguinte, denominada propagação, um radical livre combina-se com uma unidade de monômero, formando uma cadeia de polímero. A fase de reticulação segue, onde as ligações duplas do agente de reticulação são cruzadas, resultando em uma estrutura polimérica que pode ser linear e solúvel ou não linear, o que pode dar origem a hidrogéis insolúveis. Finalmente, a fase de terminação pode ocorrer de duas maneiras: por combinação, onde dois radicais livres se unem para formar uma molécula de polímero inativo ou por dismutação, resultando na formação de duas moléculas inativas (Figura 7). As principais limitações à FRP incluem a lenta transferência de massa, perdas consideráveis de polímero durante a produção e a heterogeneidade dos produtos finais, frequentemente devido à alta frequência de reações de terminação.

2.5.3 Vantagens e aplicações dos MIPs

Os MIPs oferecem várias vantagens em relação aos elementos biológicos de reconhecimento, incluindo um custo reduzido, simplicidade no processo de fabricação, e uma notável resistência térmica e química. Eles apresentam maior estabilidade em diferentes condições de pH, variações de temperatura e em presença de solventes orgânicos. Além disso, os MIPs podem ser moldados em diversos formatos (esferas, blocos ou filmes finos), dependendo das necessidades específicas da aplicação, e possuem uma longa vida útil, além de serem altamente versáteis, pois podem ser projetados para interagir com uma grande variedade de moléculas-alvo.

No entanto, existem algumas limitações associadas aos MIPs. Eles apresentam capacidades catalíticas mais baixas em comparação com sistemas biológicos, a especificidade nos locais de ligação pode ser comprometida pela heterogeneidade, e o processo de síntese pode ser complexo e exigir várias etapas (Srivastava & Singh, 2024). Ao longo do tempo, os MIPs têm sido continuamente aprimorados e amplamente aplicados em diferentes campos, como a segurança alimentar (Zhou et al., 2023) e a monitorização ambiental (Geng et al., 2024). Além disso, têm tido destaque na área da saúde, sendo utilizados como sensores (Acet et al., 2024), sistemas de liberação controlada de medicamentos (Zhao et al., 2023) e para melhorar a funcionalidade de biomoléculas, como na otimização da atividade catalítica de enzimas (Tian et al., 2022). Os MIPs têm sido amplamente aplicados no desenvolvimento de biossensores, especialmente em sensores biomiméticos, e continuam a ganhar relevância na pesquisa científica. Eles oferecem uma ampla gama de aplicações para a detecção de biomoléculas, como proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, entre outras. Isto deve-se, em grande parte, à sua superior estabilidade química e física quando comparados às técnicas convencionais de detecção. A seguir, disponibilizamos uma tabela sintética que reúne as principais aplicações de MIPs usados na detecção do biomarcador MMP7. Nesta tabela 1, são enfatizados aspetos relevantes, como os tipos de amostras utilizadas, os limites de detecção alcançados e a faixa linear de resposta. Esses dados servirão como base comparativa para o desempenho do sensor biomimético para a MMP7 desenvolvido no presente estudo.

Tabela 1 - Estado da arte de alguns sensores com capacidade de detecção de MMP7.

Sinal	Elemento de bioreconhecimento	Intervalo Linear	Limite de detecção	Referencia
Fluorescência	Micropartículas imunomagnéticas ultra-sensíveis	0,063 - 150 ng mL ⁻¹	0,039 ng mL ⁻¹	(Liang et al., 2019)
Fluorescência	Nanopartículas de MnFe ₂ O ₄ modificadas com péptidos	0,1 - 15 × 10 ⁻⁹ M	0,036 × 10 ⁻⁹ M	(H. Chen et al., 2022)
Fluorescência	Imunoensaio visual de fluorescência em papel	0,01 - 30 ng mL ⁻¹	7,3 pg mL ⁻¹	(Huang et al., 2020)
Fluorescência	Conjugados ADN-peptídeo	1,80 - 5,72 × 10 ⁻¹² M	1,71 × 10 ⁻¹² M	(Y. Li et al., 2020)

2.6 Nanomateriais

Os nanomateriais são definidos como materiais com pelo menos uma dimensão na gama dos nanómetros (1-100 nm) e apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas únicas. Estas propriedades decorrem das suas dimensões nanométricas, que resultam numa elevada relação superfície/volume, em efeitos de confinamento quântico e num extraordinário comportamento ótico e eletrónico. O elevado rácio superfície/volume dos nanomateriais é particularmente significativo, uma vez que aumenta a sua reatividade e interação com os ambientes circundantes. Esta propriedade é crucial em aplicações como a catálise, onde o aumento da área de superfície facilita reações químicas mais eficazes (Chellamuthu et al., 2019). Além disso, as propriedades eletrónicas únicas dos nanomateriais, como as observadas em materiais bidimensionais como o grafeno e os dicalcogénios de metais de transição, permitem funcionalidades avançadas em dispositivos eletrónicos (Huang et al., 2013; Huang et al., 2014).

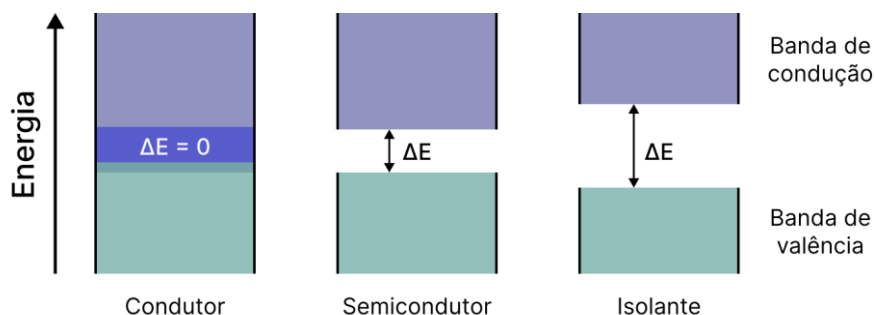


Figura 8 - Esquema ilustrativo do tipo de condução de materiais e classificação consoante a distância entre a banda de condução e a banda de valência.

A classificação dos materiais sólidos com base na sua condutividade elétrica é um conceito fundamental na ciência dos materiais e explicado principalmente através da teoria das bandas. Esta teoria divide os materiais em três categorias principais: condutores, semicondutores e isolantes, cada uma caracterizada por propriedades elétricas distintas que resultam das suas estruturas de bandas eletrónicas (Figura 5). Os materiais condutores são caracterizados por uma banda de condução parcialmente preenchida ou pela sobreposição das bandas de valência e de condução, o que resulta num intervalo de energia insignificante ou nulo. Esta ausência de um intervalo de energia significativo permite a livre circulação de eletrões, conduzindo a uma elevada condutividade elétrica. Por exemplo, metais como o cobre e a prata são condutores exemplares devido à sua estrutura eletrónica, que facilita o fluxo fácil de portadores de carga (Böer & Pohl, 2017). A elevada densidade de eletrões livres nestes materiais contribui para a sua excelente condutividade, tornando-os adequados para uma variedade de aplicações elétricas (Böer & Pohl, 2017). Por outro lado, os materiais isolantes têm uma grande faixa de energia, geralmente maior que 4 eV, que separa as bandas de valência e condução. Esta grande faixa de energia inibe o fluxo de eletrões, resultando em baixa condutividade elétrica. Isolantes comuns, como vidro e a borracha, exibem esta propriedade, pois as suas estruturas eletrónicas impedem que os eletrões sejam excitados da banda de valência para a banda de condução em condições normais (Böer & Pohl, 2017). O grande intervalo de banda atua efetivamente como uma barreira ao fluxo de eletrões, garantindo que esses materiais não conduzam eletricidade em circunstâncias normais (Böer & Pohl, 2017).

Os semicondutores ocupam uma posição intermédia entre condutores e isoladores, caracterizada por um intervalo de banda moderado, inferior a 4 eV. Este intervalo permite que os semicondutores conduzam eletricidade em determinadas condições, como a aplicação de calor ou a introdução de impurezas (dopagem) (Yang & Li, 2008). Por exemplo, o silício, um semiconductor muito utilizado, tem um intervalo de aproximadamente 1,1 eV, o que lhe permite conduzir eletricidade quando excitado termicamente ou dopado com elementos como o fósforo ou o boro (Yang & Li, 2008). A capacidade de manipular as propriedades elétricas dos semicondutores através da dopagem e de outras técnicas é crucial para o desenvolvimento de dispositivos eletrónicos, incluindo transístores e díodos (Yang & Li, 2008).

Quando os materiais semicondutores são confinados a dimensões nanométricas, apresentam propriedades eletrónicas únicas devido a efeitos de confinamento quântico. Este fenómeno resulta da limitação espacial dos portadores de carga, como os eletrões e lacunas, o que leva a uma alteração significativa da estrutura de bandas do material. À medida que o tamanho do ponto quântico (QD) diminui, os níveis de energia dos portadores de carga ajustam-se, aumentando o intervalo de banda efetivo. Esse efeito resulta do confinamento quântico mais restrito, que amplia a separação de energia entre as bandas de condução e valência, permitindo a absorção de fótons com energias iguais ou superiores a esse gap. (Krishna et al., 2021; Jung et al., 2013).

2.6.1 Metodologia de síntese

A síntese de materiais à escala nanométrica pode ser abordada através de duas metodologias principais: técnicas *top-down* e *bottom-up* (Figura 6). A abordagem descendente (*top-down*) envolve a redução mecânica de materiais a granel para atingir dimensões nanométricas. Isto pode ser conseguido através de métodos como a moagem, em que são aplicadas forças mecânicas para decompor partículas maiores em nanopartículas. Embora este método seja relativamente simples e possa produzir grandes quantidades de material, introduz frequentemente defeitos e irregularidades nas nanopartículas, que podem afetar negativamente as suas propriedades físicas e químicas (Rizal et al., 2020; Rezayat et al., 2023; Fellah et al., 2015). Por exemplo, a moagem mecânica pode levar à formação de deslocamentos e outros defeitos estruturais que comprometem a integridade e a funcionalidade das nanopartículas sintetizadas (Fellah et al., 2015; Fu et al., 2013).

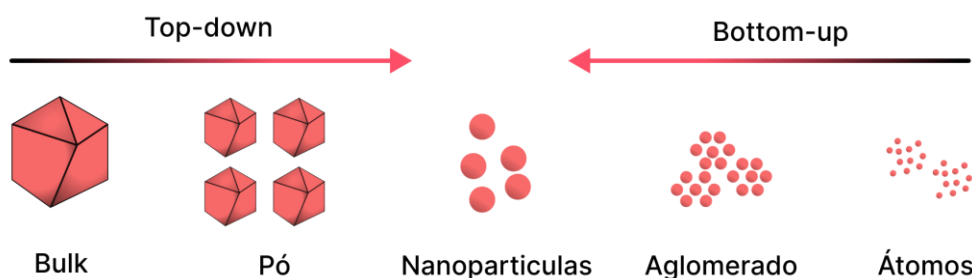


Figura 9 - Metodologias de top-down e bottom-up usadas na síntese de nanopartículas.

Em contraste, a abordagem de *bottom-up* centra-se na montagem de nanopartículas a partir de unidades mais pequenas, como átomos ou moléculas, através de reações químicas ou processos eletroquímicos. Este método permite um maior controlo sobre o tamanho, a forma e a uniformidade das nanopartículas resultantes, minimizando assim os defeitos que estão normalmente associados às técnicas *top-down* (Li et al., 2016; Sebastián & Jensen, 2016). Por exemplo, a síntese microfluídica de nanopartículas permite um controlo preciso das condições

de reação, levando à produção de nanopartículas com propriedades óticas e eletrônicas específicas (Huang et al., 2018; Thiele et al., 2015). A abordagem de *bottom-up* é particularmente vantajosa em aplicações onde as propriedades das nanopartículas são críticas, como em catálise, entrega de medicamentos e tecnologias de imagem (Zhang et al., 2010; Pekkari et al., 2019; Gebreslassie & Gebretnsae, 2021). Além disso, a abordagem *bottom-up* pode facilitar a criação de nanoestruturas complexas que são difíceis de obter através de métodos *top-down*. Por exemplo, a síntese de nanopartículas *core-shell* ou nanopartículas bimetálicas pode ser realizada usando técnicas *bottom-up*, o que permite a exploração de efeitos sinérgicos entre diferentes materiais (Pekkari et al., 2019; Prunier et al., 2015). Estas nanoestruturas avançadas podem exibir atividade catalítica e estabilidade aprimoradas, além de propriedades óticas específicas, tornando-as altamente desejáveis para várias aplicações tecnológicas (Pekkari et al., 2019; Huang et al., 2018; Gebreslassie & Gebretnsae, 2021).

A metodologia *top-down*, embora eficaz, sofre frequentemente de limitações relacionadas com a distribuição do tamanho e a morfologia das nanopartículas resultantes. A moagem mecânica, por exemplo, pode produzir uma vasta gama de tamanhos de partículas, o que pode não ser adequado para aplicações que exijam uniformidade (Rizal et al., 2020; Rezayat et al., 2023). Além disso, a entrada de energia durante a moagem pode levar a efeitos térmicos significativos, alterando potencialmente a composição química e a cristalinidade das nanopartículas (Chen et al., 2013). A introdução de impurezas e a geração de fases amorfas também podem ocorrer, o que pode prejudicar o desempenho das nanopartículas nas aplicações pretendidas (Fellah et al., 2015; Rizal et al., 2020).

Devido às vantagens evidenciadas pelo uso da metodologia *bottom-up* na obtenção de nanopartículas esféricas e monodispersas, é que se optou por utilizar rotas sintéticas baseadas no processo *bottom-up*. As nanopartículas utilizadas neste trabalho são descritas nos subcapítulos seguintes.

2.6.2 Pontos Quânticos

O estudo de nanopartículas semicondutoras, em particular as conhecidas como pontos quânticos (PQs), revela conhecimentos significativos sobre as suas propriedades e comportamentos únicos à medida que as suas dimensões se aproximam da nanoescala. Os pontos quânticos são normalmente definidos como nanopartículas semicondutoras com dimensões que variam entre 1 e 10 nm, em que o seu raio é comparável ou inferior ao raio de Bohr. O raio de Bohr define a extensão espacial da nuvem de elétrões que circunda um núcleo num átomo de hidrogénio, e no contexto dos pontos quânticos, serve como um parâmetro crítico que influencia as propriedades eletrônicas e óticas dessas nanoestruturas.

O confinamento quântico ocorre quando o tamanho do ponto quântico é comparável ao raio de Bohr, resultando em níveis de energia discretos em vez das bandas contínuas observadas em materiais em *bulk*. Este fenómeno é particularmente evidente em pontos quânticos semicondutores, onde os níveis de energia são quantizados devido ao confinamento espacial de portadores de carga (elétrões e lacunas) (Yanes et al., 2008; Weerd et al., 2017). À medida que o tamanho do ponto quântico diminui, a lacuna de energia entre esses níveis discretos aumenta, levando a um desvio para azul nos espectros de absorção e emissão. Esse comportamento dependente do tamanho é uma consequência direta do efeito de confinamento quântico, que modifica as funções de onda dos elétrões e lacunas, influenciando assim suas propriedades óticas (Ahamed & Kumar, 2019; Ko et al., 2022; Zhao et al., 2005).

A relação entre a dimensionalidade e a densidade de estados eletrônicos (DOS) é um aspeto fundamental da física da matéria condensada, particularmente no contexto dos efeitos de

confinamento quântico observados em materiais nanoestruturados. Em materiais a granel, que são tridimensionais (3D), o DOS é contínuo, levando a um espectro de absorção contínuo. Isso ocorre porque os portadores de carga não estão confinados espacialmente, permitindo que eles ocupem uma ampla gama de estados de energia. À medida que transitamos para dimensões menores, como em poços quânticos (2D) e fios quânticos (1D), o confinamento torna-se mais pronunciado, resultando numa redução do DOS e numa correspondente discretização do espectro de absorção (Jasieniak et al., 2009; Fonoberov et al., 2002).

Em poços quânticos, onde o confinamento ocorre numa direção, os estados eletrônicos tornam-se quantizados, levando a uma densidade bidimensional de estados. Esta quantização resulta numa série de níveis de energia discretos, que podem ser observados no espectro de absorção como picos distintos em vez de uma banda contínua. O grau de confinamento influencia na separação de energia entre esses níveis e pode ser sintonizado variando-se a largura do poço quântico (Ullrich & Vignale, 2000; Giansante, 2018). Por exemplo, à medida que a largura do poço quântico diminui, os níveis de energia tornam-se mais espaçados, levando a um deslocamento azul no espectro de absorção, indicativo do aumento da energia necessária para as transições eletrônicas (Helle et al., 2006). Em pontos quânticos que são sistemas de dimensão zero (0D), o confinamento ocorre em todas as três dimensões espaciais. Este nível extremo de confinamento leva a uma redução significativa na densidade de estados, à medida que os níveis de energia se tornam altamente quantizados. O espectro de absorção de pontos quânticos é caracterizado por picos discretos que correspondem às transições entre esses níveis de energia quantizados. A separação de energia entre esses níveis é altamente sensível ao tamanho do ponto quântico, com pontos menores exibindo lacunas de energia maiores e, portanto, características de absorção de energia mais altas (Ferreira et al., 2006; Hens & Moreels, 2012). Este comportamento dependente do tamanho é uma manifestação direta do efeito de confinamento quântico, onde o raio de Bohr do material desempenha um papel crítico na determinação das propriedades eletrônicas do ponto quântico (Jia et al., 2003; Zaknoon et al., 2008).

