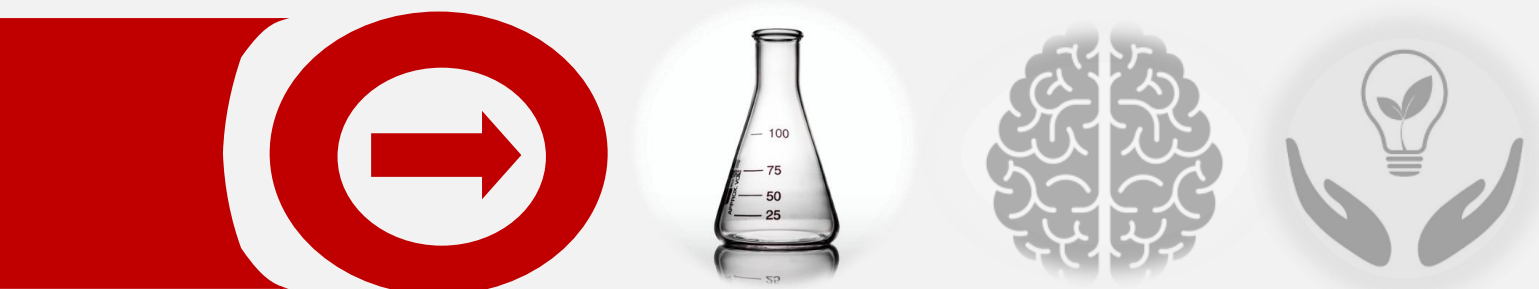




Biossensor Eletroquímico em Cortiça: Deteção de um Biomarcador Associado à Doença de ALZHEIMER

BÁRBARA PORTUGAL CORREIA

Junho de 2022



Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biorrecursos

Biossensor Eletroquímico em Cortiça: Detecção de um Biomarcador Associado à Doença de ALZHEIMER

AUTORA

BÁRBARA PORTUGAL CORREIA

ORIENTAÇÃO

DOUTORA FELISMINA MOREIRA

Coordenadora / Investigadora BioMark, Sensor Research ftm@isep.ipp.pt

PROFESSOR DOUTOR ABEL DUARTE

Professor adjunto / Investigador ISEP ajd@isep.ipp.pt

JUNHO 2022

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma!”

Antoine Laurent de Lavoisier

Agradecimentos

Começo por agradecer ao BioMark, Sensor Research pela possibilidade de poder realizar o meu estágio curricular de mestrado neste grande laboratório e por todo o acolhimento.

Agradeço em especial, à minha orientadora por toda a dedicação, carinho e companheirismo que teve, que foi fundamental.

Agradeço ainda, a todos os meus professores, com ênfase ao professor Abel Duarte, que me ajudou a realizar este projeto e me transmitiu força e apoio em todas as minhas escolhas.

Como último agradecimento, dedico-o aos meus familiares, namorado e colegas por todo o amparo, força e confiança depositada!

UM GRANDE OBRIGADA A TODOS!

Publicações

- ❖ Este biossensor desenvolvido no âmbito da tese de mestrado em Biorrecursos, foi replicado num outro tipo de suporte, em plataformas de matriz de microagulhas, desenvolvidas pelo professor Doutor da Universidade de *Swansea*, para análise do fluído intersticial de forma a conseguir um sistema minimamente invasivo, através do compartimento da pele. Este trabalho deu origem a um artigo científico, que se encontra em estado de preparação.
- ❖ A presente tese de mestrado correu de acordo com o esperado, e os resultados obtidos reúnem todas as condições para publicação, em formato de artigo científico na qual se encontra em estado de preparação.

Resumo

O desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico de rápida deteção tem sido alvo de grande interesse e investigação, sobretudo quando se refere a doenças neurológicas.

Assim sendo, o objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de sensores eletroquímicos com base em polímeros de impressão molecular (MIP) desenvolvidos em suportes sustentáveis, como a cortiça, para a determinação de um biomarcador associado a processos neuro-inflamatórios, a Interleucina 6 (*IL6*).

Numa primeira parte do trabalho, foram otimizadas as condições experimentais para a construção do biossensor, nomeadamente com a escolha criteriosa do monómero a utilizar, de forma a interagir adequadamente com a molécula alvo definida, *IL6*. A determinação seletiva deste biomarcador foi conseguida utilizando um mecanismo de polimerização eletroquímica com remoção da proteína da matriz polimérica criada, através do ácido sulfúrico. Toda a evolução das diferentes etapas da construção do biossensor foi seguida por técnicas eletroquímicas, nomeadamente, impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV). A otimização do biossensor foi efetuada em elétrodos de carbono convencionais descartáveis (SPE), em suporte em cerâmica. Por fim, o desempenho do sensor foi avaliado com a incubação de diferentes padrões de *IL6*, em solução tampão (PBS) inicialmente, e posteriormente, num sistema próximo do real, neste caso com a deteção de *IL6* em amostra de soro comercial. Foi testada a seletividade do sensor eletroquímico na presença de compostos como a ureia, glicose, entre outros, que coexistem em excesso em amostras biológicas.

Numa segunda parte do trabalho, após o estudo de condições ótimas e análise de parâmetros eletroquímicos do biossensor, o biossensor foi sintetizado com a mesma metodologia em elétrodos de carbono descartáveis em suporte de cortiça. Posteriormente, procedeu-se à avaliação do seu desempenho analítico. Em concordância com os resultados analíticos em elétrodos comerciais, concluiu-se que o sensor molecularmente impresso (MIP) em suporte de cortiça, obteve um bom desempenho analítico com gama de linearidade entre 0,001 a 10 ng/mL e coeficientes de correlação acima de 0,97 para curvas de calibração em tampão e em amostras de soro. Estes valores englobam os valores fisiológicos da proteína no soro de pacientes com a doença de Alzheimer (DA). Os polímeros sem impressão molecular (NIPs), tiveram uma resposta analítica muito baixa, concordante com o esperado devido à ausência de proteína.

Em resumo, os biossensores desenvolvidos em suportes de cortiça apresentaram um bom desempenho analítico, que comparativamente aos sensores tradicionais, considerou-se igualável. Estes resultados demonstram ser possível aplicar (bio)materiais em qualquer área, incluindo a área médica, e melhorar a preservação pelo meio ambiente. Seria interessante mais alguns estudos e otimizações neste dispositivo desenvolvido para testar esta tecnologia em escala piloto.

Uma das grandes vantagens desta estratégia proposta é uma ferramenta que permite a deteção no local, de resposta rápida, baixo custo associado e com redução de impactos ambientais causados.

Palavras-Chave: Alzheimer, Interleucina 6, Polímero de Impressão Molecular, Sensor Eletroquímico, Sustentabilidade

Abstract

The development of rapid detection diagnostic technologies has been the subject of great interest and research, especially when it comes to neurological diseases.

Therefore, the main objective of this work consisted in the development of electrochemical sensors based on molecular imprint polymers (MIP) developed on sustainable supports, such as cork, for the determination of a biomarker associated with neuro-inflammatory processes, Interleukin 6 (*IL6*).

In a first part of the work, the experimental conditions for the construction of the biosensor were optimized, namely with the careful choice of the monomer to be used, in order to properly interact with the defined target molecule, *IL6*. The selective determination of this biomarker was achieved using an electrochemical polymerization mechanism with removal of the protein from the created polymer matrix, through sulfuric acid. The entire evolution of the different stages of the biosensor construction was followed by electrochemical techniques, namely, electrochemical impedance (EIS) and cyclic voltammetry (CV). The biosensor optimization was performed using conventional disposable carbon electrodes (SPE) on a ceramic support. Finally, the sensor performance was evaluated with the incubation of different *IL6* standards, in buffer solution (PBS) initially, and later, in a system close to the real one, in this case with the detection of *IL6* in a commercial human serum sample. The selectivity of the electrochemical sensor was tested in the presence of compounds such as urea, glucose, among others, which coexist in excess in biological samples.

In a second part of the work, after studying the optimal conditions and analyzing the electrochemical parameters of the biosensor, the biosensor was synthesized with the same methodology in disposable carbon electrodes on a cork support. Subsequently, its analytical performance was evaluated. In agreement with the analytical results in commercial electrodes, it was concluded that the molecularly printed sensor (MIP) on cork support, obtained a good analytical performance with a linearity range between 0,001 to 10 ng/mL and correlation coefficients above 0,97 for calibration curves in buffer and in serum samples. These values encompass the physiological values of protein in the serum of patients with Alzheimer's disease (DA). Non-molecular imprint polymers (NIPs) had a very low analytical response, in agreement with what was expected due to the absence of protein.

In summary, the biosensors developed in cork supports presented a good analytical performance, which, compared to traditional sensors, was considered equal. These results demonstrate that it is possible to apply (bio)materials in any area, including the medical area, and improve preservation by the environment. It would be interesting to have some more studies and optimizations in this device developed to test this technology on a pilot scale.

One of the great advantages of this proposed strategy is a tool that allows on-site detection, quick response, low associated cost and reduced environmental impacts.

Keywords: Alzheimer, Interleukin 6, Molecular Imprinted Polymers, Electrochemical sensor, Sustainability

Índice

Resumo	v
Abstract	vii
Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xv
Índice de Abreviaturas	xvii
INTRODUÇÃO	1
1. CORTIÇA	2
2. BIOSSENSORES	5
2.1. Estrutura de um Biossensor	6
2.2. Elementos de Biorreconhecimento	8
2.2.1. Anticorpos naturais	8
2.2.2. Enzimas	9
2.2.3. Aptâmeros	9
2.2.4. Polímeros de Impressão Molecular (MIP)	10
2.3. Transdutores	14
2.3.1. Óticos	14
2.3.2. Piezoelétricos	14
2.3.3. Eletroquímicos	15
2.4. Elérodos	19
3. DOENÇAS NEUROLÓGICAS	22
3.1. Doença de Alzheimer	23
3.1.1. Diagnóstico	24
3.1.2. Biomarcadores	25
4. DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO	30
4.1. Materiais	30
4.1.1. Equipamentos	30
4.1.2. Reagentes e Materiais	32
4.1.3. Soluções	33
4.2. Procedimentos analíticos	33

4.2.1.	Preparação do biossensor (Pré-tratamento)	35
4.2.2.	Eletropolimerização	35
4.2.3.	Remoção da proteína.....	35
4.2.4.	Caraterização da superfície do sensor	36
4.3.	Avaliação do desempenho analítico do biossensor	36
4.3.1.	Curva de calibração.....	36
4.3.2.	Análise em Soro.....	36
4.3.3.	Estudo da seletividade.....	37
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1.	Pré-tratamento	38
5.2.	Construção do sensor	39
5.2.1.	Impressão molecular	39
5.2.2.	Remoção da proteína.....	44
5.2.3.	Caraterização da superfície do sensor.....	46
5.3.	Curva de calibração	49
5.4.	Ensaio em soro.....	52
5.5.	Estudo da seletividade	54
6.	CONCLUSÃO	55
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	66

Índice de Figuras

Figura 1. 1. Sobreiro <i>Quercus suber L.</i> , (Pintor <i>et al.</i> , 2012).....	2
Figura 2. 1. Características de um biossensor (Adaptado de Bhalla, 2016).....	5
Figura 2. 2. Estrutura e Funcionamento de um biossensor (Adaptado de Ribeiro, 2013).....	6
Figura 2. 3. Esquema dos componentes de um Biossensor (Cerqueira, 2019).....	7
Figura 2. 4. Estrutura molecular de um anticorpo (Coelho, 2014).....	8
Figura 2. 5. Esquema de síntese de um MIP (Santos <i>et al.</i> , 2012).....	11
Figura 2. 6. Monómeros utilizados na síntese de MIPs (Adaptado de Gonçalves, 2021).....	13
Figura 2. 7. Exemplo de um voltamograma cíclico reversível (Adaptado de Martins, 2019).....	16
Figura 2. 8. Representação de voltametria de onda quadrada (Pacheco <i>et al.</i> , 2013).....	17
Figura 2. 9. Exemplo de gráficos utilizados na EIS (Martins, 2019).....	18
Figura 2. 10. Circuito de espectroscopia de Impedância Eletroquímica (Adaptado de Silva, 2015).....	19
Figura 2. 11. Eléttodos presentes num SPE.....	20
Figura 3. 1. Previsão do número de pessoas com demência, no mundo, entre 2010 e 2050 (Thakur <i>et al.</i> , 2016).....	23
Figura 3. 2. Esquematização do processo de diagnóstico da doença de Alzheimer através de biossensores (Karki <i>et al.</i> , 2021).....	25
Figura 3. 3. Concentração de <i>IL6</i> em amostras de plasma em indivíduos normais, N, (controlo) comparativamente ao individuo com DA (Wu <i>et al.</i> , 2015).....	29
Figura 4. 1. Potencióstato da Metrohm Autolab.....	30
Figura 4. 2. Caixa DropSens (DRP-DSC).....	31
Figura 4. 3. RAMAN- Caracterização do sensor.....	31
Figura 4. 4. Eléttodos SPE utilizados: (A) comerciais- DropSens 110 e (B) cortiça.....	33
Figura 4. 5. Esquematização da construção do sensor eletroquímico.....	34
Figura 5. 1. Leitura inicial dos eléttodos SPE-110 e SPE- <i>cork</i> segundo ensaios de CV (A) e EIS (B).....	38
Figura 5. 2. Voltamograma obtido na eletropolimerização por CV, com oxidação de 3-APBA.....	41

Figura 5. 3. Estudo da impressão molecular no NIP (1) e MIP (2), para ambos o SPE-110 (cor-de-laranja) e SPE- <i>cork</i> (azul), pelas técnicas CV (A) e EIS (B).	43
Figura 5. 4. Estudo da remoção do <i>template</i> no NIP (1) e MIP (2), para ambos o SPE-110 (cor-de-laranja) e SPE- <i>cork</i> (azul), pelas técnicas CV (A) e EIS (B).	46
Figura 5. 5. Espectros RAMAN obtidos nas diferentes superfícies dos MIPs e NIPs preparados.	48
Figura 5. 6. Estudo da resposta analítica no sensor SPE-110 (1) e SPE- <i>cork</i> (2) em função da adição de diferentes concentrações de IL6 preparadas em PBS, pH 5, segundo a técnica de EIS; A1 e A2 representam os MIPs e B1 e B2 os NIPs, respetivamente.	50
Figura 5. 7. Curvas de calibração em PBS com concentrações crescentes de IL6 para o SPE-110 (1) e SPE- <i>cork</i> (2), pelas técnicas de EIS.	51
Figura 5. 8. Estudo da resposta analítica no sensor SPE-110 (1) e SPE- <i>cork</i> (2) em função da adição de diferentes concentrações de IL6 preparadas em soro Cormay, diluído 1000x, segundo a técnica de EIS; A1 e A2 representam os MIPs e B1 e B2 os NIPs, respetivamente.	52
Figura 5. 9. Curvas de calibração em soro Cormay, diluído 1000x, com concentrações crescentes de IL6 para o SPE-110 (1) e SPE- <i>cork</i> (2), pelas técnicas de EIS.	53
Figura 5. 10. Estudo de seletividade envolvendo a análise da resposta do sensor após incubação com tampão e outras espécies interferentes.	54

Índice de Tabelas

Tabela 1. 1. Revisão Bibliográfica da composição química da cortiça.....	3
Tabela 3. 1. Biomarcadores específicos no diagnóstico da DA (Hmpel, 2011).....	26
Tabela 4. 1. Listagem de materiais e reagentes utilizados com respetiva concentração e origem.....	32
Tabela 5. 1. Valores obtidos por RAMAN nos diferentes elétrodos SPE.....	47

Índice de Abreviaturas

<i>3- Aminophenylboronic acid</i>	3-APBA
Doença de Alzheimer.....	DA
<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	ELISA
Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	EIS
Imunoglobina	Ig
Interleucina-VI.....	IL6
Líquido Cefalorraquidiano.....	LCR
Polímero de Impressão Molecular.....	MIP
Polímero sem Impressão Molecular.....	NIP
Ponto Isoelétrico.....	PI
<i>Positron Emission Tomography</i>	PET
Proteína Amilóide Beta 1-42	Aβ₁₋₄₂
Proteína Tau Fosforilada.....	p-tau
Proteína Tau Total	t-tau
<i>Screen-Printed Electrode</i>	SPE
<i>Screen-Printed Electrode- DropSens</i>	SPE-110
<i>Screen-Printed Electrode- Cortiça</i>	SPE-cork
Sistema Nervosos Central.....	SNC
Tomografia Computorizada de Emissão de Fotões.....	SPECT
Voltametria Cíclica.....	CV
Voltametria de Onda Quadrada.....	SWV

INTRODUÇÃO

"A aceleração do processo industrial faz com que a cada dia desapareçam cerca de 10 espécies de seres vivos e 50 espécies de vegetais. Não são somente os pobres que gritam, grita também a Terra sob o esgotamento sistemático de seus recursos não renováveis e sob a contaminação do ar, do solo e da água." (Leonardo Boff) (Silva *et al.*, 2005).

O excerto mencionado do livro "Princípio de Compaixão e Cuidado" de Leonardo Boff, é uma passagem na qual introduz uma reflexão sob a importância e a responsabilidade que cada ser humano apresenta para a temática das questões ambientais (Silva *et al.*, 2005).

Nos dias que hoje correm, a evolução tecnológica juntamente com o aumento da concorrência tem concebido um grande impacto em diversas indústrias e serviços. A inovação e pesquisa de soluções rápidas e eficazes, promovem o desenvolvimento de recursos fundamentais para uma qualidade de vida cada vez mais satisfatória e com danos reduzidos nas gerações futuras. A importância da satisfação das necessidades do setor industrial, leva a uma procura crescente e uma exploração intensiva de métodos com procedimentos mais verdes, com vista a diminuir a quantidade de resíduos produzidos, assim como na utilização de solventes menos tóxicos para o meio ambiente (Silva *et al.*, 2005).

Surge dessa forma, o conceito de Economia Circular que tem como base a criação e investigação de soluções de forma a garantir o melhor aproveitamento possível dos materiais, componentes e outros produtos de modo a reduzir os impactos negativos dos sistemas industriais nos ecossistemas. Para tal, é de extrema importância a política dos 5R's (reutilizar, reduzir, reciclar, repensar e recusar) que leva a uma procura constante em novos modelos de negócio, novas prioridades de desenvolvimento de produtos e materiais (Mottin, 2016). De acordo com Araujo, 2010, este conceito é definido como "aquele que permite as gerações atuais satisfazer suas necessidades sem comprometer a capacidade das futuras gerações".

O modelo circular assume que os produtos e serviços têm origem em fatores da natureza, e que, no final de vida útil, retomam à natureza através de resíduos ou através de outras formas com menor impacto ambiental. Este conceito tem sido aplicado com grande aderência no setor industrial e encontra-se atualmente presente em diversas áreas (Mottin, 2016).

A medicina é uma das áreas com maior destaque e beneficiada com o avanço tecnológico em virtude da constante reinvenção da instrumentação médica, que enaltece a qualificação nas ações de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Desta forma, o objetivo desta dissertação passa pela combinação da valorização de um recurso natural com aplicação no contexto médico. Assim sendo, o estudo desta dissertação teve como escopo, o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico com suporte em cortiça para a deteção de um biomarcador associado à doença de Alzheimer (DA).

O trabalho foi subdividido numa parte teórica com introdução aos biossensores e enriquecimento sobre a temática, seguido de uma posterior parte prática executado no BioMark, Sensor Research. Este grupo de investigação do Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto tem como grande e potencial atividade, o desenvolvimento de dispositivos de capacidade sensorial com enfoque para o setor medicinal (Biomark, 2021).

1. CORTIÇA

A cortiça é um dos produtos 100 % naturais mais característicos de Portugal. Por definição, este é um material de origem vegetal a partir do tecido felogénico de *Quercus suber* L., constituindo o revestimento do seu tronco e ramos, Figura 1.1. Esta casca externa dos sobreiros composta por células mortas e vazias suberizadas, exerce uma barreira protetora da árvore em oposição à desidratação e ao calor (Chanut *et al.*, 2022). Este material nacional, normalmente é extraído de 9 em 9 anos e a sua colheita e transformação em produtos, com grande destaque na produção de rolhas de vinho, não compromete a árvore (Magalhães da Silva & Oliveira, 2021).



Figura 1. 1. Sobreiro *Quercus suber* L., (Pintor *et al.*, 2012).

A cortiça é um material natural de baixo custo que do ponto de vista económico, apresenta colossais vantagens face aos diversos materiais de origem natural existentes. Por esse motivo, é amplamente empregue em diversas aplicações sob a sua forma e textura natural, como em material compósito à base de partículas de cortiça e adesivos (Tavares *et al.*, 2021).

Embora as características químicas da cortiça não sejam totalmente conhecidas, esta apresenta propriedades peculiares como baixa densidade ($30\text{--}40\text{ kg/m}^3$), boa estabilidade química e biológica, boa elasticidade e elevada capacidade de amortecimento (Bento *et al.*, 2001). Além disso, a cortiça possui propriedades insuperáveis como a extraordinária “leveza” ($0,16\text{ g cm}^{-3}$), baixa permeabilidade a líquidos e a gases e baixa condutividade térmica ($4,1 \times 10^{-5}\text{ KJ m}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{ K}^{-1}$ para $T= 20\text{ }^\circ\text{C}$) que em função disso, revela boas características de isolamento térmico e elétrico (Corticeira Amorim, 2021; Chanut *et al.*, 2022).

Um dos fatores que tem grande influência nos atributos deste composto natural é a sua composição química. Esta é maioritariamente constituída por suberina (33–62 %m/m) composto responsável pelo carácter hidrofóbico e impermeabilização, lignina (13–29 %m/m) que confere a rigidez e resistência ao material e ainda, por estruturas poliméricas (principalmente celulose e hemicelulose, 6–26 %m/m). Substâncias extraíveis como o tanino, a glicerina, ceras, etc., e componentes minerais com destaque no potássio e no sódio, são responsáveis por uma pequena fração da composição química da

cortiça (8–24 % m/m) (Chanut *et al.*, 2022). Na Tabela 1.1 apresenta-se uma revisão bibliográfica sobre a composição química com suporte em artigos científicos.

Tabela 1. 1. Revisão bibliográfica da composição química da cortiça.

Composição Química da Cortiça					
<i>Suberina,</i> % m/m	<i>Lignina,</i> % m/m	<i>Polissacarídeos,</i> % m/m	<i>Extrativos,</i> % m/m	<i>Cinzas,</i> % m/m	<i>Autor/Referência</i>
38,6	21,7	18,2	15,3	0,7	(Pereira, 1988)
40	22	18	15	<i>Indefinido</i>	(Bento <i>et al.</i> , 2001)
45	27	12	10	5	(Silva <i>et al.</i> , 2005)
44	16	24	<i>Indefinido</i>	<i>Indefinido</i>	(Branco <i>et al.</i> , 2021)
33-50	13-29	6-15	8,5-24	<i>Indefinido</i>	(Li <i>et al.</i> , 2021)
45	27	12	10	<i>Indefinido</i>	(Merabti <i>et al.</i> , 2021)

A proporção desses constituintes pode variar consoante vários parâmetros entre os quais a origem geográfica, a localização morfológica na árvore, a idade, a área de produção e as condições atmosféricas (Chanut *et al.*, 2022).

Este material prontamente disponível sustenta uma das indústrias mais importantes da economia portuguesa e líder mundial do setor da cortiça, a célebre Corticeira Amorim (Corticeira Amorim, 2021). Com um registo de 75 milhões de euros em 2019 e um crescimento de 4,7 % face ao ano anterior, a utilização tradicional e com grande impacto na manufatura, registou-se a produção de rolhas de engarrafamento de vinho.

No entanto, existem inúmeras outras aplicações para este material natural e produtos relacionados, como matéria-prima para substituir outros materiais não renováveis, como o petróleo e seus derivados, que atualmente é considerado um produto de luxo. A cortiça tem aplicações que vão desde os têxteis e calçado à nanotecnologia (Pintor *et al.*, 2012).

Além disso, a sua utilização pode ser sob a forma de compostos aglomerados, resultante dos granulados obtidos a partir da trituração de cortiça virgem e ainda dos desperdícios acumulados em outras operações de processamento. Estes são normalmente aplicados na construção civil com a finalidade de revestimentos de pavimentos e paredes a fim de explorar o isolamento térmico e vibratório. Neste processo é, também, produzido um pó de cortiça com elevado valor calorífico, cerca de 20 MJ/kg com 3 % de volume de cinzas, que é utilizado para a produção de energia e, muitas vezes, em processos de

cogeração (Pintor *et al.*, 2012). Nunes *et al.*, 2013, reforça esta aplicação, com a produção de *pellets* de cortiça como uma alternativa mais segura e mais fácil de transportar para fins industriais, para a recuperação energética do pó de cortiça e de outros tipos granulados de resíduos deste composto natural.

A busca incessante em novas formas de reutilização e aproveitamento deste produto, tem avocado o interesse e a atenção de muitos investigadores. Estudos recentes como de Tavares *et al.*, 2021, mostram a utilização deste material como substrato para a produção de biossensores.

A presente dissertação, descreve o desenvolvimento de um biossensor na superfície de um *screen-printed electrode* (SPE) impresso em suporte de cortiça destinado há transdução elétrica de um biomarcador associado a processos (neuro)inflamatórios, a proteína Interleucina 6 (*IL6*). Os elétrodos impressos em cortiça são desenhados com tintas condutoras através da tecnologia serigráfica. São estabelecidos sistemas de três elétrodos, combinando elétrodos de trabalho, auxiliares ou de referência. O biossensor com base em polímero de impressão molecular (MIP) como elemento de reconhecimento é sintetizado na superfície do eletrodo de trabalho.

A utilização de sensores a partir deste recurso natural tem como vantagem, a possibilidade de modificação do suporte plano com materiais condutores adequados por métodos de deposição física ou química, na qual garantem a ligação adequada a outros compostos. Esta modificação química controlada é proporcionada pelas boas características de isolamento elétrico e térmico deste material (Tavares *et al.*, 2021). Mais do que nunca, fica claro que existe uma demanda intensiva por dispositivos a baixo custo associado com materiais de suporte naturais e biodegradáveis. Em contrapartida, os dispositivos comerciais como os sistemas de SPE são, normalmente, impressos em materiais sintéticos como o plástico ou cerâmicas. Estes suportes comerciais colocam preocupações a nível ambiental devido ao uso intensivo destes dispositivos, levando desse modo à procura de abordagens mais verdes. Rematando, a inovação de dispositivos sensoriais com suporte em materiais naturais como a cortiça, para além da sua biodegradabilidade, é uma solução possível a esta temática que devido às suas propriedades permite obter desempenhos igualáveis aos comerciais.

Por outro lado, a utilização dos produtos de cortiça é muito importante do ponto de vista ecológico, porque se está a valorizar um recurso natural ao empregar este produto renovável em produtos de longa duração, promovendo a fixação de dióxido de carbono (Daniel, 2011). Para além disso, a exploração de um sobreiro com extrações periódicas de cortiça, é relatado que produz 250 a 400 % mais de cortiça do que a que produziria se não fosse auferido, propiciando a captura de uma elevada quantidade de dióxido de carbono. Por essa razão, a exploração deste material, promove a formação de mais cortiça e consequentemente, de mais dióxido de carbono capturado, para além do facto de este tipo de produtos ser de vida longa, retendo o carbono que os compõem durante a sua vida útil e sendo «carbono neutro» na altura da sua decomposição ou aproveitamento energético (Pintor *et al.*, 2012). Segundo um estudo, em 2007, registou-se uma exportação média de 94,7 mil toneladas de cortiça para materiais de construção civil. Considerando que, 57,7 % da composição correspondeu ao teor de carbono, este valor correspondeu a 54 330 toneladas de carbono/ano nessa cortiça, que equivale a 199 065 toneladas de dióxido de carbono capturado/ano (Gil & Pereira, 2007; Gil, 2012).

