



Desenvolvimento de um biossensor para rápido diagnóstico da doença de Alzheimer

MARIA DE LURDES LEITE GONÇALVES

Novembro de 2016

Maria de Lurdes Leite Gonçalves

Desenvolvimento de um biossensor para rápido diagnóstico da doença de Alzheimer

Dissertação submetida ao Instituto Superior de Engenharia do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção de aprovação na Unidade Curricular Dissertação / Estágio, realizada sob a orientação da Professora Doutora Maria Goreti Ferreira Sales, Professora Adjunta do Instituto Superior de Engenharia do Porto e da Doutora Felismina Teixeira Coelho Moreira, investigadora do grupo de investigação BioMark.

Agradecimentos

À Doutora Goreti Sales pela sua acessibilidade, disponibilidade, pelo interesse e sabedoria que com prazer se dedica a partilhar. Pelo *coaching* que me ajudou a concentrar, a definir fronteiras e prioridades. E principalmente, quero agradecer-lhe pela sua paciência.

À Doutora Felismina Moreira por todo apoio e dedicação, pelo amor que tem pelo trabalho e pela nossa amizade.

A toda a equipa do BioMark sempre bem-disposta e disponível.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas.

E em particular, ao Fernando, por estar ao meu lado e pela força transmitida nos momentos em que perco o foco.

Resumo

A necessidade de desenvolver métodos rápidos e baratos, acessíveis a todos no mundo inteiro é de extrema importância, principalmente, quando se trata de melhorar as condições de saúde global. Um fator importante para a prevenção e tratamento de doenças é o seu correto diagnóstico. Os biossensores são uma ferramenta que pode vir a ser muito útil na construção de testes em *point-of-care*, sendo dispositivos biocompatíveis e de custo reduzido.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biossensor eletroquímico para o rastreamento da Doença de Alzheimer. Teve como base a detecção de um biomarcador relacionado com os processos neuro-inflamativos, a *Interleucina 6* (IL-6).

Os dispositivos biossensores utilizados baseiam-se em elétrodos de carbono impressos numa base cerâmica utilizando a técnica *screen-printing*. O circuito elétrico destes dispositivos é feito recorrendo a uma tinta condutora de grafite, onde posteriormente é impresso sobre o elétrodo de trabalho a mistura reacional para o desenvolvimento do polímero de impressão molecular. Esta mistura consiste no analito (IL-6), no monómero (Pirrol), no agente de ligação cruzada e no iniciador radical. A modificação da superfície do elétrodo ocorreu por polimerização eletroquímica, formando um polímero condutor na sua matriz.

Foram otimizados os parâmetros de eletropolimerização e após a polimerização o analito foi removido da estrutura polimérica por ação proteolítica de um ácido. A avaliação da performance analítica do biossensor foi efetuada por técnicas eletroanalíticas. A caracterização química e morfológica da superfície dos materiais foi efetuada por análise Raman.

A resposta do biossensor observou-se numa gama de valores entre 0,02 pg/mL e 2,0 µg/mL de IL-6, o que indica que os limites de resposta se encontram dentro dos parâmetros fisiológicos pretendidos, já que para um indivíduo saudável o valor ronda os 1,6 pg/mL e num indivíduo com neuro-inflamação os 2,3 pg/mL. Obteve-se um biossensor reproduzível, com limites de deteção baixos, resposta rápida e barato.

Palavras-chave: Biossensor, Alzheimer, Interleucina-6, Pirrol, Polímero de Impressão Molecular.

Abstract

The need to develop fast and cheap methods accessible to everyone around the world is extremely important, especially when it comes to improve global health conditions. A crucial factor for the prevention and treatment of diseases is their correct diagnosis. Biosensors printed on paper are a promising tool that can prove to be very useful in point-of-care testing, also offering easy construction procedures and biocompatibility, at a low cost.

The objective of this work is to develop an electrochemical biosensor for screening Alzheimer's disease. It is based on the detection of a biomarker associated with the neuro inflammation processes, Interleukin 6 (IL-6).

The devices described herein are based on printed carbon electrodes on a ceramic support, using screen-printing technique. The electrical circuits are designed by a conductive graphite ink and printed later on the working electrode for the development of molecular imprinting polymer. The mixture consists on the analyte (IL-6), the monomer (Pyrrol), a crosslinking agent and a radical initiator. The modification of the surface of the electrode occurred by electrochemical polymerization, forming a conductive polymer in the matrix.