2.6.3 Propriedades físicas, ópticas e eletrônicas dos PQs

Quando os elétrons estão confinados a dimensões menores do que o seu comprimento de onda de emissão, surgem dois efeitos significativos que alteram fundamentalmente as propriedades eletrônicas e óticas do material. O primeiro efeito é o aumento da lacuna de energia (*band gap*) entre as bandas de valência e condução em comparação com o material a granel. Este fenômeno é uma consequência direta do confinamento quântico, onde a restrição espacial dos elétrons leva a uma modificação dos seus níveis de energia. O segundo efeito envolve a quantização dos níveis de energia, o que resulta em estados de energia discretos em vez de uma estrutura de banda contínua. Juntos, estes dois efeitos são responsáveis pelas propriedades óticas observadas nas nanopartículas, particularmente nos pontos quânticos semicondutores.

A relação entre o tamanho das nanopartículas e a energia do *band gap* é um aspeto fundamental dos nanomateriais que tem implicações significativas nas suas propriedades eletrônicas e óticas. À medida que o tamanho das nanopartículas diminui, a energia do *band gap* tende a aumentar, um fenômeno atribuído aos efeitos do confinamento quântico (Figura 7). Este comportamento é particularmente pronunciado em nanopartículas semicondutoras, onde as transições eletrônicas entre a orbital molecular ocupada mais alta (HOMO, *highest occupied molecular orbital*) e a orbital molecular desocupada mais baixa (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*), são afetadas pelo tamanho das partículas. O aumento da energia do *band gap* com o tamanho decrescente da nanopartícula é resultado dos níveis discretos de energia que emergem à medida que as dimensões das nanopartículas se aproximam do

tamanho do raio de Bohr do excitão, levando a transições interbandas melhoradas que requerem maior energia para ocorrer (Qu & Peng, 2002; Balamurugan & Maruyama, 2005). Por exemplo, no caso dos nanocristais de CdSe, observou-se que, à medida que o tamanho de partícula diminui, a cor de emissão muda de vermelho para azul, correspondendo a um aumento na largura de banda de aproximadamente 1,74 eV para CdSe em bulk para mais de 2,5 eV para nanopartículas menores que 2 nm (Qu & Peng, 2002).

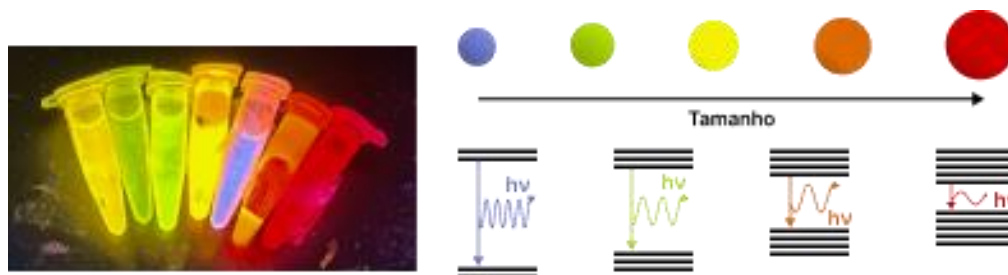


Figura 10 - Distribuição de pontos quânticos de diferentes tamanhos, e respectiva ilustração de energia de transição necessária à emissão de energia em diferentes comprimentos de onda.

Os métodos de síntese utilizados para produzir nanopartículas também podem influenciar o seu tamanho e, conseqüentemente, a sua energia de banda proibida.

O telureto de cádmio é caracterizado por uma relação estequiométrica de 1:1 entre o cádmio e o telúrio e foi escolhido para o presente estudo (Figura 8). É um material semiconductor cristalino proeminente pertencente ao grupo II-VI da tabela periódica. As características óticas relacionadas com o tamanho dos PQs de CdTe, permitem-lhes emitir luz em todo o espectro visível, graças ao seu confinamento quântico, tornando-os versáteis para várias aplicações, incluindo imagiologia médica de alta resolução e em sistemas de detecção e quantificação, como biossensores.

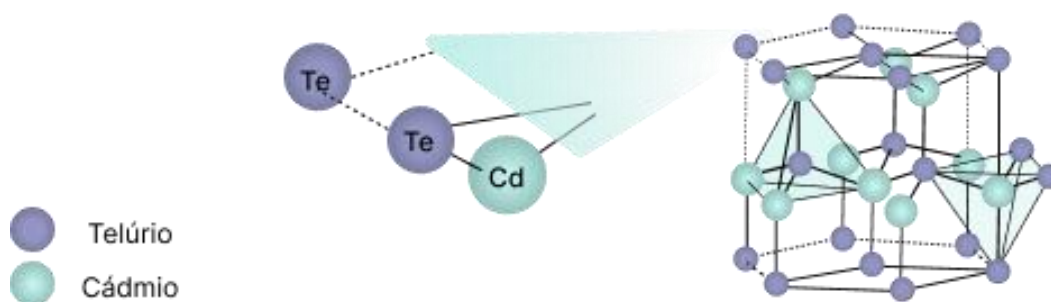


Figura 11 - Estrutura cristalina wurtzita do telureto de cádmio, CdTe.

Outro exemplo de versatilidade dos PQs é a sua compatibilidade com sistemas biológicos, permitindo aplicação em diversas áreas de saúde e terapia (Kim et al., 2011; Fok et al., 2010). Os PQs não são solúveis, no entanto consoante a modificação da sua superfície é possível moldar a sua solubilidade e toxicidade *in vivo*. Os PQs são frequentemente formados em solventes orgânicos não polares resultando em superfícies hidrofóbicas que dificultam a sua aplicação em meios aquosos. A hidrofobicidade dos PQs pode gerar agregação irreversível e baixa estabilidade coloidal quando adicionados a meios aquosos, limitando a sua utilização em aplicações biológicas. Algumas técnicas permitem melhorar a sua solubilidade e biocompatibilidade, mediante a modificação da sua superfície. Por exemplo, o encapsulamento

ou a adição de certos ligantes, aumentam a estabilidade dos PQs em solução aquosa e inibem a sua agregação. Os ligantes de superfície mais utilizados na síntese dos nanocristais de CdTe são compostos contendo grupos tiol, como o ácido tioglicólico (TGA), o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), a glutationa (GSH) e a cisteína (CYS) [RODRIGUES et al, 2016]. A modificação da superfície com certos ligantes permite uma funcionalização que promove interações iônicas, bem como o aumento do rendimento quântico de luminescência dos PQs. Os ligantes de tiol são capazes de fornecer aos PQs estabilidade em meio aquoso evitando a agregações e também adicionam funcionalidade química específica, por exemplo, com grupos amina ou carboxílicos, o que se torna interessante por possibilitar interações eletrostáticas ou covalentes com macro superfícies ou com outras nanopartículas ou biomoléculas. Diante dessas características, foram sintetizados, neste trabalho, nanocristais de CdTe@MPA, compostos por pontos quânticos de CdTe com ligantes de superfície contendo grupos tiol. A escolha dos materiais também se fundamenta na presença de grupos nitro, amino e hidroxilo na molécula alvo, que favorecem interações capazes de alterar a carga superficial ou modificar o ligante dos PQs na presença do analito.

2.6.4 Luminescência

Luminescência é um termo amplo que se refere à emissão de luz por um material ao ser excitado por uma fonte externa de energia, sem o uso de calor. Essa emissão luminosa pode ocorrer através de diversos processos, incluindo reações químicas, interação com luz ou radiação, ou ainda devido a estímulos elétricos ou biológicos. Este fenômeno é observado em diferentes contextos fascinando desde a pré-história, diferentes organismos vivos, como corais, plâncton e bactérias bioluminescentes exibem fenômenos de luminescência. O termo científico luminescência foi introduzido em 1888 pelo físico alemão Eilhard Wiedemann em derivação da palavra lúmen, que se traduz em luz.

A luminescência não se encontra em equilíbrio térmico com o ambiente que a rodeia, sendo designada como “luz fria”. Este facto permite distingui-la da incandescência, em que o calor é a única fonte de luz. O físico soviético Sergey Vavilov modificou a definição anteriormente descrita ao introduzir a ideia da escala de tempo de emissão permitindo assim classificar de acordo com a duração de emissão, dividindo a luminescência em fluorescência e fosforescência. A fluorescência distingue-se da fosforescência pela paragem de emissão de fotões após cessação da fonte de excitação, enquanto na fosforescência a emissão de luz continua durante vários segundos, minutos ou mesmo horas após a cessação da fonte de excitação.

A luminescência pode classificar-se de acordo com a fonte de excitação. Por exemplo, a quimiluminescência resulta de reações químicas, a bioluminescência de processos bioquímicos em organismos vivos e a fotoluminescência de interações com fotões. O regresso da molécula ao seu estado fundamental pode ser acompanhado por decaimentos radiativos com emissão luminescente ou por decaimentos não radiativos, com diferentes probabilidades de ocorrência como conversão interna, cruzamento intersistemas ou transferência de carga intermolecular (Figura 12).

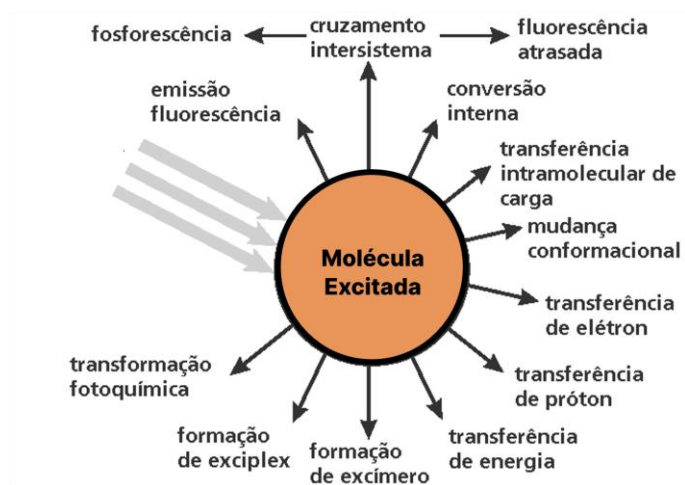


Figura 12 - Processos de perda de energia de uma molécula excitada, adaptado de (Valeur & Berberan-Santos, 2012).

Alguns destes processos de decaimento resultam da interação com outras moléculas, como por exemplo, processos de transferência de eletrão, transferência de prótons, transferência de energia. Para melhor compreender o fenómeno de fluorescência que serve de suporte à metodologia utilizada na síntese dos MIPs para o biomarcador alvo MMP7, são apresentados alguns aspetos foto-físicos básicos.

2.6.5 Transições eletrónicas

As transições eletrónicas descrevem o processo pelo qual uma molécula permuta energia e transita entre diferentes estados eletrónicos. A absorção de energia por parte de uma molécula provoca a excitação do eletrão de valência, resultando numa transição eletrónica entre dois níveis energéticos discretos bem definidos. Para que essa transição ocorra é necessária que a energia absorvida seja igual à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado. A energia (E) absorvida pode ser quantificada pela seguinte expressão:

$$E = h\nu$$

em que h corresponde à constante de Planck (6.63×10^{-34} J.s) e ν à frequência da radiação, em Hz.

De uma forma breve, o diagrama simplificado de Perrin–Jablonski (Figura 13) permite visualizar as transições eletrónicas possíveis resultantes da absorção de um fóton e os processos de decaimento com emissão fluorescente, fosforescente e outros processos não radiativos. Os estados eletrónicos singlete são designados por S_0 (estado eletrónico fundamental), S_1 e S_2 e os estados eletrónicos tripleto por T_1 e T_2 . Dentro de cada um destes estados eletrónicos de energia existem um conjunto de níveis vibracionais representado por linhas horizontais mais finas.

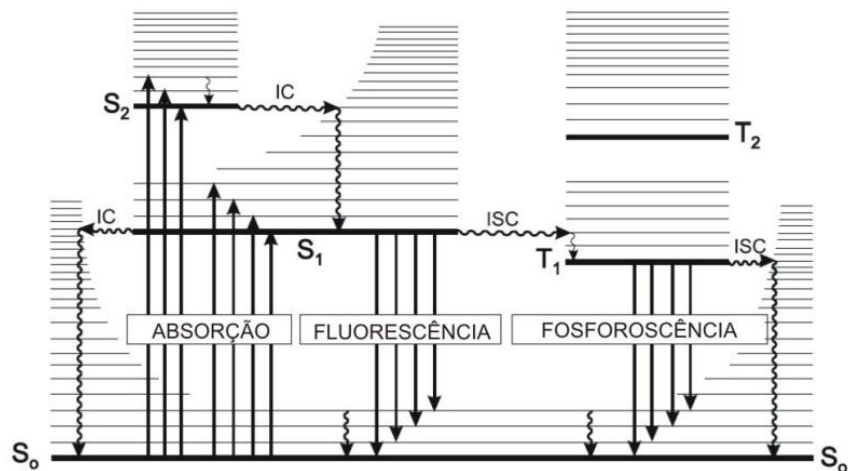


Figura 13 - Diagrama de Perrin-Jablonski com exemplos de métodos de absorção e dissipação radiativa. S₀, S₁ e S₂ - estados eletrônicos singletos; T₁, T₂ - estados eletrônicos tripleto; IC - conversão interna; ISC - cruzamento intersistemas (Therézio, 2009).

No caso do decaimento S₁→S₀ ser acompanhado pela emissão de um fóton o processo é designado de fluorescência. fluorescência tem um tempo de duração mais longo (10⁻⁹ s) que a absorção de um fóton (cerca de 10⁻¹⁵ s). No entanto, os eletrões permanecem no estado excitado por um certo período antes de emitirem um fóton ou sofrerem outro processo de decaimento (Tabela 2). A duração do tempo de excitação depende da própria molécula e do meio envolvente. Após a excitação de um determinado número de moléculas, estas sofrerão um decaimento exponencial da sua intensidade fluorescente de acordo com o tempo médio de permanência no estado excitado.

Tabela 2 - Tempos padronizados para processos de absorção e decaimento, adaptado de (Valeur & Berberan-Santos, 2012)

Processo	Tempo decorrido (s)
Absorção	10 ⁻¹⁵ s
Relaxamento vibracional	10 ⁻¹² a 10 ⁻¹⁰ s
Tempo de vida do estado excitado S1	10 ⁻¹⁰ a 10 ⁻⁷ s
Cruzamento intersistemas	10 ⁻¹⁰ a 10 ⁻⁸ s
Conversão interna	10 ⁻¹¹ a 10 ⁻⁹ s
Tempo de vida do estado excitado T1	10 ⁻⁶ a 1 s

2.6.6 Desvio de Stokes

A análise ao diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 13) permite perceber que a energia de emissão é tipicamente inferior à energia de absorção. Quando um fóton incide sobre a molécula, ocorre absorção acompanhada da transição de um eletrão de qualquer um dos níveis vibracionais de S0 para um dos níveis vibracionais de S1 ou até mesmo S2. A esta absorção está associado um comprimento de onda máximo, $\lambda_{\text{máx}}$ que está representado na Figura 10 e traduz a transição com mais probabilidades de ocorrer. De forma análoga, o espectro de emissão é uma representação das transições eletrónicas que ocorrem do nível vibracional mais baixo de S1 para um qualquer nível vibracional de S0. Dada a menor diferença de energia entre os estados no processo de decaimento comparativamente com o processo de absorção, resulta que a radiação fluorescente apresenta sempre comprimento de onda mais elevado relativamente à radiação de excitação (ou de absorção) das moléculas. Ou seja, entre o espectro de absorção e o espectro de emissão existe um desvio, conforme ilustrado na Figura 10, designado de desvio de Stokes, e é normalmente quantificado pela diferença do comprimento de onda que existe entre o pico máximo no espectro de absorção e o pico máximo no espectro de emissão.

É de notar que estes dois espectros podem apresentar uma zona de sobreposição, significando que algumas transições de excitação requerem menos energia que as libertadas em transições de regresso ao estado fundamental. O espectro de absorção utilizado para a avaliação do desvio de Stokes é obtido através da medição da radiação absorvida por um material. Por sua vez, o espectro de emissão é obtido através da excitação da amostra a um comprimento de onda fixo e análise do espectro de fluorescência resultante. Vulgarmente, também são obtidos espectros de excitação para caracterizar materiais fluorescentes. Estes espectros são normalmente próximos dos de absorção, mas fornecem uma informação diferente. Para a leitura destes espectros, fixa-se o comprimento de onda de emissão e faz-se um varrimento do comprimento de onda de excitação.

2.6.7 Fluorescência em estado estacionário

Na sequência dos fenómenos fotofísicos atrás descritos, faz-se de seguida uma breve descrição da fluorescência em estado estacionário que possibilitou a avaliação do sensor biomimético desenvolvido neste trabalho para a MMP7. Parâmetros físicos como o rendimento quântico da fluorescência e os tempos de vida dos fluoróforos sintetizados, não são abordados por estarem fora do âmbito do trabalho experimental desenvolvido na tese. Como não constituiu âmbito de estudo neste trabalho a medição dos tempos de vida dos MIPs sintetizados, não se poderá concluir se a supressão é estática ou dinâmica uma vez que a análise da supressão do fluoróforo foi realizada exclusivamente por medições da intensidade de fluorescência.

A medição da intensidade de fluorescência em estado estacionário pressupõe a existência de uma fonte de radiação com emissão constante sobre a amostra e uma medição contínua da intensidade de fluorescência. Uma vez que a absorção ocorre numa escala de tempo dos femtossegundos, o estado estacionário é atingido imediatamente após a incidência de radiação sobre a amostra. Nos sistemas de medição da intensidade de fluorescência, esta é uma medida adimensional que está associada ao número de fótons de emissão que incidem sobre o fotodetector. O espectro de fluorescência em estado estacionário é caracterizado pela sua intensidade e distribuição do comprimento de onda, o que pode revelar informações importantes sobre a estrutura molecular e a dinâmica das espécies fluorescentes. O espectro de emissão diz-nos que nem todos os fótons emitidos têm a mesma energia, refletindo as várias transições que ocorrem do nível vibracional mais baixo de S1 para os vários níveis vibracionais

de S0, o que justifica o formato sinusoidal da curva de emissão de fluorescência com o comprimento de onda.