2. BIOSSENSORES

Atualmente, a nanotecnologia juntamente com o desenvolvimento dos sensores e biossensores, são áreas em forte expansão devido à sua potencial aplicação nas áreas industriais, clínicas e ambientais. Antes da compreensão de todo o funcionamento envolvente é crucial a perceção do conceito desta tecnologia (Bhalla, 2016).

Biossensor é um pequeno dispositivo analítico, implantável ou não, com a capacidade de detetar um determinado alvo. Este elemento de reconhecimento pode ser um organismo vivo ou um componente biológico como enzimas, anticorpos, DNA, aptâmeros, MIPs, entre outros.

Embora existam diferentes tipos de sensores, no caso particular dos sensores eletroquímicos utilizado neste trabalho, estes apresentam características únicas em termos de elevada sensibilidade, seletividade, estabilidade operacional, portabilidade, acessibilidade e baixo custo associado, Figura 2.1 (Dias, 2014).

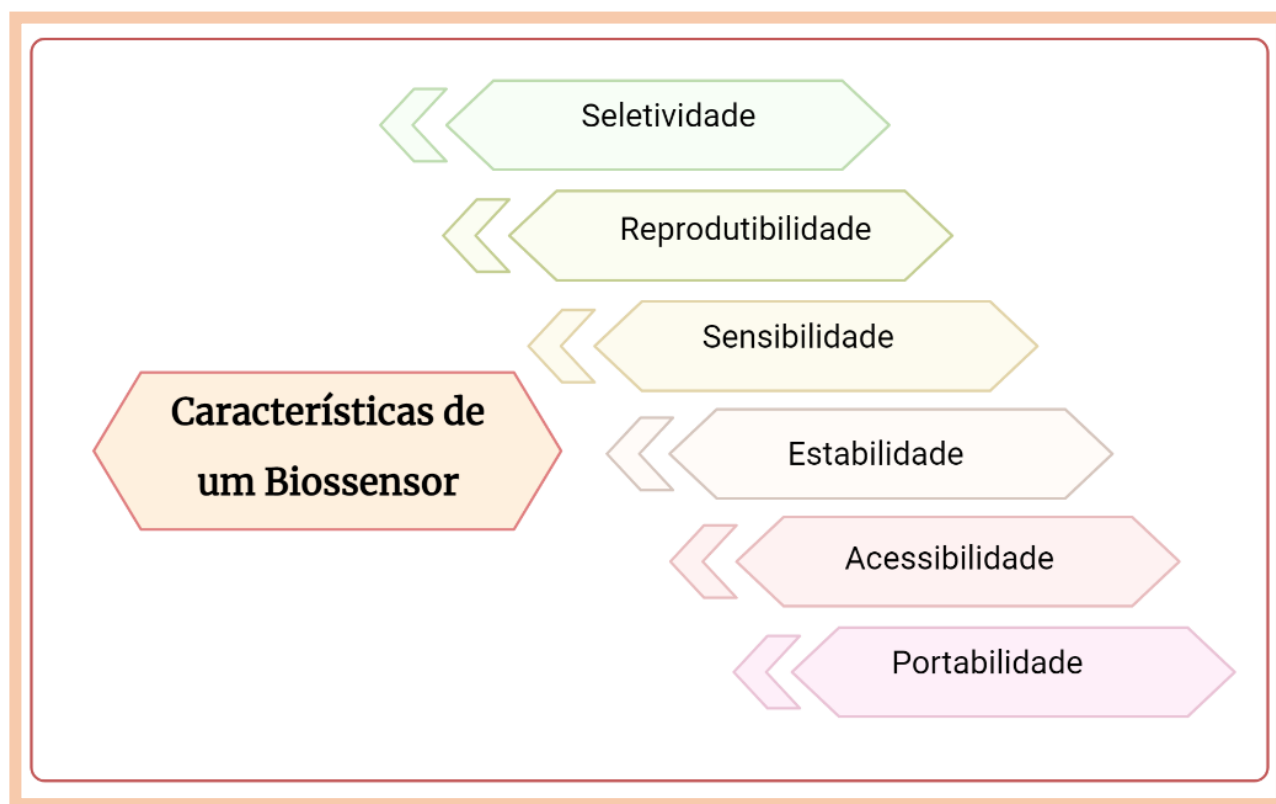


Figura 2. 1. Características de um biossensor (Adaptado de Bhalla, 2016).

Estas vantagens mencionadas na Figura acima, tornam a sua aplicação mais viável no que diz respeito à saúde, sendo as análises e diagnósticos clínicos o maior alvo de investigação (Dias, 2014).

Apesar dos biossensores possuírem algumas limitações consoante o tipo de transdutor que apresentam, estes têm adicionalmente atraído especial atenção nas últimas décadas, sobretudo nas áreas da segurança alimentar, qualidade de água e do solo, monitorização ambiental, toxinas de defesa e deteção de biomoléculas indicadores de drogas (Bhalla, 2016).

2.1. Estrutura de um Biossensor

A estrutura e princípio de funcionamento de um biossensor encontra-se representado na Figura 2.2. Um biossensor é constituído essencialmente por 3 componentes (Bhalla, 2016; Lopes, 2016; Silva, 2013):

- ❖ **Bioreceptor:** parte recetora sensível às características do sistema que recebe e capta a informação adquirida com uma determinada natureza física. Reconhece estritamente o analito, substância de interesse que precisa de deteção. A interação entre analito e bioreceptor denomina-se de biorreconhecimento, cujos diferentes tipos destes elementos produzem um sinal que pode ser sob a forma de calor, luz, pH, mudanças de carga e massa, entre outros.
- ❖ **Transdutor físico-químico:** pode apresentar diferentes tipologias como eletroquímico, ótico, piezoelétrico e térmico. Tem como função a conversão da informação obtida, do elemento de biorreconhecimento no caso dos biossensores, num sinal mensurável.
- ❖ **Amplificador do sinal:** Num biossensor, o papel do amplificador é processar sinal elétrico recebido da transdução e preparar o sistema eletrónico para exibição, de forma a tornar o sinal mais visível e minimizar o ruído externo que possa existir devido às interferências ambientais, ou provocado pelos equipamentos envolvidos na captura e medição dos sinais. Por fim, o sinal amplificado do biossensor é lido e quantificado por meios computacionais.

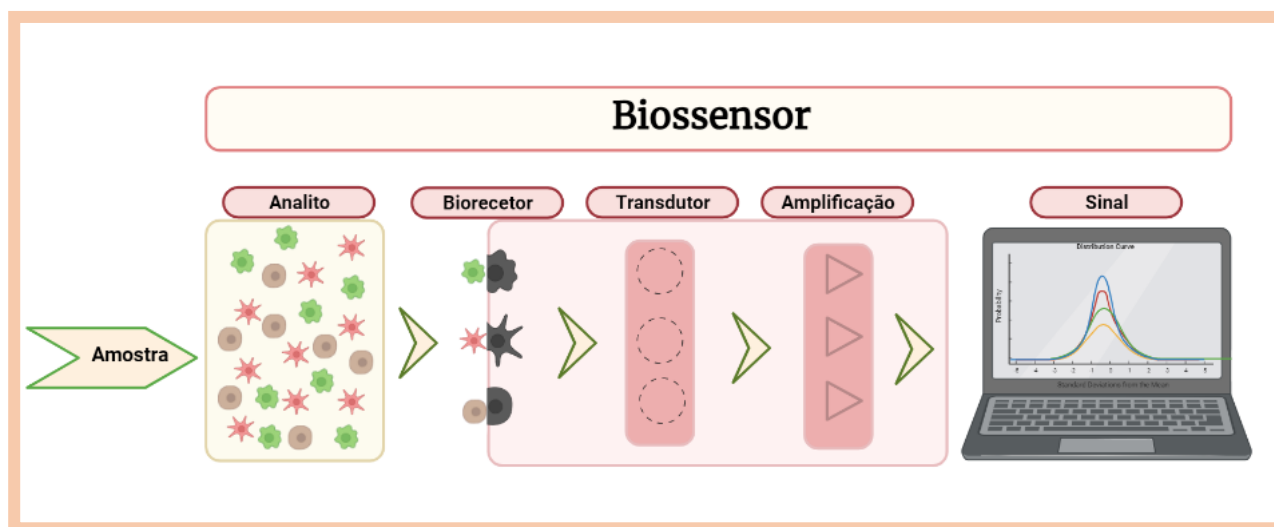


Figura 2. 2. Estrutura e Funcionamento de um biossensor (Adaptado de Ribeiro, 2013).

Os sensores apresentam a capacidade de converter a informação química ou física de forma contínua, transformando-a numa informação útil. No caso de se tratar de sensores eletroquímicos, então a informação é convertida num sinal elétrico. Assim sendo, estes podem ser classificados em físicos quando se destinam a fins de medição e pretendem medir propriedades de natureza física como viscosidade, temperatura e índice de refração. Por outro lado, os sensores químicos reconhecem constituintes químicos, como a concentração de determinada substância a qual chamamos de analito (Lopes, 2016).

Na Figura 2.3 apresenta-se um esquema dos componentes de um biossensor que serão descritos seguidamente.

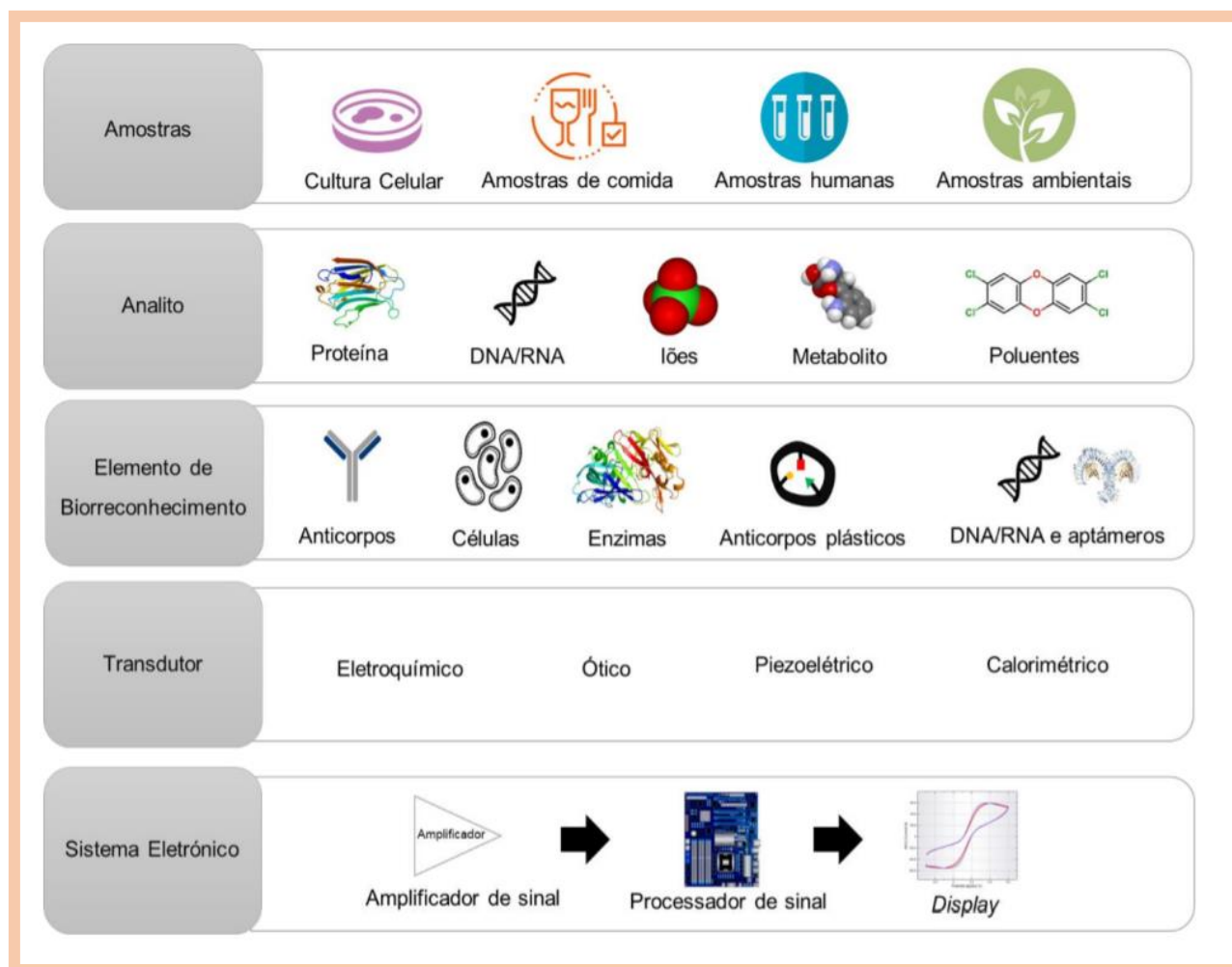


Figura 2. 3. Esquema dos componentes de um Biossensor (Cerqueira, 2019).

2.2. Elementos de Biorreconhecimento

Elementos de biorreconhecimento são componentes críticos do biossensor. São bio(moléculas) capazes de reconhecer o analito de uma determinada amostra em estudo. A essas (bio)moléculas tem-se o nome de bioreceptores na qual podem ser divididas em naturais (anticorpos, enzimas) e elementos artificiais que incluem nanomateriais como aptâmeros e polímeros de impressão molecular (MIP). Dessa forma, o conhecimento destes diferentes elementos de biorreconhecimento é especialmente importante para que perante cada objetivo do biossensor, seja aplicado os materiais de reconhecimento ideal e de forte afinidade com o (bio)analito alvo (Tohill, 2009).

2.2.1. Anticorpos naturais

Anticorpos, também designado de imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas por células formadas a partir da diferenciação dos linfócitos B, designadas de plasmócitos. Estas moléculas são proteínas constituídas por cadeias de peptídeos leves e pesadas como se vê na Figura 2.4. Os anticorpos atuam na defesa do organismo e são moléculas com alto grau de afinidade e bastante específicas, ou seja, cada anticorpo atua apenas contra determinado antigénio (molécula que se liga a um anticorpo). Pode-se diferenciar cinco classes de anticorpos: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE que se diferenciam por suas propriedades biológicas e localizações funcionais (Nelson *et al.*, 2000).

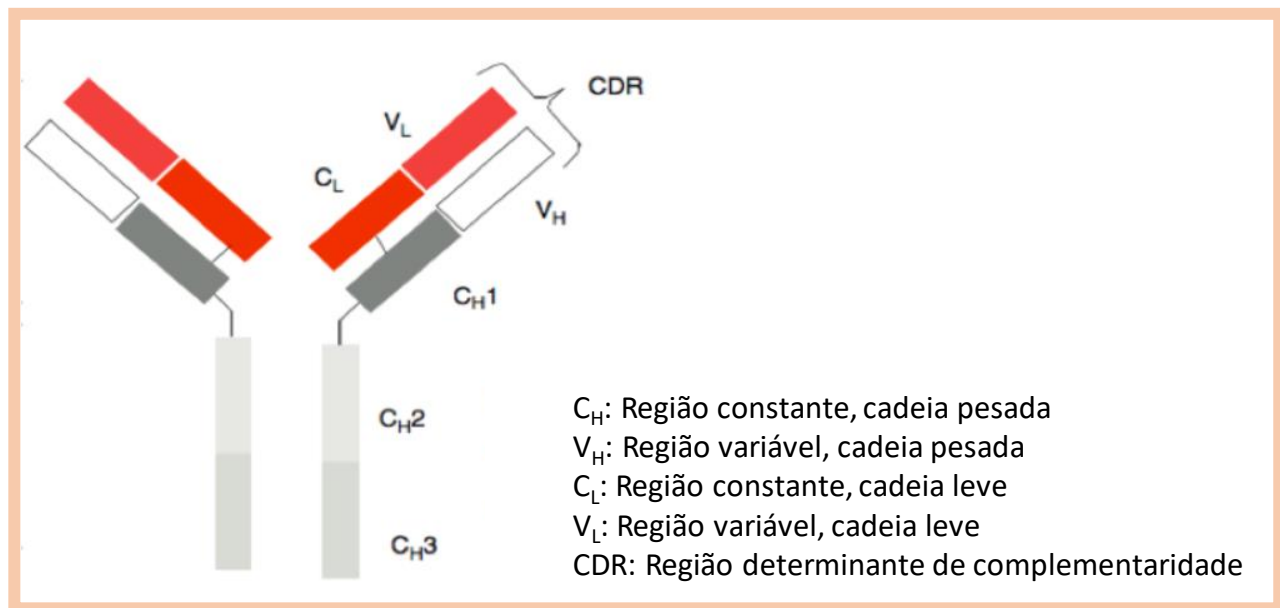


Figura 2. 4. Estrutura molecular de um anticorpo (Coelho, 2014).

Os anticorpos são ferramentas importantes na investigação e têm sido amplamente usados como elemento de biorreconhecimento direcionado à deteção de células cancerosas e diferentes patologias como testes de diagnóstico. Também podem ser aplicadas como terapêuticas como no tratamento de tumores dentro do corpo (Nelson *et al.*, 2000).

Os anticorpos podem ser subdivididos em monoclonais e policlonais. Os primeiros, são advindos de um único linfócito B que é selecionado artificialmente e replicado inúmeras vezes. Este mesmo, apenas se liga a um epítopo de uma única forma, sítio de ligação específica que é reconhecido por um anticorpo. Este fato promove elevada especificidade. A classe dos policlonais tem a capacidade de reconhecimento e de ligação de vários epítomos, que com o recurso a técnicas de alto rendimento, podem ser utilizados contra qualquer tipo de biomarcador (Tothill, 2009).

O principal obstáculo na utilização tanto de anticorpos (monoclonais e policlonais) como de moléculas semelhantes, relaciona-se com o método de produção devido há necessidade de obtenção de grandes quantidades de proteínas purificadas, geralmente na ordem dos microgramas (Chambers & Johnston, 2003). Para além disso, estas biomoléculas apresentam reduzida estabilidade, com elevado custo e com longos tempos de resposta. Estas biomoléculas não são, por isso, os elementos ideais para aplicação em programas de rastreio ou medições de rotina hospitalar.

Globalmente, existe uma ampla gama de anticorpos disponível comercialmente e a aplicação deste elemento de biorreconhecimento como marcadores específicos em patologias em biossensores, tem registado um bom desempenho (Tothill, 2009).

2.2.2. Enzimas

Biossensores baseados em biocatálise envolvem um grande número de reações bioquímicas que são catalisadas seletivamente por uma ou mais enzimas específicas. O grupo mais importante e com maior aplicação nos sensores tem sido as oxidorreduções, que catalisam reações de oxidação ou redução com recurso a oxigênio ou cofatores (Tothill, 2001).

As vantagens de usar enzimas como elemento de biorreconhecimento é a elevada seletividade de interações enzima-substrato específicas. As desvantagens passam pelo alto custo associado ao sensor e aos problemas a longo prazo de estabilidade devido à modificação da enzima e à respetiva desnaturação. De forma a combater esta dificuldade, torna-se necessário conseguir estabilização química e desenvolver procedimentos de imobilização que confirmam a estabilidade (Tothill, 2001).

2.2.3. Aptâmeros

Aptâmeros são peptídeos constituídos por uma sequência aleatória de ácidos nucleicos sintéticos como o DNA e RNA com fim a apresentar afinidade específica para uma molécula alvo. A sua elevada afinidade a uma variedade de alvos resulta do dobramento da fita simples numa estrutura globular específica. Assim sendo, estes elementos de biorreconhecimento têm sido potenciais adversários a biomoléculas de origem natural (Cerchia et al., 2002).

Na comercialização de biossensores, a utilização de moléculas biológicas como os anticorpos e as enzimas com a funcionalidade de recetor, tem-se tornado desvantajoso devido à sua baixa estabilidade e alto custo (Tothill, 2001).

Uma nova abordagem que tem vindo a evoluir ao longo dos últimos anos e de forma a superar a dificuldade da estabilidade de moléculas biológicas é o uso de recetores artificiais. O desenvolvimento

destes recetores como os aptâmeros, continua a ser um desafio em diversas áreas, nomeadamente em termos de afinidade para fornecer o limite de deteção necessário e especificidade (Tothill, 2001).

2.2.4. Polímeros de Impressão Molecular (MIP)

Atualmente, o elemento de biorreconhecimento artificial que tem sido mais utilizado para detetar vários biomarcadores de patologias distintas são os polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês *molecularly imprinted polymer*). Estes materiais inteligentes são altamente seletivos e empregues no preparo de amostras de diversos tipos de analitos e matrizes (Amouzadeh Tabrizi *et al.*, 2022).

O mecanismo de impressão molecular envolve uma técnica de modelagem e compreende a formação de locais de reconhecimento molecular para uma determinada molécula alvo numa rede tridimensional de polímeros sintéticos (monómero funcional, monómero de reticulação e um iniciador de polimerização num solvente). Por outras palavras, no processo de impressão, ocorre a formação de cavidades específicas que são capazes de se ligar à molécula molde através da interação com o monómero funcional, de acordo com o tamanho, forma e grupos funcionais (Boulanouar *et al.*, 2018).

Na tecnologia de impressão molecular, para a formação do complexo analito-alvo são essenciais alguns elementos para a sua síntese. Dessa forma, o molde é um elemento chave porque é o responsável pela organização espacial dos grupos funcionais dos monómeros (Lopes, 2016).

Relativamente aos polímeros sintéticos, o monómero funcional é responsável por estabelecer as ligações nos locais de reconhecimento e os mais utilizados são monómeros com grupos ácidos carboxílicos ou ácidos sulfónicos (Sousa & Maurício Barbosa, 1609). A presença em excesso do monómero de reticulação e do solvente apropriado, designado por vezes na literatura como agente de ligação cruzada ou “*cross-linking*”, são responsáveis pelo controlo da estrutura assim como da estabilização mecânica da matriz polimérica. Estes auxiliam na estabilização dos locais de ligação com capacidade de reconhecimento molecular (Zaidi, 2020). O iniciador é outro polímero sintético e permite a criação de radicais livres que possibilitam o início e a manutenção da reação de polimerização (Lopes, 2016). Por fim, ocorre a remoção da molécula molde da estrutura polimérica, que tanto pode ser por meio de lavagens com solventes apropriados, ou quando necessário, por clivagem química, quando há o estabelecimento de ligações covalentes entre a molécula e o monómero (Coelho *et al.*, 2018). O MIP resultante é, portanto, capaz de reconhecimento seletivo do analito alvo nos sítios derivados do molde.

Estes materiais poliméricos apresentam como vantagens a fácil preparação, alta afinidade entre o MIP e o analito, o baixo custo de produção, a rápida e alta estabilidade térmica e química, a robustez sobre severas condições de temperatura e pH, e como último, a reversibilidade (Figueiredo *et al.*, 2008).

Embora o processo de formação de MIPs seja simples, é necessário ter especial atenção e cuidado na escolha dos reagentes e dos procedimentos a adotar, a fim de evitar a formação de polímeros com características indesejáveis associadas à estrutura e à uniformidade das partículas e cavidades criadas (Cerqueira, 2013).

2.2.4.1. Síntese de um MIP

O processo de síntese de um MIP ocorre em três etapas: a complexação; a polimerização; e a eluição, Figura 2.5.

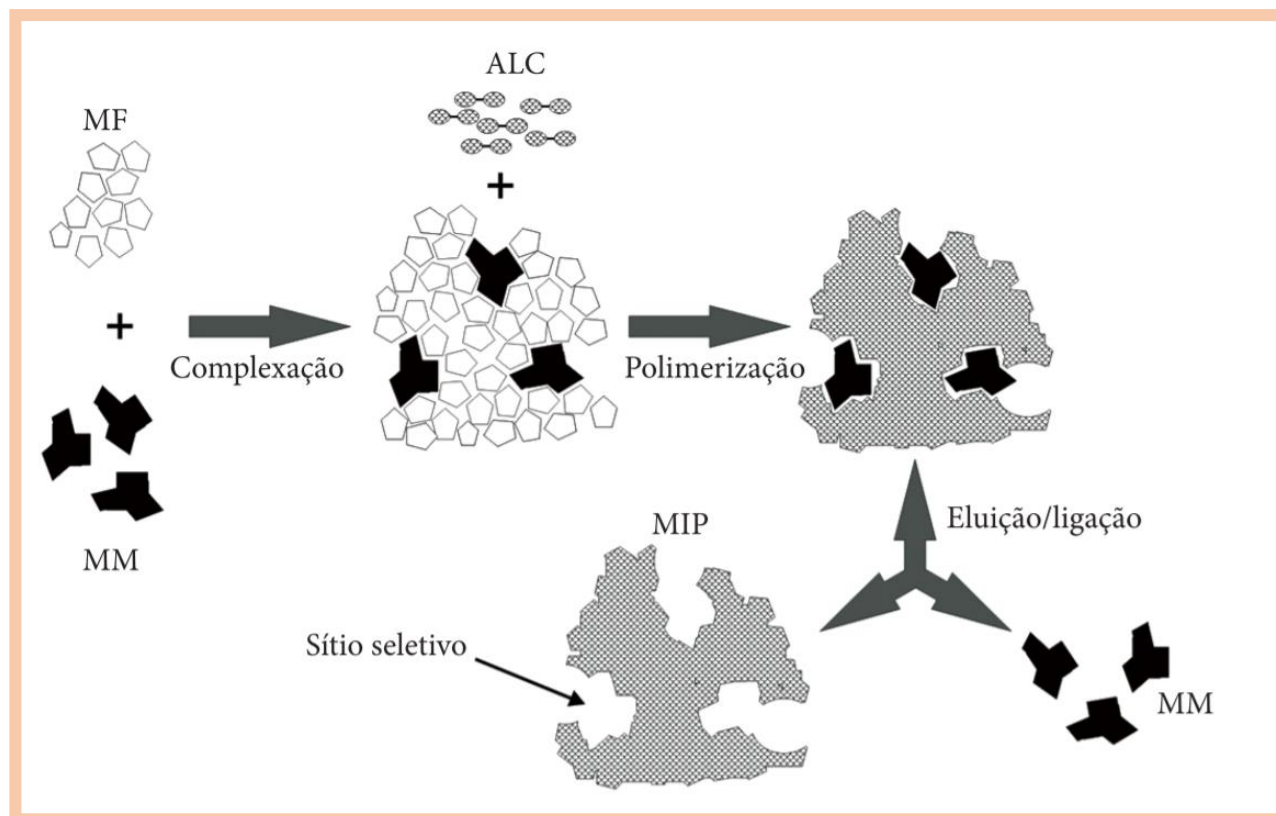


Figura 2. 5. Esquema de síntese de um MIP (Santos *et al.*, 2012).

A primeira etapa desta síntese, designada de complexação, Figura 2.5, consiste na formação de pré-arranjo molecular por ligações covalente, não covalente ou semi-covalente entre a molécula molde e os monómeros funcionais definidos.

Posteriormente, ocorre a polimerização na presença de um iniciador e agentes de reticulação a fim de iniciar o processo de formação de um polímero tridimensional. A polimerização convencional, conhecida também como polimerização radicalar, não é necessário estímulo elétrico no sistema, uma vez que o início da polimerização ocorre espontaneamente na preparação da solução da mistura da molécula molde com os monómeros e iniciador radicalar (Moreira *et al.*, 2011). No entanto, a polimerização pode ser efetuada também com o recurso a um estímulo térmico, elétrico ou ação da luz ultravioleta (Sousa & Maurício Barbosa, 1609).

Embora a técnica de impressão molecular seja um fenómeno bastante recorrente e empregue na síntese de MIPs, as tradicionais tecnologias de polimerização demonstram resultados insatisfatórios e grandes dificuldades permanecem na impressão de estruturas grandes como de proteínas. Hashemi-Moghaddam *et al.*, 2017, explica que proteínas de grande dimensão impedem que a proteína que se

conecte e deixe locais de ligação artificial, porque regista-se uma dificuldade na movimentação do molde. Refere, ainda que, proteínas com elevado número de locais de ligação e com muitos grupos funcionais na superfície, aumentam a probabilidade de ocorrência de interações inespecíficas na polimerização que promove reatividades cruzadas e baixa seletividade.