The electropolymerization parameters were optimized prior to polymerization. The protein was imprinted on the sensing layer by growing the polymer around IL-6 and removing it later by proteolytic action of a suitable acid. The performance of the biosensor was evaluated by electroanalytical techniques. The chemical and morphological characterization of the materials was carried by Raman analysis.

The biosensor response was observed from 0.02 pg/mL to 2.0 µg/mL from IL-6, indicating that the response limits are within the desired physiological parameters, since for a healthy individual the value is around 1.6 pg/mL and for an individual with neuro-inflammation is 2.3 pg/mL. Overall, the presented biosensor offers the advantages of being a low cost and reproducible biosensor, with low detection limits and fast response.

Keywords: Biosensor, Alzheimer, Interleukin-6, Pyrrol, Molecular Imprinted Polymers.

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 1 |
| 1.1 | Doença de Alzheimer | 2 |
| 1.2 | Neuro-Inflamação | 3 |
| 1.2.1 | <i>A resposta imunitária do SNC à neuro-inflamação</i> | 4 |
| 1.3 | Monitorização da IL-6 | 5 |
| 1.3.1 | <i>Métodos óticos</i> | 6 |
| 1.3.2 | <i>Métodos separativos</i> | 6 |
| 1.3.3 | <i>Métodos bioquímicos</i> | 6 |
| 1.3.4 | <i>Métodos eletroanalíticos</i> | 7 |
| 1.4 | Biossensores | 9 |
| 1.4.1 | <i>Elementos de bioreconhecimento</i> | 10 |
| 1.4.2 | <i>Transdutor</i> | 16 |
| 1.4.3 | <i>Plataformas sensoras</i> | 16 |
| 1.5 | Objetivos gerais e estrutura da dissertação | 17 |
| 2 | Descrição Experimental | 19 |
| 2.1 | Materiais | 19 |
| 2.1.1 | <i>Equipamento</i> | 19 |
| 2.1.2 | <i>Reagentes e Materiais</i> | 20 |
| 2.1.3 | <i>Soluções</i> | 20 |
| 2.2 | Procedimentos analíticos | 21 |
| 2.2.1 | <i>Preparação do C-SPE</i> | 21 |
| 2.2.2 | <i>Estudo das condições de trabalho do NIP</i> | 22 |
| 2.2.3 | <i>Preparação do MIP</i> | 24 |
| 2.2.4 | <i>Parâmetros analíticos - Limite de deteção IL-6</i> | 25 |
| 2.2.5 | <i>Análise Qualitativa dos Materiais</i> | 25 |
| 3 | Resultados e Discussão | 27 |
| 3.1 | Caraterização dos C-SPEs | 27 |
| 3.1.1 | <i>Preparação do C-SPE</i> | 27 |
| 3.2 | Condições de polimerização | 28 |
| 3.2.1 | <i>Potencial de Oxidação do Pirrol</i> | 28 |
| 3.2.1 | <i>Gama de Potencial de Trabalho</i> | 29 |
| 3.2.2 | <i>Número de Ciclos na Eletropolimerização</i> | 32 |
| 3.2.3 | <i>Velocidade de Varrimento (V/s)</i> | 34 |
| 3.2.4 | <i>Condições de funcionamento do NIP</i> | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.5 Estudo do efeito do solvente no NIP | 36 |
| 3.2.6 Estudo da Gama de Concentração do Pirrol..... | 39 |
| 3.2.7 Parâmetros selecionados para a preparação do NIP | 40 |
| 3.3 Síntese do MIP | 40 |
| 3.3.1 MIP por impressão na superfície..... | 40 |
| 3.3.2 MIP por impressão por polimerização em Bulk (3-D) | 43 |
| 3.3.3 Estudo da reprodutibilidade | 45 |
| 3.3.4 Curva de calibração da IL-6..... | 46 |
| 3.3.5 Testes em soro | 48 |
| 3.4 Caracterização dos Materiais | 49 |
| 3.4.1 Espectroscopia de Raman..... | 49 |
| 4 Conclusão..... | 51 |
| 5 Referências Bibliográficas | 53 |