2.6.8 Supressão da fluorescência

A supressão ou inibição da fluorescência (do inglês *quenching*), refere-se a qualquer processo de diminuição da intensidade da emissão de fluorescência de uma molécula. Este processo pode resultar de vários mecanismos, que podem ser genericamente classificados em fatores intrínsecos e extrínsecos. Esses processos de decaimento de eletrões no estado excitado podem ser intrínsecos à própria molécula ou intramoleculares podem resultar de interferências com moléculas vizinhas e por isso se dizem intermoleculares. A supressão, em geral, é um processo físico e, portanto, não ocorrem reações químicas de formação de novos produtos. Ou seja, após o decaimento, o fluoróforo não se converte num novo produto e, portanto, mantém a sua estrutura molecular (Valeur & Berberan-Santos, 2012). Dos processos de interação com moléculas vizinhas, apenas será considerado o que ocorre por colisão entre o fluoróforo e o supressor. Ao interagir com o analito, os PQs sofrem o efeito de supressão de fluorescência. No trabalho aqui apresentado os PQs funcionam como fluoróforo e a MMP7 como supressor. Sendo um processo dependente do tempo, necessita que durante o tempo de vida do estado excitado dos PQs ocorra uma colisão com o supressor, resultando no regresso ao estado fundamental com emissão de calor. Este processo é classificado de supressão dinâmica e depende da difusão das moléculas no meio. Outro processo designa-se por supressão estática, que difere da dinâmica pela formação de um par fluoróforo-supressor no estado fundamental e independente dos choques entre as moléculas. A supressão estática pode verificar-se nos casos em que a difusão das moléculas está limitada à viscosidade elevada do meio ou em matrizes rígidas. Em ambos processos de supressão, a intensidade fluorescente apresenta um decaimento exponencial que é proporcional à concentração do supressor, dada pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv}[Q] \quad (1)$$

Onde:

- F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor,
- F é a intensidade de fluorescência na presença do supressor,
- k_{sv} é a constante de Stern-Volmer que descreve a eficiência de extinção,
- $[Q]$ é a concentração do supressor.

De uma forma geral, quando se representa graficamente a razão F_0/F em função da concentração do supressor, obtém-se uma relação linear em que o declive (k_{sv}) representa a constante de Stern-Volmer, a pressão e temperatura constantes.

No caso da supressão estática, a constante representa a constante de equilíbrio de formação do complexo (k_s).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv}[Q] = 1 + k_s[Q] \quad (2)$$

Sendo a supressão também dependente da concentração do supressor, a uma dada pressão e temperatura. Em alguns casos pode verificar-se simultaneamente a ocorrência da supressão dinâmica e estática, o que conduz a um desvio da linearidade de F_0/F em função da concentração do supressor $[Q]$.

3 Procedimento Experimental

Neste capítulo serão descritos os materiais e reagentes utilizados durante a realização do trabalho, bem como a caracterização dos materiais sintetizados, e os protocolos utilizados para a sua produção. O trabalho experimental iniciou-se com a síntese dos PQs com emissão no laranja, seguidamente fez-se a síntese dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs, seguindo-se os estudos de deteção, reprodutibilidade e seletividade para o biomarcador alvo MMP7, com o sensor biomimético sintetizado.

3.1 Materiais

Ao longo do trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes sem qualquer passo de purificação adicional, conforme se apresenta na Tabela 3.

Tabela 3 – Lista de reagentes e devida origem comercial.

Reagentes	Origem comercial
Pó de telúrio (200 mesh, 99,8 %)	Alfa Aesar
Borohidreto de sódio (NaBH ₄ , 99 %)	Fisher Chemical
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	Fisher Chemical
Cloreto de cádmio hemi (penta-hidratado) (CdCl ₂ . 2. 5H ₂ O, 98 %)	Acros Organic
Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Panreac Química SA
Carbonato de sódio deca-hidratado (Na ₂ CO ₃ . 10H ₂ O)	Riedel-de Haën
Etanol (96 %)	Fluka
3-mercaptopropionic acid (3-MPA)	Sigma-Aldrich
Cloridrato de aminoetil-2 metacrilato (AEMH.HCl)	LabChem
Acrilamida (AAm)	Sigma-Aldrich
N, N-metilenobis(acrilamida) (MBA)	Sigma-Aldrich
Tampão fosfato salino (PBS, do inglês Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich
MES (ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico)	Sigma-Aldrich
Tris-base (tris(hidroximetil)aminometano)	Sigma-Aldrich
Persulfato de amônio (APS, do inglês Ammonium persulfate)	Sigma-Aldrich
Soro liofilizado HN	PZ CORMAY S. A.
Antigénio carcinoembrionário (CEA)	VWR Life Science
Metaloproteinase de matriz 7 (MMP7)	Sigma-Aldrich
Antigénio carboidrato 19-9 (CA19-9)	Biorbyt
Albumina de soro humano (HSA)	Abbeva
Creatinina	Fluka

3.2. Equipamentos e Técnicas de Caracterização

3.2.1. Espectroscopia de fluorescência

Todos os espectros de emissão dos PQs bem como dos MIPs e NIPs sintetizados foram obtidos com recurso a um espectrómetro de fluorescência Lumina, da marca Thermo Scientific, equipado com lâmpada de arco de xénon de 150 W como fonte luminosa. A velocidade de varrimento foi de 600 nm/min, o tempo de integração foi de 50 ms e o tempo de reação foi de 0,02 segundos. As fendas de excitação e emissão foram ajustadas para 20 nm e os filtros de emissão e excitação foram ajustados para o ar. Todas as medições foram efetuadas numa cuvete de quartzo de volume 350 µL com um percurso ótico de 1mm.



Figura 14- Espectrômetro de fluorescência Lumina da *Thermo Scientific*.

3.2.2. Espectroscopia UV-Vis

Os estudos de ultravioleta-visível (UV-vis) foram registrados num espectrofotômetro Evolution 220 (Thermo Scientific) (Figura 15).



Figura 15-Espectrômetro de ultravioleta-visível Evolution 220.

3.2.3. Espectroscopia de FTIR

Os espectros de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) foram recolhidos utilizando um espectrómetro Nicolet iS10 acoplado a um acessório de amostragem de refletância total atenuada (ATR) com cristal de contacto de diamante (Figura 16) com uma resolução de 8 cm^{-1} e uma gama espectral de 3750-850 cm^{-1} .



Figura 16- Espectrómetro de FTIR com ATR, Nicolet iS10

3.2.4. Espectroscopia de SEM e EDS

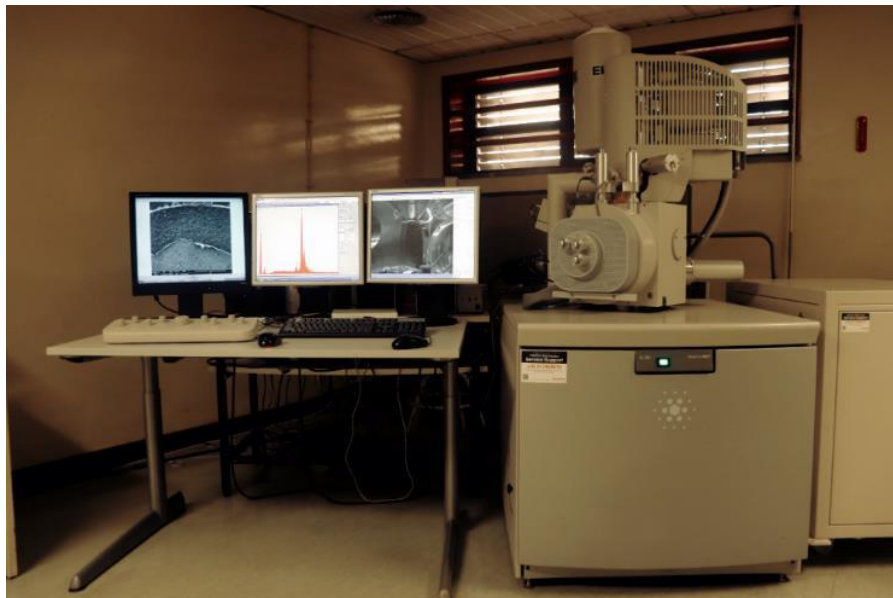


Figura 17- Microscópio Eletrónico de Varrimento SEM modelo FEI Quanta 400 FEG nas instalações do laboratório CENTRO DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE DO PORTO (CEMUP)

As imagens de SEM (do inglês, Scanning Electron Microscopy) e as de espectroscopia de raios X por dispersão de energia, EDS (do inglês, Energy-dispersive X-ray spectroscopy), foram adquiridas num modelo FEI Quanta 400 FEG operado a uma voltagem de aceleração de 15 kV.

3.3. Metodologias

3.3.1. Síntese dos PQs de CdTe@MPA

Para a obtenção dos PQs de CdTe@MPA foi utilizado um protocolo de síntese em meio aquoso de acordo com Piloto et al., com pequenas modificações, a partir da síntese descrita na literatura e funcionalizando a superfície dos PQs com o ácido 3-mercaptopropionico (MPA) (Piloto et al., 2018).

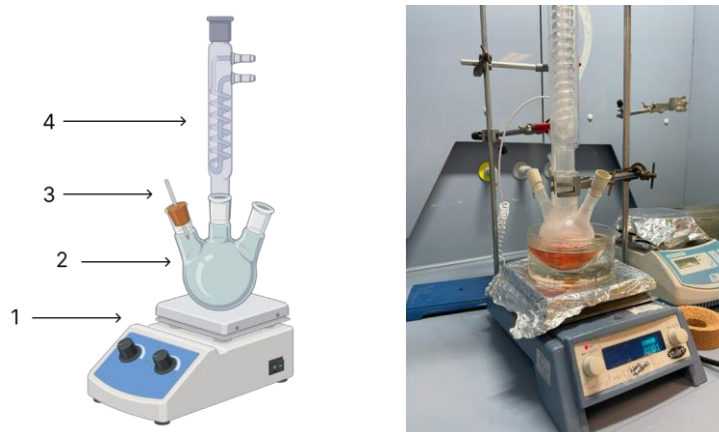


Figura 18- Esquema de equipamento utilizado durante a síntese dos PQs CdTe@MPA. (1) Placa de aquecimento com agitação, (2) Balão de fundo redondo com três tubuladuras, (3) Termómetro e (4) Condensador Dimroth.

Na preparação do precursor de hidrogenotelureto de sódio (NaHTe), 180 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4), 38,1 mg de telúrio em pó (Te) e 5 mL de água ultrapura (previamente degaseificada com N_2 gasoso) são misturados num gobelé. O gobelé é imerso num banho de água a 80°C com agitação contínua. A reação prossegue até que o pó negro de telúrio seja totalmente convertido numa solução púrpura de hidrogenotelureto de sódio (NaHTe). Esta solução é altamente reativa e deve ser utilizada imediatamente na etapa seguinte.

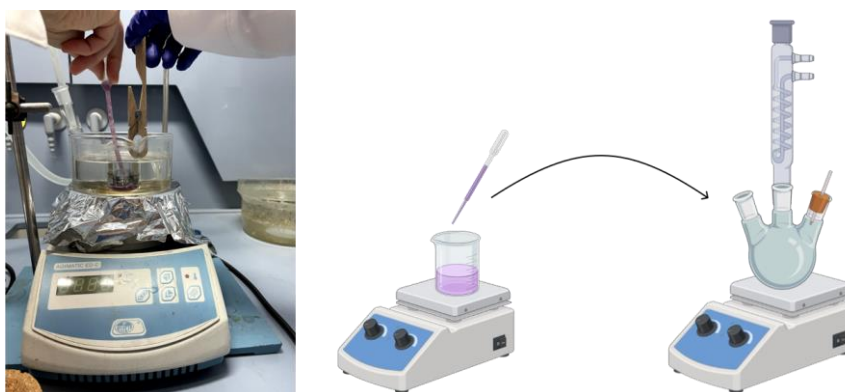


Figura 19- Preparação do precursor de hidrogenotelureto de sódio (NaHTe) e posterior adição ao balão de fundo redondo onde decorre a síntese dos PQs CdTe@MPA.

Seguidamente, num balão de três gargalos são adicionados 100 mL de água ultrapura, $4,0 \times 10^{-3}$ mol de cloreto de cádmio e $6,8 \times 10^{-3}$ mol de MPA. A mistura é desgaseificada com azoto durante 30 minutos para remover qualquer oxigénio dissolvido. Após a desgaseificação, a solução do precursor já previamente preparada, é injetada nesta mistura numa única adição rápida. A reação é permitida a prosseguir sob condições de refluxo. O tamanho dos pontos quânticos pode ser controlado ajustando a duração do processo de refluxo.

Após a síntese, os PQs são purificados por precipitação. em etanol absoluto, O precipitado é separado por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, os pellets são secos num exsiccador à temperatura ambiente e mantidos sob vácuo até remoção completa dos solventes. Uma vez terminado o processo de secagem, os pontos quânticos são triturados até à obtenção de um pó fino e armazenados ao abrigo da luz.

3.3.2. Síntese dos MIP@PQs

Os MIP@PQs foram preparados por polimerização radicalar livre, com impressão na superfície de pontos quânticos de CdTe@MPA, aqui designados como MIP@PQs. Desta forma, incubou-se uma solução de MMP7 ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) com uma suspensão de PQs CdTe@MPA, emissores de fluorescência no c.d.o. laranja (5 mg mL^{-1}), em PBS 0,01 M pH 7,4, durante 10 minutos, à temperatura ambiente (Figura 20, passo 1). Paralelamente foram desgaseificadas as soluções do monómero funcional e do agente reticulante com azoto, durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se o cloridrato de metacrilato de aminoetilo ($9,12 \times 10^{-6}$ M) à mistura reacional e agitou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a suspensão a 4000 rpm à temperatura ambiente e ressuspendeu-se o pellet em 1 mL de PBS 0,01 M pH 7,4 junto com o monómero funcional acrilamida (AAM) ($5,44 \times 10^{-5}$ M) e a bis-acrilamida (MBA) ($6,12 \times 10^{-5}$ M). Adicionaram-se igualmente o persulfato de amónio (APS) ($6,96 \times 10^{-6}$ M) com tetrametiletilenodiamina (TEMED) ($2,32 \times 10^{-6}$ M) e a polimerização foi prolongada durante 30 minutos à temperatura ambiente (Figura 20, passo 2). Seguidamente centrifugou-se a mistura reacional dos MIP@PQs a 4000 rpm durante 5 minutos a 20°C e descartou-se o sobrenadante. Resuspendeu-se o pellet em 1 mL de PBS 0,01 M pH 7,4 e registou-se a sua fluorescência (Figura 20, passo 3). Fez-se a remoção da proteína MMP7 das cavidades dos MIP@PQs, com tampão carbonato/bicarbonato 0,01 M a pH 9,2. Para isso, resuspendeu-se os MIP@PQs neste tampão durante 24 horas e avaliou-se a eficiência da remoção da proteína pela medição da sua fluorescência. Depois resuspendeu-se os MIP@PQs num banho de ultrassons a uma potência de 120 W e uma frequência de 40 kHz. Finalmente testou-se o reconhecimento de padrões de

proteína às cavidades impressas dos MIP@PQs por calibrações em solução em PBS e em soro humano liofilizado HN, diluído a 100 vezes em PBS (Figura 20, passo 4). Este protocolo foi repetido para os NIP@PQs e para os PQs CdTe@MPA sem conjugação aos MIPs.

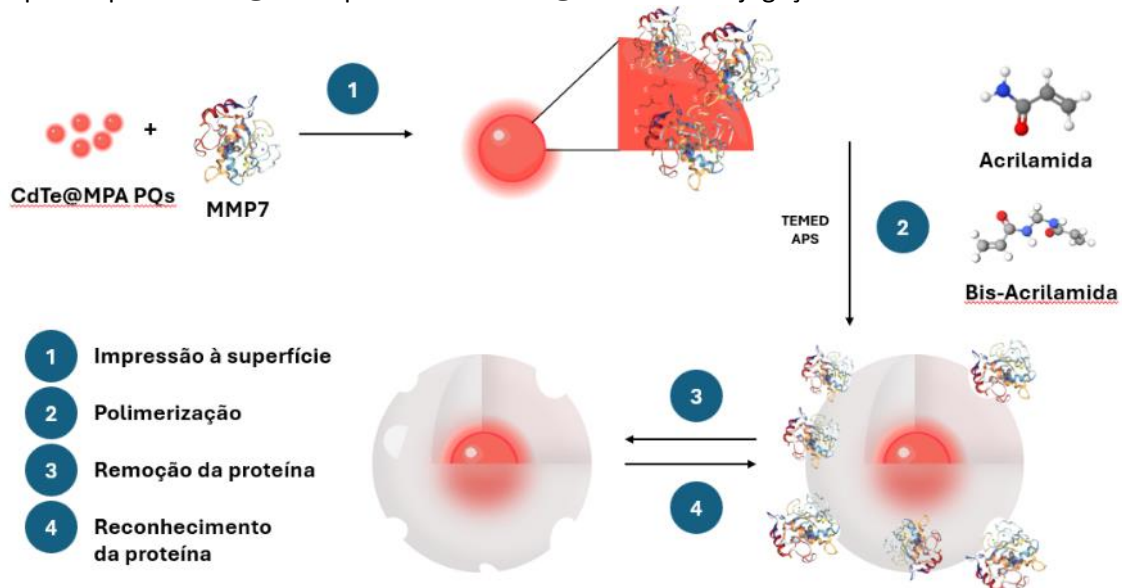


Figura 20- Representação esquemática da construção dos MIP@PQs para a proteína MMP7. Incubação da proteína MMP7 à superfície dos PQs (1); Polimerização na presença do monômero e do agente reticulante (2); Remoção da proteína MMP7 da matriz polimérica, com formação das cavidades impressas (3); Reconhecimento da proteína MMP7 às cavidades dos MIP@PQs (4).