Dado essa situação, estudos nesta área têm vindo a evoluir e os processos de desenvolvimento destes materiais em contexto de impressão molecular e que apresentam maior eficácia são a polimerização em superfície e a polimerização em *Bulk*.

A polimerização em superfície caracteriza-se pela formação de locais de ligação que se encontram na superfície ou na proximidade do polímero (Dong *et al.*, 2021). Neste método, há maior facilidade na difusão da macromolécula na rede polimérica, o que minimiza a preocupação relativamente ao tamanho do molde. Neste tipo de polimerização relativamente à impressão em *Bulk*, permite uma transferência de massa mais rápida e necessitam de menores quantidades de moléculas molde, uma vez que o molde é usado apenas na etapa de revestimento da superfície (Moreira *et al.*, 2011; Cerqueira, 2013). Outra das vantagens registadas é a maior seletividade e a elevada reprodutibilidade (Gonçalves, 2016). No entanto, devido ao menor número de locais impressos, é possível que a sensibilidade seja menor em comparação com a polimerização em *Bulk*.

A polimerização em *Bulk* é uma abordagem mais simples e consiste na adição consecutiva de todos os compostos presentes na reação: analito, monómero, solvente, agente reticulante e iniciador (Yarman *et al.*, 2021). Esta mistura é polimerizada através da adição de um iniciador radicalar ao sistema, formando nano-camada que transforma a grande quantidade de monómeros em redor do analito, numa estrutura polimérica artificial (Gonçalves, 2021).

Uma outra técnica de polimerização denominada por eletropolimerização apresenta muitas vantagens como a presença de estabilidade da estrutura polimérica controlada em termos de espessura do polímero que, por sua vez poderá ser ajustado à carga durante a eletrooxidação, que torna os MIPs sintetizados por técnicas eletroquímicas muito mais reprodutíveis que a polimerização convencional (iniciador radicalar).

Como última e terceira etapa, na finalização do processo de síntese, há a interrupção da polimerização e dá-se a remoção das moléculas molde presas por métodos físicos ou químicos, deixando as cavidades tridimensionais do polímero na superfície do substrato (Dong *et al.*, 2021). Nesta etapa, normalmente recorre-se a solventes orgânicos, enzimas, ácidos ou bases para facilitar a extração e deixar a estrutura 3D formada (Zaidi, 2020). Contudo, pode, por vezes, ser uma etapa complicada porque consoante o tipo de solvente escolhido, a remoção do molde pode não ocorrer, ou por outro lado, quando ocorrer, poderá danificar a estrutura polimérica do MIP (Gonçalves, 2021).

O papel desta última etapa no processo de síntese é crucial e único na aplicabilidade em geral, dos MIPs e necessário antes de cada medição.

2.2.4.2. Eletropolimerização

A aplicação de uma técnica de eletropolimerização para preparar um sensor MIP é outra alternativa. A produção em massa de dispositivos analíticos com a capacidade de impressão de materiais com alta precisão e rapidez é muito desejável nos biossensores e aplicável aos sensores eletroquímicos.

A síntese de MIPs capazes de detetar analitos impõe a escolha de um monómero adequado que possa interagir com o analito-alvo (Leibl *et al.*, 2020). O processo de escolha do monómero é fundamental, e requer estudos de forma a encontrar materiais que sejam os mais adequados para a construção do MIP, para que seja atingido um bom desempenho analítico do biossensor, que é de grande interesse (Liu *et al.*, 2006).

Um conjunto de monómeros eletropolimerizáveis podem ser utilizados para a impressão molecular. Na Figura 2.6 pode ver-se alguns dos mais usados e a respetiva estrutura molecular. Analisando a Figura, é visível uma característica comum entre todos estes compostos, todos são constituídos por hidrocarbonetos aromáticos complementados com grupos funcionais carboxílicos, hidroxilos e aminas.

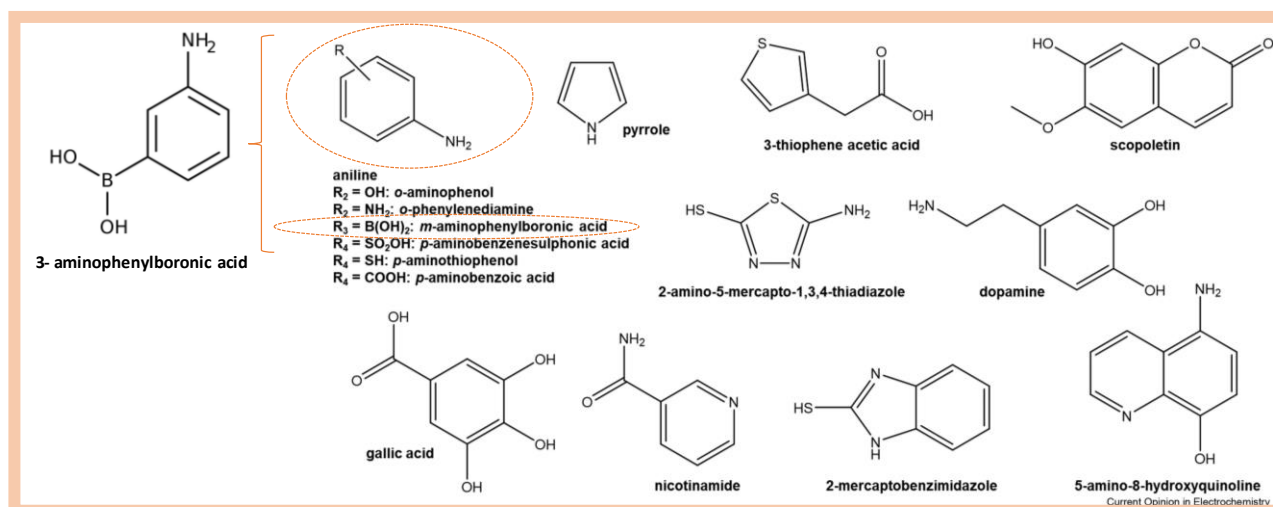


Figura 2. 6. Monómeros utilizados na síntese de MIPs (Adaptado de Gonçalves, 2021).

O monómero 3- Aminophenylboronic acid (3-APBA), segundo a literatura, pode ser amplamente utilizado na eletropolimerização de um MIP por oxidação deste monómero funcional sintético. Foi relatado por (Li *et al.*, 2017) que em 2017, desenvolveu-se um sensor eletroquímico sensível usando ácido fenilborônico na impressão molecular, com fim a detetar glicose em soro humano. Este relato teve sucesso, pois o filme impresso foi isolante e ultrafino e o sensor teve uma boa resposta capacitiva, detetando glicose numa faixa de linearidade entre 0,1- 50 mmol/L.

Este filme de 3-APBA tem sido alvo de muitos estudos para modificação de superfície de biomateriais porque atua como matriz biocompatível para a imobilização de biomacromoléculas (Mo *et al.*, 2020). A utilização deste monómero tem a capacidade de formar electroquimicamente uma camada de

polímero ultrafino, isolante e rígido, na superfície do eletrodo pela respetiva oxidação de 3- APBA (Rick & Chou, 2006).

É importante referir que na literatura até ao momento, ainda não se investigou a aplicação de filmes de 3-APBA para a deteção de biomarcadores associados à doença de Alzheimer com especificidade para a IL6.

2.3. Transdutores

Transdutor é outro componente presente na estrutura do biossensor, responsável pela conversão do sinal bioquímico num sinal eletrónico em proporção à concentração de um analito específico ou grupo de analitos (Gerard *et al.*, 2002). Embora o sinal possa ser amplificado e contínuo, os dispositivos podem ser configurados para exibirem medições únicas para atender aos requisitos específicos do mercado.

Os transdutores abordados nesta revisão bibliográfica são óticos, piezoelétricos e eletroquímicos. Embora estes transdutores apresentem semelhanças, estes podem exibir efeitos inerentes na matriz polimérica e intervir na leitura do reconhecimento nos sítios de ligação (Yarman *et al.*, 2021).

2.3.1. Óticos

Transdutores óticos apresentam uma característica única relativamente aos restantes detetores, pois estes medem propriedades óticas, como as alterações detetáveis nos sensores MIPs. Após a constatação, o sinal é convertido num sinal eletrónico que seja proporcional à concentração do analito (Ahmad *et al.*, 2019).

Existem dois tipos de sensores óticos: sensores de afinidade e optoelectrónicos. Os sensores de afinidade detetam analitos com propriedades óticas inerentes, como por exemplo alterações no índice de refração devido à ligação de proteínas ou de outras moléculas de grande peso molecular na superfície do sensor. O monitoramento de fluorescência é outro exemplo usado como transdutor ótico, sendo comumente utilizado devido aos baixos limites de deteção atingíveis (Ahmad *et al.*, 2019).

Além disso, o sensor optoelectrónico, é outro sensor ótico na qual se aplica este tipo de transdutores. Neste caso, o mecanismo envolvente depende do tipo de monómero selecionado, sendo necessário para um bom desempenho do sensor, monómeros que possuem boas propriedades óticas com a capacidade de detetarem mudanças e responder à presença de analitos. Neste tipo de sensor, os monómeros devem apresentar elevada absorção molar e devem ser fotoquimicamente e termicamente estáveis (Ahmad *et al.*, 2019).

2.3.2. Piezoelétricos

Transdutores piezoelétricos são definidos como a capacidade de produzirem carga elétrica através da aplicação de forças mecânicas de compressão ou atração, causando deformação mecânica de um material com características piezoelétricas, resultando numa diferença de potencial elétrico. O sinal elétrico neste mecanismo pode resultar na acumulação de energia cinética resultante da deformação do material, que é convertido em energia elétrica pelo transdutor, designado de efeito piezoelétrico direto. O efeito inverso, é outra forma de operação e consiste na deformação da estrutura cristalina de um material

com características piezoelétricas que ocorre aquando da aplicação de uma diferença de potencial elétrico proporcional à ação mecânica observada (Lima, 2018).

Estes mecanismos, por norma, são capazes de produzir uma grande densidade energética, no entanto, são materiais dispendiosos e bastante frágeis (Karaseva & Ermolaeva, 2014). De todas as suas características, este tipo de sensor, normalmente é aplicado para a deteção de antibióticos individuais e seu conteúdo total, dependendo dos anticorpos usados (Karaseva & Ermolaeva, 2014), e para a medição de amônia, hidrogênio, metano, monóxido de carbono, óxido nitroso e outros compostos organofosforados (Gerard, 2002). O princípio deste sensor pode ser ainda usado na medição de mudanças de massa, viscosidade ou densidade na superfície do sensor (Tothill, 2001).

2.3.3. Eletroquímicos

A produção em larga escala de dispositivos eletroquímicos tem sido promissora devido à sua simplicidade, acessibilidade por serem portáteis e de fácil manuseamento, baixo custo de produção e com possibilidade de serem descartáveis. Estas inúmeras vantagens, torna-os aplicáveis para uso doméstico ou consultório médico, como no diagnóstico de patologias (Tothill, 2009).

Um biossensor eletroquímico consiste num biossensor com um transdutor eletroquímico. Neste tipo de transdução, várias técnicas podem ser aplicadas durante a construção de MIPs, assim como a avaliação do desempenho analítico, incluindo:

- ❖ **Voltamétricos:** técnica que se baseia na aplicação de um potencial controlado aos elétrodos e mede-se a corrente neste processo (Moanea *et al.*, 1996). A voltametria estuda a relação entre a voltagem, a corrente e o tempo.
- ❖ **Conduvimétricos:** consistem na medição de alterações na condutividade do meio. Este sensor é aplicado a enzimas porque têm a capacidade de reduzir-oxidarem através das reações enzima-substrato (Sergeyeva *et al.*, 1999).
- ❖ **Potenciométricos:** consistem na medição da resposta analítica do sensor aplicado com variação de potencial elétrico entre os elétrodos e a solução *redox* (Gerard, 2002).
- ❖ **Amperométricos:** consistem na medição a um potencial elétrico constante de corrente elétrica obtida pelo processo de oxidação e redução da matriz polimérica (Yeh & Ho, 2005).
- ❖ **Impedimétricos:** consistem na medição da impedância através de alterações na capacitância e na resistência à transferência de eletrões nos elétrodos (Miranda, 2016).

Presentemente, as técnicas eletroquímicas mais salientes no contexto da monitorização de biomoléculas são a voltametria cíclica (CV, do inglês, *Cyclic Voltametry*), a voltametria de onda quadrada (SWV, *Square Wave Voltametry*) e a espetroscopia de impedância eletroquímica (EIS, *Eletrochemical Impedance Spectroscopy*).

Estes métodos eletroanalíticos que serão descritos seguidamente, utilizam as propriedades elétricas como análise da corrente elétrica, das diferenças de potencial, a carga e o tempo, para analisar a

interação entre a espécie *redox* e a interface do sensor. Estas interações permitem estudar a perda (oxidação) ou o ganho de eletrões (redução) que um determinado material sofre na presença de um estímulo elétrico (Cerqueira, 2013).

2.3.3.1. Voltametria Cíclica (CV)

Esta técnica eletroquímica, de uma forma geral, aborda o comportamento dos compostos eletroativos para adquirir informação qualitativa e quantitativa sobre o mecanismo de oxidação e redução.

A eficiência da CV advém da capacidade de obtenção rápida de informações sobre a termodinâmica do comportamento *redox* numa ampla faixa de potencial, da cinética de reações de transferência eletrónica e sobre reações químicas acopladas e a ocorrência de adsorção de produtos no elétrodo (Gonçalves, 2016; Pacheco *et al.*, 2013).

Neste sentido, como pode ser observado na Figura 2.7, o potencial inicial aplicado tem que ser um valor na qual nenhuma reação ocorre, por exemplo a -0,2 V de tensão. Quando o varrimento de potencial é aplicado para regiões mais positivas, verifica-se a oxidação das espécies eletroativas que existem na solução, registando-se um aumento da corrente proporcional à concentração do analito, formando um pico anódico. No mesmo exemplo, tal é verificado pela curva a cor-de-laranja, para uma tensão elétrica de 0,02 V e uma corrente elétrica de 1,2 A. Quando o potencial atinge um valor na qual nenhuma reação de oxidação ocorre, 0,2 V e 0,3 A, o potencial é varrido no sentido inverso até atingir o valor inicial, representado pela linha de cor azul. No caso de ser uma reação reversível, os produtos formados no varrimento direto, serão reduzidos no varrimento indireto formando um pico simétrico ao pico da oxidação (pico catódico) (Martins, 2019; Pacheco *et al.*, 2013).

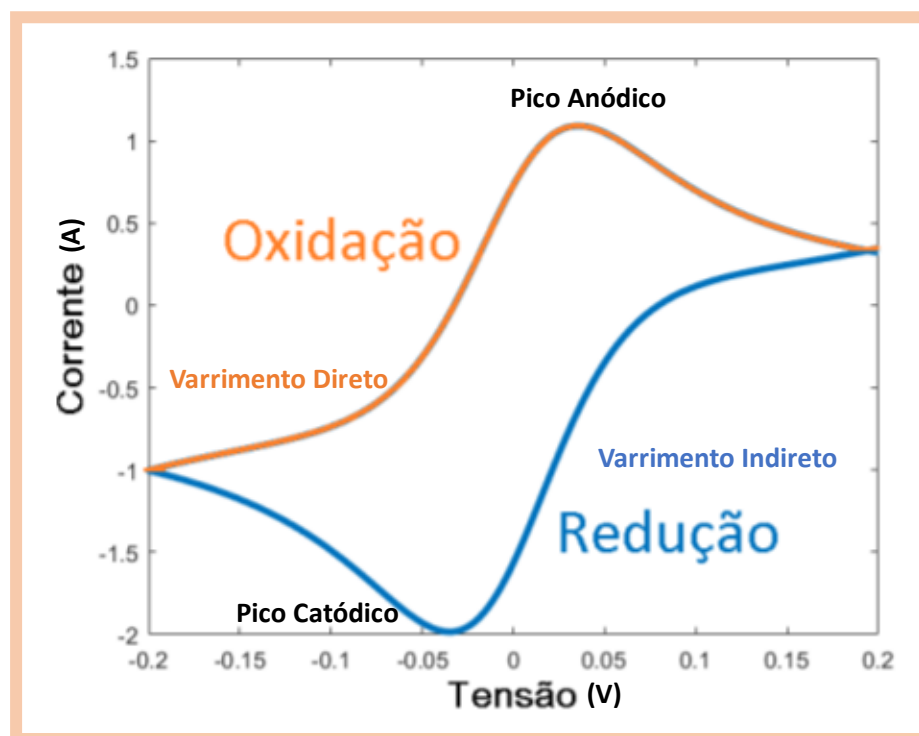


Figura 2. 7. Exemplo de um voltamograma cíclico reversível (Adaptado de Martins, 2019).

Na voltametria, os parâmetros eletroquímicos mais revelantes são a direção do varrimento de potencial, a velocidade de varrimento, o potencial inicial, o potencial máximo, o potencial mínimo e o potencial final (Gonçalves, 2016).

2.3.3.2. Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica bastante utilizada na eletroquímica devido a uma análise mais rápida e sensível. Em muitos estudos, esta técnica pode ser comparada aos métodos cromatográficos e espectroscópicos devido ao limite de deteção (Souza *et al.*, 2003).

Esta técnica consiste na aplicação de um determinado potencial variável de acordo com a amplitude do impulso e duração. Com isto, são aplicados impulsos que podem ser positivos e negativos e o sinal que se obtém apresenta uma intensidade de corrente de forma diferencial. Assim sendo, a representação gráfica obtida consiste numa curva em função de corrente-potencial, Figura 2.8.

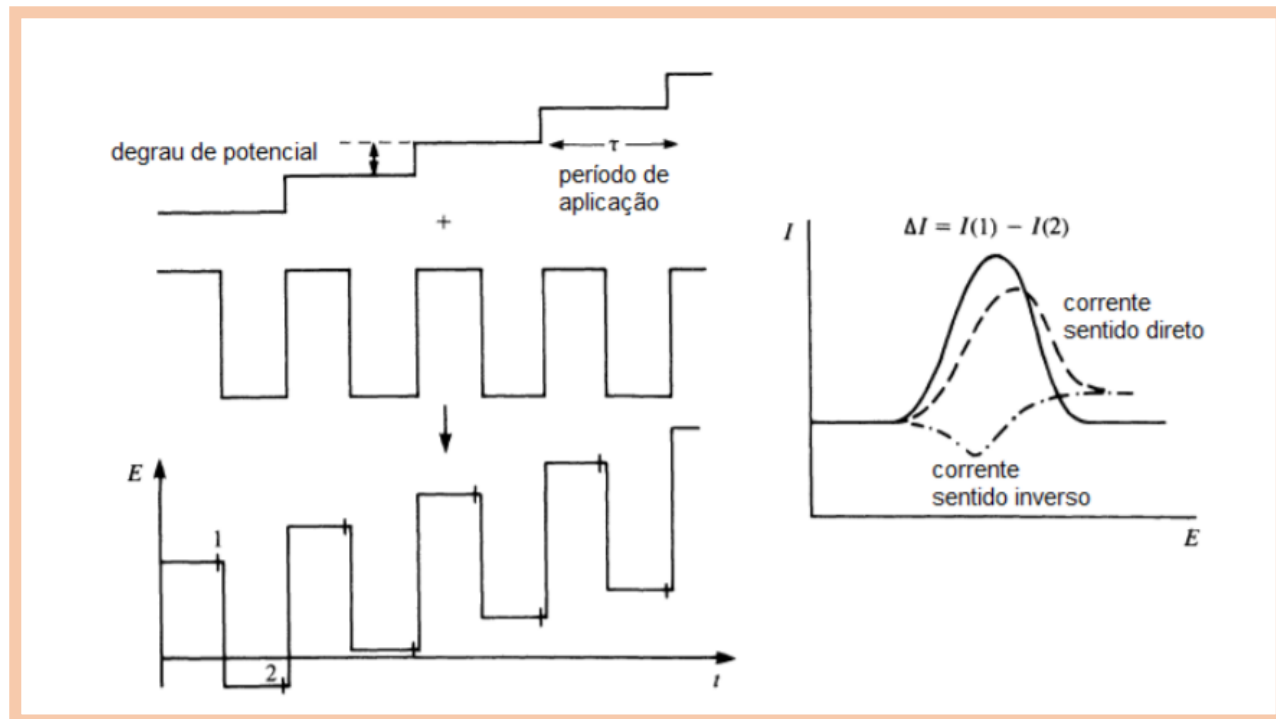


Figura 2. 8. Representação de voltametria de onda quadrada (Pacheco *et al.*, 2013).

Estas curvas, por norma, são bem definidas e simétricas, porque as variações tanto na altura como na largura do impulso de potencial são constantes para um definido intervalo de potencial. Geralmente, a altura dos picos produzidos é diretamente proporcional à concentração do analito em determinadas condições (Souza *et al.*, 2003).

2.3.3.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A impedância eletroquímica, mais conhecida por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma das técnicas mais complexas que permite obter informação da contribuição de processos eletroquímicos que ocorrem na superfície dos elétrodos, assim como, de qualquer estímulo externo que influencie a condutividade de um material (Gonçalves, 2016).

De uma forma geral, EIS permite a quantificação da resistência ou capacitância do eletrólito no elétrodo de trabalho e com isso, avaliar as características das superfícies de elétrodos quimicamente modificados. Entende-se que o comportamento eletroquímico que ocorre nos elétrodos é semelhante ao de uma resistência, conhecida como impedância de Faraday (Silva, 2015).

Por outras palavras, EIS é utilizada quando se pretende compreender o comportamento de um sensor através da aplicação de ondas sinusoidais de baixa amplitude num curto intervalo de frequência, que normalmente corresponde entre 2 a 10 mV (Martins, 2019).

O diagrama de impedância eletroquímica, Figura 2.9, representa a resistência do material obtido através dos métodos de corrente alternada, que corresponde a uma variação de sentido do fluxo de eletrões formando uma onda senoidal. Com recurso ao diagrama obtido, é possível analisar o modo como a camada de polímero impresso se comporta em função do tempo em relação ao processo, através da medida da intensidade da corrente resultante, após a aplicação de um potencial alternado ou corrente alternada programada pelo computador.

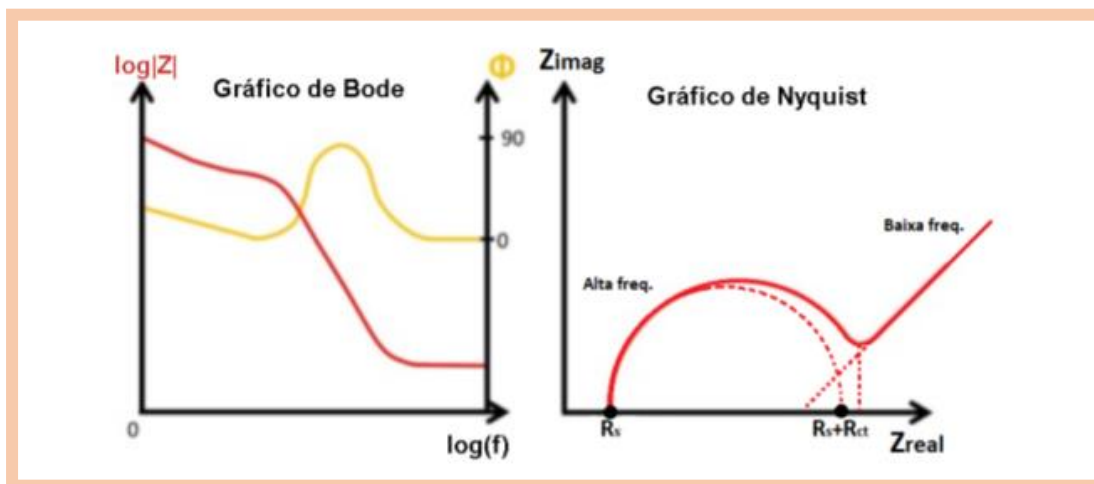


Figura 2. 9. Exemplo de gráficos utilizados na EIS (Martins, 2019).

Na Figura 2.9 mostra dois tipos de representações gráficas tipicamente obtidas numa análise EIS. À esquerda apresenta-se o gráfico de Bode que não demonstra informação intuitiva, e à direita encontra-se a representação gráfica de Nyquist. Este gráfico apresenta um semicírculo resultante de um conjunto de pontos para uma frequência particular em que nas abcissas corresponde à componente real da impedância (Z') e no eixo das ordenadas corresponde à parte imaginária (Z'') (Silva, 2007; UETA, 2002).

Na representação gráfica, a Impedância (Z) é o fator de proporcionalidade entre o potencial e a corrente ao longo do tempo. Dessa forma, a lei de Ohm afirma que é constante a razão entre a diferença de potencial nas extremidades de um recetor e a intensidade de corrente que o atravessa. Essa razão constante é a resistência elétrica, expressa em Ohm, (Ω) (Martins, 2019):

$$R = U/I \text{ (Eq. 1)}$$

Em que, U é a diferença de potencial elétrica, em V, I é a intensidade de corrente, em A, e R é a resistência elétrica, em Ω .

Na Figura 2.10 encontra-se representado o circuito *randles* em que R_0 representa a resistência do circuito da célula eletrolítica, R_c simboliza a resistência de polarização do eletrodo, C_L a capacitância e, R_i representa a resistência interna.

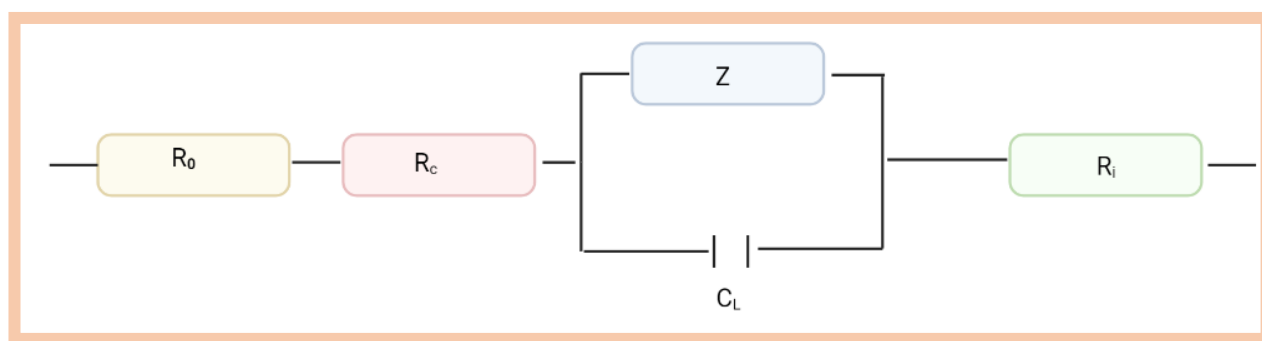


Figura 2. 10. Circuito de espectroscopia de Impedância Eletroquímica (Adaptado de Silva, 2015).

2.4. Eléttodos

A presente dissertação de mestrado aborda o desenvolvimento e a caracterização de um biossensor eletroquímico. Para a execução desta técnica é necessário analisar as reações que ocorrem na superfície do eletrodo a partir de parâmetros eletroquímicos.

Sucintamente, os eletrodos encontram-se inseridos num suporte sólido que pode ser de diferentes materiais, sendo os mais comuns, os de cerâmica. É nos eletrodos que as reações químicas e as medições eletroanalíticas ocorrem e que permitem a condução de corrente elétrica.

Para responder da melhor forma aos resultados pretendidos, é crucial a adequada seleção dos eletrodos onde o sensor será desenvolvido.