Índice de Figuras

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1.1 | Barreira Hemato-Encefálica (BHE) [10]..... | 3 |
| Figura 1.2 | Representação esquemática da impedância na forma exponencial e no plano complexo para a reação de eletrodo. Adaptado da Ref.[55]..... | 9 |
| Figura 1.3 | Configuração do sistema biossensor. Adaptado da Ref. [59] | 10 |
| Figura 1.4 | Biossensor enzimático | 11 |
| Figura 1.5 | Biossensor com anticorpo como elemento de bioreconhecimento. | 12 |
| Figura 1.6 | Biossensor com aptâmero como elemento de bioreconhecimento. | 13 |
| Figura 1.7 | Processo de formação do polímero de impressão molecular. | 14 |
| Figura 2.1 | Potenciostato /galvanostato PGSTAT302N..... | 19 |
| Figura 2.2 | Thermo Scientific DXR Raman microscope 532nm Filter | 19 |
| Figura 2.3 | Screen-Printed Carbon Electrodes (DropSens)..... | 21 |
| Figura 2.4 | Representação esquemática da síntese do MIP | 22 |
| Figura 3.1 | Leituras da solução padrão redox no C-SPE inicial (sem modificações): CV (a), SWV(b) e EIS(c)..... | 27 |
| Figura 3.2 | Estudo do potencial de oxidação do Pirrol..... | 29 |
| Figura 3.3 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização numa gama de potencial de estudo [-0,8V a +0.65V]...... | 29 |
| Figura 3.4 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização numa gama de potencial de estudo [-0,8V a +0,8V]...... | 30 |
| Figura 3.5 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização numa gama de potencial de estudo [-0,8V a +1.1V]...... | 31 |
| Figura 3.6 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS. Comparação da modificação do eletrodo após eletropolimerização nas gamas de potencial entre [-0,8V a +0,65V], [-0,8V a +0,8V] e [-0,8V a +1.1V]. | 31 |
| Figura 3.7 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com um número de 5 ciclos. | 32 |
| Figura 3.8 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com um número de 10 ciclos. | 33 |
| Figura 3.9 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com um número de 20 ciclos. | 33 |
| Figura 3.10 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS. Comparação da modificação do eletrodo após eletropolimerização variando o número de ciclos em 5, 10 e 20. | 34 |
| Figura 3.11 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com uma velocidade de varrimento de 0,025V/s..... | 34 |
| Figura 3.12 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com uma velocidade de varrimento de 0,050V/s..... | 35 |
| Figura 3.13 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com uma velocidade de varrimento de 0,100V/s..... | 35 |
| Figura 3.14 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS. Comparação da modificação do eletrodo após eletropolimerização variando a velocidade de varrimento em 0,025V/s, 0,050V/s e 0,100V/s..... | 36 |
| Figura 3.15 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 5 ciclos e após a aplicação do Acetonitrilo. | 37 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 3.16 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a aplicação do Acetonitrilo por incubação. | 37 |
| Figura 3.17 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a limpeza com Acetonitrilo por CV. | 37 |
| Figura 3.18 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 5 ciclos e após a limpeza com Etanol por incubação durante 3h. | 38 |
| Figura 3.19 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a limpeza com Etanol por incubação durante 3h. | 38 |
| Figura 3.20 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 5 ciclos e após a limpeza com Ácido Oxálico por incubação durante 3h. | 39 |
| Figura 3.21 | Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a limpeza com Ácido Oxálico por incubação durante 3h. | 39 |
| Figura 3.22 | Comparação do efeito de diferentes concentrações de Pirrol na eletropolimerização, pelas leituras obtidas com a solução padrão redox em CV, SWV e EIS. | 40 |
| Figura 3.23 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE inicial (sem modificações) após a limpeza com KCl, no ensaio do MIP 3 (1ª fase). | 41 |
| Figura 3.24 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, após incubação da proteína e eletropolimerização do Pirrol, no ensaio do MIP 3 (2ª fase). | 41 |
| Figura 3.25 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão Redox no C-SPE, após remoção da proteína com Ácido Oxálico, no ensaio do MIP 3 (3ª fase). | 41 |
| Figura 3.26 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 1. | 41 |
| Figura 3.27 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 2. | 42 |
| Figura 3.28 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 3. | 42 |
| Figura 3.29 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, antes e depois da Incubação da proteína IL-6. | 42 |
| Figura 3.30 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE inicial (sem modificações) após a limpeza com KCl, no ensaio do MIP 3 (1ª fase). | 43 |
| Figura 3.31 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, após a eletropolimerização da solução (IL-6 + Py-COOH + Py), no ensaio do MIP 3 (2ª fase). | 43 |
| Figura 3.32 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, após remoção da proteína com Ácido Oxálico, no ensaio do MIP 3 (3ª fase). | 44 |
| Figura 3.33 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 1. | 44 |
| Figura 3.34 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 2. | 44 |
| Figura 3.35 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 3. | 44 |
| Figura 3.36 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, estudo da reprodutibilidade de C-SPE's diferentes após a eletropolimerização. | 46 |
| Figura 3.37 | Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, estudo da reprodutibilidade de C-SPE's diferentes após a remoção da proteína com ácido oxálico. | 46 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 3.38 | Leituras do, EIS e SWV da solução padrão redox no C-SPE, adição de diferentes concentrações de IL-6 preparada em PBS em 3MIP's..... | 47 |
| Figura 3.39 | Retas de calibração obtidas com concentrações de IL-6 preparadas em PBS para MIP e NIP, pelas técnicas EIS (a) e SWV (b). | 48 |
| Figura 3.40 | Leituras do, EIS e SWV da solução padrão redox no C-SPE, adição de diferentes concentrações de IL-6 preparada em soro no MIP's. | 48 |
| Figura 3.41 | Retas de calibração obtidas com concentrações de IL-6 preparadas em soro para MIP e NIP, pelas técnicas EIS (a) e SWV (b). | 49 |
| Figura 3.42 | Espetro de Raman da superfície dos C-SPE's em diferentes fases de estudo. | 50 |