Na otimização do processo de síntese dos MIP@PQs foram ajustadas as condições experimentais tais como os tempos de polimerização da síntese dos MIP@PQs, as concentrações de monômero funcional e de agente reticulante e as condições de remoção da molécula molde das cavidades impressas dos MIP@PQs.

3.3.3. Calibração dos MIP@PQs em solução aquosa

Após a remoção da proteína das cavidades impressas, os MIP@PQs desenvolvidos neste estudo foram avaliados como sensores biomiméticos para a detecção do biomarcador MMP7, assim como os seus controlos NIP@PQs. Foram igualmente avaliados os PQs CdTe@MPA sintetizados, para efeitos comparativos das respostas de calibração com os sensores impressos. Mediu-se a variação do sinal de fluorescência destes três sistemas em função da concentração de MMP7 em PBS 0,01 M pH 7,4, de acordo com a equação de Stern-Volmer (1). Prepararam-se padrões de MMP7 no intervalo de concentração $[1 \times 10^{-10} - 5 \times 10^{-7}] \text{ g mL}^{-1}$. Para cada ponto da curva de calibração, foram calculados os desvios padrão (do inglês RSD *relative standard deviation*) e as barras de erro correspondentes ($S/N=3$). Resumidamente, adicionaram-se a 190 μL de uma suspensão de MIP@PQs, 2 μL de solução padrão de MMP7 na gama de concentrações $[1 \times 10^{-10} - 5 \times 10^{-7}] \text{ g mL}^{-1}$, ajustando-se o volume final a 200 μL com PBS 0,01 M pH 7.4. Mediu-se o sinal de fluorescência dos MIP@PQs na presença de cada padrão de MMP7 em PBS. Repetiu-se este protocolo para os NIP@PQs e para os PQs de CdTe@MPA. Repetiram-se as calibrações dos três sistemas sensores no mesmo intervalo de concentrações dos padrões de MMP7 em soro humano liofilizado HN, o qual foi previamente filtrado com membranas 50 kDa de cutoff de

peso molecular e diluído a 100 vezes em PBS 0,01 M pH 7,4. A solução stock de MMP7 (2×10^{-4} g mL⁻¹) foi mantida a -20°C em alíquotas com um volume de 50 µL. Durante a sua utilização estas foram mantidas a 4°C, pelo período máximo de cinco dias. Repetiram-se as calibrações para os três sistemas sensores com os padrões MMP7 preparados na mesma gama de concentração, mas desta vez em soro HN liofilizado diluído a 100 vezes em PBS 0,01 M pH 7,4.

3.3.4. Estudos de Estabilidade dos PQs e dos MIP@PQs

Foram estudados alguns fatores que condicionam a estabilidade dos PQs, tendo-se preparado uma suspensão de PQs a 5 mg mL⁻¹ em diferentes meios, como água ultrapura a pH 5,6, e diferentes tampões bioquímicos a 0,01 M, tal como se verifica na Figura 22. Assim, testou-se a estabilidade de uma solução de PQs CdTe@MPA a 5 mg mL⁻¹ em PBS a pH 7,4, em MES a pH 6,5 e em Tris-base a pH 7,4. As suspensões dos PQs preparadas foram armazenadas à temperatura ambiente e protegidas da luz.

3.3.5. Estudos de Seletividade dos MIP@PQs

Para avaliar a seletividade dos MIP@PQs para a MMP7, foram realizados testes de seletividade utilizando quatro interferentes comumente presentes na matriz de soro humano. Foram eles a albumina de soro humano (HSA), a creatinina e dois biomarcadores associados ao cancro pancreático, como o antigénio carcinoembrionário (CEA) e o antigénio carboidrato 19-9 (CA 19-9). Os ensaios de seletividade dos MIP@PQs foram realizados na presença e na ausência de MMP7 em PBS 0,01 M pH 7,4. Resumidamente, misturaram-se a 190 µL de uma suspensão de MIP@PQs, 2 µL de solução padrão de MMP7 a 1 µg mL⁻¹ em PBS. Seguidamente, foi adicionada uma solução padrão de creatinina a 0,06 µg mL⁻¹ e o volume final foi ajustado para 200 µL com PBS, como se mostra na Tabela 4. O processo foi repetido para a proteína HSA a 0,4 mg mL⁻¹, a CA19-9 a 10 U mL⁻¹ e a CEA a 4 ng mL⁻¹. As suspensões dos MIP@PQs foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente, ressuspendeu-se o pellet em 200 µL de PBS e procedeu-se à leitura da fluorescência dos MIP@PQs. Este protocolo foi igualmente repetido para os NIP@PQs.

Tabela 4- Interferentes utilizados nos estudos de seletividade e as presentes concentrações iniciais (Ci), volume inicial (Vi), concentração final (Cf) e volume final (Vf). Padrões de diluição preparados através da solução mãe e do PBS com a respetiva concentração final.

Interferentes	Ci	Vi	Cf	Vf
Creatinina	6 (µg mL ⁻¹)	2 µl	0,06 (µg mL ⁻¹)	200 µl
HSA	40 (mg mL ⁻¹)	2 µl	0,4 (µg mL ⁻¹)	200 µl
CA 19-9	1k (U mL ⁻¹)	2 µl	10 (U mL ⁻¹)	200 µl
CEA	0,4 (µg mL ⁻¹)	2 µl	0,4 (ng mL ⁻¹)	200 µl
MMP7	1 (µg mL ⁻¹)	2 µl	10 (ng mL ⁻¹)	200 µl

4. Resultados e Discussão

No âmbito deste trabalho, decidiu-se funcionalizar a superfície dos PQs com o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) para detetar a MMP7. Esta opção baseia-se por um lado, no facto dos grupos funcionais da MMP7 poderem interagir com os grupos funcionais na superfície dos PQs e por outro na carga superficial que estes grupos adquirem no tampão usado, resultando numa variação do sinal de fluorescência dos PQs na presença da MMP7. Posteriormente, foram sintetizados os sensores biomiméticos MIP@PQs para o biomarcador alvo MMP7. A seguir, avaliou-se a resposta analítica desses sensores ao biomarcador alvo, tanto em tampão PBS quanto em soro HN liofilizado. Ensaios de seletividade foram realizados para verificar a especificidade do sensor biomimético na detecção do MMP7, considerando a presença de outras moléculas na matriz do soro HN. Para fins comparativos, foram também sintetizados os correspondentes polímeros não impressos NIP@PQs em PBS. Ambas as respostas dos sensores biomiméticos foram comparadas à resposta analítica dos PQs em suspensão, com relação ao biomarcador alvo. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, assegurando a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados obtidos e garantindo a eficácia do sensor biomimético na detecção do MMP7.

4.1. Caracterização dos PQs de CdTe@MPA

4.1.1. Análise Espectral de Fluorescência

A Figura 21 representa os espectros de absorção e de emissão de uma suspensão de PQs de CdTe@MPA a 5 mg mL^{-1} em PBS 0,01 M pH 7,4. Traçou-se o espectro de excitação da suspensão (curva preta) e traçou-se o espectro de emissão da suspensão (curva laranja). A suspensão foi excitada a 480 nm, tendo-se registado um pico de emissão de fluorescência a 606 nm (curva laranja), correspondendo à emissão de cor laranja da suspensão sob luz visível e de cor laranja fluorescente sob luz UV de 365 nm.

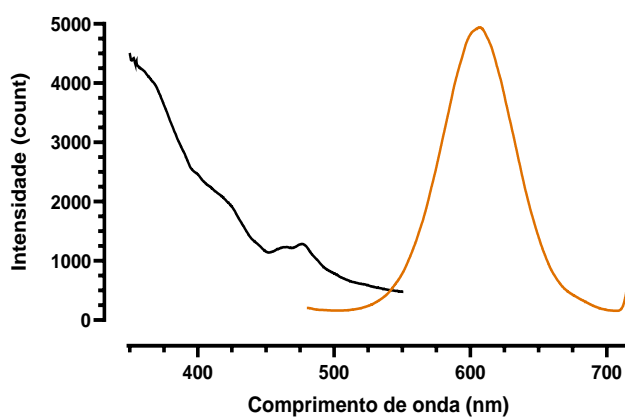


Figura 21- Espectros de excitação (linha preta) e de emissão de fluorescência (linha laranja) de uma suspensão de CdTe@MPA preparada a 5 mg mL^{-1} em PBS 0,01 M pH 7,4.

4.1.2. Estudos de Estabilidade dos PQs

As propriedades de fluorescência dos pontos quânticos (PQs) podem variar ao longo do tempo, dependendo de sua estabilidade química. Fatores que influenciam essa estabilidade incluem o tamanho das nanopartículas, o tipo de ligantes acoplados à superfície, o pH do meio em que estão suspensas e as condições de armazenamento. Por exemplo, a presença de ligantes adequados pode prevenir a agregação dos PQs e proteger contra processos de oxidação, enquanto o pH do meio pode afetar a carga superficial e a solubilidade das nanopartículas, influenciando sua estabilidade e propriedades óticas. Além disso, condições de armazenamento, como temperatura e exposição à luz, podem levar à degradação ou alteração das características dos PQs ao longo do tempo. Como se mostra na Figura 22, observa-se um ligeiro aumento inicial na intensidade de fluorescência dos PQs no primeiro dia após a sua ressuspensão nos tampões, exceto na água ultrapura. Esse aumento pode estar relacionado com as interações dos PQs com os íons presentes nos tampões, que ajudam a estabilizar a superfície das nanopartículas e intensificam a sua fluorescência, um efeito conhecido como passivação superficial. Por outro lado, a redução gradual da intensidade de fluorescência nos dias subsequentes de armazenamento pode ser atribuída à foto-oxidação dos grupos tiol presentes na superfície dos PQs em ambiente aquoso. Esse processo de oxidação leva à precipitação das nanopartículas de CdTe@MPA, o que resulta numa supressão da fluorescência ao longo do tempo. Com base no estudo de estabilidade dos PQs, optou-se por utilizar tampão

PBS 0,01 M, pH 7,4, para a impressão da proteína MMP7. Esta escolha deve-se ao fato de que este pH está próximo do fisiológico, o que ajuda a manter a conformação nativa da proteína. Manter o pH próximo ao fisiológico é crucial para preservar a estrutura e função das proteínas, evitando alterações conformacionais que possam comprometer sua atividade biológica.

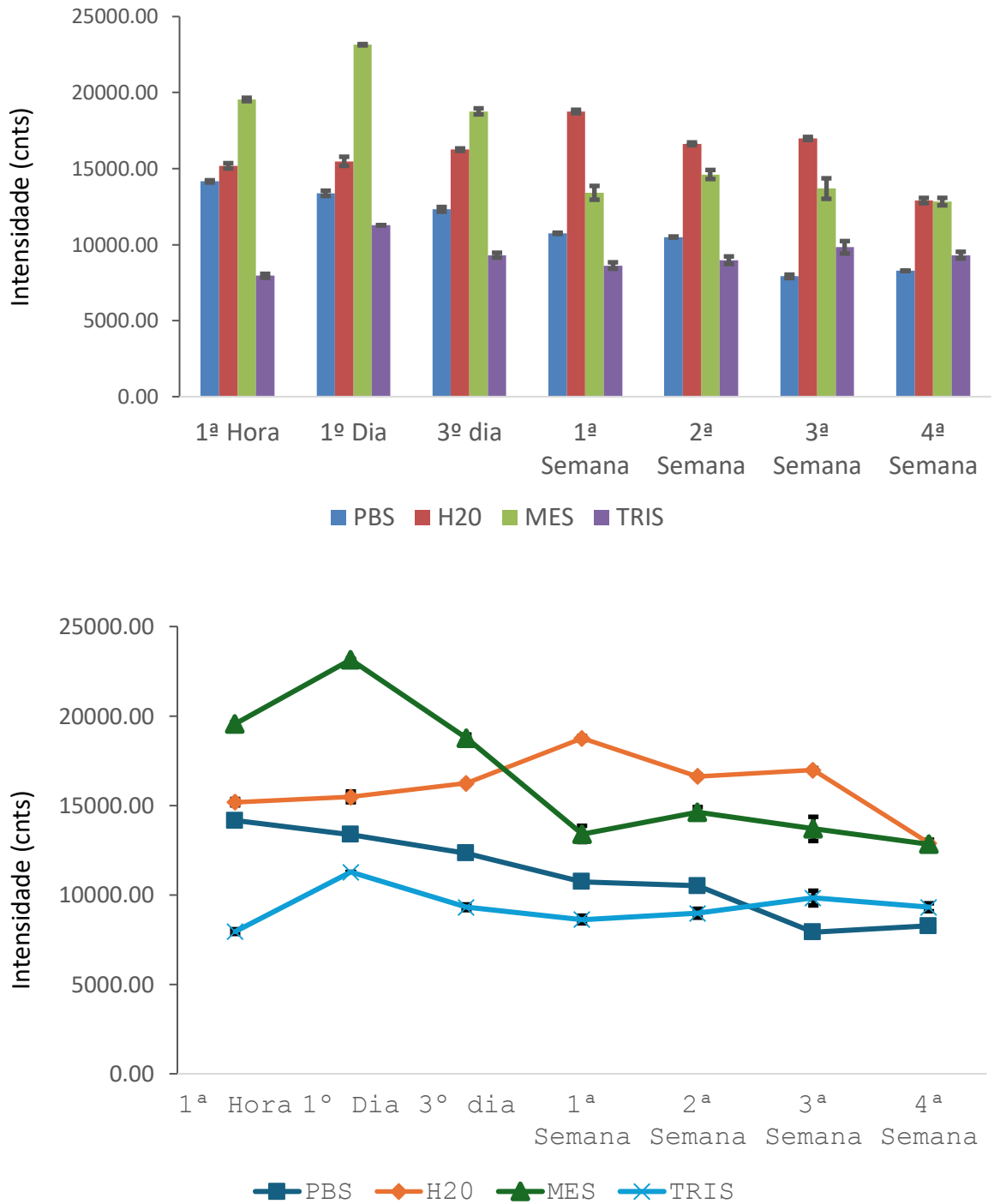


Figura 22- Estudos de estabilidade de suspensões de PQs de CdTe@MPA a 5 mg mL⁻¹, em PBS, MES e TRIS, meios tampão com 0,01 M de força iônica e em água ultrapura a pH 5,6.

4.1.3. Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura nas propriedades de uma suspensão de PQs de CdTe@MPA, a 5 mg mL^{-1} em PBS 0,01 M pH 7,4, foi investigado no intervalo de 23 a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Este estudo visa avaliar se variações de temperatura podem comprometer o desempenho dos sensores biomiméticos. Alterações térmicas podem influenciar as propriedades óticas dos PQs, como a intensidade e o comprimento de onda de emissão, devido a mudanças na estrutura eletrônica e possíveis efeitos de confinamento quântico. Compreender esses efeitos é essencial para garantir a confiabilidade dos sensores em diferentes condições térmicas.

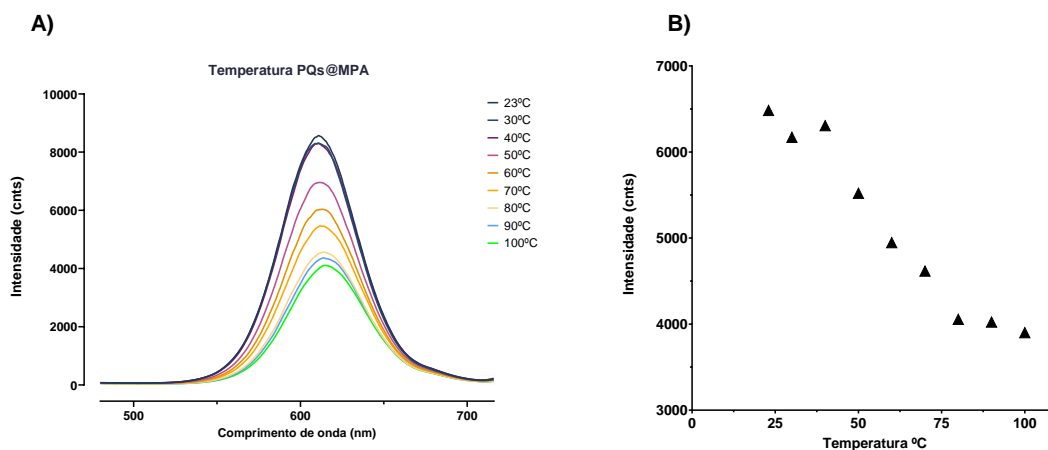


Figura 23- Efeito da temperatura nas suspensões de PQs CdTe@MPA, em PBS 0,01 M pH 7,4. (B) Valores médios de intensidade para cada valor de temperatura registrado.

A análise da Figura 23 revela que, apesar da ampla faixa de temperaturas estudada, a intensidade de fluorescência dos PQs varia, inclusive na faixa biofísica de 25 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Essas variações indicam a importância de manter uma temperatura estável durante a preparação do sensor, minimizando flutuações térmicas que possam comprometer o seu desempenho. Alterações na temperatura podem influenciar as propriedades óticas dos PQs, afetando a precisão e a confiabilidade dos sensores biomiméticos desenvolvidos neste trabalho.

4.1.4. Efeito da Diluição

A Figura 24 ilustra o efeito da diluição de uma suspensão inicial de PQs a 5 mg mL^{-1} em PBS, através da adição de volumes de tampão correspondentes aos padrões utilizados numa calibração. Calcularam-se os respectivos erros e o desvio padrão relativo (RSD, %, $S/N=3$).