Neste trabalho foram selecionados eletrodos descartáveis em suporte de cortiça denominados por *screen-printed electrodes* (SPE) com propriedades físicas ou químicas apropriadas e controladas. Os SPE comparativamente aos eletrodos convencionais, possibilitam uma produção em grande escala, são portáteis, descartáveis e de pequena dimensão (Gonçalves, 2016). Na Figura 2.11 apresenta-se um SPE constituído por três eletrodos.

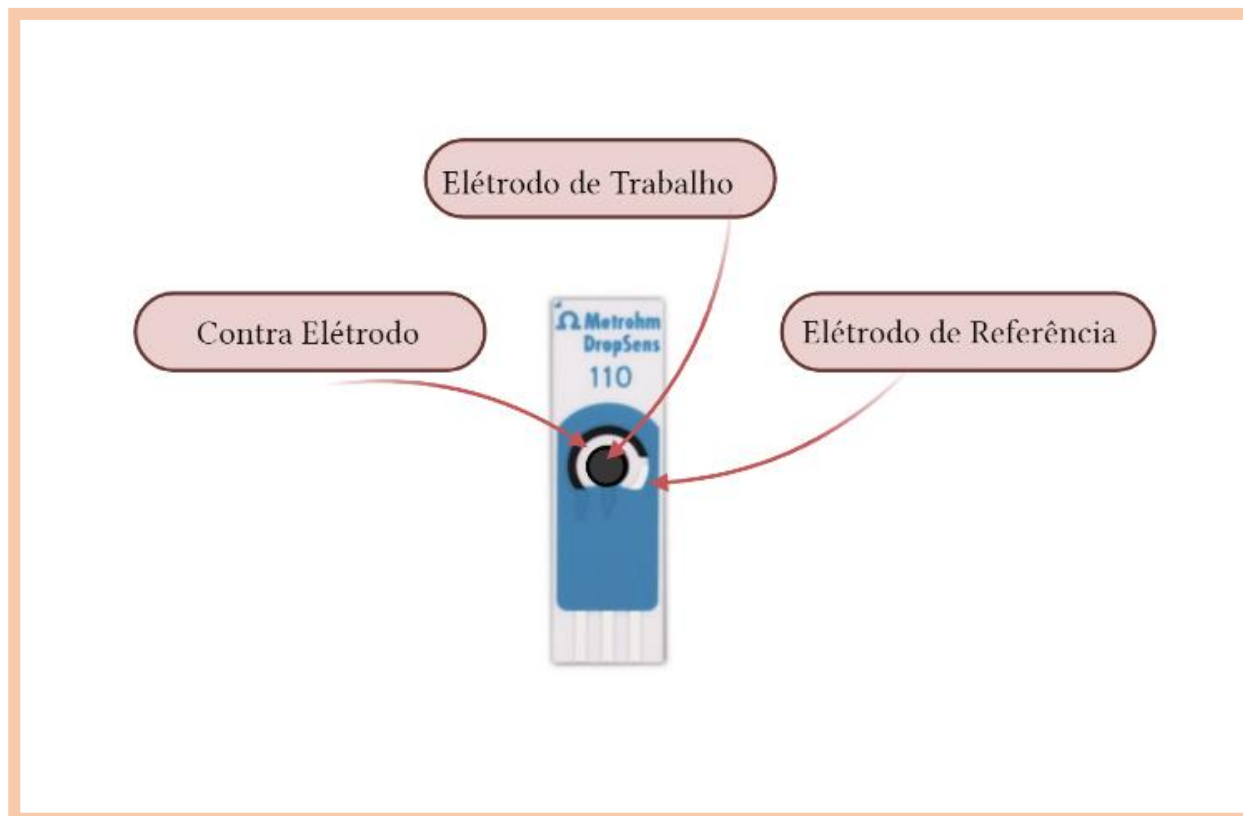


Figura 2. 11. Eléctrodos presentes num SPE.

- ❖ **Eléctrodo de Referência:** Responsável por manter o potencial eléctrico constante, preciso e conhecido, independente da temperatura (Sacramento, 2014). Este tipo de eléctrodo deve corresponder a certos requisitos para que possa ser considerado como de referência como: invariabilidade do potencial durante o processo independentemente da corrente que passa pelo eléctrodo; ajuste rápido a um determinado potencial; ser de fácil preparação e não interferir com pequenas correntes que passem no eléctrodo (Ribeiro, 2016).
- ❖ **Eléctrodo de Trabalho:** Este eléctrodo, conhecido também como eléctrodo indicador, é composto por um material sensível ao alvo, e por isso, o seu potencial varia proporcionalmente à concentração da espécie a ser determinada. Além disso, deve apresentar elevada reprodutibilidade e responder de uma forma rápida ao estudo em causa (Sacramento, 2014).

Existem vários tipos de eléctrodos de trabalho, sendo os de carbono comumente empregues na construção de sensores devido: a) dispor uma ampla gama de potencial eléctrico; b) uma superfície química rica em grupos carbono e, por fim, o baixo custo comparativamente a outros eléctrodos de trabalho como os de ouro. Eléctrodos de ouro, por sua vez, são recorrentemente utilizados pela facilidade de transferência de electrões e por serem quimicamente inertes (Silva, 2015).

- ❖ **Contra Eléctrodo:** Conhecido também como eléctrodo auxiliar, permite juntamente com o eléctrodo de trabalho, fechar o circuito eléctrico, garantindo dessa forma o impedimento da passagem de corrente

para o eléctrodo de referência, pois podem alterar a sua composição e em consequência o seu potencial. Quando se pretende promover um sistema *redox*, normalmente trabalha-se em correntes eléctricas demasiado pequenas na ordem dos nano-amperes, nA. Nestes casos o eléctrodo de referência pode atuar também como contra eléctrodo (Daniel, 2013).

O contra eléctrodo tem que ser um material condutor e inerte, sendo os mais comuns de carbono vítreo ou platina (Daniel, 2013).

Nesta dissertação o biossensor será desenvolvido na superfície de um eléctrodo descartável em suporte de cortiça cujos eléctrodos de referência, contra eléctrodo e de trabalho são compostos por prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e carbono. Na superfície do eléctrodo de trabalho é produzida um polímero de impressão molecular para deteção de um biomarcador associado a processos neuroinflamatórios.

3. DOENÇAS NEUROLÓGICAS

Nas últimas décadas, tem se registado por todo o mundo, um aumento do envelhecimento da população juntamente com um acréscimo rápido de distúrbios neurológicos, representando um desafio para a sustentabilidade dos sistemas de saúde a nível mundial. Este envelhecimento persistente é um conceito abrangente e tornou-se uma preocupação para a sociedade atual.

O aumento da esperança média de vida, associado ao crescente aumento da qualidade de vida, concebeu maior longevidade da população. Prevê-se que cerca de 35 milhões de indivíduos em todo o mundo, em 2050, sofram de doenças associadas ao envelhecimento, nomeadamente doenças neurodegenerativas (Cummings, 2011).

No entanto, em Portugal, a esperança média de vida também tem vindo a aumentar ao longo das últimas décadas. Em 2018, alcançou os 80,9 anos, contra 67,1 da década de 70. Este envelhecimento da população em Portugal deve-se também à diminuição da taxa de natalidade registada que é alarmante porque representa uma crescente procura por melhores cuidados de saúde e constitui alguns problemas económicos. O índice de envelhecimento em Portugal no ano de 2021 foi de 182,1 %. O decréscimo da porção de jovens e alargamento do número de idosos instiga um declive paralelo oposto dos níveis de fertilidade e mortalidade. Nas duas últimas décadas, segundo os dados registados na PORDATA, houve um decréscimo de jovens de 13,6 % e consequentemente um aumento de 44,6 % de idosos (PORDATA, 2021).

O processo de envelhecimento é contínuo, heterogéneo, universal, irreversível e conduz ao declive fisiológico normal e aumenta a prevalência de determinadas doenças, como é o caso das doenças neurodegenerativas (Cummings, 2011).

As doenças neurológicas englobam um conjunto de patologias que afetam o sistema nervoso, e podem afetar pessoas de qualquer idade, contudo, torna-se mais predominante em idade avançada. Os distúrbios neurológicos representam um grande problema para a saúde em todo o mundo, representando 3 % da carga mundial de doenças (Thakur *et al*, 2016).

A manifestação destas doenças normalmente é registada por fatores comuns como mudanças comportamentais, alteração na fala e variações mentais, no humor, de equilíbrio, atenção, entre outros. No entanto, podem ser causadas por diversos fatores entre os quais, falhas no desenvolvimento do sistema nervoso, infeções, tumores e aspetos genéticos (Ribeiro, 2016).

A demência é uma síndrome que envolve o declínio cognitivo e alterações neuropsiquiátricas, originando perda de agilidade na movimentação, esquecimento e mudanças no comportamento (*World Health Organisation*, 2021). O fator de risco mais significativo de demência é o aumento da idade pois, nos idosos a velocidade de regeneração das células é inferior ao de um jovem e o corpo apenas tem a capacidade de substituir um número reduzido de neurónios. Esta insuficiência na capacidade de substituir as células perdidas, causa distúrbios e lesões a nível cerebral, originando as doenças neurodegenerativas (Thakur *et al*, 2016).

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde em 2010, registou-se aproximadamente 35,6 milhões de pessoas no mundo que apresentaram demência, um número que é previsto triplicar até 2050 devido ao crescente aumento de envelhecimento registado por todo o mundo. Dessa forma, na Figura 3.1. apresenta-se o número estimado de pessoas com demência no período de 2010 a 2050. Espera-se que esse número aumente para 78 milhões em 2030 e 115 milhões em 2050 (Thakur *et al.*, 2016).

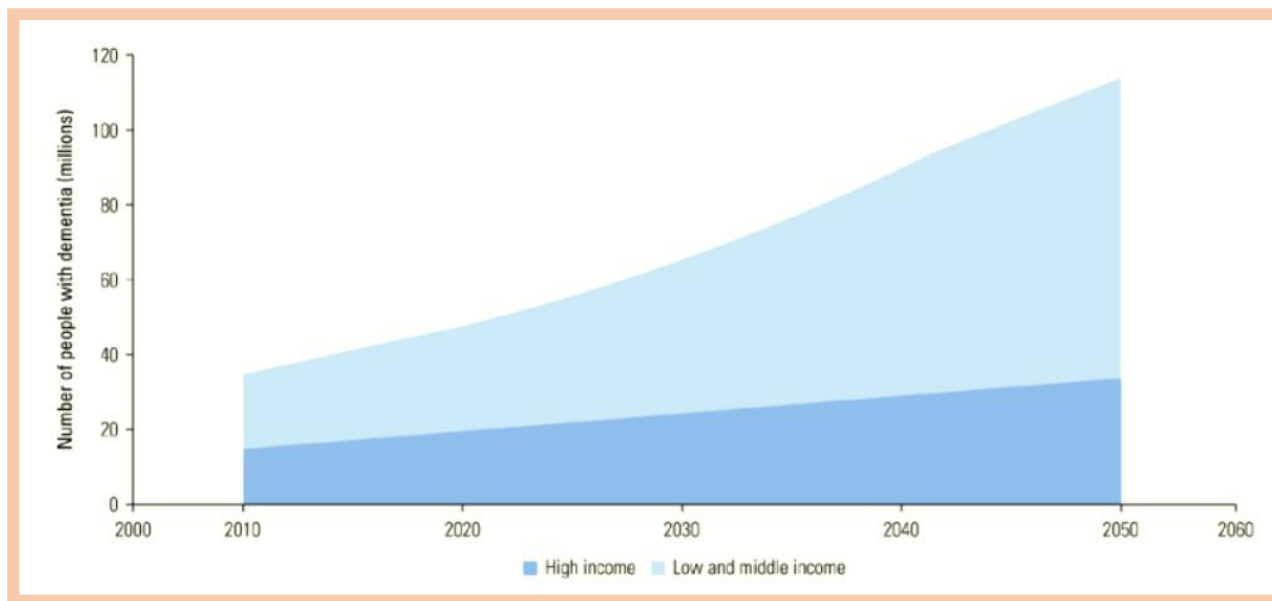


Figura 3. 1. Previsão do número de pessoas com demência, no mundo, entre 2010 e 2050 (Thakur *et al.*, 2016).

Perante as inúmeras doenças neurológicas, a grande maioria não apresenta ainda cura e algumas destacam-se pela sua elevada frequência como a epilepsia, demência, doenças cerebrovasculares, esclerose múltipla e doença de Parkinson (Thakur *et al.*, 2016).

Nesta dissertação é abordado apenas a doença de Alzheimer (DA) visto que é a forma mais comum de demência.

3.1. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa irreversível e a principal causadora de demência predominante na nossa sociedade. Esta doença é a 5ª principal causa de morte em pacientes idosos com mais de 65 anos e afeta atualmente mais de 50 milhões de pessoas. É esperado que esse número duplique a cada 20 anos, uma consequência do envelhecimento da população (John *et al.*, 2022).

A DA causa deterioração cognitiva e perda de memória, caracterizando uma variedade de sintomas neuropsiquiátricos, distúrbios de comportamento e comprometimento progressivo das atividades de vida diária (John *et al.*, 2022). No entanto, paralelamente aos distúrbios cognitivos, é desencadeado um declínio progressivo de sintomas não cognitivos como deficiências motoras, ansiedades, aumento de fragilidades e depressão (Mladenovic Djordjevic *et al.*, 2021). Reconhecendo as disfunções associadas à patogénese da DA, enaltece-se a preocupação e o interesse na busca a tratamentos e procedimentos

clínicos de forma a reduzir a carga prática e psicológica que requer tanto de familiares como de iátricos (Mladenovic Djordjevic *et al.*, 2021).

Patologicamente, DA é definida por perdas neuronais em regiões cerebrais específicas através de emaranhados neurofibrilares intraneuronais compostos por uma acumulação de placas neuríticas extracelulares que são depósitos de peptídeos β -amiloide ($A\beta$), terminando principalmente no aminoácido 42, e por uma acumulação da proteína Tau hiper-fosforilada. Há evidências que essa acumulação se inicia anos antes dos aparecimentos de sintomas clínicos da DA, permitindo um diagnóstico precoce (Alzheimer Europe, 2013; European Commission, 2009; Zetterberg, 2017).

3.1.1. Diagnóstico

Um diagnóstico de demência normalmente é baseado na história da própria doença com análise dos distúrbios cognitivos sendo realizado através de meios de investigação como exames sanguíneos, com fim a remover hipóteses relacionadas com causas possíveis como as não cerebrais. O exame de imagem é outro tipo de exame e tem o intuito de desconsiderar diagnósticos alternativos e fornecer resultados positivos e evidências para um determinado diagnóstico (Zetterberg, 2017).

Atualmente, através de uma autópsia ao cérebro, consegue-se alcançar um diagnóstico definitivo com 100 % de exatidão, sendo inviável este exame a uma pessoa viva. Como solução para um diagnóstico precoce com máxima exatidão, podem ser feitos diagnósticos específicos que complementam diversos estudos em torno do reconhecimento de biomarcadores de doenças neurodegenerativas nos fluídos biológicos. As monitorizações destes biomarcadores elevam o diagnóstico para um patamar mais eficaz e podem vir a auxiliar na prevenção e futuro tratamento de doenças como a DA (Zetterberg, 2017; Karki *et al.*, 2021).

O diagnóstico desta patologia pode ser realizado por diferentes amostras biológicas do corpo do ser humano, entre as quais se evidencia a urina, as lágrimas, o suor, a saliva, o sangue e o líquido cefalorraquidiano (LCR). Este último, consiste numa amostra proveniente do cérebro e por essa razão é recorrentemente utilizada neste tipo de diagnóstico devido ao elevado teor de biomarcadores visto que, diagnostica alterações patológicas no cérebro de forma mais significativa (Karki *et al.*, 2021). A recolha de LCR é laboriosa porque trata-se numa coletada na coluna vertebral, o que pode ser desconfortável para o paciente. No combate a esta concludente desvantagem, os recursos a amostras de sangue têm sido, privilegiadas e atraentes, uma vez que para além da sua simplificação no processo de recolha, há uma diminuição no volume necessário no diagnóstico e permite a deteção de biomarcadores de DA, sobretudo peptídeo $A\beta$ e proteína tau (Karki *et al.*, 2021).

Atualmente, os biomarcadores da DA são monitorizados pelos métodos *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou ensaios de imunoabsorção enzimática, que permitem a deteção de proteínas ou anticorpos. Este tipo de monitorização é demorado, caro e restritivo a uso laboratorial, exigindo muito tempo de fabrico para um resultado mais fidedigno (Zetterberg, 2017).

Dessa maneira, o diagnóstico precoce auxilia no atraso do desenvolvimento da DA, sendo desta forma importante a concretização de soluções que permitam determinar se alguma pessoa tem ou não propensão a desenvolver a doença. Complementando o diagnóstico, atualmente há um interesse no desenvolvimento dos projetos relacionados com a deteção de doenças neurodegenerativas através de

técnicas mais viáveis, não invasivas e de baixo custo associado (Karki *et al.*, 2021). Assim sendo, a tecnologia avançada de biossensores acarreta o diagnóstico de DA antes do aparecimento real dos sintomas patológicos, desempenhando um papel significativo no controlo precoce da doença.

Na Figura 3.2 apresenta a esquematização do processo de diagnóstico através de um biossensor para a deteção de um indefinido biomarcador associado a esta doença.

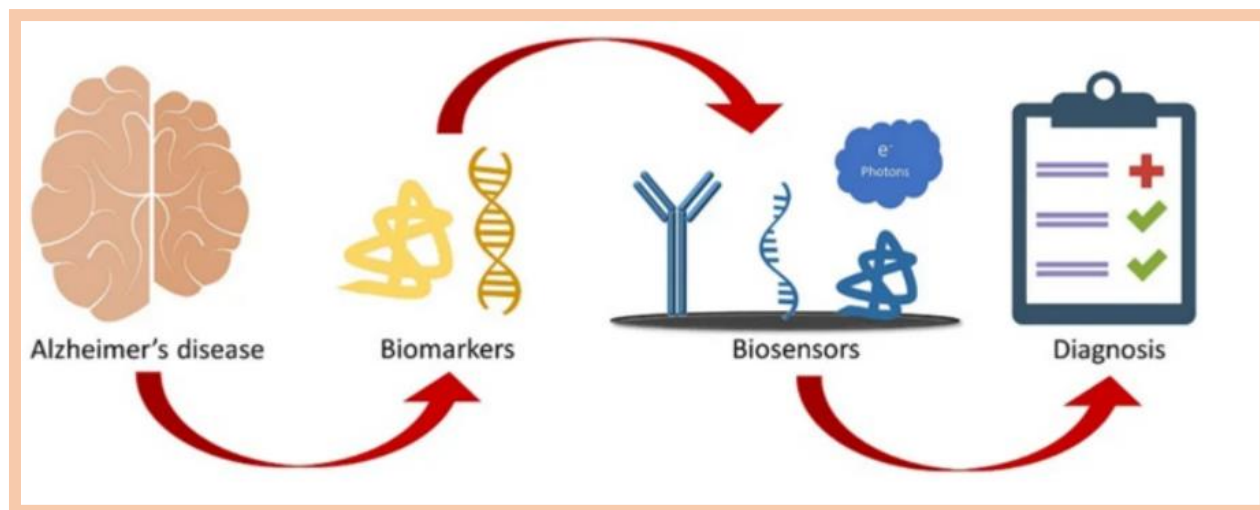


Figura 3. 2. Esquematização do processo de diagnóstico da doença de Alzheimer através de biossensores (Karki *et al.*, 2021).

A plataforma de um biossensor para a deteção precoce de biomarcadores associado à doença DA tem sido uma metodologia moderna e com ampla projeção de investigação devido à sua eficiência avaliada pela reprodutibilidade, precisão, ultra- sensibilidade e estabilidade da plataforma do sensor, bem como seus resultados de deteção em diferentes amostras de fluidos corporais. Portanto, esta dissertação aprofunda esta metodologia inovadora, com especificação num biomarcador.

3.1.2. Biomarcadores

O diagnóstico precoce da doença de Alzheimer por meio do uso de biomarcadores poderia facilitar a implementação e o monitoramento de intervenções terapêuticas precoces com potencial capacidade de modificar significativamente o curso da doença. De forma a compreender os principais biomarcadores que existem, o conhecimento do seu conceito é significativo. Um marcador biológico, renomeado de biomarcador, é um indicador que pode ser medido experimentalmente e indica a ocorrência de um processo biológico normal ou patológico, ou seja, determina processos normais ou a presença de algum estado de doença. Os biomarcadores são muito úteis do ponto de vista clínico, uma vez que podem auxiliar no rastreio, causa, diagnóstico, progressão, monitorização terapêutica e na remissão de determinada patologia (Altuna-Azkargorta & Mendioroz-Iriarte, 2021).

Dessa forma, a identificação de biomarcadores para a DA tem sido objetivo da investigação clínica atual e a maioria envolve análise de LCR ou *Positron emission tomography (PET) scans*. O *PET scans* corresponde a um exame que mede a atividade metabólica das células dos tecidos do corpo (Bowman & Kilts, 2003).

Um dos objetivos dos projetos relacionados com esta área é que a deteção dos biomarcadores seja possível em amostras de sangue obtidas de uma veia do braço ou por picada no dedo, de forma a evitar procedimentos mais invasivos. Dessa forma, têm sido abordados novas metodologias menos invasivas e mais sensíveis através de amostras de soro. Todas estas tecnologias são passíveis de serem aplicadas a outros biomarcadores, sendo que neste projeto é mencionado uma plataforma sensorial para a deteção e monitorização de um biomarcador complementar de doença inflamatória, a *IL6*. Além disso, o suporte de cerâmica destes sensores (convencionais), podem ser substituídos por suportes mais verdes como o papel, a cortiça ou um qualquer outro recurso natural, de forma que o conceito de química verde seja implementado.

Concluindo, a busca por biomarcadores para o diagnóstico precoce e desenvolvimento de tratamentos modificadores desta doença é um esforço contínuo e desafiador. Os biomarcadores para esta patologia podem ser divididos em específicos, neurotransmissores e neuro-inflamatórios. Com o avanço tecnológico e a intensa investigação nos biossensores, a maioria destes biomarcadores são detetados em nanoescala (Karki *et al.*, 2021).

3.1.2.1. Biomarcadores Específicos

Globalmente, segundo diversos estudos científicos, existem diversos métodos para deteção de biomarcadores associados à DA como: atrofia cerebral significativa na região parietoccipital na ressonância magnética; a presença de amiloide beta 1-42 cerebral (detetada por PET *scans*), que origina uma redução da taxa do metabolismo cerebral da glicose em regiões parieto-temporais bilaterais; presença de fluxo sanguíneo cerebral alterado por Tomografia Computorizada de Emissão de Fotões (SPECT), e por fim, a verificação de níveis alterados de proteína amiloide beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$) e de outras proteínas no plasma (Marcôa, 2011). Contudo, estes testes não medem diretamente a patologia relacionada à DA, mas sugerem a neurodegeneração e podem apoiar se a DA é casual ou contributiva (Marcôa, 2011).

Ao mesmo tempo, existem três potenciais marcadores biológicos que revelam alta probabilidade de DA que podem ser detetados e quantificados no LCR e mostraram uma elevada performance no diagnóstico desta doença. Entre os três marcadores, verificam-se níveis baixos de proteína $A\beta_{1-42}$, níveis altos de proteínas tau total (t-tau) e tau fosforilada (p-tau) e a alta razão entre t-tau ou p-tau e $A\beta_{1-42}$ (Marcôa, 2011). Na Tabela 3.1. encontra-se descrito os níveis fisiológicos destes biomarcadores num indivíduo em estado saudável comparativamente a um paciente com DA.

Tabela 3. 1. Biomarcadores específicos no diagnóstico da DA (Humpel, 2011).

Biomarcador	Controlo (pg/mL)	DA (pg/mL)
Amiloide beta 1-42 ($A\beta_{1-42}$)	794 ± 20	<500
Tau total (t-tau)	136 ± 89 (21-50 anos)	-
	243 ± 127 (51-70 anos)	> 450
	341 ± 171 (> 71 anos)	> 600
Tau fosforilada (p-tau)	23 ± 2	> 60

A DA é caracterizada principalmente pela patologia da proteína $A\beta_{1-42}$ que se encontra no gene da proteína precursora da amiloide, no longo braço do cromossoma 21 (Mantzavinos & Alexiou, 2017). Os níveis fisiologicamente produzidos de $A\beta_{1-42}$ são eliminados do cérebro, porém a acumulação deste péptido no plasma é o resultado de um aumento da produção promovida por falhas nos mecanismos fisiológicos de limpeza no cérebro (Thal *et al.*, 2008). Como se confirma pela análise da Tabela 3.1, pacientes com DA revelam menores níveis deste péptido no LCR (< 500 pg/mL), devido à deposição das moléculas nas placas amiloides ou limpeza reduzida da ($A\beta_{1-42}$) do parênquima cerebral (Humpel, 2011). O excesso de produção, deposição e agregação de ($A\beta_{1-42}$) leva à oxidação, disfunção neuronal, neurotoxicidade e neuroinflamação, refletidos pela apoptose.

Outros biomarcadores de lesão neuronal são as proteínas t-Tau e p-Tau que são medidas positivamente, em que a probabilidade de desenvolvimento de DA aumenta em proporção com a quantificação destes biomarcadores (Thal *et al.*, 2008). Estes biomarcadores são convencionais para outras patologias e podem ser detetados *in vivo* ou *in vitro*. A quantidade de t-Tau encontra-se relacionada com a intensidade da degeneração neuronal e aumenta gradualmente com a idade, em indivíduos saudáveis, passando de 450 pg/mL para mais de 600 pg/mL, em pacientes com idades entre os 51 e 70 anos (Humpel, 2011). A p-Tau corresponde à t-Tau hiperfosforilada em aproximadamente 39 locais diferentes e a sua deteção da p-Tau181 (proteína Tau fosforilada na posição 181) corresponde a um biomarcador definitivo da DA. O aparecimento de p-Tau resulta em falhas das funções neuronais, representando a presença das tranças neurofibrilares (Humpel, 2011).

Como visto anteriormente, existem diversos biomarcadores específicos no LCR para a DA. No entanto, a combinação destes três biomarcadores aumenta significativamente a validade do diagnóstico da DA, visto que produzem uma sensibilidade combinada superior a 95 % e uma especificidade superior a 85 % (Humpel, 2011).

3.1.2.2. Neurotransmissores

Neurotransmissores são mensageiros químicos geralmente sintetizados endogenamente em aminoácidos nos neurónios, na qual transmitem os sinais através da sinapse e junções neuromusculares. Os neurotransmissores são liberados das vesículas sinápticas na fenda sináptica, onde são capazes de interagir com os recetores apropriados dos neurotransmissores na célula-alvo. A disfunção sináptica, anormalidades mitocondriais, respostas inflamatórias, alterações hormonais e anormalidades do ciclo celular são algumas das consequências da DA, havendo uma implicação negativa na neurotransmissão (Kandimalla & Reddy, 2017).

Dos principais neurotransmissores referidos em Kandimalla & Reddy, 2017, como glutamato, glicina, norepinefrina, epinefrina, melatonina, gastrina, oxitocina, vasopressina, colecistocina, neuropeptídeo Y ou as encefalinas, a acetilcolina é um dos principais neurotransmissores que desempenham um papel crucial na patogénese da DA e um dos mais importantes nos processos de memória. Dessa forma, a perda progressiva deste mensageiro químico é ponto de referência para o diagnóstico desta patologia e o principal alvo terapêutico para a sua prevenção (Kandimalla & Reddy, 2017).