Índice de Tabelas

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabela 2.1: | Lista de materiais e reagentes utilizados e sua origem..... | 20 |
| Tabela 3.1: | Concentração das soluções preparadas de IL-6..... | 46 |
| Tabela 3.2: | Valores obtidos por espectroscopia Raman na superfície de diferentes C-SPE em diferentes fases de estudo. | 50 |

Nomenclatura

| | |
|--------------------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| BHE | Barreira Hemato-encefálica |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| C-SPE | <i>Carbon – Screen-printed electrodes</i> |
| CV | <i>Cyclic Voltametry</i> |
| DA | Doença de Alzheimer |
| EIS | <i>Eletrochemical Impedance Spectroscopy</i> |
| ELISA | <i>Enzyme- linked Immunosorbent Assay</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IL-1β | Citoquina - Interleucina-1 beta |
| IL-6 | Citoquina - Interleucina-6 |
| MIP | <i>Molecular Imprinted Polymers</i> |
| NIP | <i>Non Imprinted Polymers</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| p-tau | Proteína tau |
| Py | Pirrol (C ₄ H ₅ N) |
| Py-COOH | Ácido pirrol-2-carboxílico (C ₅ H ₅ NO ₂) |
| RIA | <i>Radioimmunoassay</i> |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SPE | Screen-printed electrodes |
| SPR | <i>Surface Plasmon Resonance</i> |
| SWV | <i>Square Wave Voltametry</i> |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alfa |
| Z | Impedância (Ω) |

1 Introdução

A doença de Alzheimer (DA) é a condição de demência predominante de nossa sociedade, envolvendo mudanças progressivas e degenerativas do sistema nervoso central, e que afeta principalmente pessoas idosas. Está relacionada com uma deterioração cognitiva, falhas de memória, com uma diversidade de sintomas neuropsiquiátricos, vários distúrbios de comportamento e com o comprometimento progressivo das atividades de vida diária.[1]

Apesar do grande impacto social e económico, não há nenhum teste atual capaz de fornecer um diagnóstico preciso da DA, que é essencial para uma adequada terapia e acompanhamento de cada paciente. A obtenção um diagnóstico com 100% de exatidão só é possível numa análise *post mortem* ao cérebro. Efetuar uma análise do tipo biopsia a uma parte do cérebro, numa pessoa viva é inviável. Não se conhecem biomarcadores circulantes não invasivos que permitam diagnosticar a DA.

Atualmente, diversas áreas de investigação visam incluir a possibilidade de identificação de biomarcadores da DA em vários fluidos biológicos. Monitorar os níveis de tais biomarcadores pode vir a ser um importante meio de diagnóstico no futuro, principalmente se estes são encontrados no sangue periférico (evitando procedimentos invasivos). Os biomarcadores da DA são atualmente monitorados por meio de anticorpos naturais/reações antígeno e/ou procedimentos cromatográficos sofisticados, sendo caro e restrito a uso em laboratório, exigindo muito tempo para produzir uma resposta exata.