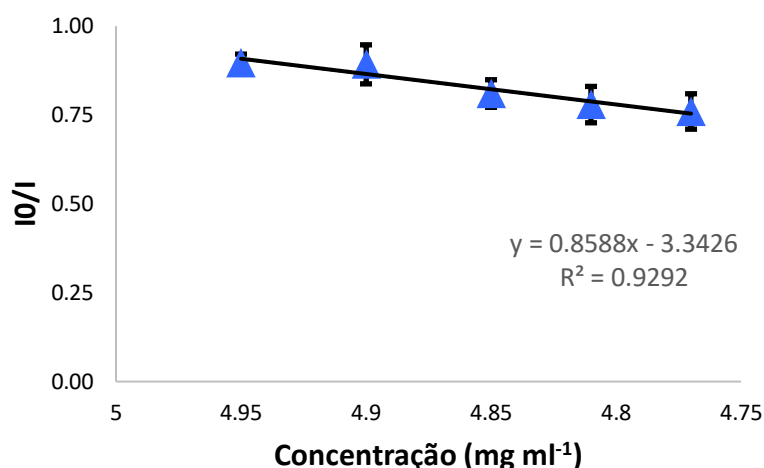


Figura 24- Efeito da diluição de uma suspensão de PQs a 5 mg mL⁻¹ pela adição de um volume equivalente de PBS, correspondente ao volume do padrão utilizado para a calibração e a diminuição da intensidade relativa de fluorescência (I₀/I)

Observou-se uma redução de aproximadamente $17,2 \pm 1,45\%$ na intensidade de fluorescência da suspensão de pontos quânticos (PQs) durante a sua diluição em PBS (Figura 24). Este efeito de diluição das suspensões de PQs também está presente nos estudos de calibração dos MIPs e dos seus controlos NIP@PQs com a proteína MMP7.

4.2. Caracterização dos MIP@PQs

A impressão à superfície dos PQs de CdTe@MPA foi escolhida como a melhor abordagem neste trabalho para a produção de MIPs, para garantir que as cavidades impressas permanecessem em contacto próximo com a superfície dos PQs, o que é fundamental para minimizar efeitos de resposta não específica dos PQs a outras moléculas interferentes e desta forma contribuir para uma maior afinidade e especificidade de ligação à molécula alvo MMP7. Utilizou-se a técnica de polimerização radicalar livre para a síntese dos sensores biomiméticos MIP@PQs e dos seus controlos não impressos, os NIP@PQs. Durante o processo de polimerização, foi necessário ajustar alguns parâmetros para controlar o crescimento do polímero e evitar o aprisionamento das moléculas-alvo dentro da matriz polimérica. Os ajustes incluíram o tempo de polimerização, as concentrações de iniciador e catalisador e as concentrações de monómero e agente reticulante.

4.2.1. Análise espectral de UV-Vis

Foram registados os espetros de absorção UV-Vis das suspensões dos PQs a 5 mg mL⁻¹ e das suspensões dos MIP@PQs e dos seus controlos, em PBS 0,01 M pH 7,4 (Figura 25). A monitorização da remoção da MMP7 dos polímeros impressos foi realizada através da leitura UV-Vis dos sobrenadantes, uma vez que o acompanhamento gráfico das suspensões se revelou inconclusivo devido ao carácter contínuo de absorção dos PQs nesta zona de c.d.o. e à própria opacidade da suspensão polimérica (Figura 25, linha laranja contínua).

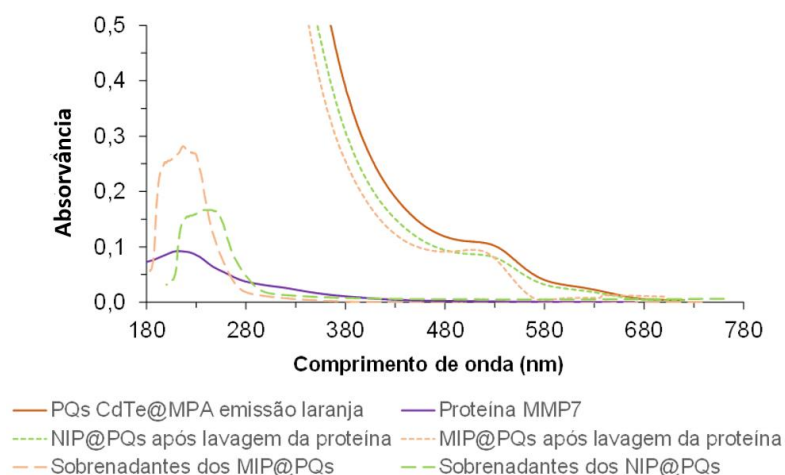


Figura 25- Espectro UV-Vis de uma suspensão de PQs CdTe@MPA a 5 mg mL^{-1} (linha laranja contínua), de uma solução de proteína MMP7 a 1 ug mL^{-1} (linha roxa contínua), de uma suspensão de MIP@PQs (linha amarela tracejado fino) e dos seus controlos NIP@PQs (linha verde tracejado fino), após lavagem com tampão carbonato/bicarbonato pH 9,2, dos sobrenadantes dos MIP@PQs (linha laranja tracejado grosso) e dos seus controlos NIP@PQs (linha verde tracejado grosso), após ressuspensão em PBS 0,01 M pH 7,4.

Na Figura 25, observa-se igualmente um pico máximo de absorção da proteína por volta dos 230 nm (Figura 25, linha roxa contínua), o qual se seguiu nas soluções dos sobrenadantes dos MIP@PQs até ao seu desaparecimento, indicando a remoção da proteína dos mesmos (Figura 25, linha laranja tracejado grosso).

4.2.2. Ajuste das condições de impressão do biomarcador

Durante o procedimento de impressão, utilizou-se uma concentração de MMP7 a $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e testou-se a polimerização por FRP após 30 minutos (Figura 26). Observa-se após a impressão que a intensidade de fluorescência dos MIP@PQs diminui em relação aos seus controlos não impressos NIP@PQs, evidenciando o efeito da presença da proteína na polimerização (Figura 26, curva polimerização).

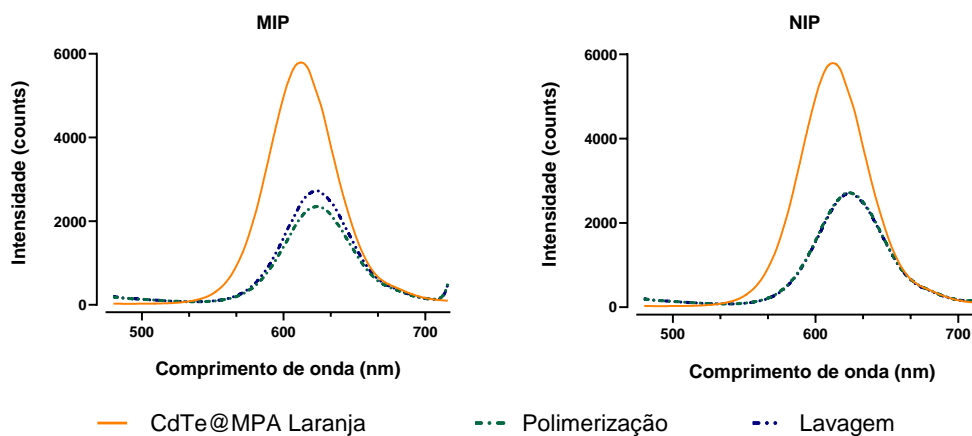


Figura 26-Emissão de fluorescência obtida durante a síntese dos sensores biomiméticos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs em PBS 0,01 M pH 7,4, para uma impressão de MMP7 a 1 mg/mL e 30 minutos de polimerização.

Após a remoção da proteína dos MIP@PQs, observa-se um ligeiro aumento na intensidade de fluorescência, o que não ocorre nos NIP@PQs (Figura 26, curva de lavagem). Este fenómeno pode ser atribuído ao facto de que a impressão da proteína na superfície dos PQs aumenta a interação com as cavidades de reconhecimento impressas, facilitando uma interação direta e eficiente entre os sítios de impressão e a molécula molde, devido à maior acessibilidade dessas áreas. Além disso, essa abordagem proporciona uma interação mais rápida com a molécula molde. Na impressão em *bulk*, os sítios de reconhecimento podem ser distribuídos por todo o volume do polímero de forma aleatória, incluindo regiões internas de difícil acesso. Como resultado, a molécula alvo pode ficar "aprisionada" dentro da matriz polimérica, o que não apenas dificulta sua remoção, mas também compromete a eficiência de reutilização do material impresso.

4.2.3. Ajuste das condições de polimerização

Com o objetivo de garantir uma melhor qualidade e sensibilidade ao sensor biomimético, foram ajustados os fatores que podem influenciar a polimerização por FRP, usada na síntese dos MIP@PQs, como as concentrações do monómero (AAM) e do agente reticulante (MBA), com ênfase na razão entre eles, como se mostra na Tabela 4. Estas razões foram também testadas para três tempos de polimerização, 30 minutos, 1 hora e 2 horas (Figura 27).

Tabela 4 - Concentrações utilizadas e correspondentes razões de monómero e crosslinker usadas na polimerização FRP.

Monómero: reticulante	1:1	1:5
AAM	1×10^{-5} M	1×10^{-5} M
MBA	1×10^{-5} M	5×10^{-5} M

Nos gráficos da Figura 27, mostram-se os efeitos das diferentes razões de (monómero: reticulante) sobre a intensidade de fluorescência dos MIP@PQs, para três tempos de polimerização (30 minutos, 1 hora e 2 horas).

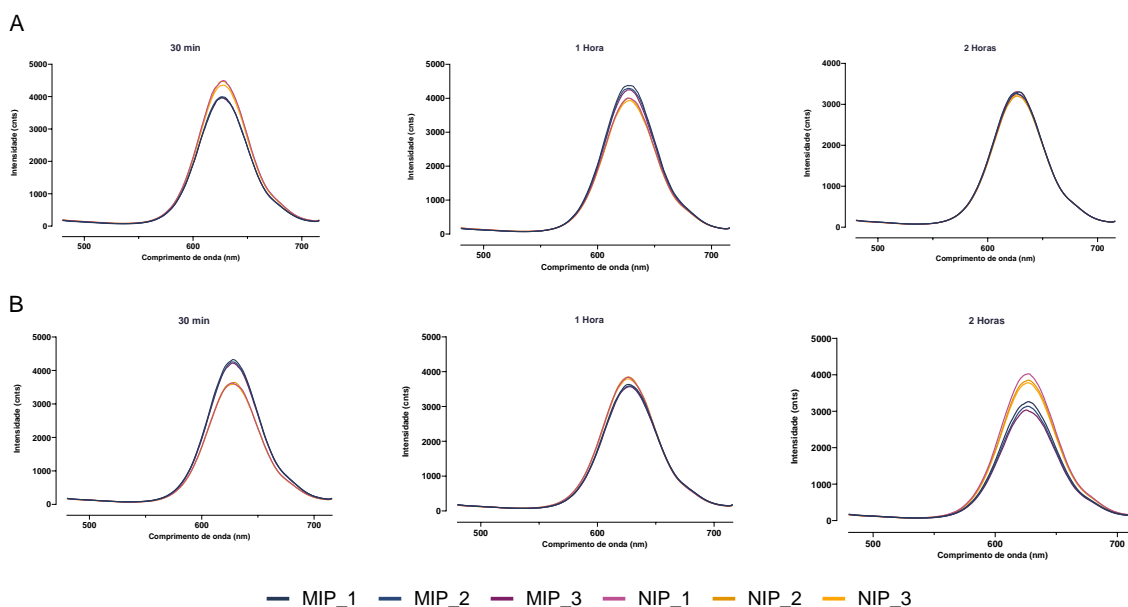


Figura 27- Efeito das razões (monômero: reticulante) usadas na síntese dos MIP@PQs por FRP em PBS 0,01 M pH 7,4, para diferentes tempos de polimerização. Razão (monômero:reticulante) (1:1) (A); razão (monômero:reticulante) (1:5) (B).

Da análise dos gráficos da Figura 27, verifica-se que a razão (1:5) proporciona uma maior intensidade de fluorescência para os MIP@PQs comparativamente aos NIP@PQs, para o tempo de polimerização de 2 horas. Já na razão (1:1), o aumento do tempo de polimerização para 2 horas desfavorece esta tendência. Os resultados indicam que a razão (1:5), combinada com um tempo de polimerização de 2 horas, proporciona a melhor condição de polimerização da proteína-alvo MMP7 nos MIP@PQs, uma vez que a diferença de fluorescência entre os MIPs e os NIPs é mais acentuada. Dessa forma, essa condição foi escolhida para a síntese dos MIP@PQs.

4.2.4. Ajuste das condições de lavagem

As condições de lavagem dos MIP@PQs foram ajustadas após a etapa de polimerização, com o objetivo de avaliar se este processo melhorava a remoção da proteína das cavidades e facilitava a desaglomeração de possíveis agregados de PQs na matriz polimérica (Figura 28A). Conforme se mostra na Figura 28A, a sonicação por 10 minutos não foi eficaz, pois levou a uma redução na fluorescência dos MIP@PQs em comparação com os NIP@PQs. Em contrapartida, a sonicação por 30 minutos aumentou a fluorescência dos MIP@PQs em relação aos polímeros não impressos. Estes resultados indicam que a combinação de lavagem com tampão carbonato/bicarbonato por 24 horas, seguida de sonicação por 30 minutos, proporciona uma remoção mais eficiente da proteína MMP7 das cavidades impressas, estabelecendo-se como a condição ideal para o processo de lavagem.

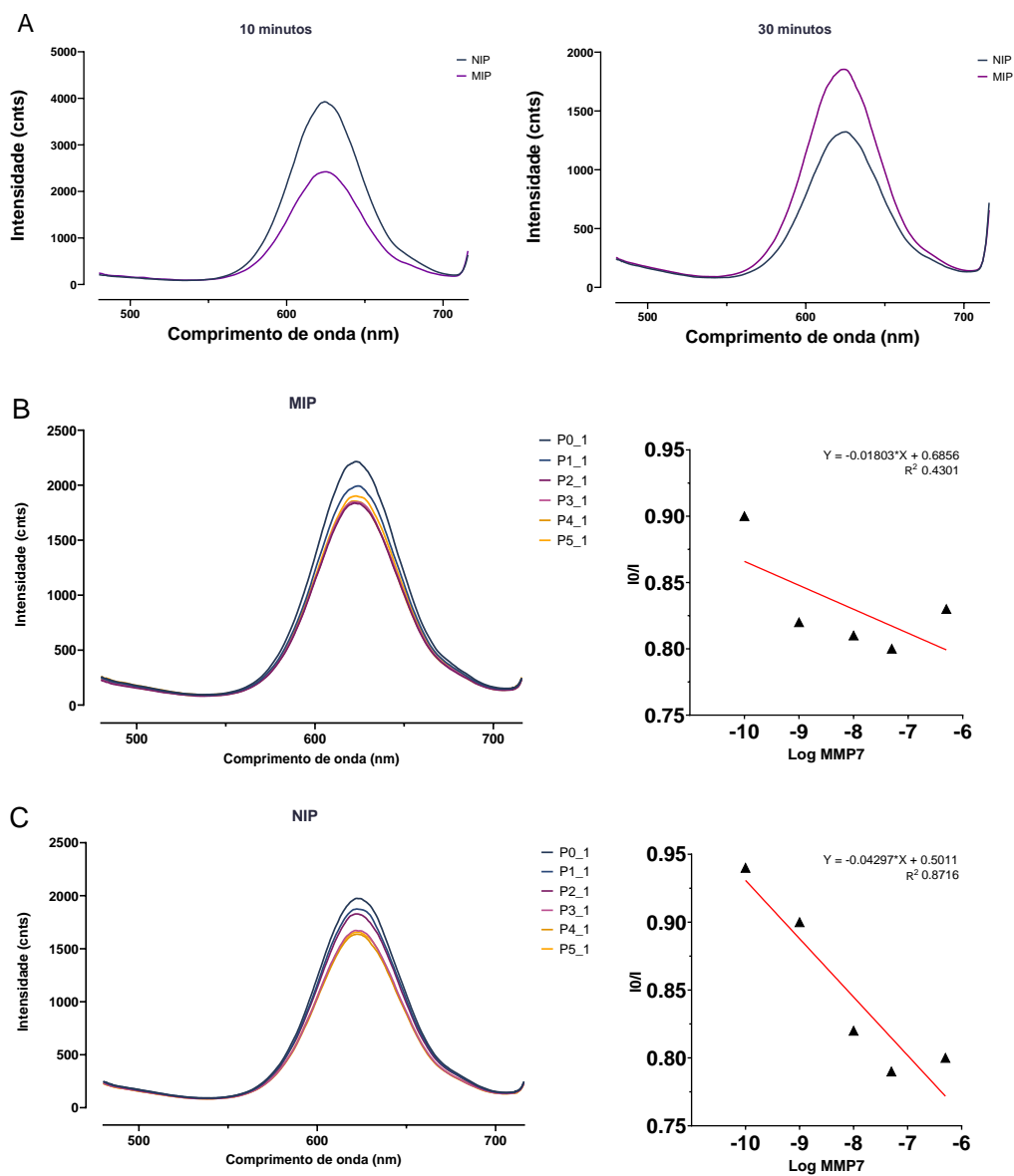


Figura 28- Ajuste das condições de lavagem dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs.

A redução do ciclo de lavagem para 6 horas não resulta em boas curvas de calibração para os MIP@PQs, conforme se mostra na Figura 28B, nem para os controlos NIP@PQs, apresentados na Figura 28C.