3.1.2.3. Neuro-inflamatórios

A neuroinflamação desempenha um papel em muitas condições neurológicas e consiste numa inflamação no sistema nervoso central (SNC) (Berdyeva *et al.*, 2019). Este mecanismo ocorre quando as células responsáveis e presentes no SNC e com elevada capacidade de fagocitose, designadas de micróglia, detetam um dano no tecido nervoso causado normalmente por compostos neurotóxicos, desencadeando um conjunto de reações dinâmicas e complexas com consequências protetoras ou nocivas que levam à produção de mediadores capazes de provocar lesões teciduais e neurodegeneração (Berdyeva *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020). As micróglia podem apresentar-se sob três formas diferentes consoante a sua necessidade local:

- ❖ Ameboide: Atua na modelação neuronal e permite um movimento livre no tecido nervoso e atua sem incutir inflamação local.
- ❖ Ramificada: Responsável do equilíbrio imunológico no cérebro encontrando-se presente sobretudo em adultos.
- ❖ Ativa: Apresenta elevada atividade no mecanismo de resposta à infeção através da produção de fatores pró-inflamatórios como citocinas, radicais livres, neurotoxinas podendo estimular a deposição de proteínas no SNC e provocar disfunção do sistema imune (Machado *et al.*, 2020).

A ativação destas células ocorre quando se regista danos no SNC e atua como resposta a uma variedade de estímulos, nomeadamente infeções, lesões cerebrais traumáticas, a presença de metabolitos tóxicos, ou a reações imunológicas. Dessa forma, em padrões moleculares associados a perigo sobretudo à patogenia da DA, determinada como inflamação crónica, a micróglia ativa liberta principalmente citocinas que podem ser várias, contudo as mais comuns são IL-1 β , IL6, IL-18, TNF- α , IFN- γ (Machado *et al.*, 2020).

Nesta dissertação, o biomarcador utilizado é a IL6. Esta citocina pró-inflamatória multifuncional apresenta um papel importante na defesa desta patologia, com elevados efeitos reguladores sobre a resposta inflamatória. Para a deteção da IL6 embora existam diferentes métodos, é relevante a sua quantificação e comparação dos níveis plasmáticos deste biomarcador entre um grupo controle e um grupo DA. Consequente, o estudo de Wu *et al.*, 2015, quantificou $1,6 \pm 0,8$ pg /mL desta proteína numa amostra de plasma num individuo em estado normal, valor fisiológico, e registou um acréscimo nesse valor para um paciente de DA, tendo obtido um valor de 2 ± 1 pg/mL, Figura 3.3.

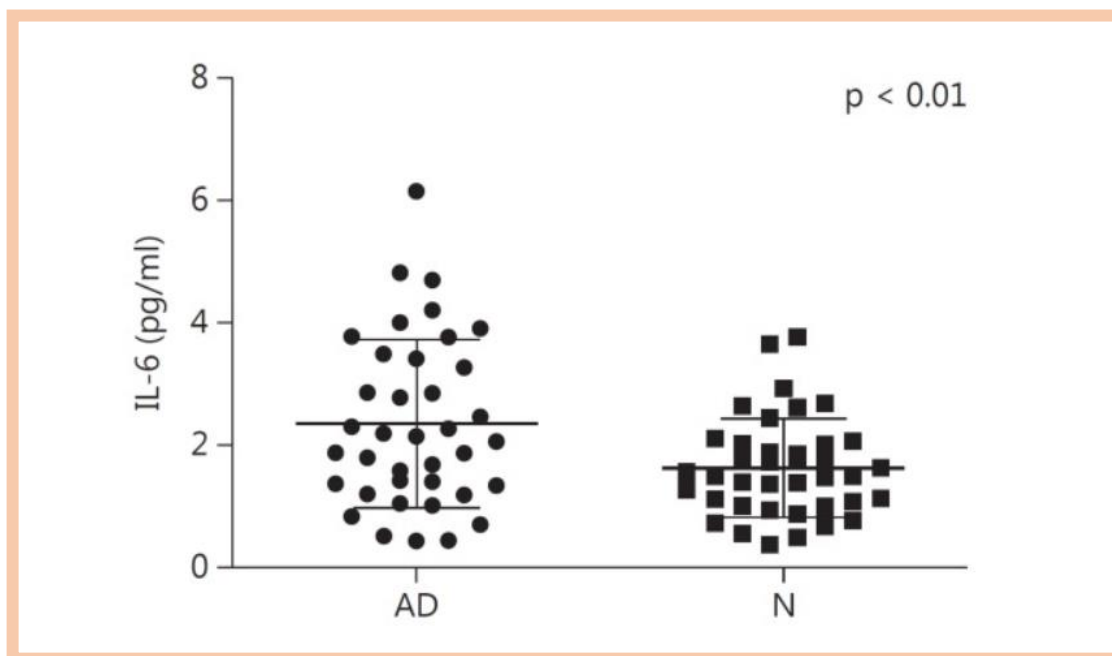


Figura 3. 3. Concentração de *IL6* em amostras de plasma em indivíduos normais, N, (controlo) comparativamente ao indivíduo com DA (Wu *et al.*, 2015).

Contudo, é de extrema importância referir que os diagnósticos do Alzheimer por proteínas de atividade inflamatória apenas servem para: a discriminação de existência de enfermidades ou não-enfermidades; avaliação da extensão da atividade de inflamação; monitorização do desenvolvimento da doença e a resposta a intervenções terapêuticas.

Com isto, é de salientar que a utilização da *IL6* para o diagnóstico desta patologia proporciona aos clínicos uma importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico e o acompanhamento das enfermidades inflamatórias. Uma vez que este biomarcador é inespecífico seria indispensável a realização de outros ensaios de forma a detetar proteínas específicas como mencionadas anteriormente.

4. DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO

O principal objetivo desta dissertação consistiu em desenvolver um dispositivo biossensor com base em elétrodos de cortiça descartáveis, com a utilização de recursos naturais e materiais sustentáveis.

Dessa forma, desenvolveu-se um biossensor em suporte de cortiça para a deteção de um biomarcador associado a processos inflamatórios, proteína *IL6*. Este biossensor servirá como ferramenta de auxílio aos clínicos no rastreio e progressão da doença de Alzheimer através das condições de neuro-inflamação. Contudo, é importante salientar que este biomarcador é inespecífico e ajuda a complementar um teste com biomarcadores específicos.

Numa primeira fase, o sensor foi estruturado e otimizado em elétrodos comerciais (SPE), em elétrodos trabalho em carbono, que combina (bio)materiais de elevada especificidade com um transdutor eletroquímico onde ocorreu a polimerização eletroquímica em *Bulk*. Após o estudo de condições ótimas e análise de parâmetros eletroquímicos, reproduziu-se para suporte de cortiça e analisou-se o seu desempenho.

Uma das grandes vantagens desta estratégia proposta é uma ferramenta que permite a deteção no local, de resposta rápida e baixo custo associado.

Neste capítulo é descrito de modo detalhado os materiais e os equipamentos utilizados, bem como o procedimento experimental em que foi baseado para o desenvolvimento deste biossensor eletroquímico sensível à proteína *IL6*.

4.1. Materiais

4.1.1. Equipamentos

O principal equipamento utilizado foi um potencióstato/galvanostato da *Metrohm Autolab*, **PGSTAT204**, Figura 4.1, controlado pelo Software Nova 2.15. Este equipamento foi crucial para as medições eletroquímicas para a avaliação tanto da construção como do desempenho do sensor através das técnicas eletroquímicas. Este dispositivo eletrónico, com corrente máxima de 400 mA, permite controlar a diferença de potencial elétrico nos elétrodos SPE que se conectam a uma caixa da *DropSens* (DRP-DSC), Figura 4.2.

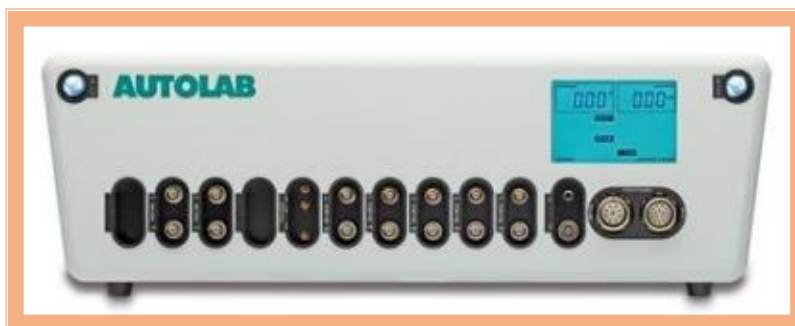


Figura 4. 1. Potencióstato da Metrohm Autolab.



Figura 4. 2. Caixa DropSens (DRP-DSC).

Para a caracterização química do sensor, foi utilizado um método espectroscópico, a técnica de espectroscopia Raman, representado na Figura 4.3., da *Thermo Scientific* (DXR 532 nm *Filter*) no sentido da obtenção de informações a nível molecular do material em estudo. Desta técnica, obtêm-se espectros compostos por picos que correspondem a uma vibração específica de uma ligação molecular e com isso, analisar a estrutura química do material e a modificação da superfície dos elétrodos SPE (Castro, 2013).



Figura 4. 3. RAMAN- Caracterização do sensor.

4.1.2. Reagentes e Materiais

A lista de materiais e reagentes utilizados para a realização deste trabalho com a respetiva concentração utilizada e empresa da qual foram adquiridos, encontra-se listado na Tabela 4.1. Estes reagentes não sofreram qualquer purificação adicional e foram utilizados conforme se encontram disponíveis no mercado.

Tabela 4. 1. Lista de materiais e reagentes utilizados com respetiva concentração e origem.

<i>Reagente/Material</i>	<i>Concentração</i>	<i>Fabricante</i>
Hexacianoferrato (II) de potássio	5 mM	Riedel-de Haën
Hexacianoferrato (III) de potássio	5 mM	Riedel-de Haën
Cloreto de potássio	0.1 M	Carlo Erba
Tampão Fosfato-Salino - PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	0.01 M	Panreac
<i>3- Aminophenylboronic acid (3-APBA)</i>	5 mM	Acros Organics
Ácido sulfúrico	0.5 M	Sigma- Aldrich
Ácido fosfórico	0.1 M	Riedel-de Haën
<i>IL6 Human, recombinant animal component free</i>	10 µg/mL	Abcam
Soro (<i>Cormay Serum</i>)	-	Fluka
<i>Screen-printed Carbon Electrodes (SPE- Cork)</i>	-	BioMark, Coimbra
<i>Screen-printed Carbon Electrodes (SPE-110)</i>	-	Metrohm Dropsens

4.1.3. Soluções

Na generalidade, todas as soluções necessárias à realização deste trabalho, foram preparadas em água ultrapura com condutividade inferior a $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$, purificada pelo sistema Milli-Q. A pesagem dos reagentes sólidos e medição dos reagentes líquidos foi rigorosa e com posterior diluição em balões volumétricos de classe A, com capacidade conforme os volumes necessários. Todas as medições de volume foram efetuadas através das pipetas *GILSON* com volumes reguláveis.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando uma conhecida solução *redox probe* de ferro, constituída por hexacianoferrato de potássio III e hexacianoferrato de potássio II, 5 mM, tri-hidratado dissolvido num eletrólito de suporte de cloreto de potássio a 0.1M.

A preparação de uma solução do monómero 3- APBA, foi preparado numa solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 M, pH 7,4), com a dissolução de 1 pastilha de PBS em 500 mL de água ultrapura. De seguida, para proceder à realização da curva de calibração, passou-se a utilizar tampão fosfato 0,01 M, de pH igual a 5, acidificado com ácido fosfórico através do medidor de pH com modelo GLP 21 da CRISON. As soluções utilizadas para a construção da curva de calibração foram obtidas a partir de uma solução stock de *IL6* com concentração de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($4,5 \times 10^{-5}$ M).

4.2. Procedimentos analíticos

Na fase inicial do desenvolvimento do sensor, foram realizados estudos de otimização de diferentes etapas em elétrodos SPE comerciais adquiridos pela *Metrohm DropSens* (SPE-110) (A). Após o estudo de vários parâmetros e atingido resultados esperados e reprodutíveis, o mesmo procedimento analítico foi igualmente aplicado em elétrodos SPE com suporte em cortiça, (SPE-*cork*), Figura 4.4. Estes dispositivos apresentam como características, dimensões de $3,4 \times 1,0 \times 0,05$ cm, contactos elétricos em prata com 4 mm de diâmetro, elétrodo de trabalho em carbono com um diâmetro de 4 mm, contra elétrodo de carbono e elétrodo de referência em carbono no (SPE-*cork*) e prata no sensor (SPE-110).

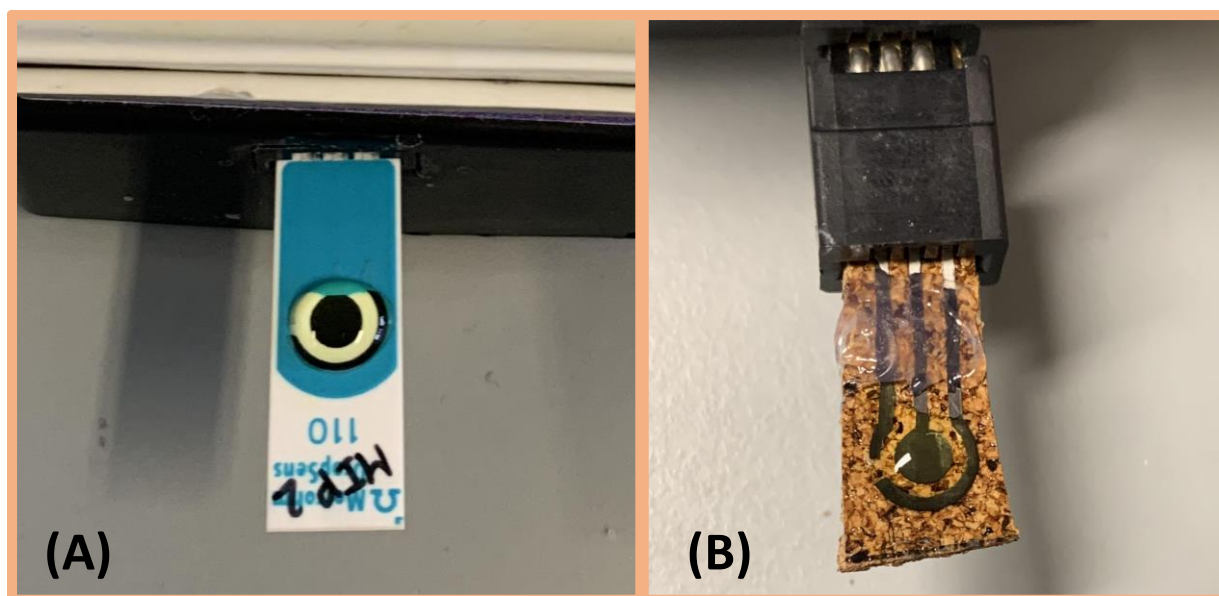


Figura 4. 4. Elétrodos SPE utilizados: (A) comerciais- DropSens 110 e (B) cortiça.

Os elétrodos comerciais da *DropSens* 110, SPE-110, são os elétrodos de carbono comumente utilizados em ensaios laboratoriais para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, cujo suporte geralmente apresentado é substrato em cerâmica. Em contrapartida, os sensores em suporte de cortiça como o representado na Figura 4.4 B, foram fabricados no BiomaK. Estes dispositivos, como referenciado anteriormente, além de fornecerem uma tecnologia mais sustentável e com redução do impacto ambiental, comparativamente a outros suportes apresentam um baixo custo associado. Além disso, fator importante no desenvolvimento destes biossensores é o conhecimento da composição da tinta de carbono utilizada na produção do sistema dos três elétrodos. Nos elétrodos comerciais essa informação não se apresenta tão detalhada. Este parâmetro é importante uma vez que na montagem do sensor, a composição da tinta de carbono pode influenciar a dispersão e a adesão posterior no processo de impressão. Dessa forma, o controlo da deposição da tinta de carbono permite obter uma superfície capaz de sofrer modificações e verificar a reprodutibilidade.

No entanto e de uma forma geral, ambos os dispositivos beneficiam por recorrerem a volumes reduzidos de amostra, atingindo o nível dos microlitros, μL .

Conforme ilustrado na Figura 4.5, a construção do dispositivo sensor envolveu uma sequência de etapas: preparação dos elétrodos (A), eletropolimerização (B), remoção de proteína (C) e avaliação do desempenho com respetiva calibração e interpretação de resultados eletroquímicos (D).

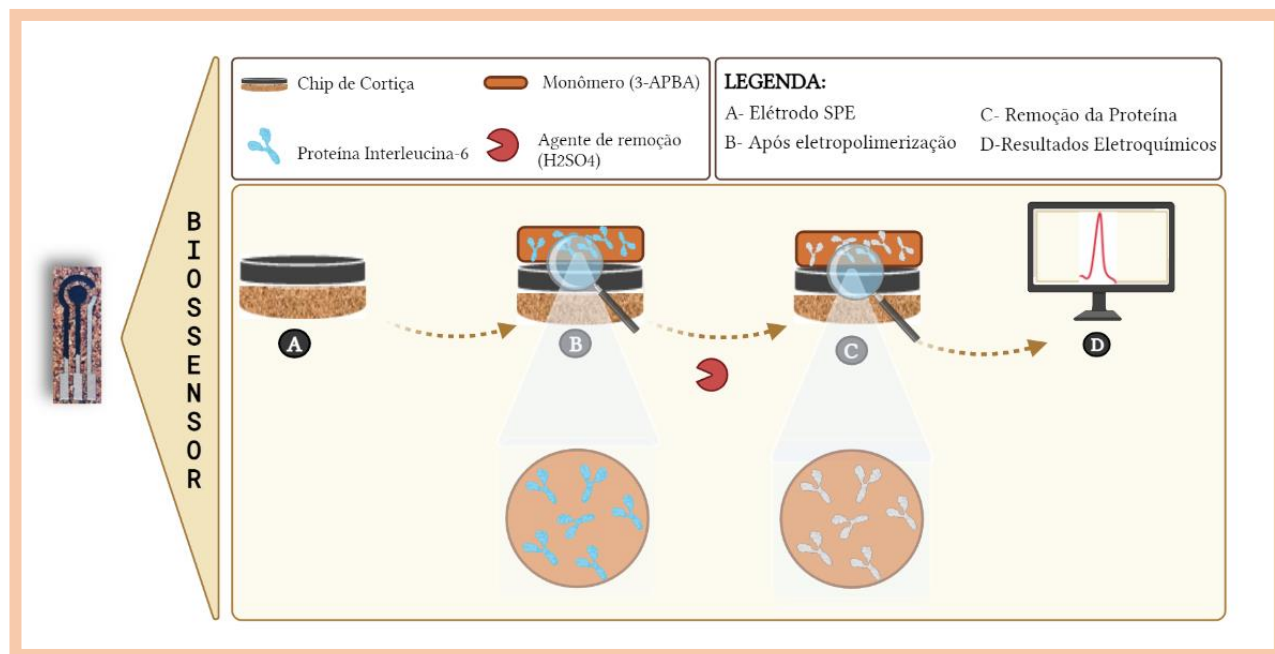


Figura 4. 5. Esquemática da construção do sensor eletroquímico.

O procedimento para cada uma das etapas definidas para a síntese do material MIP encontra-se descrito de uma forma mais detalhada nas subsecções seguintes.

4.2.1. Preparação do biossensor (Pré-tratamento)

Como verificado anteriormente, a preparação do biossensor eletroquímico envolve um conjunto de etapas.

Começou-se por otimizar o procedimento nos elétrodos comerciais da *DropSens* e definiu-se os parâmetros eletroquímicos para avaliar o estado inicial do SPE. Para tal, utilizou-se a solução *redox*, incubando um volume fixo de 70 μL envolvendo os três elétrodos. Após finalizar cada etapa definida na Figura 4.5 como A, B, C e D, efetuaram-se leituras em CV, SWV e EIS, a fim de poder comparar os resultados e interpretar a modificação química ocorrida na superfície do eletrodo de trabalho. Os parâmetros eletroquímicos foram iguais para ambos os substratos. Nos ensaios CV, os potenciais foram definidos no intervalo de -0,8 a +0,7 V, a 50 mV/s. Nos potenciais SWV utilizou-se um potencial de -0,3 para +0,7 V, com uma frequência de 2 Hz. Quanto à EIS, utilizou-se uma perturbação de potencial senoidal de amplitude de 0,01 V e um número de frequências iguais a 50, distribuídas logaritmicamente numa faixa de frequência de 0,1-100 kHz. Todos os dados do EIS foram ajustados a um circuito equivalente de *Randles*.

4.2.2. Eletropolimerização

No sentido de desenvolver o sensor foi preparado o MIP. Esta etapa, consistiu na preparação de uma solução do monómero 3- APBA preparada em PBS a pH 7,4 e sempre no momento da sua utilização. Para facilitar a sua dissolução, a solução foi submetida a tratamento por ultrassons num período de tempo controlado. A solução de polimerização consistiu na combinação da proteína *IL6*, 10 $\mu\text{g/mL}$ com a solução de monómero preparada, numa proporção 1:10. A mistura resultante, foi colocada na superfície dos três elétrodos e formou-se a camada MIP por (eletro)polimerização. Para tal, foi utilizado a técnica eletroquímica CV, com os seguintes parâmetros:

- ❖ Número de ciclos: 15
- ❖ Taxa de varredura (*Scan-Rate*): 0,02 V/s
- ❖ Intervalo de Potencial: -0,2 a 1,0 V

Em paralelo, preparou-se um polímero sem impressão molecular (NIP, do inglês *non-imprinted polymer*). Este material foi preparado de modo similar ao descrito para o MIP, excluindo-se, no entanto, a molécula molde do procedimento com substituição por mesmo volume de PBS, pH 7,4.

4.2.3. Remoção da proteína

O processo de remoção da proteína *IL6* foi efetuado aplicando 5 μL de solução de ácido sulfúrico, a 0,5 M, por um período de 1 hora, à temperatura ambiente e apenas no eletrodo de trabalho. Posteriormente, foi lavado abundantemente com água ultrapura de forma a remover o agente de remoção e toda a *IL6* extraída da matriz polimérica.

Posteriormente, procedeu-se à incubação de 7 μL de PBS a pH 5 por um período de 30 minutos, a fim de estabilizar o sensor com o tampão correspondente ao utilizado no passo seguinte, avaliação do seu

desempenho analítico. A etapa da estabilização do sensor é crucial, uma vez que garante que os resultados eletroquímicos obtidos na curva de calibração, apenas resultam da influência da proteína e desse modo, permite um maior controlo e acessibilidade na interpretação dos resultados.

Nesta etapa, a *IL6* é extraída da matriz polimérica por clivagem das ligações peptídicas, obtendo assim as cavidades que são complementares à proteína em tamanho, forma e funcionalidade.

Finalizando esta última etapa da construção do biossensor, a temperatura de armazenamento foi crucial, sobretudo para o suporte em cortiça, tendo sido otimizado a temperatura ambiente. Verificou-se que excesso de humidade começou a moldar o sensor, formando uma estrutura côncava no mesmo ao invés de permanecer em estrutura plana devido à sua característica de maleabilidade.

Após a conclusão das etapas anunciadas, o biossensor encontra-se completo, estável e apto para a avaliação do seu desempenho.

4.2.4. Caraterização da superfície do sensor

O estudo por espectroscopia de RAMAN, foi a técnica qualitativa utilizada neste trabalho que permitiu juntamente com as técnicas eletroanalíticas como CVs e EIS, um controlo da modificação química ocorrida na superfície dos elétrodos SPE, nos MIPs e NIPs. Dessa forma, foram analisadas 5 amostras, um SPE sem qualquer tratamento, um NIP e outro MIP eletropolimerizado em *Bulk* consoante as condições mencionadas anteriormente, e, por fim, um NIP e um MIP após o tratamento com ácido sulfúrico. Todos os dados obtidos foram examinados pelo programa *OMNIC Software*.

4.3. Avaliação do desempenho analítico do biossensor

4.3.1. Curva de calibração

No final de todo o processo da síntese do sensor, é importante a validação do mesmo com a análise do respetivo desempenho analítico através da capacidade do mesmo para reconhecer nas cavidades criadas, a proteína *IL6*. Para tal, efetuaram-se curvas de calibração, na qual se expressa a relação existente entre o sinal medido com a respetiva concentração de analito. Assim, os ensaios foram dirigidos com a incubação sucessiva durante um período de 20 minutos, de concentrações crescentes de *IL6* preparadas numa solução tampão de PBS (pH 5).

De acordo com o ponto isoelétrico (PI) da *IL6*, tendo um valor de 6,17 (Gonçalves, 2016), a solução tamponante utilizada foi mais ácida a fim de promover uma solução com cargas positivas devido à protonação das aminas presentes no analito. Conhecido o valor fisiológico de *IL6* numa amostra de um paciente em estado normal, 1.6 ± 0.8 pg /mL (Wu *et al.*, 2015), definiu-se 5 soluções com títulos de 1 pg/mL, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 1 ng/mL e 10 ng/mL. Em seguida, procedeu-se à lavagem com água ultrapura e avaliou-se o seu desempenho segundo técnicas de EIS e SWV através da solução *redox*.

4.3.2. Análise em Soro

Os ensaios foram repetidos num contexto mais realista, preparando-se soluções padrão de *IL6* em soro Cormay, diluído mil vezes em tampão PBS (pH 5). Os valores das concentrações definidas foram

idênticos às do ensaio anterior e dessa forma, o sensor foi estudado entre uma gama de 1 pg/mL a 10 ng/mL. Este ensaio teve o intuito de avaliar o comportamento do sensor numa situação mais real. O soro Cormay apresentava-se sob a forma de liofilizado (Ferreira, 2021) o que permitiu um estudo do comportamento do biossensor numa matriz biológica, segundo a técnica EIS.

4.3.3. Estudo da seletividade

O estudo de seletividade foi realizado incubando diferentes compostos presentes no soro humano sintético a fim de avaliar a interferência (%). Dessa forma, analisou-se os resultados pelos métodos de SWV e EIS, com os diferentes agentes de interferência selecionados. Este estudo é relevante porque existem determinados compostos que interferem de modo seletivo, afetando a concentração do produto final. Para tal, adotou-se o método das soluções misturadas, onde uma solução contendo um padrão dentro da gama de linearidade da curva de calibração foi misturada com cada um dos possíveis compostos interferentes.

Os compostos interferentes foram os seguintes: *IL6* (100 pg/mL), glicose (0,7 mg/mL), ureia (0,2 mg/mL) e BSA diluída mil vezes em tampão PBS, pH 5 (1 mg/mL). A quantidade de interferência, em percentagem, foi calculada em relação ao sinal da proteína na ausência de compostos interferentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente capítulo tem como propósito a apresentação e a análise dos resultados obtidos ao longo do trabalho experimental, no desenvolvimento do biossensor eletroquímico para a detecção de *IL6*. A organização dos resultados apresentados, encontram-se de acordo com a orientação definida no capítulo anterior, passando por uma comparação entre os dois biossensores estabelecidos, um em suporte comercial, e outro em suporte mais verde, em cortiça.

5.1. Pré-tratamento

Geralmente, os SPE são sujeitos a um pré-tratamento eletroquímico, adequado à sua utilização, com fim a remover potenciais contaminantes que possam estar presentes na superfície do elétrodo e fomentar o aparecimento de alguns grupos funcionais na tinta de carbono. Contudo, verificou-se que os elétrodos utilizados tanto os SPE-110 como SPE-cork, sem a modificação química, apresentaram resultados semelhantes e reprodutíveis nas medições realizadas, e por essa razão foi eliminada este processo de pré-tratamento. Na Figura 5.1, apresenta-se a leitura inicial realizada aos elétrodos SPE-110 e SPE-cork, segundo as técnicas CV (A) e EIS (B).