No entanto, sabe-se que a DA tem origem numa inflação, e uma vez que os biomarcadores da inflamação já são circulantes, quando associados a outros sintomas, ao efetuar-se um estudo a esses biomarcadores poderá ser uma forma de se efetuar o rastreio da DA. Neste sentido, o principal objetivo desta dissertação é desenvolver uma plataforma sensora autónoma de baixo custo, baseada em materiais biomiméticos para o rastreio de biomarcadores da resposta inflamatória, neste caso, à presença da proteína IL-6 (antigénio), uma vez que o início da doença/progressão tem sido correlacionado com condições pró-inflamatória.[2] O dispositivo é criado com materiais de deteção de captura do biomarcador com elevada afinidade e seletividade avaliadas e testadas em amostras reais. Estes (bio) materiais serão sintetizados na superfície de suportes de carbono.

1.1 Doença de Alzheimer

A DA é caracterizada pela perda progressiva de memória e de outras funções cognitivas. O tempo de duração da doença é de cerca de 10 anos, podendo durar muitos mais e desde que se começa a manifestar no paciente, este vai perdendo as suas capacidades acabando por morrer, completamente desorientado e incapacitado. A longa duração da DA e a forma como ela se manifesta acarreta uma carga emocional e financeira elevada, tanto para o paciente como para a família e a sociedade.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças neurológicas em geral, fruto da incapacidade cognitiva e motora a que se associam, são responsáveis pela maior contribuição para o impacto global das doenças na sociedade a nível mundial (6,3%). A DA e outras demências são responsáveis por cerca de 20% desse contributo.

Só no ano de 2010 foi estimado que a DA custou ao mundo cerca de \$604 bilhões. Existem atualmente cerca de 36 milhões de pessoas afetadas com esta doença e estima-se que este número triplique até 2050. Poucos sistemas de cuidados de saúde estão preparados para lidar com uma evolução tão grande de casos.[3, 4]

Em termos neuropatológicos, a DA caracteriza-se pela morte neuronal em determinadas partes do cérebro e ainda não se sabe quais as causas. Podem ser observados dois diferentes tipos da DA:[5] i) A DA esporádica que pode afetar adultos de qualquer idade, mas ocorre principalmente após os 65 anos. O gene ApoE14 está associado ao desenvolvimento da DA numa idade avançada, e esta forma de doença é a mais generalizada; ii) A DA familiar é uma forma menos comum, esta é transmitida geneticamente. Se um dos progenitores tiver um gene mutado existe a probabilidade de 50% de cada filho vir a herdá-lo. Não significa que a pessoa, com esse gene, possa vir a desenvolver a Doença de Alzheimer, e se tal ocorrer, será entre os 40 e 60 anos.

Nas fases iniciais, os sintomas da DA podem ser impercetíveis. Começa geralmente com pequenos esquecimentos e dificuldade de se expressar, normalmente estes indícios são até aceites pelos familiares como fazendo parte do processo normal de envelhecimento. Mas, progressivamente, os sintomas vão se agravando à medida que as células cerebrais vão morrendo e perdendo capacidades. Como principais sintomas, apresentam-se a perda de memória, a dificuldade de estruturar e manter uma conversa, a dificuldade em executar as tarefas diárias, a perda da noção do tempo e desorientação, a dificuldade em reconhecer imagens visuais e relações, o trocar o lugar das coisas, o afastamento da vida social e alterações de humor e personalidade. [5]

Estes sintomas podem variar de pessoa para pessoa, mediante a área cerebral afetada, progredindo a ritmos diferentes. As capacidades da pessoa podem variar de dia para dia ou

mesmo dentro do próprio dia, podendo piorar em períodos de *stress*, cansaço ou devido a problemas de saúde. Estão a ser investigadas várias causas suspeitas da DA, incluindo fatores ambientais, perturbações bioquímicas e processos imunitários. As causas estão relacionadas alterações químicas que provocam danos às células cerebrais. Estas podem variar consoante a pessoa e estar associadas a um ou vários fatores.[5] A DA é progressiva e degenerativa e, atualmente, irreversível.[5] A importância da sua precoce deteção é uma mais-valia para o seu preventivo diagnóstico.