4.3. Análise estrutural dos PQs de CdTe@MPA

4.3.1. Análise FTIR

Foram adquiridos os espectros de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) dos polímeros molecularmente impressos MIP@PQs, dos correspondentes controlos, NIP@PQs e dos CdTe@MPA sintetizados neste trabalho para analisar e identificar os grupos funcionais e comparar diferenças estruturais entre os materiais (Figura 29). Esta análise é crucial para compreender a composição química de cada material, avaliar a eficácia da impressão nos MIPs e determinar a extensão da polimerização e avaliar a eficácia do processo de lavagem utilizado para a remoção da proteína da matriz polimérica. Os espectros FTIR dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs mostram bandas de absorção largas a $3332,81\text{ cm}^{-1}$ (MIPs) e a $3322,87\text{ cm}^{-1}$ (NIPs), que são atribuídas a vibrações de estiramento O-H de grupos hidroxilo ou estiramento N-H de amins ou amidas. Estes picos apontam para a presença de grupos funcionais de ligação de hidrogénio nos polímeros impressos e não impressos. A amostra dos PQs CdTe@MPA apresenta uma banda larga a $3315,10\text{ cm}^{-1}$, indicando o estiramento O-H de ácidos carboxílicos no agente de revestimento ou moléculas de água adsorvidas. O aparecimento uniforme destas bandas nos três materiais mostra a existência de grupos O-H ou N-H, que são necessários para as interações de ligação de hidrogénio nas redes de polímeros e na superfície dos pontos quânticos. Ambos espectros de MIP@PQs e de NIP@PQs mostram bandas de absorção significativas a $1714,46\text{ cm}^{-1}$ (MIPs) e $1714,21\text{ cm}^{-1}$ (NIPs), correspondentes às vibrações de estiramento de grupos carbonilo (C=O), que se encontram frequentemente em amidas. Estes grupos carbonilo derivam muito provavelmente de agentes de reticulação ou de moléculas modelo remanescentes em matrizes poliméricas. No entanto, este pico está visivelmente ausente dos espectros dos PQs CdTe@MPA. Este facto deve-se provavelmente à coordenação do grupo carboxilato no MPA com a superfície de CdTe, que transforma o grupo carbonilo livre num ião COO^- , removendo assim o sinal significativo de estiramento C=O habitualmente registado para ácidos carboxílicos livres.

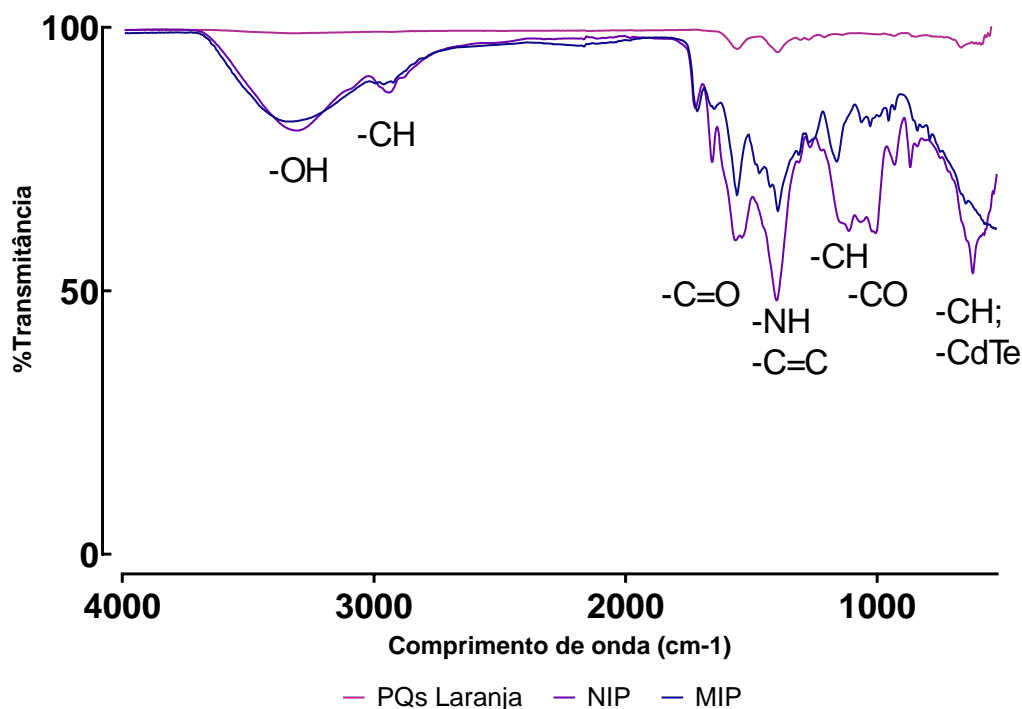


Figura 29- Espectros de FTIR de amostras dos PQs CdTe@MPA com emissão no laranja (linha violeta), dos MIP@PQs (linha azul-escura) e dos seus controlos NIP@PQs (linha roxa) após o passo da remoção da proteína.

As bandas de absorção a 1556,49 cm^{-1} (MIP@PQs) e 1552,81 cm^{-1} (NIP@PQs) são predominantemente devidas a vibrações de flexão N-H (amida II). A amostra dos PQs CdTe@MPA apresenta também uma banda de absorção a 1554,48 cm^{-1} , indicando um estiramento assimétrico do grupo COO-. Isto confirma a presença de iões carboxilato desprotonados em coordenação com os pontos quânticos de CdTe. Apresenta ainda um estiramento simétrico do grupo COO- a 1394,85 cm^{-1} , o que é observado de forma semelhante nos espectros dos MIPs (1393,92 cm^{-1}) e dos NIPs (1394,05 cm^{-1}). Enquanto nos PQs este estiramento assimétrico está relacionado com a ligação do MPA aos pontos quânticos, nos MIPs e nos NIPs, derivam provavelmente de cadeias laterais de amidas no polímero. Ambos os espectros MIP@PQs e NIP@PQs mostram vibrações de estiramento C-O a 1271,29 cm^{-1} e 1270,01 cm^{-1} , do grupo carbonilo na forma amida na matriz polimérica. Estes grupos funcionais são necessários para a reação de ligação cruzada no polímero. Os espectros dos PQs CdTe@MPA mostram uma banda de absorção comparável a 1271,59 cm^{-1} , indicando o estiramento C-O do grupo carboxilo do MPA. Os picos a 953,85 cm^{-1} no espectro dos MIP@PQs e 954,91 cm^{-1} no espectro dos NIP@PQs indicam vibrações de flexão C-H fora do plano. Estes picos indicam a presença de grupos vinílicos na matriz polimérica, que ajudam a manter a integridade estrutural e funcionalidade dos dois polímeros preparados. Os espectros dos PQs CdTeMPA revelam um pico a 932,00 cm^{-1} , indicando a flexão C-H nas cadeias alifáticas do agente de funcionalização MPA. Embora a posição da banda de flexão C-H no espectro dos PQs varie significativamente, confirma a existência de grupos alifáticos nas três amostras, embora em configurações estruturais diferentes. São igualmente visíveis nestes espectros as bandas de absorção a 583,10 cm^{-1} e 664,46 cm^{-1} , que correspondem a vibrações de estiramento do Cd-S. Estas bandas já não estão visíveis nos espectros dos MIPs e dos NIPs. A existência de estiramento Cd-S na amostra dos PQs demonstra que os pontos quânticos foram cobertos com sucesso com MPA,

indicando que o grupo tiol (-SH) do MPA formou uma ligação estável com os átomos de cádmio nos pontos quânticos.

4.3.2. Análise SEM e EDS

Foram obtidas as imagens de SEM e a respetiva análise EDS, de suspensões de PQs CdTe@MPA, dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs em PBS, após o passo da remoção da proteína, como se mostra na Figura 30.

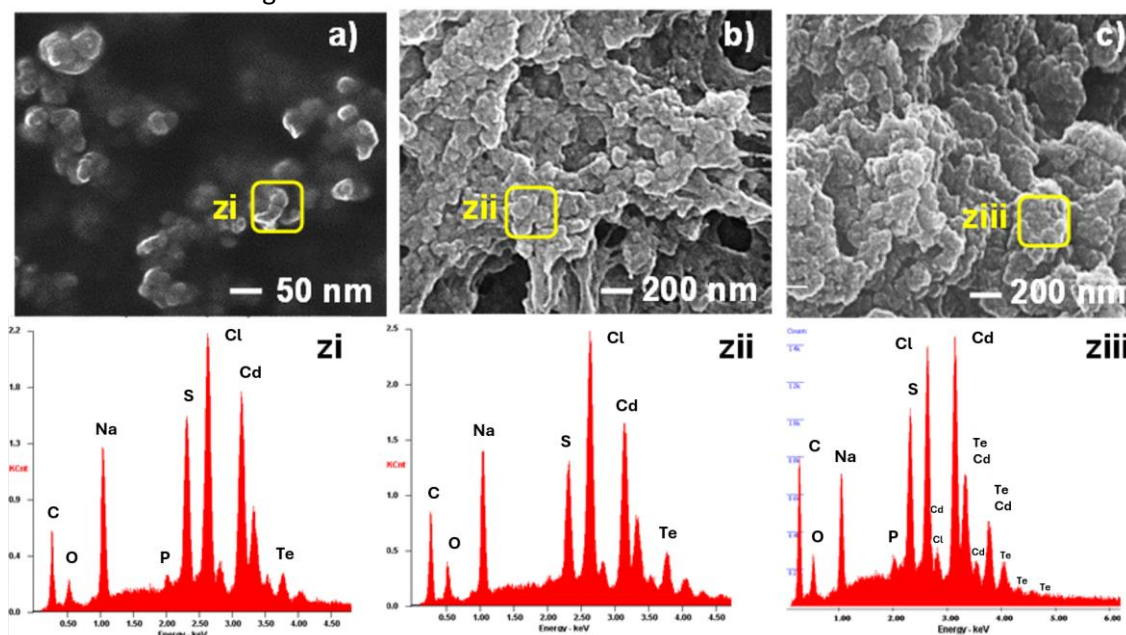


Figura 30- Espetros de SEM e respetiva análise EDS, de suspensões de PQs CdTe@MPA com emissão no laranja a) e zi); dos MIP@PQs b) e zii); e dos seus controlos não impressos NIP@PQs c) e ziii), após remoção da proteína.

De acordo com as imagens de SEM, os PQs de CdTeMPA apresentam-se como aglomerados com um tamanho médio aproximado de 50 nm (Figura 30a). Tanto os materiais poliméricos MIP@PQs (Figura 30b) quanto NIP@PQs (Figura 30c) apresentam um diâmetro médio maior devido ao crescimento do polímero. No entanto essa diferença de tamanho torna-se pouco perceptível entre MIPs e NIPs. A análise por EDS mostrou que os elementos carbono, oxigénio, cádmio e telúrio estão dispersos pela superfície do polímero. Além disso, essa análise revelou que o elemento carbono é encontrado em menores quantidades nos polímeros impressos, provavelmente pela presença de uma estrutura menos densa como resultado da remoção da proteína (Figura 30, zii). Adicionalmente, os polímeros impressos MIP@PQs apresentam uma maior contagem do elemento oxigénio comparativamente com os seus controlos NIP@PQs (Figura 30, ziii), o que pode ser atribuído a resíduos de proteína que tenham ficado retidos na matriz polimérica. As zonas mais brilhantes das imagens de SEM correspondem a materiais com maior número atómico e por isso associados aos PQs. Como os pontos quânticos estão conjugados com os MIPs, as zonas mais a cinzento poderão corresponder a elementos de número atómico mais baixo e por isso às zonas de material polimérico (Figura 30, zii). Todas as análises de EDS mostram que os elementos cádmio e enxofre estão presentes nos MIPs@PQs (Figura 30, zii), nos seus controlos NIP@PQs (Figura 30, ziii) e nos PQs CdTe@MPA (Figura 30, zi).

4.4. Calibração dos MIP@PQs

O desempenho dos MIP@PQs, dos seus controlos NIP@PQs e dos PQs de CdTe@MPA foi avaliado na presença da proteína alvo MMP7 em PBS e em soro a 1% em PBS. Utilizou-se o método da curva de calibração para expressar a relação entre o sinal ótico dos materiais impressos e a concentração de MMP7 em solução.

4.4.1. Calibração em PBS

Registou-se o sinal de fluorescência dos MIP@PQs preparados por impressão em superfície de MMP7 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS, com uma concentração de 2 mg mL^{-1} (Figura 31). A Figura 31A apresenta as curvas de calibração obtidas após 10 minutos de incubação com cada padrão de MMP7. A Tabela 5 apresenta os dados analíticos, que foram analisados utilizando a equação de Stern-Volmer (1). Aqui, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença da proteína MMP7, respetivamente, k_{SV} é a constante de Stern-Volmer, e $[Q]$ é a concentração da proteína MMP7 carregada na suspensão. Os MIP@PQs apresentaram uma correlação linear na extinção da fluorescência (F/F_0) tal como se verifica na Figura 31A. O fator de impressão (IF) é determinado pela acessibilidade do local da substância a analisar e pela resistência à transferência de massa através da matriz polimérica. Já as calibrações com nanopartículas de PQs, não revelaram a mesma diminuição do sinal de fluorescência com concentrações crescentes de MMP7 em PBS no mesmo intervalo de concentração (Figura 31C).

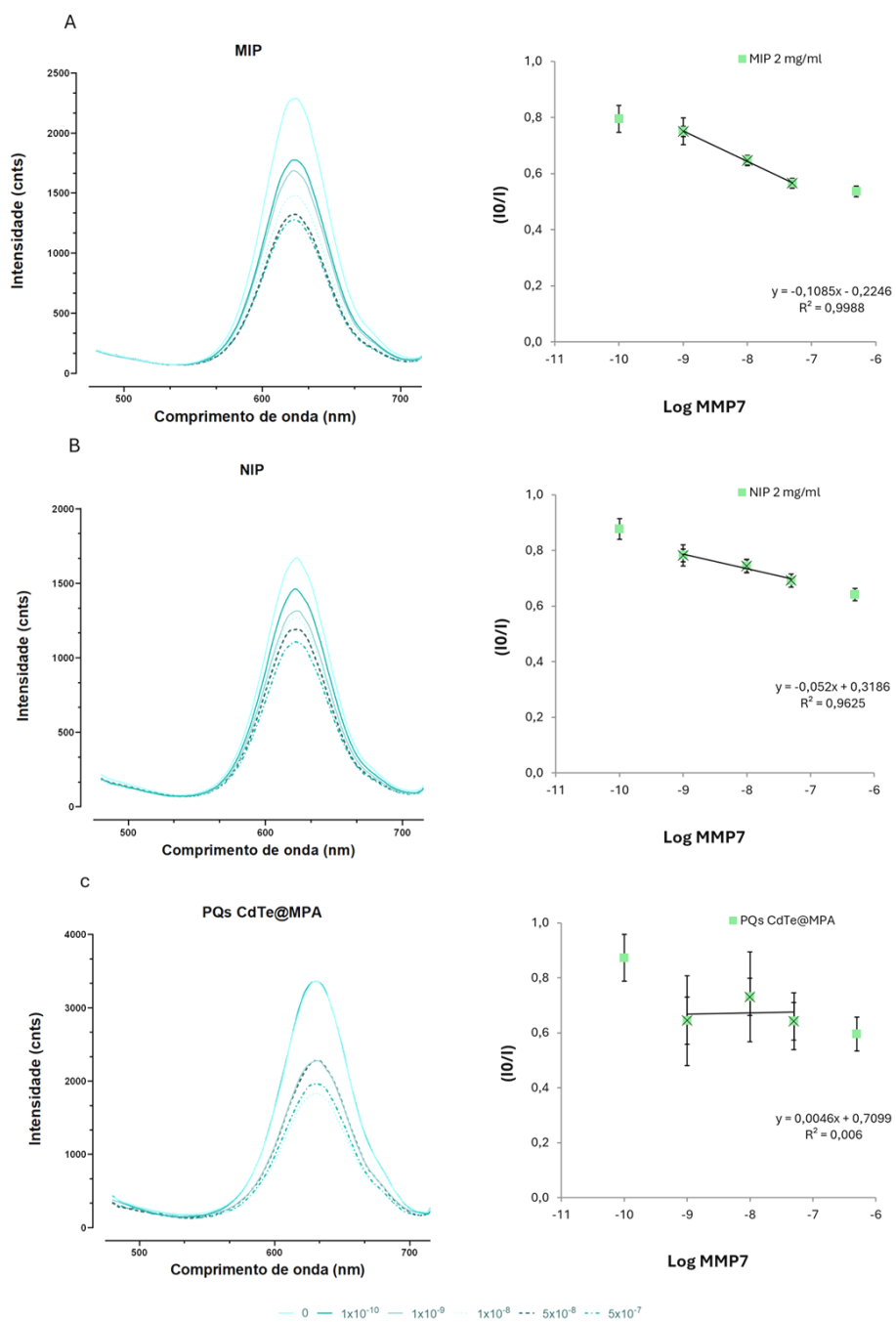


Figura 31-Espetros de emissão de fluorescência dos MIP@PQs (A) e dos seus controlos NIP@PQs (B), após calibrações com padrões de MMP7 em PBS 0,01M, pH 7,4. Os MIP@PQs foram previamente preparados por impressão em superfície de MMP7 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS, com uma concentração de 2 mg mL^{-1} .

Tabela 5- Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, k_{sv} e IF, para as calibrações dos MIP@PQs, dos seus controlos e dos PQs com emissão na região laranja, a 2 mg mL⁻¹, com MMP7 no intervalo de concentrações [0,1 a 500] g mL⁻¹ em PBS 0,01 M, pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Dados	PQs	MIP@PQs	NIP@PQs
LR (ng ml ⁻¹)	[1,0 – 50,0]	[1,0 - 50,0]	[1,00 - 50,0]
LOD (ng ml ⁻¹)	344	0,93	5,30
k_{sv}	0,0046	-0,108	-0,0520
IF	-----	2,09	-----

Os MIP@PQs preparados a 2 mg mL⁻¹ apresentaram a melhor resposta analítica ($k_{sv} = 0,108$, Figura 31A, Tabela 5) em comparação com os NIP@PQs ($k_{sv} = 0,0520$, Figura 31B) e com os PQs ($k_{sv} = 0,0046$, Figura 31C). Os MIP@PQs atingiram um LOD superior de 0,93 ng mL⁻¹ (S/N=3) e um IF de 2,09 (Tabela 5). O intervalo de linearidade (do inglês: *Linear range*, LR) situou-se entre 0,1 e 50 ng mL⁻¹, sendo este valor inferior ao valor de corte da MMP7 associado ao cancro pancreático (superior a 5 ng mL⁻¹).