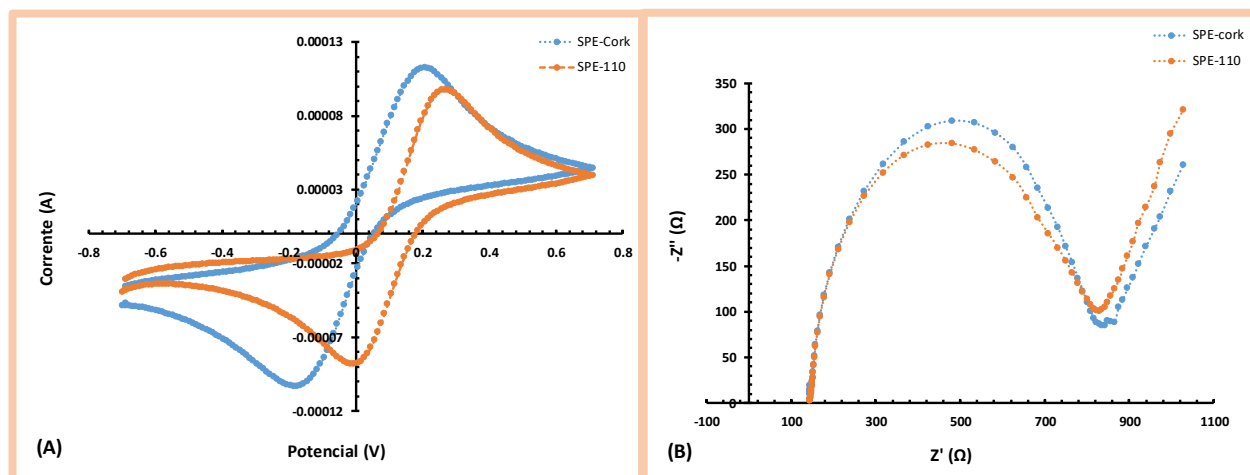


Figura 5. 1. Leitura inicial dos elétrodos SPE-110 e SPE-cork segundo ensaios de CV (A) e EIS (B).

Os elétrodos comerciais, representado a cor-de-laranja, apresentaram uma menor separação de picos de oxidação-redução (0,3 V), comparativamente ao suporte em cortiça, representado a azul, o que favorece a transferência de eletrões, no entanto, apresenta um valor mais baixo em termos de corrente elétrica (0,00010 A). De forma a melhorar a transferência de eletrões e diminuir a separação de picos no voltamograma (CV) procedeu-se a diferentes pré-tratamentos dos elétrodos. Testaram-se algumas limpezas eletroquímicas como a Cronoamperometria a $-1,7$ V durante 200 s, utilizando a solução de cloreto de potássio a 0,1 M. Os resultados obtidos nas etapas seguintes após esta limpeza, não foram favoráveis e complementaram a ideologia da exclusão desta etapa no processo. Assim sendo, sempre que um novo sensor foi preparado, após a leitura inicial com a solução *redox*, prosseguiu-se para a construção do sensor, visto que o pré-tratamento não foi expressivo e esta etapa foi anulada.

5.2. Construção do sensor

A ideologia deste trabalho, além de reintroduzir o conceito de sustentabilidade e a valorização dos recursos naturais na temática dos sensores, é de extrema importância a visão de produção numa escala piloto destes dispositivos. Dessa forma, a fim de ser viável à escala industrial, procurou-se otimizar na construção do sensor, procedimentos simples, efêmeros e acessíveis em termos económicos.

5.2.1. Impressão molecular

Na preparação do sensor eletroquímico, a eletropolimerização foi o método responsável pela síntese dos MIPs. A vantagem da utilização deste método é a capacidade de controlo e otimização de diversas condições de polimerização e de variáveis como (i) a escolha do monómero, (ii) a gama de potencial e (iii) o número de ciclos na polimerização são as abordadas em seguida.

i. Escolha do monómero

A seleção do monómero é essencial e deve ser cuidadosamente escolhido a fim de garantir boas ligações existentes entre os grupos funcionais do monómero com grupos funcionais específicos da proteína.

Inicialmente, o monómero escolhido para a interação com a *IL6* foi a dopamina. O monómero dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) é um neurotransmissor de catecolaminas que segundo a literatura, pode ser amplamente utilizada na eletropolimerização de monómeros para síntese de MIPs por oxidação deste monómero funcional sintético (Leibl *et al.*, 2020). Foi relatado por (Liu *et al.*, 2006) que em 2006, foi desenvolvido o primeiro sensor eletroquímico usando dopamina na impressão molecular, com fim a detetar a nicotina em soro humano. Este relato teve sucesso, pois o filme impresso foi isolante e ultrafino e o sensor teve uma boa resposta capacitiva, detetando nicotina numa faixa entre 1-25 $\mu\text{mol/L}$.

Mo *et al.*, 2020, descobriram que este monómero tem a capacidade de polimerizar livremente, por outras palavras, auto-polimerizar sob condições alcalinas, formando uma camada de polímero na superfície do eletrodo isolante, rígida e ultrafina, designando este revestimento de (poli)dopamina. Além disso, o filme de (poli)dopamina pode ser formado ainda electroquimicamente pela oxidação da dopamina (Ruan *et al.*, 2013). Este filme tem sido alvo de muitos estudos para modificação de superfície de biomateriais porque atua como matriz biocompatível para a imobilização de biomacromoléculas (Mo *et al.*, 2020).

Os resultados preliminares da eletropolimerização com este monómero, foram bastante promissores. No entanto, após o estudo e repetição de vários ensaios, verificou-se uma dificuldade no controlo da estabilidade deste monómero o que complicou a reprodutibilidade dos resultados. Algumas otimizações foram feitas, a fim de monitorar a auto-polimerização da dopamina. Dessa forma, experimentou-se diferentes valores de pH da solução de tampão na preparação deste monómero. Começou-se por experimentar com PBS a pH 6, mas dificultava o processo de polimerização, uma vez que este composto apresenta grupos amina na sua constituição e sendo a constante de acidez ($\text{pK}_a = 8,93$), o monómero apresentava-se com muitas cargas positivas o que inibia a auto-polimerização. De seguida, experimentou-se com PBS a pH 8,5, sabendo que em meio alcalino se polimeriza, mas detetou-se uma

polimerização instantânea e de difícil controlo. Assim sendo, o valor de pH ideal a utilizar neste monómero foi PBS a pH 7,4.

Posteriormente, otimizou-se a presença e a ausência de oxigênio na solução de dopamina preparada e depreendeu-se que a desoxigenação desta solução favoreceu e permitiu um maior controlo da mesma.

Factos curiosos sobre este polímero, é que no processo de eletropolimerização, verificou-se ao longo da ocorrência dos ciclos definidos em CVs, o aparecimento de uma cor laranja intensa na solução mistura preparada, com a junção deste monómero e proteína, *Anexo A.1*. A mudança de tonalidade deveu-se ao processo constante de oxidação e redução do composto que produziu uma molécula designada de dopaminequienona que com a sua acumulação no elétrodo de trabalho, foi responsável por esta tonalidade. Deste processo, formou-se um polímero estável, espesso e fracamente condutor (Roushani & Zalpour, 2021).

Além disso, foi possível visualizar a olho nu, a auto-polimerização deste monómero. Com o fator tempo, presença de oxigênio e valor de pH, foi visível a modificação da solução monómero com a passagem de uma tonalidade incolor para cinzenta escuro e a formação de aglomerados, *Anexo A.2*. Quanto mais oxigênio estivesse presente e valores de pH superiores a 7,4, esta alteração era visível num período curto de aproximadamente meia hora.

Após todas as otimizações com este monómero, concluiu-se que era árduo a reprodutibilidade dos resultados e a garantia das mesmas condições nos ensaios experimentais. Por essa razão, escolheu-se outro composto que tivesse algumas semelhanças com a dopamina. Assim, surgiu o monómero 3-*Aminophenylboronic acid*, também constituído por hidrocarbonetos aromáticos complementados com grupos funcionais carboxílicos, hidroxilos e aminas.

ii. Gama de potencial

Posteriormente à escolha do monómero, um dos primeiros estudos realizados foi a gama de potencial aplicado, a fim de averiguar o potencial que é preciso proporcionar aos elétrodos para a oxidação do monómero 3-APBA. Para tal, a técnica eletroanalítica escolhida foi os CVs, e fixou-se certos parâmetros como o número de ciclos e a velocidade de varrimento. Na Figura 5.2, apresenta-se o voltamograma obtido com o valor da corrente (A) em função do potencial aplicado (V).

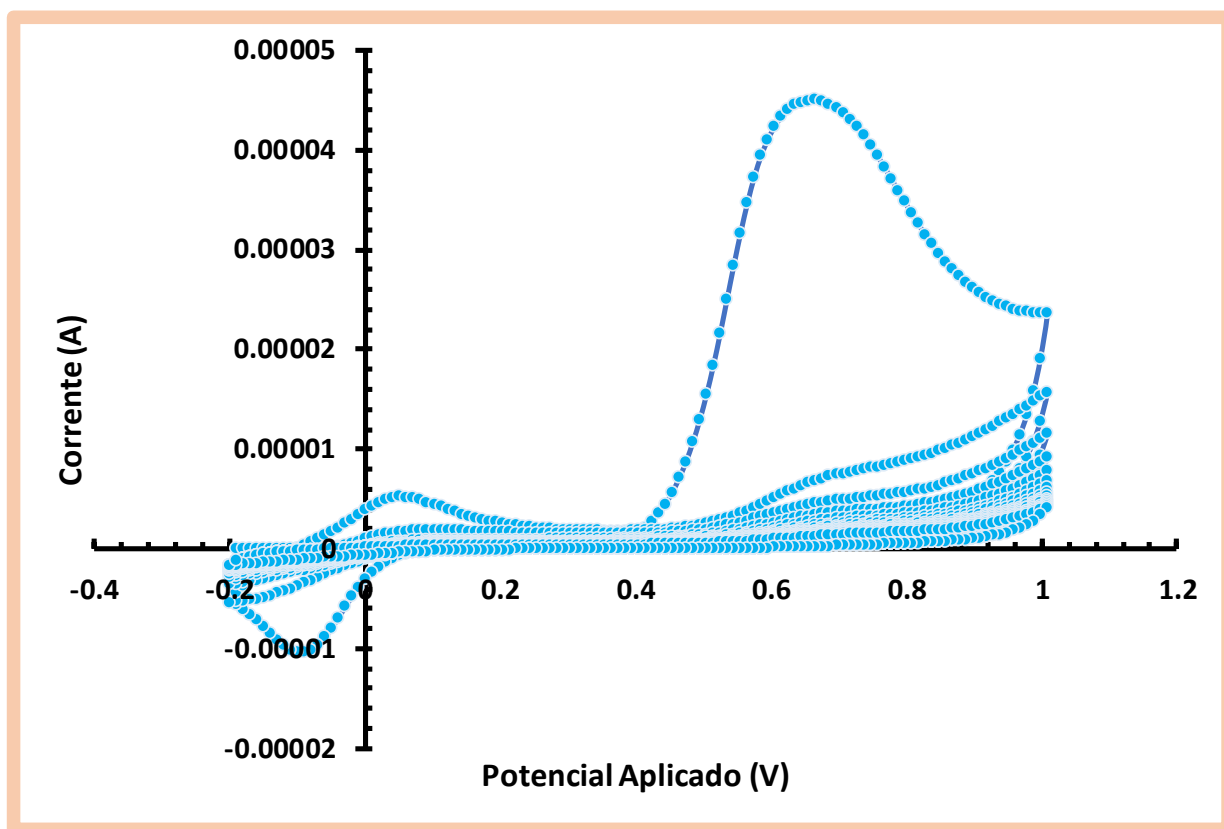


Figura 5. 2. Voltamograma obtido na eletropolimerização por CV, com oxidação de 3-APBA.

Segundo o voltamograma obtido, observa-se que o presente monómero apresenta um pico máximo de oxidação a um potencial de 0,65 V e um pico de redução a -0,1 V. Assim sendo, a gama de potencial otimizada neste trabalho foi de -0,2 V a 1 V.

iii. Número de ciclos

O número de ciclos é um parâmetro que influencia a espessura, estabilidade do filme obtido após eletropolimerização.

Neste trabalho, o número de ciclos selecionado após otimização foi 15. Verificou-se que não era possível aplicar menos ciclos visto que a *IL6* é uma molécula de grandes dimensões, com um peso molecular de 22 kDa, que com a presença de uma camada fina de polímero, tornou-se difícil aderir à matriz polimérica e dessa forma o processo de impressão molecular não foi eficaz sendo os resultados obtidos bastante aleatórios em termos de análise eletroquímica. Por outro lado, com o aumento do número de ciclos, é expectável que a espessura polimérica resultante aumente. Esse efeito foi desvantajoso pois durante o processo de remoção da molécula molde, a extração da proteína tornou-se difícil devido ao excesso de polímero formado. Com isto, fixou-se 15 ciclos de polimerização.

iv. Velocidade de varrimento

A velocidade de varrimento foi também otimizada e ficou definida de 0,02 V/s. Estas condições de polimerização foram usadas de igual forma tanto na preparação de MIPs como NIPs.

Assim, após todas as otimizações e a conquista da reprodutibilidade desta etapa, na Figura 5.3, apresenta-se os resultados obtidos da construção para ambos os sensores. A cor-de-laranja representa o estado inicial do sensor para o SPE-110 e a azul para o SPE-cork. A verde e a cor-de-rosa representa o após eletropolimerização, segundo as técnicas de CVs (A) e EIS (B). Preparou-se ainda um sensor controlo, nas mesmas condições que o MIP (1), mas com a ausência da proteína, e com isso, obteve-se um polímero não molecularmente impresso, NIP (2).

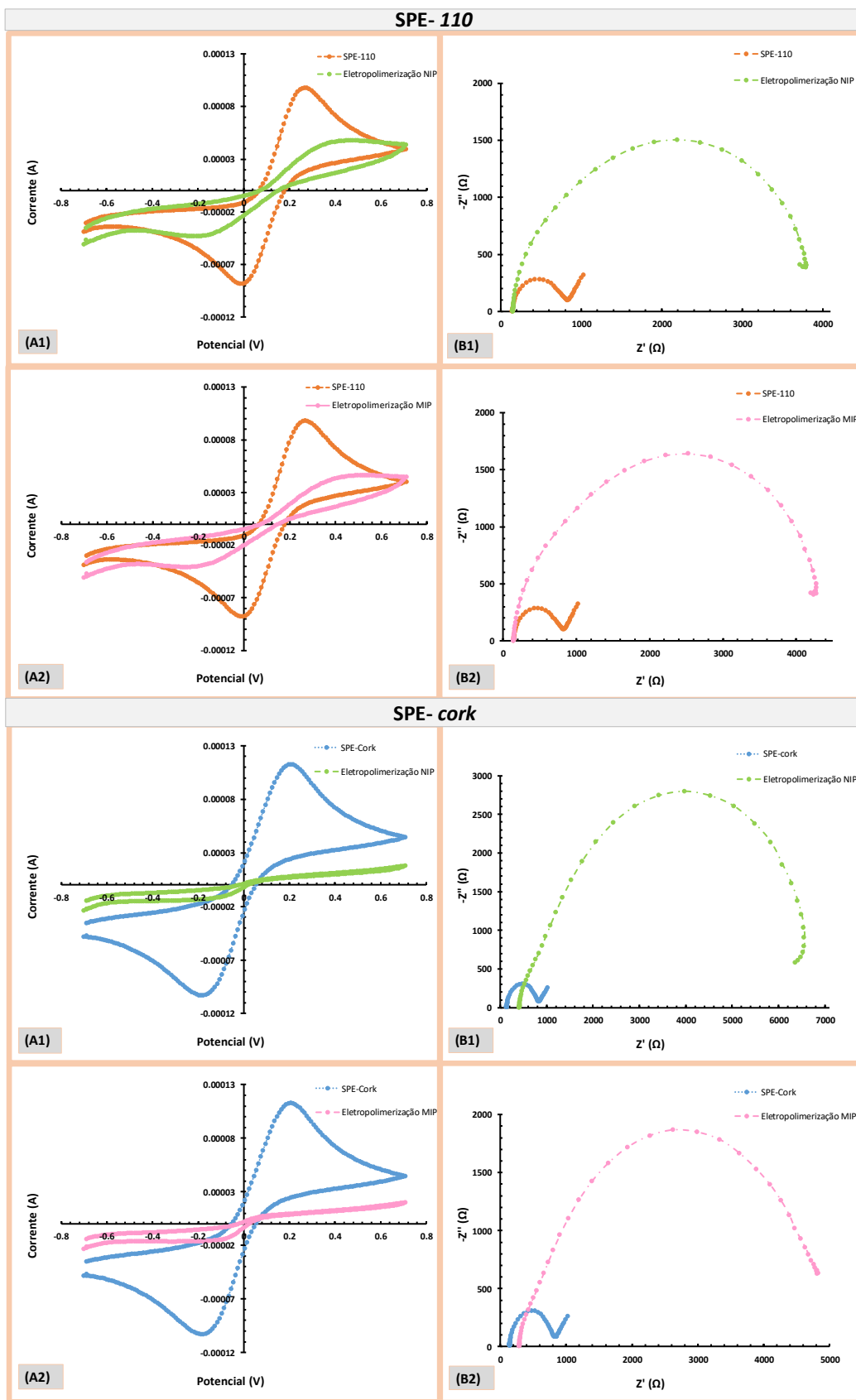


Figura 5. 3. Estudo da impressão molecular no NIP (1) e MIP (2), para ambos o SPE-110 (cor-de-laranja) e SPE-cork (azul), pelas técnicas CV (A) e EIS (B).

Empiricamente, a Figura 5.3., apresenta uma comparação dos resultados obtidos após a eletropolimerização com o sensor no seu estado inicial, segundo a técnica de CV e EIS.

Relativamente à voltametria cíclica, comprovou-se que o monómero 3- APBA apresentou um comportamento muito isolante após os 15 ciclos de eletropolimerização juntamente com uma taxa de varredura de 0,02V/s. Verificou-se uma redução significativa na passagem de corrente em função do potencial aplicado. Observou-se em (A1) e (A2) de ambos os sensores, comparativamente ao estado inicial (antes da polimerização), representado a azul ou a cor-de-laranja, uma diminuição de corrente com a redução significativa da altura dos picos de oxidação/redução. Para o SPE-110, houve uma diminuição de -0,07 mA a 11 mA, para -0,045 mA a 0,5 mA. No SPE-cork, essa diminuição de corrente foi mais acentuada com a passagem de -0,07 mA a 11 mA, para -0,02 mA a 0,1 mA.

Sustentando a presença do polímero na superfície do sensor, os resultados de EIS (B1) e (B2) vêm assegurar esse mesmo facto, com um aumento da resistência de transferência de eletrões. É possível observar um acréscimo de 1000 Ω para aproximadamente 4000 a 5000 Ω . Esta alteração e discrepância de valores entre os elétrodos iniciais e após a eletropolimerização foram positivos uma vez que comprovou a organização e o desenvolvimento de uma matriz polimérica.

A comparação da taxa de polimerização ocorrida tanto no SPE-110 como no SPE-cork, pode ser verificada na tabela presente no *Anexo A.3*, com o registo da média da resistência dos triplicados para os MIPs e NIPs.

5.2.2. Remoção da proteína

Para finalizar o processo e de modo a obter um polímero com as cavidades livres e específicas para a molécula-alvo, foi necessário remover o *template IL6* da matriz polimérica. Após a investigação dos principais solventes utilizados, procedimentos comuns e condições mais usuais nestas análises de extração ou desnaturação de proteínas, testou-se a incubação com dois solventes diferentes: hidróxido de sódio a 0,1 M e ácido sulfúrico a 0,5 M. Perante os resultados obtidos, verificou-se que o ácido sulfúrico foi o melhor solvente, uma vez que conseguiu extrair com maior eficiência a molécula-alvo, segundo os dados de impedância.

Posteriormente, avaliou-se o tempo ideal de incubação deste solvente para remoção completa de *IL6*. Os intervalos de tempo estudados foram 30 minutos, 1 hora e 2 horas. De acordo com estes intervalos de tempo, 1 hora, foi o tempo crucial definido neste trabalho, uma vez que a reprodutibilidade com 30 minutos de incubação com ácido sulfúrico mostrou-se inconstante, devido à maior dificuldade na remoção total de proteína. Em contrapartida, o período de 2 horas, revelou ser excessivo, sendo a taxa de remoção muito alta, que leva à perceção da remoção de algumas partes da matriz polimérica, o que não é pretendido.

A temperatura durante o processo de incubação, foi outro parâmetro avaliado nesta etapa e verificou-se que para os SPE-cork, este parâmetro influenciou mais devido à estrutura e composição química do material. A presença de humidade, modificou ligeiramente a sua estrutura devido à absorção de água, o que não foi favorável para os elétrodos, uma vez que quebrou os contactos elétricos e a resposta eletroquímica foi danificada. A temperatura ambiente foi a condição ideal para este trabalho.

Assim, após o sucesso desta etapa, efetuou-se uma taxa de remoção com o diferencial do registo das impedâncias entre a etapa de impressão molecular com a etapa de remoção da proteína, que se encontra no *Anexo A.3*. Este cálculo permitiu a comparação do desenvolvimento de um MIP com um NIP, e ainda, a analogia entre SPE-110 e SPE-*cork*. Dessa maneira, os resultados foram concordantes com o esperado, e verificou-se uma alteração na resposta tanto no NIP como no MIP, uma vez que o ácido sulfúrico altera quimicamente a superfície do eletrodo. No entanto, essa percentagem foi mais significativa na etapa de remoção de polímeros molecularmente impressos. Registou-se com os valores dos triplicados, uma taxa de 33 % para os MIPs do SPE-110 e 42 % para o SPE- *cork*. Relativamente aos NIPS, apenas se registou uma remoção de cerca de 22 % para os sensores comerciais e 30 % para os de cortiça, devido à ausência da proteína. Com estes valores, verificou-se ainda que, a taxa de remoção foi mais eficiente nos sensores com suporte em cortiça. A taxa de remoção dos NIPs relacionou-se apenas com a alteração da superfície polímera devido ao tratamento ácido dado que não existiu proteína na matriz polimérica.

Na Figura 5.4, apresenta-se os resultados obtidos segundo as técnicas de Cv e EIS. As maiores diferenças encontram-se nos SPE-*cork*, que vai ao encontro com os valores registados na tabela presente no *Anexo A.3*.

Na voltametria cíclica, após a remoção da proteína com o ácido, observou-se um ligeiro aumento da corrente sendo superior no MIP do SPE-*cork*, com picos de oxidação e redução bem definidos. Na impedância o comportamento foi similar, verificou-se uma diminuição no valor da impedância, representado a roxo, comparativamente à etapa da eletropolimerização, passando um diferencial de aproximadamente 2 000 Ω para o MIP do SPE-*cork* e, de 1000 Ω , para o respetivo NIP.

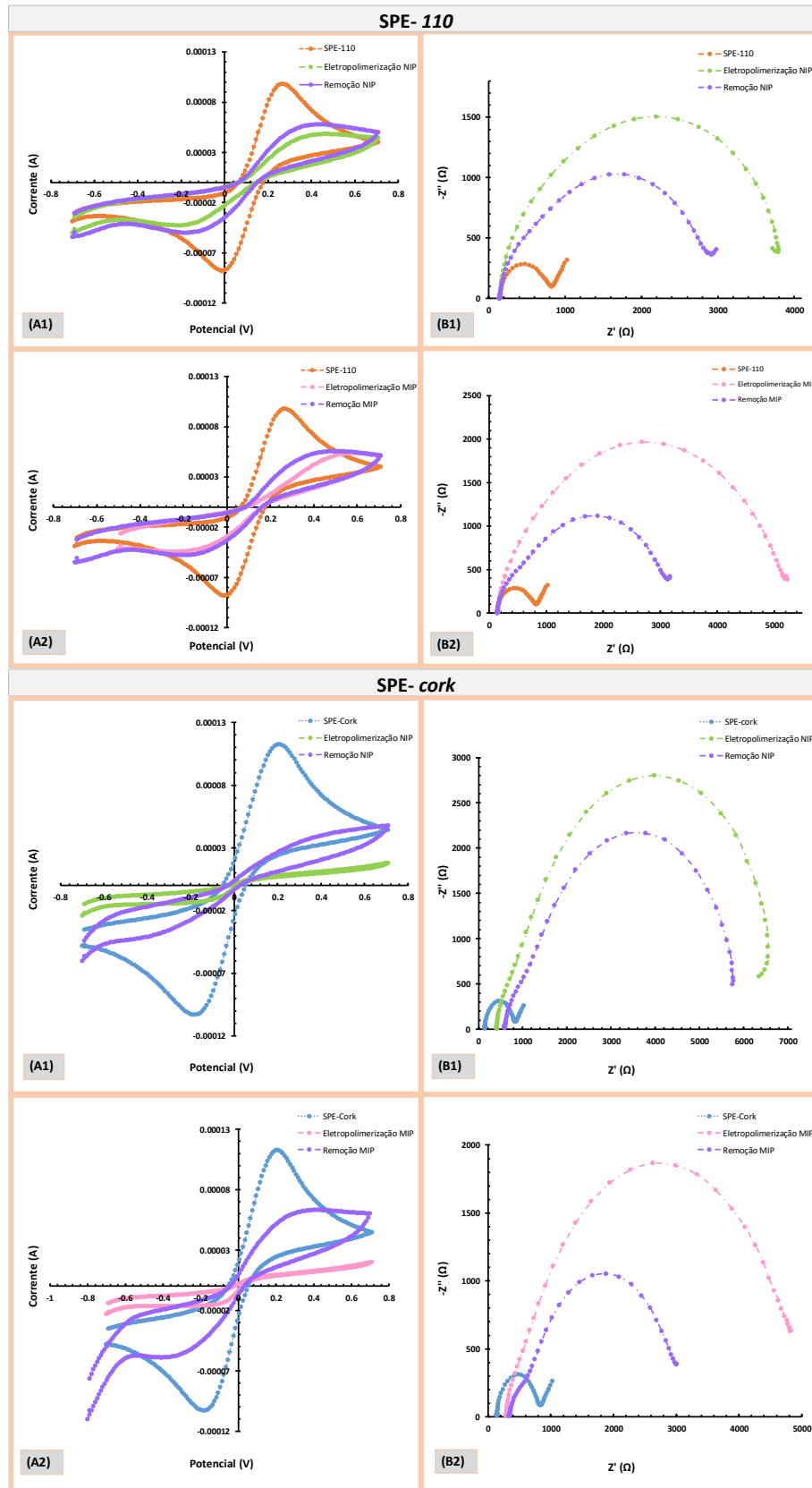


Figura 5. 4. Estudo da remoção do *template* no NIP (1) e MIP (2), para ambos o SPE-110 (cor-de-laranja) e SPE-*cork* (azul), pelas técnicas CV (A) e EIS (B).

5.2.3. Caracterização da superfície do sensor

A modificação química da superfície dos sensores foi controlada e comprovada com o recurso da análise dos espectros de RAMAN. Para tal, foram estudadas cinco amostras, entre as quais, um eletrodo SPE sem qualquer tratamento, um NIP e outro MIP após a eletropolimerização, e, por fim, um NIP e um MIP após a remoção da proteína com o ácido sulfúrico.

Na Tabela 5.1 e na Figura 5.5, apresenta-se os resultados obtidos para cada uma das amostras analisadas, com o registo do valor das frequências (cm^{-1}) atingidas e intensidades (I, a.u.) entre os picos (G) e (D). É importante salientar que a banda (G) encontra-se associada à frequência de deslocamento tangencial e a banda (G') associa-se ao pico de segunda ordem que são sensíveis às modificações ocorridas nos elétrodos. A banda (D) referenciada direciona-se para a intensidade do pico apresentado associado aos defeitos da modificação química da amostra (Ribeiro, 2016).

Tabela 5. 1. Valores obtidos por RAMAN nos diferentes elétrodos SPE.

Espectros Raman			
SPE Inicial	Frequência (cm^{-1})	Intensidade, I (a.u.)	I_D/I_G
D	1349.98	526.09	0.72
G	1574.02	732.46	
NIP	Frequência (cm^{-1})	Intensidade, I (a.u.)	I_D/I_G
D	1346.83	859.67	0.77
G	1575.35	1110.60	
MIP	Frequência (cm^{-1})	Intensidade, I (a.u.)	I_D/I_G
D	1347.79	986.63	0.86
G	1578.25	1149.43	
NIP TR	Frequência (cm^{-1})	Intensidade, I (a.u.)	I_D/I_G
D	1351.65	819.05	0.78
G	1580.17	1052.89	
MIP TR	Frequência (cm^{-1})	Intensidade, I (a.u.)	I_D/I_G
D	1345.87	905.14	0.82
G	1578.25	1103.11	

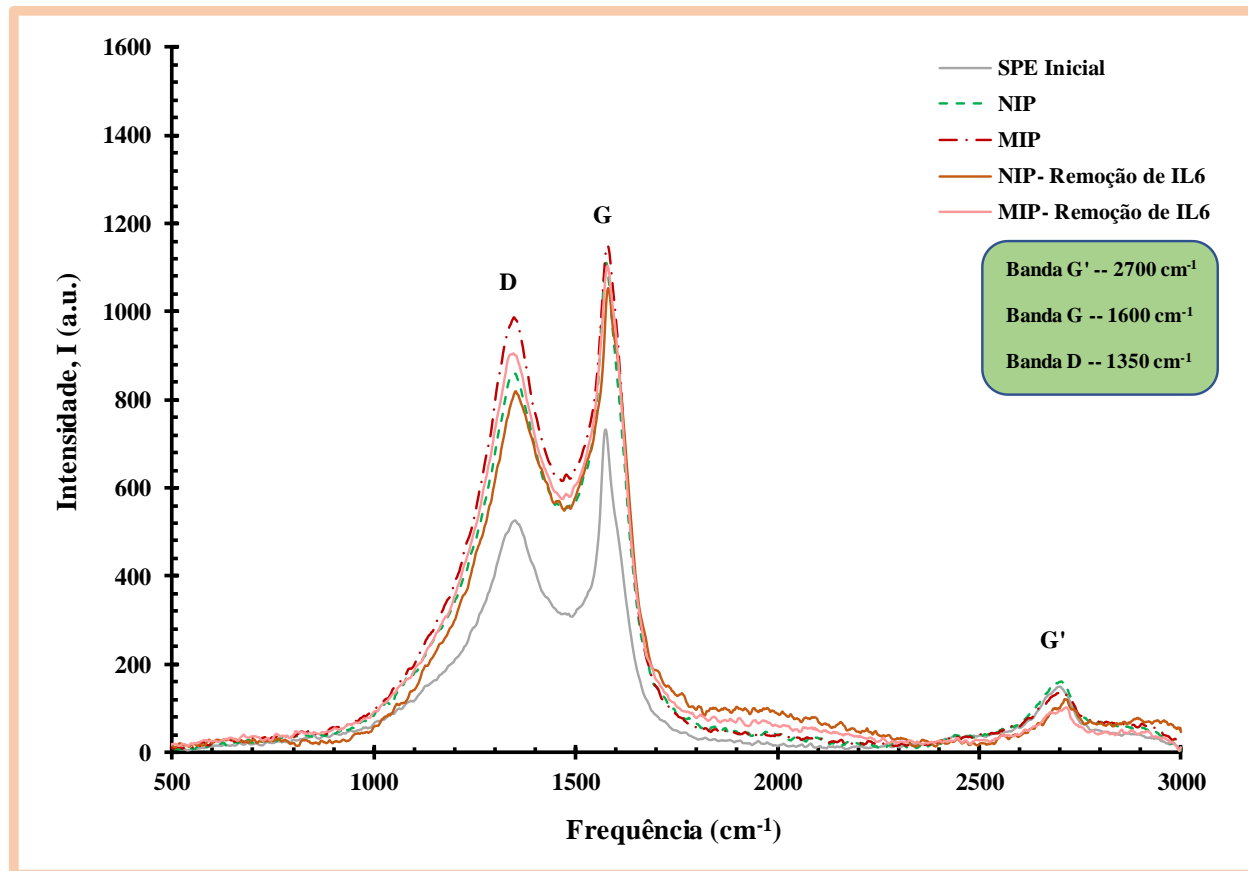


Figura 5. 5. Espectros RAMAN obtidos nas diferentes superfícies dos MIPs e NIPs preparados.

Após a análise dos resultados, sugere poder-se concluir que a razão dos picos I_D/I_G para os elétrodos SPE sem qualquer modificação, foi semelhante em todos, com o registo em média no valor de 0,72.

Após a eletropolimerização, os resultados indiciam que é possível observar que a relação dos picos I_D/I_G para os NIPs, foi superior aos do SPE inicial, ($I_D/I_G=0,77$), assim como após tratamento químico com ácido sulfúrico ($I_D/I_G=0,78$). O aumento de I_D/I_G após a polimerização está relacionado com defeitos estruturais inseridos na superfície do elétrodo devido à presença de polímero (NIP). Após tratamento químico com ácido, o valor da razão dos picos foi de ($I_D/I_G=0,78$), demonstrando que o tratamento teve um efeito negligenciável na superfície do sensor NIP em termos químicos e estruturais.

Os MIPs, apresentaram um aumento do rácio I_D/I_G comparativamente com os NIPs associados à presença da proteína *IL6* na estrutura polimérica formada. Assim, o valor após a eletropolimerização nos MIPs foi superior como o esperado, ($I_D/I_G=0,86$), e após a remoção do analito, esse valor foi inferior ($I_D/I_G=0,82$) devido à submissão a um tratamento ácido com a eliminação da proteína na matriz polimérica.

No geral, o aumento do rácio I_D/I_G após polimerização está relacionado com a introdução de defeitos estruturais na superfície devido à presença de compostos aromáticos e da proteína na matriz polimérica. Depois do tratamento ácido estes mesmos defeitos decrescem no MIP ($I_D/I_G=0,82$), indicando a remoção da proteína.

Neste sentido, o espetro traçado foi concordante com o esperado e permitiu comprovar a eficácia tanto da eletropolimerização como do processo de remoção envolvente, para os materiais poliméricos com e sem impressão molecular.

5.3. Curva de calibração

Após a otimização dos parâmetros relativamente à construção do sensor e a obtenção consecutiva da reprodutibilidade, pretendeu-se avaliar a qualidade da resposta analítica do biossensor para diferentes concentrações de *IL6*. Com essa finalidade, estudou-se a resposta dos sensores MIP e NIP, respetivamente, com diferentes concentrações de proteína estabelecidas e, por fim, a comparação do desempenho analítico no sensor sintetizado em elétrodos comerciais (SPE-110) e nos elétrodos fabricados com suportes de cortiça (SPE-*cork*). Soluções com concentrações crescentes numa gama entre 1 pg/mL a 10 ng/mL foram preparadas em solução tampão, PBS a pH 5, e incubadas no elétrodo de trabalho com 7 μ L durante 20 minutos. Posteriormente, após a lavagem do elétrodo com água ultrapura, registou-se a resposta eletroquímica entre as diferentes concentrações de proteína para cada um dos sensores, através da leitura com a solução *redox probe*.

Em simultâneo, efetuou-se as diferentes incubações e as leituras com as diferentes soluções de *IL6* no NIP. Dessa forma, na Figura 5.6, apresenta-se os resultados de EIS obtidos para ambos os sensores, sendo SPE-110 (1) e SPE-*cork* (2), e o respetivo MIP (A) e NIP (B).

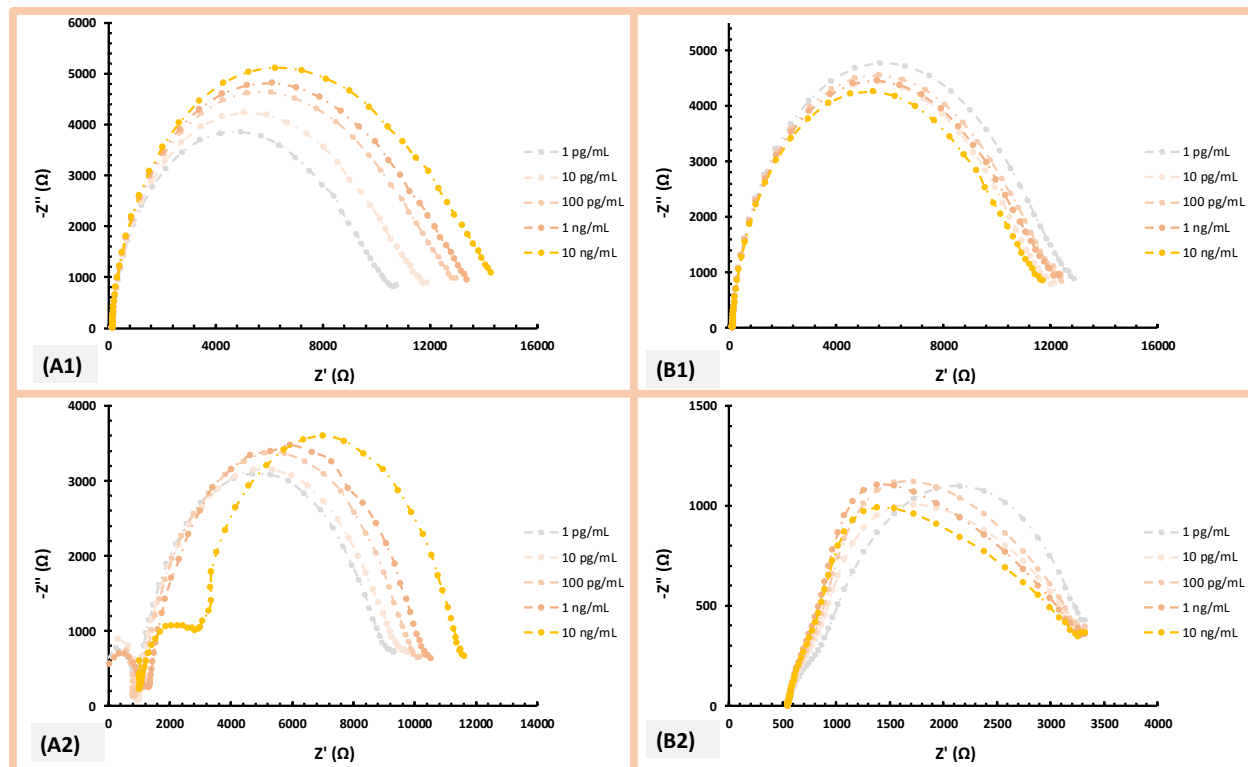


Figura 5. 6. Estudo da resposta analítica no sensor SPE-110 (1) e SPE-cork (2) em função da adição de diferentes concentrações de IL6 preparadas em PBS, pH 5, segundo a técnica de EIS; A1 e A2 representam os MIPs e B1 e B2 os NIPs, respetivamente.

Relativamente ao comportamento observado, constatou-se que os materiais MIP e NIP foram capazes de produzir uma resposta eletroquímica segundo o esperado, sendo que a maior sensibilidade verificada ocorreu nos materiais MIP. O aumento gradual da tonalidade de cor registada de cinza claro a cor-de-laranja mais intenso, nos polímeros molecularmente impressos, foi proporcional com o aumento da concentração de *IL6* incubada, sendo esse registo mais evidente no SPE-cork.

Por outro lado, em ambos os NIPs, não se verificou uma resposta linear com a presença de concentrações crescentes de *IL6*. Presenciou-se, no SPE-110, intervalos muito curtos entre os diferentes padrões como inexistência de resposta, assim como no SPE-cork, registou-se uma resposta aleatória sobretudo na concentração de 10 pg/mL e 1 ng/mL, Figura 5.6- (B2). Estes resultados foram concordantes com o esperado, uma vez que o NIP não apresenta cavidades na matriz polimérica para a deteção de *IL6*.

Posteriormente, com a média dos triplicado dos resultados, efetuou-se a curva de calibração em PBS, para o MIP e em paralelo para o NIP, com o estudo da resistência, *Circle FIT* (Ω), em função das concentrações de *IL6* no intervalo de 1 pg/mL a 10 ng/mL, em ambos os sensores, como se observa pela Figura 5.7.

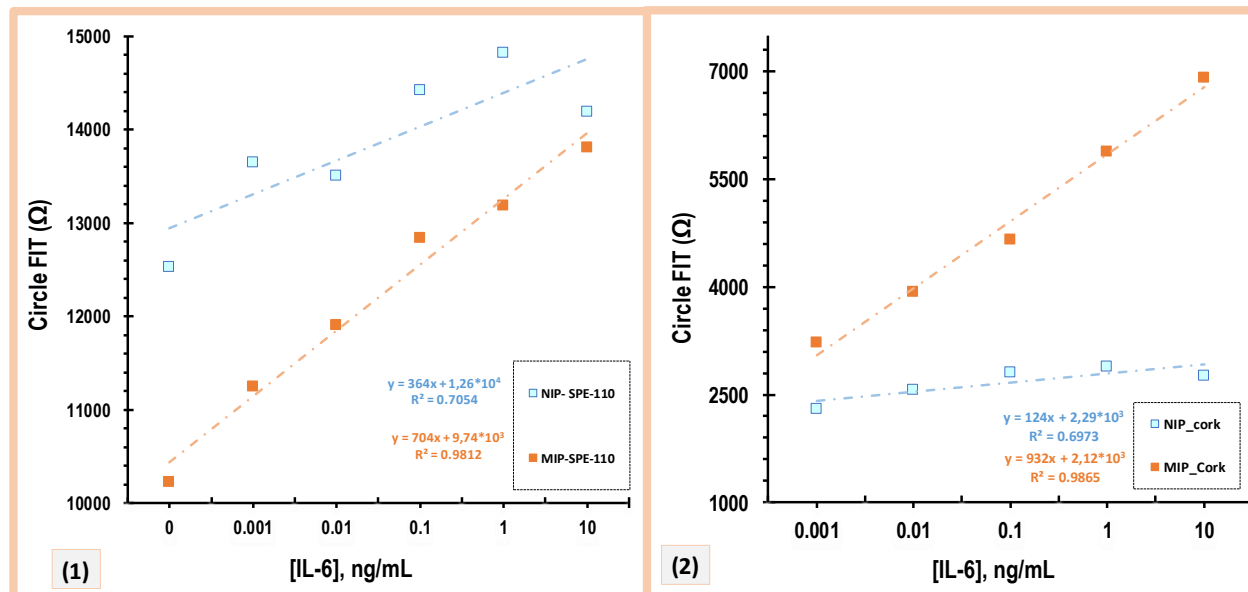


Figura 5. 7. Curvas de calibração em PBS com concentrações crescentes de IL6 para o SPE-110 (1) e SPE-cork (2), pelas técnicas de EIS.

De acordo com a análise da Figura 5.7, os resultados foram concordantes com os resultados descritos pela Figura 5.6. Tanto o NIP como o MIP, segundo o valor das impedâncias pelo *Circle FIT* (Ω), apresentaram resistências crescentes à transferência de cargas com o aumento da concentração da proteína, o que comprova a existência de ligações da proteína à superfície do sensor. Nos ensaios eletroquímicos, as alterações registadas das resistências do material, encontram-se normalmente associadas ao balanço existente entre cargas e massas. Na presente situação, conhecido o valor de PI da proteína que apresenta um valor de 6,17, e sabendo que a calibração foi feita a pH 5, valor inferior ao PI, a proteína encontrou-se maioritariamente protonada. O aumento de cargas positivas presentes, poderá facilitar a transferência de eletrões uma vez que a *redox probe* tem carga negativa, e dessa forma, seria esperado a diminuição da resistência ao longo do aumento da concentração de *IL6*. Contudo, sendo a *IL6* uma proteína de grandes dimensões, esta promoveu uma barreira à transferência de eletrões, dificultando esta passagem, e este balanço de massa promoveu, conseqüentemente, um aumento da resistência como verificado na Figura 5.6.

Contudo, tanto no SPE-110 (1) como no SPE-cork (2), essa ligação da proteína foi mais significativa nos MIPs, que pode ser observada segundo os coeficientes de correlação, visto que foram bem superiores relativamente aos NIPs, assim como os respetivos declives. Pela análise das retas, sabe-se que o valor do declive para o MIP do SPE-110, foi de 704 [Ω/(ng/mL)] enquanto para o MIP do SPE-cork, o valor dos triplicados foi de 932 [Ω/(ng/mL)]. Quanto aos NIPs, no SPE-110 foi de 364 [Ω/(ng/mL)] e no SPE-cork foi de 124 [Ω/(ng/mL)]. Neste caso, mostra que ambos os MIPs têm um comportamento mais variável consoante o aumento da concentração de *IL6*, o que demonstra serem favoráveis para a determinação de *IL6*.

Comparativamente com os dois suportes analisados neste trabalho, o suporte em cortiça, conseguiu obter resultados semelhantes ao suporte comercial e obteve um desempenho analítico ligeiramente superior, dado que o declive obtido foi de 932, ao dos elétrodos comerciais, que foi de 704, com coeficiente de correlação de 0,98. Este parâmetro é de extrema importância, pois o declive obtido

encontra-se relacionado com a sensibilidade do elétrodo o que mostra que o biossensor em suporte de cortiça foi mais sensível. Além disso, a gama de linearidade encontrou-se dentro do limite fisiológico da *IL6*, 1,6 pg/mL.

5.4. Ensaios em soro

Posteriormente à curva de calibração em PBS, explorou-se a avaliação do desempenho dos biossensores em contexto mais realista. Dessa forma, preparou-se as mesmas concentrações de soluções padrão em soro Cormay, diluído mil vezes em solução tampão, a pH 5. Na Figura 5.8, apresenta-se o comportamento do biossensor após a incubação crescente das várias concentrações de proteína preparada neste meio.

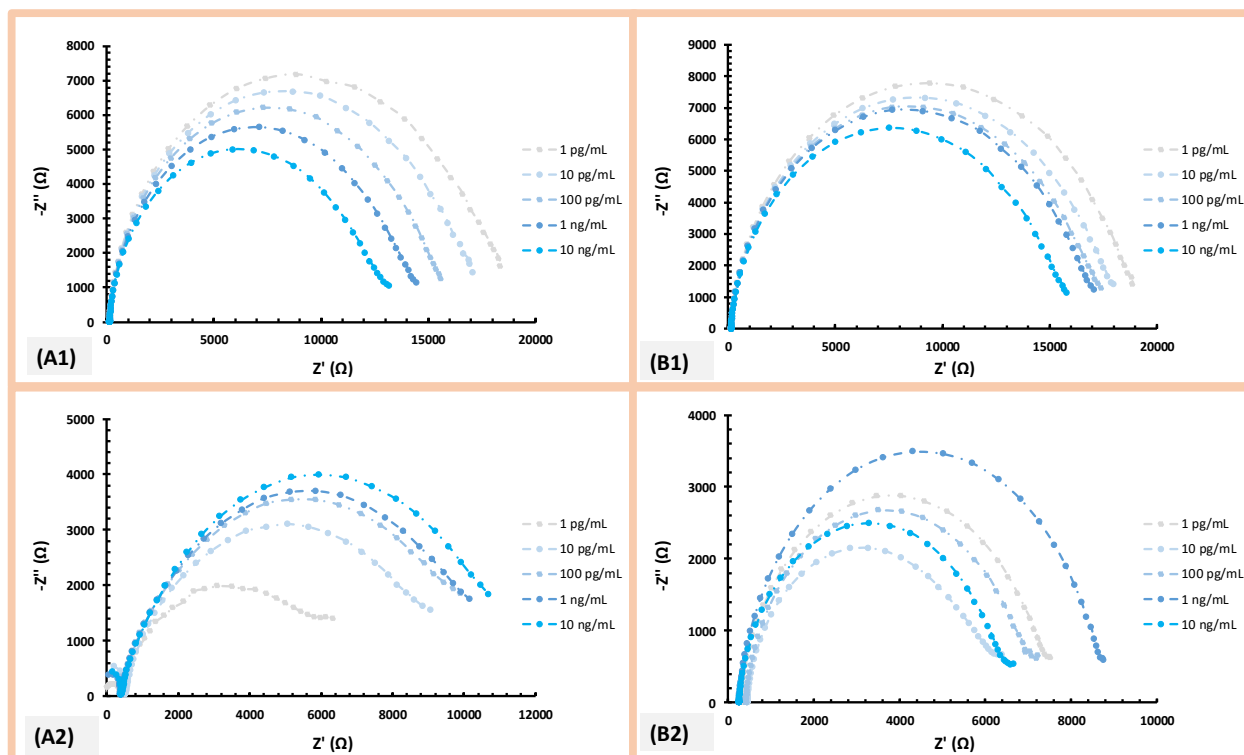


Figura 5. 8. Estudo da resposta analítica no sensor SPE-110 (1) e SPE-cork (2) em função da adição de diferentes concentrações de *IL6* preparadas em soro Cormay, diluído 1000x, segundo a técnica de EIS; A1 e A2 representam os MIPs e B1 e B2 os NIPs, respetivamente.

Segundo a análise da Figura 5.8, observa-se que neste meio, existiu resposta analítica e com resultados favoráveis e promissores.

Globalmente, verificou-se que ambos os MIPs (A1 e A2) para as soluções padrão preparadas, demonstraram ser, novamente, melhores que os NIPs (B1 e B2). Esse registo foi observado pelo aumento da tonalidade de cor das curvas, começando em cinza até à curva azul escura que representa o padrão mais concentrado, 10 ng/mL. Em (A1) e (A2), verificou-se um decréscimo e um aumento proporcional e concordante com as concentrações de *IL6* incubadas. Enquanto que em (B1) e (B2), a resposta foi aleatória e não se presenciou a correlação do gradiente de cor. A inexistência de resposta nos NIPs foi, mais uma vez, presumível devido à privação da ligação da proteína à superfície do sensor.

Relativamente à contradição da resposta verificada em (A1) e (A2), registou-se no primeiro, uma dificuldade na passagem dos iões entre a superfície do eléctrodo e a solução *redox*, através do decréscimo da resistência à transferência de carga, em proporção com o aumento das concentrações de proteína incubadas no SPE-110. Em contrapartida, o comportamento do MIP no SPE-*cork*, (A2), foi oposto e a resistência à transferência de carga, aumentou com os diferentes padrões. Essa diferença pode ser justificada por duas variáveis, do meio em estudo, dado que o soro é um fluido complexo e ainda do balanço de cargas resultante da interação do soro com a superfície do sensor, uma vez que os suportes são diferentes e a composição da tinta de carbono presente no eléctrodo de carbono também se difere. Dado à privação do tempo disponível para otimização desta parte do trabalho, não foi possível otimizações mais profundas. Contudo, verificou-se que, o biossensor em suporte de cortiça foi capaz de dar resposta analítica, e tanto o MIP (A2) como o NIP (B2), os gráficos obtidos foram de acordo com o expectado.

Seguidamente, na Figura 5.9, apresenta-se as curvas de calibração em soro obtidas com os valores dos triplicados, segundo a resistência, *Circle FIT* (Ω), em função das concentrações de *IL6*, tanto para o SPE-110 (1) e SPE-*cork* (2).

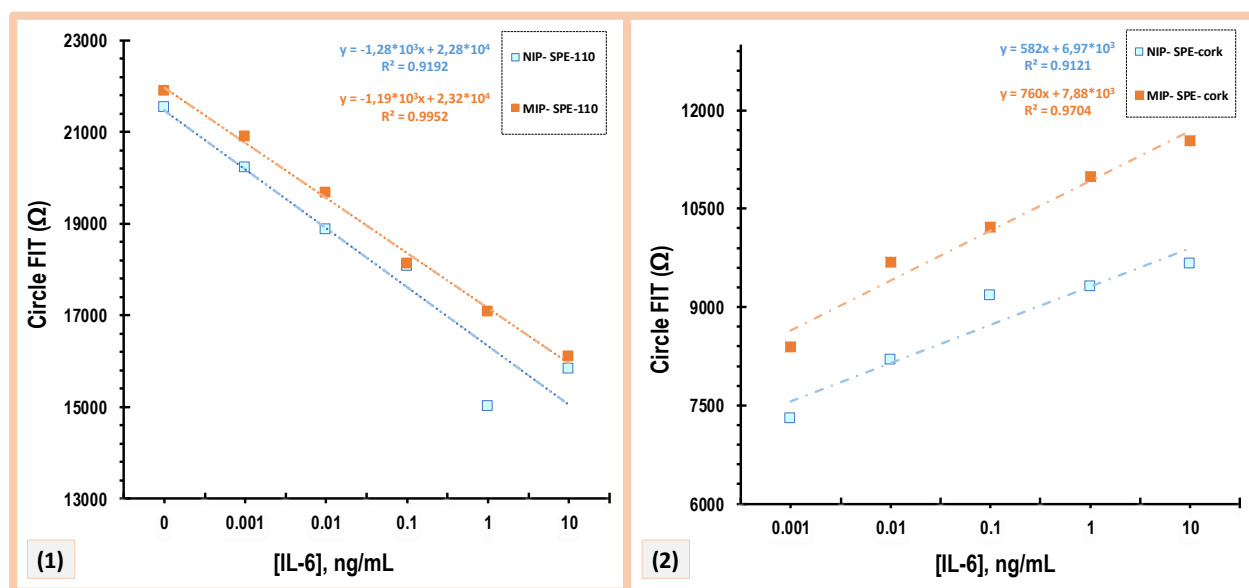


Figura 5. 9. Curvas de calibração em soro Cormay, diluído 1000x, com concentrações crescentes de *IL6* para o SPE-110 (1) e SPE-*cork* (2), pelas técnicas de EIS.

De uma forma geral, estes biossensores desenvolvidos, demonstraram um bom comportamento num contexto prático e grande potencial.

Empiricamente, tanto na SPE-110 como na SPE-*cork*, os declives das retas foram opostos, mas verificou-se que em ambos os MIPs obtiveram um melhor desempenho analítico, com coeficientes de correlação de 0,9952 e 0,9704, respetivamente. Ambos os valores, foram significativamente superiores aos registados nos NIPs. Além disso, no (2) mostra que o declive do MIP, igual a 760 [Ω /(ng/mL)], foi superior ao do NIP que foi de 582 [Ω /(ng/mL)]. Estes valores demonstram que, o MIP teve um comportamento mais variável neste meio e com o acréscimo da concentração de *IL6*. Dessa forma, estes resultados reforçam o realce do bom funcionamento do sensor em suporte em cortiça, com capacidade de detetar *IL6* numa amostra de um paciente com doença de Alzheimer.

5.5. Estudo da seletividade

Testes de seletividade foram então realizados para avaliar a capacidade do sensor de distinguir a proteína *IL6* de outras espécies presentes em fluidos biológicos. Desta forma, concentrações fixas de *IL6* na superfície do sensor, foram incubadas juntamente com diferentes espécies interferentes, em concentrações correspondentes às condições fisiológicas normais.

Este estudo foi realizado com *IL6* (100 pg/mL), glicose (0,7 mg/mL), ureia (0,2 mg/mL) e BSA diluída mil vezes em tampão PBS, pH 5 (1 mg/mL), Figura 5.10. A incubação foi realizada à temperatura ambiente por 20 minutos, e as respetivas substâncias interferentes foram preparadas em tampão contendo pH 5. Quanto mais baixo fosse o valor da percentagem de interferência, menor seria a interferência causada pelo composto em estudo.