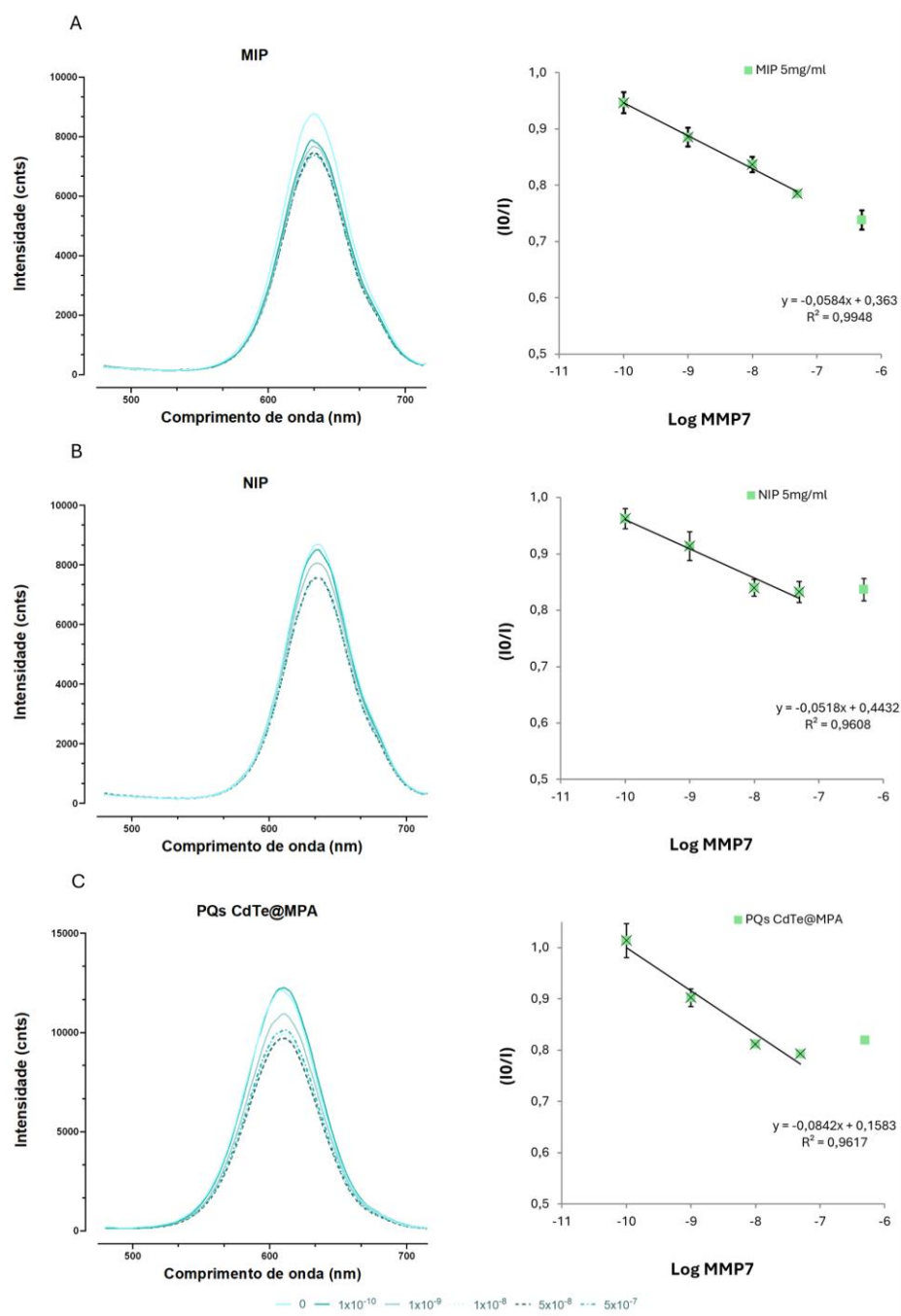


Figura 32- Espectros de emissão de fluorescência dos MIP@PQs (A) e dos seus controlos NIP@PQs (B), após calibrações com padrões de MMP7 em PBS 0,01M, pH 7,4. Os MIP@PQs foram previamente preparados por impressão em superfície de MMP7 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS, com uma concentração de 5 mg mL^{-1} .

Tabela 6- Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, k_{sv} e IF, para as calibrações dos MIP@PQs, dos seus controlos e dos PQs com emissão na região laranja, a 5 mg mL⁻¹, com MMP7 no intervalo de concentrações [0,1 a 500] ng mL⁻¹ em PBS 0,01 M, pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Dados	PQs	MIP@PQs	NIP@PQs
LR (ng ml ⁻¹)	[0,10 - 50,0]	[0,10 - 50,0]	[0,10 - 50,0]
LOD (ng ml ⁻¹)	4,02	1,46	4,07
k_{sv}	-0,0842	-0,0584	-0,0518
IF	-----	1,13	-----

Os MIP@PQs preparados a 5 mg mL⁻¹ comparativamente com os preparados a 2 mg mL⁻¹, apresentaram um desempenho analítico inferior ($k_{sv} = 0,0584$, Figura 32A, Tabela 6). Observou-se o mesmo efeito nos controlos NIP@PQs ($k_{sv} = 0,0518$, Figura 32B) e nos PQs ($k_{sv} = 0,0842$, Figura 32C). Além disso, os MIP@PQs preparados a 5 mg mL⁻¹, pioraram o seu LOD para 1,46 ng mL⁻¹ (S/N=3) e diminuíram o seu valor de IF para 1,13 (Tabela 6). A faixa de linearidade manteve-se para os MIP@PQs preparados a 5 mg mL⁻¹, entre 0,1 e 50 ng mL⁻¹.

4.4.2. Calibração em Soro

Este estudo oferece uma visão concisa do que ocorreria num cenário real, onde proteínas adicionais estão presentes no soro humano. Para isso, utilizou-se o soro Cormay HN, um soro humano liofilizado destinado ao controle de qualidade rotineiro de constituintes inorgânicos, orgânicos e enzimáticos, geralmente dentro da faixa normal. Para evitar que o sinal de fluorescência dos PQs fosse significativamente atenuado, o soro foi diluído 100 vezes em PBS 0,01 M, pH 7,4. Considerando a melhor resposta analítica dos MIP@PQs preparados a 2 mg mL⁻¹, as calibrações em soro diluído a 1% em PBS foram realizadas com essa concentração.

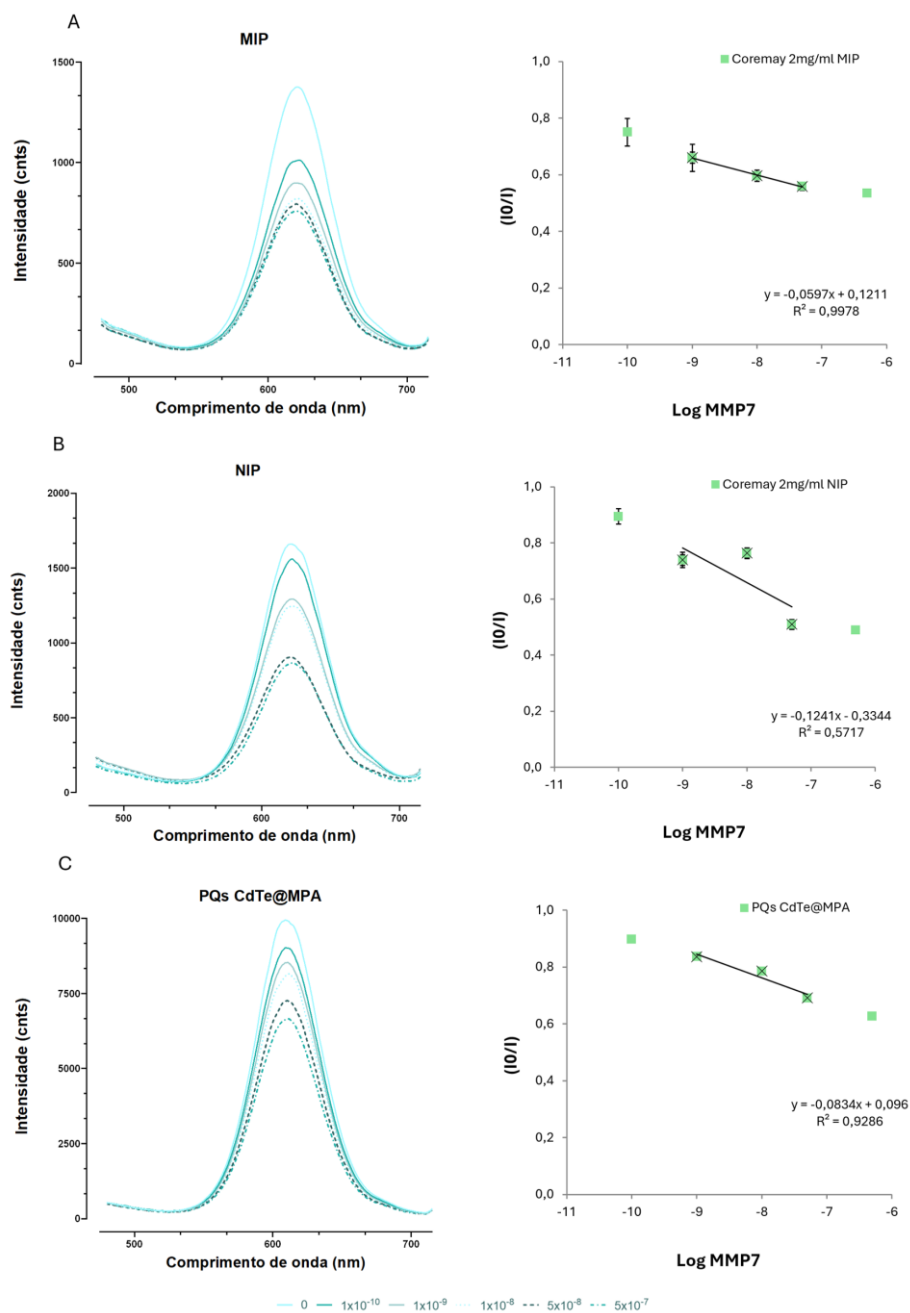


Figura 33- Espectros de emissão de fluorescência dos MIP@PQs (A) e dos seus controlos NIP@PQs (B), após calibrações com padrões de MMP7 em soro humano diluído a 100 vezes. Os MIP@PQs foram previamente preparados por impressão em superfície de MMP7 a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS, com uma concentração de 2 mg mL^{-1} .

Tabela 7- Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, ksv e IF, para as calibrações dos MIP@PQs, dos seus controlos e dos PQs com emissão na região laranja, a 2 mg mL⁻¹, com MMP7 no intervalo de concentrações [0,1 a 500] ng mL⁻¹ em soro humano diluído a 100 vezes em PBS 0,01 M, pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

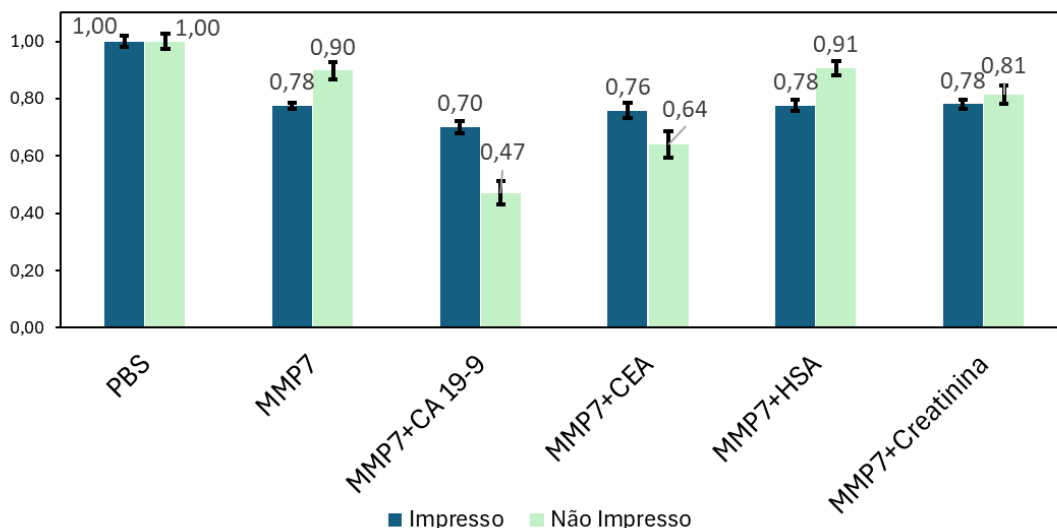
Dados	PQs	MIP@PQs	NIP@PQs
LR (ng ml ⁻¹)	[1,0 - 50,0]	[1,0 - 50,0]	[1,0 - 50,0]
LOD (ng ml ⁻¹)	7,44	1,26	23,2
ksv	-0.0834	-0,0597	-0,124
IF	-----	0.4813	-----

Nas calibrações em soro, os MIP@PQs pioraram a sua resposta analítica ($k_{sv} = 0,0597$, Figura 33A) em comparação com os NIP@PQs ($k_{sv} = 0,124$, Figura 33B) e com os PQs ($k_{sv} = 0,0834$, Figura 33C). De facto, os MIP@PQs diminuíram o seu LOD para 1,26 ng mL⁻¹ (S/N=3) e atendendo a que não se verificou uma correlação linear dos NIP@PQs em função da concentração de MMP7 em soro, não foi possível calcular o valor de IF neste meio. Também se verificou uma diminuição do intervalo de linearidade dos MIP@PQs neste meio entre 1 e 50 ng mL⁻¹, (Figure 33A, Tabela 7).

4.5. Estudos de seletividade dos MIP@PQs

Nos estudos de seletividade, tomou-se como referência o sinal de fluorescência dos MIP@PQs na presença do padrão P3 de MMP7 a 10 ng mL^{-1} . Normalizaram-se os valores dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs na ausência de MMP7, de modo que todos os valores apresentados na Figura 34 são comparados a esse referencial normalizado.

A)



B)

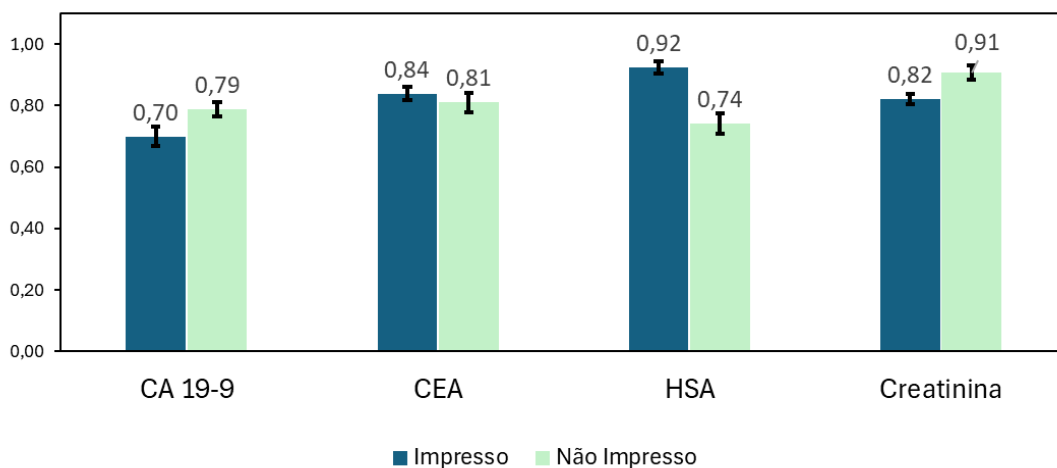


Figura 34 – Estudos de seletividade dos MIP@PQs e dos seus controlos NIP@PQs, na presença de MMP7 a 10 ng mL^{-1} (A) e na ausência de MMP7 (B), para quatro interferentes, CA 19-9 a 10 U mL^{-1} , CEA a 4 ng mL^{-1} , creatinina a $0,06 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e HSA a $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, em PBS $0,01 \text{ M pH } 7,4$.

Da análise da Figura 34A, a presença de MMP7 isoladamente, faz diminuir a intensidade de fluorescência dos MIP@PQs em $(21,8 \pm 1,92) \%$. Na presença conjunta com CA19-9, verifica-se que a perda de sinal dos MIP@PQs é intensificada $(30,1 \pm 1,02) \%$, já a CEA, causa uma perda de sinal de $(24,1 \pm 1,62) \%$, e a HSA e a creatinina causam uma perda semelhante $(22,3 \pm 1,52) \%$ e $(22,5 \pm 1,63) \%$, respetivamente. Dado que o maior decréscimo de fluorescência dos MIP@PQs

ocorre na presença isolada da molécula alvo MMP7, estes resultados são indicativos de que os MIP@PQs têm maior seletividade para a proteína MMP7, mesmo na presença de outros interferentes. Esta suposição foi reforçada num outro estudo de seletividade, onde se avaliou a presença de cada interferente isoladamente, como se mostra na Figura 34B. Da análise desta Figura verifica-se que a exposição dos MIP@PQs à CA19-9 resultou numa diminuição da fluorescência em $(30,2 \pm 1,42)$ %, um valor comparável à redução observada na presença conjunta com MMP7 $(30,1 \pm 1,02)$ %. O mesmo acontece com a CEA e com a creatinina, com uma perda de sinal menos drástica $(16,3 \pm 1,21)$ % e $(18,3 \pm 1,21)$ %, respetivamente, comparativamente à perda de sinal na presença de MMP7 $(24,1 \pm 1,62)$ % e $(22,5 \pm 1,63)$ %, respetivamente. Quando a HSA está presente isoladamente em PBS, observa-se uma redução na fluorescência dos MIP@PQs de $(8,01 \pm 1,33)$ %. No entanto, na presença conjunta com MMP7, a sua contribuição para a diminuição do sinal de fluorescência dos MIP@PQs é negligenciável. Em conclusão, os estudos de seletividade indicam que os sensores biomiméticos MIP@PQs desenvolvidos para a MMP7 são seletivos para esta proteína.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Neste capítulo, são apresentadas as conclusões finais do trabalho, assim como as suas considerações e estudos futuros.

5.1. Conclusões Finais

A detecção precoce do cancro do pâncreas é essencial devido à sua difícil identificação nas fases iniciais e à alta taxa de mortalidade associada. Diante dessas dificuldades, o desenvolvimento de sensores biomiméticos para detecção de biomarcadores tornou-se uma área promissora, destacando-se pela sensibilidade e baixo custo.

Nesta dissertação, foi desenvolvido um sensor biomimético MIP@PQs, para detetar o biomarcador MMP7, usado no tratamento e monitorização do cancro do pâncreas. A estratégia de impressão em superfície foi utilizada para criar cavidades de reconhecimento específico para a MMP7, facilitando a sua remoção da matriz polimérica e aprimorando a capacidade de reconhecimento do sensor biomimético desenvolvido, o qual apresentou alta sensibilidade e seletividade em PBS 0,01 M a pH 7,4, com boa reprodutibilidade e estabilidade fotoluminescente. A ampla faixa de detecção do biomarcador alvo em soro HN diluídas 100 vezes, demonstrou o potencial dos MIP@PQs como sondas sensíveis para detecção e monitorização do biomarcador MMP7 no cancro do pâncreas. Comparado com outros sensores, o sensor biomimético desenvolvido neste estudo apresentou, em soro humano a 1% em PBS, um intervalo de linearidade mais curto, de [1,00 a 50,0] ng mL⁻¹, e um limite de detecção (LOD) de 1,26 ng mL⁻¹, inferior aos valores reportados na literatura (entradas 1 e 3 da Tabela 1). Estratégias para melhorar estes parâmetros analíticos estão previstas em trabalhos futuros, visando otimizar a resposta analítica dos MIP@PQs ao biomarcador alvo, MMP7.

5.2. Perspetivas futuras

No futuro seria interessante testar o sensor em amostras reais e desenvolver um modelo portátil e que não recorra a equipamentos dispendiosos. Este sensor conseguiria chegar a diferentes regiões e apoiar toda a população. Isto permitiria às equipas de saúde utilizar o dispositivo para monitorizar os pacientes com esta doença a nível local. Esta abordagem da patologia num contexto de prevenção de recidivas, diminuiria o custo dos cuidados de saúde em fases avançadas da doença levando a uma diminuição dos gastos de monitorização e aumentando ao mesmo tempo a eficácia dos tratamentos e consequentemente o aumento da sobrevida a 5 anos.

Referências

- (Abo Dena, Ali & El-Sherbiny 2020) Abo Dena, A, Ali, A & El-Sherbiny, I 2020, *Surface-Imprinted Polymers (SIPs): Advanced Materials for Bio-Recognition*, Journal of Advanced Materials, vol. 8, pp. 1–19
- (Bhalla et al. 2016) Bhalla, N, Jolly, P, Formisano, N & Estrela, P 2016, Introduction to Biosensors, *Essays in Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- (Bray et al. 2024) Bray, F, Laversanne, M, Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Soerjomataram, I & Jemal, A 2024, Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 74, no. 3, pp. 229–263, <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- (Buckley & O'Reilly 2024) Buckley, CW & O'Reilly, EM 2024, Next-Generation Therapies for Pancreatic Cancer, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 18, no. 1–3, pp. 55–72, <https://doi.org/10.1080/17474124.2024.2322648>
- (Chen, Zhang & Wang 2022) Chen, H, Zhang, H & Wang, Z 2022, A Ratiometric Fluorescent Probe Based on Peptide Modified MnFe₂O₄ Nanoparticles for Matrix Metalloproteinase-7 Activity Detection in Vitro and in Vivo, *The Analyst*, vol. 147, no. 8, pp. 1581–1588, <https://doi.org/10.1039/D2AN00212D>
- (Chen et al. 2016) Chen, L, Wang, X, Lu, W, Wu, X & Li, J 2016, Molecular Imprinting: Perspectives and Applications, *Chemical Society Reviews*, vol. 45, no. 8, pp. 2137–2211, <https://doi.org/10.1039/C6CS00061D>
- (Conroy et al. 2023) Conroy, T, Pfeiffer, P, Vilgrain, V, Lamarca, A, Seufferlein, T, O'Reilly, EM, Hackert, T, Golan, T, Prager, G, Haustermans, K, Vogel, A & Ducreux, M 2023, Pancreatic Cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for Diagnosis, Treatment and Follow-Up, *Annals of Oncology*, vol. 34, no. 11, pp. 987–1002, <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.08.009>
- (Cormack & Elorza 2004) Cormack, PAG & Elorza, AZ 2004, Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation, *Journal of Chromatography B*, vol. 804, no. 1, pp. 173–182, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>
- (Desai & Guddati 2023) Desai, S & Guddati, AK 2023, Carcinoembryonic Antigen, Carbohydrate Antigen 19-9, Cancer Antigen 125, Prostate-Specific Antigen and Other Cancer Markers: A Primer on Commonly Used Cancer Markers, *World Journal of Oncology*, vol. 14, no. 1, pp. 4–14, <https://doi.org/10.14740/wjon1425>
- (Despacho n.o 13227/2023) Despacho n.o 13227/2023, de 27 de Dezembro, Diário da República n.o 248/2023, Série II de 2023-12-27 51.
- (Eersels, Lieberzeit & Wagner 2016) Eersels, K, Lieberzeit, P & Wagner, P 2016, A Review on Synthetic Receptors for Bioparticle Detection Created by Surface-Imprinting Techniques—From Principles to Applications, *ACS Sensors*, vol. 1, no. 10, pp. 1171–1187, <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00572>
- (Eksin & Erdem 2023) Eksin, E & Erdem, A 2023, Recent Progress on Optical Biosensors Developed for Nucleic Acid Detection Related to Infectious Viral Diseases, *Micromachines*, vol. 14, no. 2, p. 295, <https://doi.org/10.3390/mi14020295>
- (Ertürk & Mattiasson 2017) Ertürk, G & Mattiasson, B 2017, Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors, *Sensors*, vol. 17, no. 2, p. 288, <https://doi.org/10.3390/s17020288>

- (Geng et al. 2024) Geng, L, Huang, J, Fang, M, Wang, H, Liu, J, Wang, G, Hu, M, Sun, J, Guo, Y & Sun, X 2024, Recent Progress of the Research of Metal-Organic Frameworks-Molecularly Imprinted Polymers (MOFs-MIPs) in Food Safety Detection Field, *Food Chemistry*, vol. 458, p. 140330, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140330>
- (Group 2018) Group, F-NBW 2018, Glossary, Food and Drug Administration (US), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338448>
- (Hong et al. 2023) Hong, T, Shen, X, Syeda, MZ, Zhang, Y, Sheng, H, Zhou, Y, Xu, J, Zhu, C, Li, H, Gu, Z & Tang, L 2023, Recent Advances of Bioresponsive Polymeric Nanomedicine for Cancer Therapy, *Nano Research*, vol. 16, no. 2, pp. 2660–2671, <https://doi.org/10.1007/s12274-022-5002-2>
- (Huang et al. 2020) Huang, L, Wang, J, Wang, Q, Tang, D & Lin, Y 2020, Distance-Dependent Visual Fluorescence Immunoassay on CdTe Quantum Dot-Impregnated Paper Through Silver Ion-Exchange Reaction, *Microchimica Acta*, vol. 187, no. 10, p. 563, <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04546-7>
- (Klein 2019) Klein, AP 2019, Pancreatic Cancer: A Growing Burden, *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, vol. 4, no. 12, pp. 895–896, [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30323-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30323-1)
- (Li et al. 2022) Li, M, Jiang, F, Xue, L, Peng, C, Shi, Z, Zhang, Z, Li, J, Pan, Y, Wang, X, Feng, C, Qiao, D, Chen, Z, Luo, Q & Chen, X 2022, Recent Progress in Biosensors for Detection of Tumor Biomarkers, *Molecules*, vol. 27, no. 21, p. 7327, <https://doi.org/10.3390/molecules27217327>
- (Li et al. 2020) Li, Y, Liu, W, Xu, Q, Hu, J & Zhang, C 2020, Construction of a Sensitive Protease Sensor with DNA-Peptide Conjugates for Single-Molecule Detection of Multiple Matrix Metalloproteinases, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 169, p. 112647, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112647>
- (Liang et al. 2019) Liang, J, Lin, G, Tian, J, Chen, J, Liang, R, Chen, Z, Deng, Q, Dong, Z, Liu, T & Wu, Y 2019, Measurement of Urinary Matrix Metalloproteinase-7 for Early Diagnosis of Acute Kidney Injury Based on an Ultrasensitive Immunomagnetic Microparticle-Based Time-Resolved Fluoroimmunoassay, *Clinica Chimica Acta*, vol. 490, pp. 55–62, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.037>
- (Lino et al. 2022) Lino, C, Barrias, S, Chaves, R, Adegas, F, Martins-Lopes, P & Fernandes, JR 2022, Biosensors as Diagnostic Tools in Clinical Applications, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1877, no. 3, p. 188726, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188726>
- (Luo et al. 2019) Luo, G, Fan, Z, Gong, Y, Jin, K, Yang, C, Cheng, H, Huang, D, Ni, Q, Liu, C & Yu, X 2019, Characteristics and Outcomes of Pancreatic Cancer by Histological Subtypes, *Pancreas*, vol. 48, no. 6, pp. 817–822, <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001338>
- (Mas et al. 2021) Mas, L, Lupinacci, RM, Cros, J, Bachet, J-B, Coulet, F & Svrcek, M 2021, Intraductal Papillary Mucinous Carcinoma Versus Conventional Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Comprehensive Review of Clinical-Pathological Features, Outcomes, and Molecular Insights, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 13, p. 6756, <https://doi.org/10.3390/ijms22136756>
- (Mummareddy et al. 2021) Mummareddy, S, Pradhan, S, Narasimhan, A & Natarajan, A 2021, On Demand Biosensors for Early Diagnosis of Cancer and Immune Checkpoints Blockade Therapy Monitoring from Liquid Biopsy, *Biosensors*, vol. 11, no. 12, p. 500, <https://doi.org/10.3390/bios11120500>
- (O'Neill & Stoita 2021) O'Neill, RS & Stoita, A 2021, Biomarkers in the Diagnosis of Pancreatic Cancer: Are We Closer to Finding the Golden Ticket?, *World Journal of*

- Gastroenterology, vol. 27, no. 26, pp. 4045–4087, <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i26.4045>
- (Partyka et al. 2023) artyka, O, Pajewska, M, Kwaśniewska, D, Czerw, A, Deptała, A, Budzik, M, Cipora, E, Gąska, I, Gazdowicz, L, Mielnik, A, Sygit, K, Sygit, M, Krzych-Fałta, E, Schneider-Matyka, D, Grochans, S, Cybulska, AM, Drobnik, J, Bandurska, E, Ciećko, W & Kozłowski, R 2023, Overview of Pancreatic Cancer Epidemiology in Europe and Recommendations for Screening in High-Risk Populations, *Cancers*, vol. 15, no. 14, p. 3634, <https://doi.org/10.3390/cancers15143634>
- (Peng et al. 2023) Peng, J, Madduri, S, Clontz, AD & Stewart, DA 2023, Clinical Trial-Identified Inflammatory Biomarkers in Breast and Pancreatic Cancers, *Frontiers in Endocrinology*, vol. 14, <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1106520>
- (Piloto et al., 2018) Piloto, A.M., David, Rodrigues, S.M., Santos, C., Santos and Sales, F. (2018). Plastic antibodies tailored on quantum dots for an optical detection of myoglobin down to the femtomolar range. *Scientific Reports*, 8(1). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23271-z>
- (Perumal & Hashim 2014) Perumal, V & Hashim, U 2014, Advances in Biosensors: Principle, Architecture and Applications, *Journal of Applied Biomedicine*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>
- (Pulumati et al. 2023) Pulumati, A, Pulumati, A, Dwarakanath, BS, Verma, A & Papineni, RVL 2023, Technological Advancements in Cancer Diagnostics: Improvements and Limitations, *Cancer Reports*, vol. 6, no. 2, <https://doi.org/10.1002/cnr2.1764>
- (Rahib et al. 2021) Rahib, L, Wehner, MR, Matrisian, LM & Nead, KT 2021, Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040, *JAMA Network Open*, vol. 4, no. 4, p. e214708, <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.4708>
- (Schepis et al. 2023) Schepis, T, De Lucia, SS, Pellegrino, A, del Gaudio, A, Maresca, R, Coppola, G, Chiappetta, MF, Gasbarrini, A, Franceschi, F, Candelli, M & Nista, EC 2023, State-of-the-Art and Upcoming Innovations in Pancreatic Cancer Care: A Step Forward to Precision Medicine, *Cancers*, vol. 15, no. 13, p. 3423, <https://doi.org/10.3390/cancers15133423>
- (Shavanova et al. 2016) Shavanova, K, Bakakina, Y, Burkova, I, Shtepliuk, I, Viter, R, Ubelis, A, Beni, V, Starodub, N, Yakimova, R & Khranovskyy, V 2016, Application of 2D Non-Graphene Materials and 2D Oxide Nanostructures for Biosensing Technology, *Sensors*, vol. 16, no. 2, p. 223, <https://doi.org/10.3390/s16020223>
- (Shen, Xu & Ye 2013) Shen, X, Xu, C & Ye, L 2013, Molecularly Imprinted Polymers for Clean Water: Analysis and Purification, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 52, no. 39, pp. 13890–13899, <https://doi.org/10.1021/ie302623s>
- (Singh et al. 2023) Singh, AK, Mittal, S, Das, M, Saharia, A & Tiwari, M 2023, Optical Biosensors: A Decade in Review, *Alexandria Engineering Journal*, vol. 67, pp. 673–691, <https://doi.org/10.1016/j.aej.2022.12.040>
- (Spivak 2005) Spivak, D 2005, Optimization, Evaluation, and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 12, pp. 1779–1794, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.012>
- (Srivastava & Singh 2024) Srivastava, A & Singh, M 2024, Limitations and Challenges in the Practical Implementation of MIPs, in *Molecularly Imprinted Polymers as Artificial Antibodies for the Environmental Health*,

- Springer Nature Switzerland, pp. 389–412, https://doi.org/10.1007/978-3-031-58995-9_14
- (Stoffel, Brand & Goggins 2023) Stoffel, EM, Brand, RE & Goggins, M 2023, Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention, *Gastroenterology*, vol. 164, no. 5, pp. 752–765, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.02.012>
- (Takaori et al. 2016) Takaori, K, Bassi, C, Biankin, A, Brunner, TB, Cataldo, I, Campbell, F, Cunningham, D, Falconi, M, Frampton, AE, Furuse, J, Giovannini, M, Jackson, R, Nakamura, A, Nealon, W, Neoptolemos, JP, Real, FX, Scarpa, A, Sclafani, F, Windsor, JA & Johnson, CD 2016, International Association of Pancreatology (IAP)/European Pancreatic Club (EPC) Consensus Review of Guidelines for the Treatment of Pancreatic Cancer, *Pancreatology*, vol. 16, no. 1, pp. 14–27, <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.10.013>
- (Tempero et al. 2021) Tempero, MA, Malafa, MP, Al-Hawary, M, Behrman, SW, Benson, AB, Cardin, DB, Chiorean, EG, Chung, V, Czito, B, Del Chiaro, M, Dillhoff, M, Donahue, TR, Dotan, E, Ferrone, CR, Fountzilas, C, Hardacre, J, Hawkins, WG, Klute, K, Ko, AH & George, GV 2021, Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 19, no. 4, pp. 439–457, <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0017>
- (Thévenot et al. 2001) Thévenot, DR, Toth, K, Durst, RA & Wilson, GS 2001, Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, no. 1–2, pp. 121–131, [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- (Valente et al. 2024) Valente, R, Coppola, A, Scandavini, CM, Halimi, A, Magnusson, A, Lauro, A, Sotirova, I, Arnelo, U & Franklin, O 2024, Interactions Between the Exocrine and the Endocrine Pancreas, *Journal of Clinical Medicine*, vol. 13, no. 4, p. 1179, <https://doi.org/10.3390/jcm13041179>
- (Van Doren 2022) Van Doren, SR 2022, MMP7 Marks Severe Pancreatic Cancer and Alters Tumor Cell Signaling by Proteolytic Release of Ectodomains, *Biochemical Society Transactions*, vol. 50, no. 2, pp. 839–851, <https://doi.org/10.1042/BST20210640>
- (Vasapollo et al. 2011) Vasapollo, G, Sole, RD, Mergola, L, Lazzoi, MR, Scardino, A, Scorrano, S & Mele, G 2011, Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 9, pp. 5908–5945, <https://doi.org/10.3390/ijms12095908>
- (Wang et al. 2016) Wang, SC, Parekh, JR, Porembka, MR, Nathan, H, D’Angelica, MI, DeMatteo, RP, Fong, Y, Kingham, TP, Jarnagin, WR & Allen, PJ 2016, A Pilot Study Evaluating Serum MMP7 as a Preoperative Prognostic Marker for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, vol. 20, no. 5, pp. 899–904, <https://doi.org/10.1007/s11605-015-3057-z>
- (Wu et al. 2022) Wu, L, Li, X, Miao, H, Xu, J & Pan, G 2022, State of the Art in Development of Molecularly Imprinted Biosensors, *VIEW*, vol. 3, no. 3, <https://doi.org/10.1002/VIW.20200170>

- (Xu, Wang & Liu 2021) Xu, S, Wang, L & Liu, Z 2021, Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: An Emerging Versatile Platform for Cancer Therapy, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 60, no. 8, pp. 3858–3869, <https://doi.org/10.1002/anie.202005309>
- (Yunus et al. 2023) Yunus, G, Singh, R, Raveendran, S & Kuddus, M 2023, Electrochemical Biosensors in Healthcare Services: Bibliometric Analysis and Recent Developments, *PeerJ*, vol. 11, p. e15566, <https://doi.org/10.7717/peerj.15566>