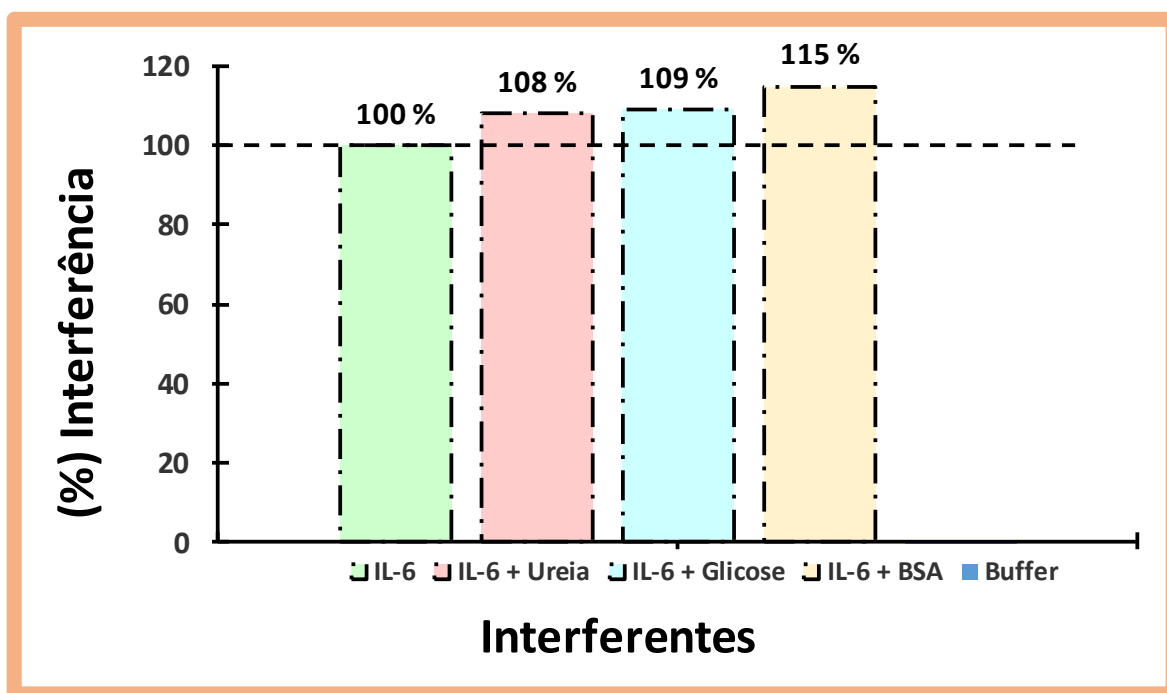


Figura 5. 10. Estudo de seletividade envolvendo a análise da resposta do sensor após incubação com tampão e outras espécies interferentes.

Com a análise da Figura 5.10, verificou-se que cada substância interferente afetou ligeiramente o sinal eletroquímico. O desvio médio (%) do sinal elétrico produzido por cada substância interferente em relação ao controle (*IL6*) foi de 8 % para glicose, 9 % para ureia e 15 % para BSA. Dado às baixas percentagens referenciadas, pode-se concluir com este estudo que não se verificaram variações consideráveis de interferência e, portanto, o sensor mostrou-se específico para a determinação de *IL6* em soro humano sintético.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos seletivos é uma abordagem muito recorrente e com grande evolução, nos últimos tempos. Esta temática, expande-se para uma diversidade de áreas, podendo ser aplicada sobretudo nas áreas da segurança alimentar, qualidade da água e do solo, monitorização ambiental, na qual permitem quantificar a molécula alvo de interesse. No entanto, a sua contribuição na área médica, é o maior alvo de investigação, onde tem sido destacada pela monitorização do estado clínico de pacientes.

Neste trabalho, foi desenvolvido um sensor eletroquímico onde ocorreu a polimerização eletroquímica com o monómero 3- APBA, para a deteção da proteína *IL6*, de forma a auxiliar o rastreio deste biomarcador de resposta inflamatória. Contudo, é importante salientar que este biomarcador é inespecífico e ajuda a complementar um teste com biomarcadores específicos, e assim, auxiliar no rastreio do aparecimento e progressão da doença de Alzheimer.

Posteriormente à otimização em elétrodos SPE comerciais adquiridos pela *DropSens*, o grande objetivo, foi testar e elaborar sensores com suporte mais sustentável, como a cortiça, e comparar a performance analítica do sensor. Após vários parâmetros de otimização, como a escolha do monómero, o valor ideal de pH e o agente de remoção mais adequado, foi possível alcançar a reprodutibilidade na construção dos biossensores com avaliação através das leituras com a solução *redox*, pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica.

Seguidamente, avaliou-se o desempenho analítico de ambos os sensores elaborados e obtiveram-se boas respostas analíticas, com curvas de calibração tanto em PBS como em soro Cormay, com coeficientes de correlação acima de 0,97 para os MIPs, e valores inferiores para os NIPs. Completando esta ideologia, estes dois dispositivos conseguiram ter uma resposta linear a partir de 1 pg/mL, ou seja, possuem um limite de deteção abaixo do valor fisiológico de *IL6* presente no ser humano.

Com isto, revela que o trabalho foi bem-sucedido e alcançou os objetivos definidos. No geral, o sensor aqui apresentado e criado, apresentou simplicidade no projeto, curto tempo de medição, alta precisão e baixo limite de deteção. Esta abordagem parece ser uma ferramenta bem-sucedida para a triagem de biomarcadores inflamatórios no ponto de atendimento e apresenta um grande potencial de aplicabilidade em escala piloto.

O recurso aos produtos naturais, nos dias de hoje, tem sido predominante e aplicado em todos setores industriais. Através do desenvolvimento deste trabalho, permitiu comprovar tal ideologia e mostrar que é viável a junção da área dos sensores com a sustentabilidade. O sensor produzido conseguiu obter resultados igualáveis aos tradicionais, mas este, apresenta como crucial vantagem o baixo custo e a valorização deste recurso natural e nacional.

À parte, mas completando este trabalho, todo o procedimento otimizado e condições definidas, foram aplicadas num outro suporte, em plataformas de matriz de microagulhas, desenvolvidas pelo Professor Doutor Sanjiv Sharma da Universidade de *Swansea*, e avaliou-se o desempenho desta tecnologia de impressão molecular para deteção elétrica e direta de proteínas no compartimento da pele de uma

forma minimamente invasiva. Deste trabalho, surgiu uma *short communication* que se encontra em fase final de escrita do manuscrito.

Em suma, o presente trabalho reúne todas as informações necessárias para publicação em revista científica, e neste momento, encontra-se em processo de escrita de artigo científico.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como trabalhos futuros, seria interessante explorar e procurar implementar métodos mais verdes, com a presença de quantidades reduzidas de químicos neste procedimento, com vista a maximizar a diminuição do impacto ambiental e aplicar uma gestão mais sustentável.

Como é dito: “O nosso planeta tem limites e nós homens temos e devemos aceitá-los e respeitá-los, pois nós homens é que pertencemos à Terra e não a Terra ao homem “(Moreira, 2011).

Para solucionar este problema e diminuir a quantidade de químicos presente no procedimento experimental e aplicar acentuadamente o conceito de biorrecursos, é sugerido:

- ❖ **Substituição da solução *redox* de ferro:** por outros compostos semelhantes e que apresentem a mesma capacidade de função.
- ❖ **Desenvolvimento de outro procedimento com a exclusão da solução *redox* de ferro:** na solução mistura que é preparada com a adição do monómero escolhido juntamente com a molécula alvo, incrementar um outro composto na qual presenciasse a mesma função que a solução de ferro utilizada, ou seja, tivesse a capacidade de oxidar e reduzir os compostos, mas na posterior leitura após cada etapa, pudesse ser lida apenas com a solução tampão como o PBS ao invés de solução de ferro.
- ❖ **Escolha de outro agente de remoção:** seria interessante a procura de agentes de remoção mais naturais como a utilização de enzimas, como por exemplo, proteinases, glucases, ..., e avaliar o efeito presenciado na etapa referente à remoção da molécula alvo e estabelecer comparação.
- ❖ **Métodos de limpeza/ Reutilização do Biossensor:** a procura de métodos de limpeza intensiva para estes dispositivos seria de extrema importância, uma vez que após cada utilização e no final da avaliação do desempenho analítico, os sensores são sempre descartados. Assim sendo, a possibilidade de reintroduzir novamente no processo, a presença do conceito de reutilização e a diminuição da quantidade de resíduos produzidos por cada aplicação, seria bastante útil e ajudaria na preservação deste nosso planeta.
- ❖ **Desenvolvimento de um sistema autónomo com energia renovável:** desenvolver e apresentar um potencióstato autónomo de corrente elétrica com recurso a energias renováveis como a luz solar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, O. S., Bedwell, T. S., Esen, C., Garcia-Cruz, A., & Piletsky, S. A. (2019). Molecularly Imprinted Polymers in Electrochemical and Optical Sensors. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 294–309). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.009>
- Altuna-Azkargorta, M., & Mendioroz-Iriarte, M. (2021). Blood biomarkers in Alzheimer's disease. In *Neurología* (Vol. 36). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2018.03.006>
- Alzheimer Europe (2013). Dementia in Europe Yearbook: National policies covering the care and support of people with dementia and their carers, Alzheimer Europe.
- Amouzadeh Tabrizi, M., Fernández-Blázquez, J. P., Medina, D. M., & Acedo, P. (2022). An ultrasensitive molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor for the determination of SARS-CoV-2-RBD by using macroporous gold screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113729>
- Araujo, J. B. (2010). Desenvolvimento de método de avaliação de desempenho de processos de manufatura considerando parâmetros de sustentabilidade. 1–193. <https://doi.org/10.11606 / T.18.2010.tde-02032010-141958>
- Bento, M. F. S., Pereira, H., Moutinho, A., Van den Berg, K., & Boon, J. (2001). A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. In *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* (Vol. 57). www.elsevier.com/locate/jaap
- Berdyeva, T., Xia, C., Taylor, N., He, Y., Chen, G., Huang, C., Zhang, W., Kolb, H., Letavic, M., Bhattacharya, A., & Szardenings, A. K. (2019). PET Imaging of the P2X7 Ion Channel with a Novel Tracer [18F] JNJ-64413739 in a Rat Model of Neuroinflammation. *Molecular Imaging and Biology*, 21(5), 871–878. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-01313-2>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introdução aos biossensores. *Essays in biochemistry*, 60 (1), 1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- BioMark Sensor Research. (2021). Acedido em 22 de Novembro de 2021, em: <https://www.biomark.isep.ipp.pt/pt/home/>
- Boulanouar, S., Mezzache, S., Combès, A., & Pichon, V. (2018). Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples. In *Talanta* (Vol. 176, pp. 465–478). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.067>
- Bowman, F., & Kilts, C. (2003). Modeling intra-subject correlation among repeated scans in positron emission tomography (PET) neuroimaging data. *Human brain mapping*, 20(2), 59–70. <https://doi.org/10.1002/hbm.10127>
- Branco, D. G., Santiago, C. A., Oliveira, F. J., Cabrita, L., & Evtuguin, D. v. (2021). Surface properties of cork in relation to reactive washing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 624. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126762>

- Castro, R. M. B. (2013). Desenvolvimento e aplicação de um biossensor para monitorização de creatinina, um biomarcador associado a doenças emergentes. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/6407>
- Cerchia, L., Hamm, J., Libri, D., Tavitian, B., & Franciscis, V. (2002). *Nucleic acid aptamers in cancer medicine*, 528, 12-16. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03275-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03275-1)
- Cerqueira, S. M. V. (2013). Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para monitorização da radioterapia no melanoma. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/15734>
- Chambers, R., Johnston, S. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat Biotechnol* **21**, 1088–1092 (2003). <https://doi.org/10.1038/nbt858>
- Chanut, J., Wang, Y., Dal Cin, I., Ferret, E., Gougeon, R. D., Bellat, J. P., & Karbowiak, T. (2022). Surface properties of cork: Is cork a hydrophobic material? *Journal of Colloid and Interface Science*, 608, 416–423 <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.09.140>
- Coelho, J. T. A. (2014). Anticorpos Monoclonais. Tese de Mestrado. Universidade Fernando Pessoa.
- Coelho, M. K. L., Giarola, J. F. & Pereira, A. C. (2018). Sensores Eletroquímicos Baseados em Polímeros Impressos Molecularmente e a Determinação de Fármacos em Amostras Farmacêuticas e Biológicas. *Revista Virtual da Química*. 10 (5), 1180-1206. ISSN 1984-6835
- Corticeira Amorim, (2021). SGPS Corticeira Amorim (Ed.) Relatório Anual Consolidado 2019.
- Cummings, J. L. (2011). Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), e13–e44 <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2010.06.004>
- Daniel, S. M. (2013). Mapeamento do teor de chumbo em aquíferos da Mina de Neves Corvo por técnicas voltamétricas. Tese de Mestrado. Universidade de Évora.
- Daniel, G. D. (2011). A Indústria da Cortiça e o seu Potencial de Inovação. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/2869>
- Dias, A. B. V. G. (2014). Construção de Biossensores de ADN para a Avaliação da Capacidade Antioxidante. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/5514>
- Dong, C., Shi, H., Han, Y., Yang, Y., Wang, R., & Men, J. (2021). Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique. In *European Polymer Journal* (Vol. 145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110231>
- European Commission. (2009). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on a European initiative on Alzheimer's disease and other dementias. European Commission.
- Ferreira, B. S. (2021). Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção de um biomarcador associado a doenças neurodegenerativas. Tese de Mestrado. Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Port. <http://hdl.handle.net/10400.22/19270>

- Figueiredo, E. C., Cristi, A., Dias, B., Aurélio, M., Arruda, Z., & Figueiredo, E. C. (2008). Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. In *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 44)
- Gerard, M., Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. In *Biosensors & Bioelectronics* (Vol. 17) [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00312-8)
- Gil, L. (2012). Cortiça. Acedido a 10 de Dezembro de 2021. Disponível em: https://repositorio.ineg.pt/bitstream/10400.9/1582/1/LivroMateriais_cap13_Corti%C3%A7a.pdf
- Gil, L. & Pereira, C. (2007). A Fórmula da cortiça. Revista da Secção Regional do Norte da ANET. Disponível em: http://srnorte.oet.pt/wp-content/uploads/2021/06/revista_1.pdf
- Gonçalves, M. L. L. (2016). Desenvolvimento de um biossensor para rápido diagnóstico da doença de Alzheimer. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/11064>
- Gonçalves, M. L. (2021). Electropolymerized molecularly imprinted polymers: perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists. In *Current Opinion in Electrochemistry* (Vol. 25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.09.007>
- Hashemi-Moghaddam, H., Zavareh, S., Karimpour, S., & Madanchi, H. (2017). Evaluation of molecularly imprinted polymer based on HER2 epitope for targeted drug delivery in ovarian cancer mouse model. *Reactive and Functional Polymers*, 121, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.10.025>
- Humpel, C. (2011). Identificação e validação de biomarcadores para a doença de Alzheimer. *Trends in Biotechnology*, 29(1), 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.09.007>
- John, O. O., Amarachi, I. S., Chinazom, A. P., Adaeze, E., Kale, M. B., Umare, M. D., & Upaganlawar, A. B. (2022). Phytotherapy: A promising approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 2, 100030. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2021.100030>
- Kandimalla, R., & Reddy, PH (2017). Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 57 (4), 1049–1069. <https://doi.org/10.3233/JAD-161118>
- Karaseva, N. A., & Ermolaeva, T. N. (2014). Piezoelectric immunosensors for the detection of individual antibiotics and the total content of penicillin antibiotics in foodstuffs. *Talanta*, 120, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.018>
- Karki, H. P., Jang, Y., Jung, J., & Oh, J. (2021). Advances in the development paradigm of biosample-based biosensors for early ultrasensitive detection of alzheimer's disease. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00814-7>
- Leibl, N., Duma, L., Gonzato, C., & Haupt, K. (2020). Polydopamine-based molecularly imprinted thin films for electro-chemical sensing of nitro-explosives in aqueous solutions. *Bioelectrochemistry*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107541>

- Li, S., Zhang, Q., Lu, Y., Ji, D., Zhang, D., Wu, J., Chen, X., & Liu, Q. (2017). One step electrochemical deposition and reduction of graphene oxide on screen printed electrodes for impedance detection of glucose. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 244, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.142>
- Li, X., Liu, R., Long, L., Liu, B., & Xu, J. (2021). Tensile behavior and water absorption of innovative composites from natural cork granules and bamboo particles. *Composite Structures*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2020.113376>
- Lima, C. G. M. (2018). Transdutores Piezoelétricos na Recolha da Energia Cinética das Vibrações. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia da Beira Interior. <http://hdl.handle.net/10400.6/9926>
- Liu, K., Wei, WZ., Zeng, JX. *et ai*. Aplicação de um novo filme impresso de polidopamina eletrossintetizado para a detecção capacitiva de nicotina. *Anal Bioanal Chem* **385**, 724-729 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0489-z>
- Lopes, F. T. (2016). Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de Naloxona. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/10964>
- Machado, A. P. R., Carvalho, I. O., & Rocha Sobrinho, H. M. da. (2020). Neuroinflamação na doença de alzheimer. *Revista Brasileira Militar de Ciências*, 6(14). <https://doi.org/10.36414/rbmc.v6i14.33>
- Magalhães da Silva, S. P., & Oliveira, J. M. (2021). Cork powders wettability by the Washburn capillary rise method. *Powder Technology*, 387, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.04.005>
- Mantzavinos, V., & Alexiou, A. (2017). Biomarcadores para o diagnóstico da doença de Alzheimer. *Current Alzheimer research*, 14 (11), 1149-1154. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203125942>
- Marcôa, A. R. C. (2011). *Novas Estratégias no Diagnóstico de Doença de Alzheimer: O Papel dos Biomarcadores*. 1–51. <http://hdl.handle.net/10216/61125>
- Martins, P. A. A. D. (2019). Instrumentação para biossensor eletroquímico utilizando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro. <http://hdl.handle.net/10773/29715>
- Merabti, S., Kenai, S., Belarbi, R., & Khatib, J. (2021). Thermo-mechanical and physical properties of waste granular cork composite with slag cement. *Construction and Building Materials*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121923>
- Miranda, J. L. (2016). Sensor impedimétrico baseado em nanopartículas de ouro modificadas com Clavanina A em camadas automontadas de cisteína para detecção de bactérias. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/25044>
- Mladenovic Djordjevic, A. N., Kapetanou, M., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Todorovic, S., Athanasopoulou, S., Jovic, M., Prvulovic, M., Taoufik, E., Matsas, R., Kanazir, S., & Gonos, E. S. (2021). Pharmacological intervention in a transgenic mouse model improves Alzheimer's-associated pathological phenotype: Involvement of proteasome activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 162, 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.038>

- Mo, G., Qin, D., Jiang, X., Zheng, X., Mo, W., & Deng, B. (2020). A sensitive electrochemiluminescence biosensor based on metal-organic framework and imprinted polymer for squamous cell carcinoma antigen detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127852>
- Moanea, S., Smyth, M. R., & O'keeffeb, M. (1996). Differential-pulse Voltammetric Determination of Clenbuterol in Bovine Urine Using a Naf ion-modified Carbon Paste Electrode*. In *Analyt* (Vol. 121). <https://doi.org/10.1039/AN9962100779>
- Moreira, F. T. C., Dutra, R. A. F., Noronha, J. P. C., Cunha, A. L., & Sales, M. G. F. (2011). Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.026>
- Moreira, T. (2011). Gestão de Perdas em Redes de Abastecimento de Água- assistida pelo simulador EPANET. Faculdade de Engenharia do Porto, Porto. 1-201.
- Mottin, A. C. (2016). Desenvolvimento e aplicação de sistemas para liberação prolongada de fertilizantes obtidos com nanofibras de poli (3-hidroxi-butirato) (PHB) incorporadas com hidrogéis. 109.
- Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. G. (2000). Monoclonal antibodies. *Molecular pathology : MP*, 53(3), 111–117. <https://doi.org/10.1136/mp.53.3.111>
- Nunes, L. J. R., Matias, J. C.O & Catalão, J. P. S. (2013). Energy recovery from cork industrial waste: Production and characterisation of cork pellets. *Fuel*, 113, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.05.052>
- Pacheco, W. F., Semaan, F. S., Almeida, V. G. K., Ritta, A. G. S. L., Aucélio, R. Q. (2013). Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Revista Virtual de Química*. 5(4):516–37. ISSN 1984-6835
- Pereira, H. (1988). Wood Science and Technology Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. In *Wood Sci. Technol* (Vol. 22).
- Pintor, A. M. A., Ferreira, C. I. A., Pereira, J. C., Correia, P., Silva, S. P., Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S., & Boaventura, R. A. R. (2012). Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. In *Water Research* (Vol. 46, Issue 10, pp. 3152–3166). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.048>
- PORDATA. (2021). Indicadores de Envelhecimento. Acedido a 27 de dezembro de 2021. Disponível em: PORDATA - Indicadores de envelhecimento
- Ribeiro, J. A. O. (2013). Caracterização e Otimização de Sensores Eletroquímicos para Aminas Biogénicas. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Ribeiro, S. C. S. R. (2016). Desenvolvimento de um anticorpo plástico para a deteção potenciométrica de um biomarcador da Doença de Alzheimer. Acedido a 27 Dezembro, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.22/11234>

- Rick, J., & Chou, T. C. (2006). Amperometric protein sensor - fabricated as a polypyrrole, poly-aminophenylboronic acid bilayer. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(3), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.04.007>
- Roushani, M., & Zalpour, N. (2021). Selective detection of Asulam with in-situ dopamine electropolymerization based electrochemical MIP sensor. *Reactive and Functional Polymers*, 169. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105069>
- Ruan, C., Shi, W., Jiang, H., Sun, Y., Liu, X., Zhang, X., Sun, Z., Dai, L., & Ge, D. (2013). One-pot preparation of glucose biosensor based on polydopamine-graphene composite film modified enzyme electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 177, 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.010>
- Sacramento, A. I. S. (2014). Desenvolvimento de um biossensor para monitorização de acetilcolina, um biomarcador associado à Doença de Alzheimer. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/8433>
- Santos, M. G., Abrão, L. C. C., Freitas, L. A. S., Moraes, G. O. I., Lima, M. M. & Figueiredo, E. C. (2013). Emprego de polímeros de impressão molecular em preparo de amostras para análise de compostos orgânicos: aplicações e tendências. *Scientia Chromatographica*. 4(3):161-195. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2012.012>
- Sergeyeva, T. A., Piletsky, S. A., Brovko, A. A., Slinchenko, E. A., Sergeyeva, L. M., Panasyuk, T. L., & El'skaya, A. v. (1999). Conductimetric sensor for atrazine detection based on molecularly imprinted polymer membranes. In *Analyst* (Vol. 124).
- Silva, A. G. S. G. (2007). Estudo do comportamento eletroquímico do nióbio sob carregamentos e descarregamentos de hidrogênio. Tese de Pós-graduação. Universidade Federal do Paraná.
- Silva, F. M., Lacerda, P.S.B. & Junior, J.J. (2005). Desenvolvimento sustentável e química verde. *Q. Nova*, v.28, n.1, p.103-110. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100019>
- Silva, J. I. P. (2013). Sensor electroquímico seletivo para a Norfloxacin. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/5783>
- Silva, M. S. V. (2015). Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para monitorização do cancro da mama. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. <http://hdl.handle.net/10400.22/8073>
- Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., & Reis, L. R. (2005). Cortiça: propriedades, capacidades e aplicações. *International Materials Reviews*, 50 (6), pp. 345 – 365.
- Sousa, M. D., & Maurício Barbosa, C. (1609). Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controlo da libertação de fármacos. Parte 1: síntese e caracterização. In *Quim. Nova* (Vol. 32, Issue 6).
- Souza, D, Machado, S. A. S. & Avaca, L. A. (2003). Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. In *Quim. Nova* (Vol. 26, Issue 1). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>

- Tavares, A. P. M., Sá, M. H. de, & Sales, M. G. F. (2021). Innovative screen-printed electrodes on cork composite substrates applied to sulfadiazine electrochemical sensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 880. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114922>
- Thakur, K. T., Albanese, E., Giannakopoulos, P., Jette, N., Linde, M., Prince, M. J., Steiner, T. J., & Dua, T. (2016). Neurological Disorders. In V. Patel (Eds.) *et. al., Mental, Neurological, and Substance Use Disorders: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 4)*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.
- Thal, D. R., Griffin, W. S., de Vos, R. A., & Ghebremedhin, E. (2008). Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 115(6), 599–609. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0366-2>
- Tothill, I. E. (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 55–62). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.015>
- Tothill, I. E. (2001). Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. In *Computers and Electronics in Agriculture* (Vol. 30). www.elsevier.com/locate/compag
- UETA, R. R. (2002). A espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo da interface platina/lectina. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/9513>
- World Health Organization. (2021). Dementia. Acedido a 27 dezembro de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Wu, YY, Hsu, JL, Wang, HC, Wu, SJ, Hong, CJ, & Cheng, IH (2015). Alterações dos Marcadores Neuroinflamatórios IL6 e TRAIL na Doença de Alzheimer. *Demência e transtornos cognitivos geriátricos extra*, 5 (3), 424-434. <https://doi.org/10.1159/000439214>
- Zaidi, S. A. (2020). Molecular imprinting: A useful approach for drug delivery. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.10.012>
- Yarman, A., Kurbanoglu, S., Zebger, I., & Scheller, F. W. (2021). Simple and robust: The claims of protein sensing by molecularly imprinted polymers. In *Sensors and Actuators, B: Chemical* (Vol. 330). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129369>
- Yeh, W. M., & Ho, K. C. (2005). Amperometric morphine sensing using a molecularly imprinted polymer-modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, 542(1 SPEC. ISS.), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.01.071>

ANEXOS

➤ Anexo A.1



Figura A. 1. Eletropolimerização com Dopamina.

➤ Anexo A.2

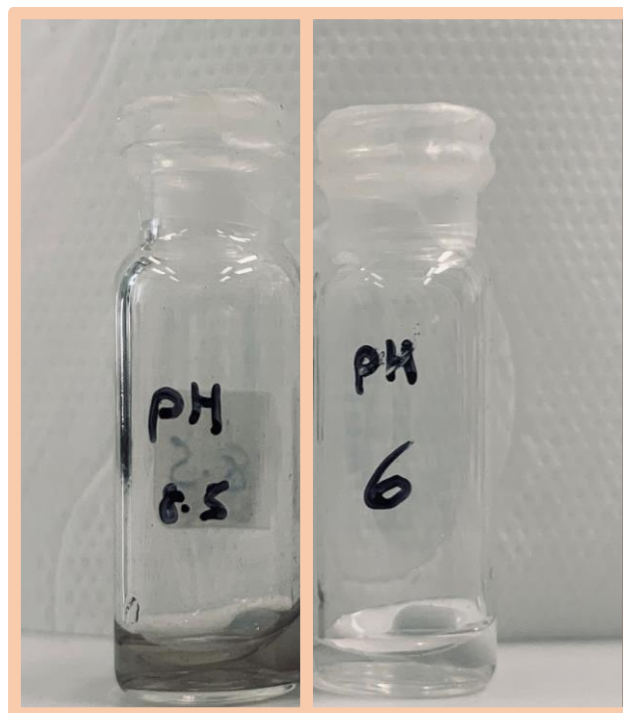


Figura A. 2. Solução de Dopamina preparada em PBS a pH 8.5 e pH 6.

➤ Anexo A.3

Tabela A. 1. Comparação dos valores obtidos de EIS da construção de SPE-110 e SPE- *cork*.

SPE-110								
	MIP				NIP			
	1	2	3	Média	1	2	3	Média
Após eletropolimerização	4458.9	4024	4139.4	4207.433	3514.8	3561.7	3760.2	3612.233
Após remoção	2666.1	2979.5	2862.2	2835.933	2556.1	2668.7	3253.2	2826
Taxa de remoção	40%	26%	31%	33%	27%	25%	13%	22%

SPE-<i>cork</i>								
	MIP				NIP			
	1	2	3	Média	1	2	3	Média
Após eletropolimerização	5779.1	4695.3	4651.7	5042.033	7107.4	3021.3	6429.6	5519.433
Após remoção	3177.3	2796.7	2796.7	2923.567	4069	2034.3	5453.2	3852.167
Taxa de remoção	45%	40%	40%	42%	43%	33%	15%	30%