1.2 Neuro-Inflamação

Neuro-inflamação é uma inflamação do tecido nervoso. Esta inflamação pode ser desencadeada como resposta a uma variedade de estímulos, nomeadamente infeções, lesões cerebrais traumáticas, a presença de metabolitos tóxicos, ou a reações imunológicas. No sistema nervoso central (SNC), incluindo o cérebro e a medula espinal, as microglias são as células residentes inatas imunes que são ativadas em resposta a esses estímulos.[6, 7] O SNC é um local imunologicamente privilegiado, porque as células imunitárias periféricas são geralmente protegidas por uma *Barreira Hemato-Encefálica* (BHE), uma estrutura especializada composta por astrócitos e endotélio. [7, 8] No entanto, as células imunitárias periféricas podem passar essa barreira e encontrar-se com neurónios e células gliais e formar grandes moléculas complexas de histocompatibilidade, perpetuando reações imunológicas. [7, 9] Embora essa reação seja iniciada no sentido de proteger o sistema nervoso central do agente infeccioso, o seu efeito pode ser tóxico e pode desencadear uma inflamação generalizada, assim como, provocar a migração de leucócitos através da BHE (Figura 1.1) [7]

A neuro-inflamação é considerada como crónica. A inflamação crónica é a ativação sustentada de células gliais e pela passagem de outras células do sistema imunológico para o cérebro. Este tipo de inflamação crónica está associado a doenças do foro neuro degenerativo, tal como a DA.

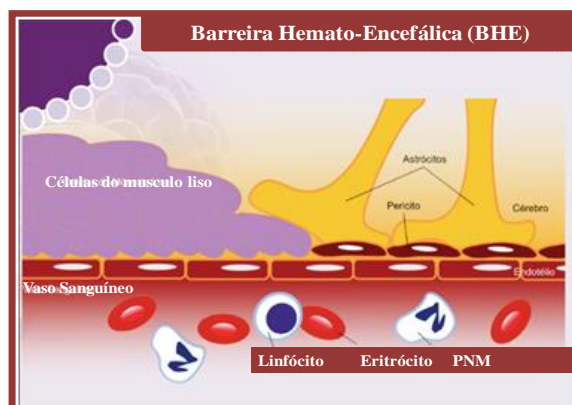


Figura 1.1 Barreira Hemato-Encefálica (BHE) [10]

1.2.1 A resposta imunitária do SNC à neuro-inflamação

➤ Células gliais

As microglias são reconhecidas como as células gliais imunitárias inatas SNC. [6, 7] Quando na presença de uma inflamação crónica (onde existe uma degradação do tecido e da BHE), a microglia gera espécies reativas de oxigénio que libertam sinais para recrutar células imunes da periferia como resposta à inflamação.[7, 11, 12]

Os astrócitos são células gliais e são as células mais abundantes no cérebro. Eles estão envolvidos na manutenção e suporte dos neurónios e são um componente significativo da BHE. Após uma lesão ao cérebro, os astrócitos podem ser ativados como em resposta aos sinais libertados por neurónios feridos ou microglias ativadas. Uma vez ativados, os astrócitos podem libertar vários fatores de crescimento e sofrerem alterações morfológicas. [7, 13]

➤ Citoquinas

As citoquinas são uma classe de proteínas que regulam a inflamação, a sinalização das células, e vários processos celulares, tais como crescimento e sobrevivência.[14] As *quimiocinas* são um subconjunto das citoquinas que regulam a migração celular, tais como atrair células do sistema imune para um local da infeção ou lesão. Vários tipos de células no cérebro podem produzir citoquinas e *quimiocinas*, tais como as microglias, os *astrócitos*, as células endoteliais e outras células da glia. Fisiologicamente, *quimiocinas* e citoquinas funcionam como neuro moduladores que regulam a inflamação e o desenvolvimento. No cérebro saudável, as células libertam citoquinas para produzir um ambiente local inflamatório de forma a recrutarem as microglias para limpar a infeção ou lesão. No entanto, onde ocorre neuro-inflamação as células podem ter libertado uma quantidade elevada de citoquinas e *quimiocinas* que podem comprometer a BHE. As células imunitárias periféricas são chamadas ao local da lesão pelas citoquinas e estas, com a BHE comprometida, podem agora migrar através dela para o cérebro. As citoquinas mais comuns produzidas em resposta a uma lesão cerebral são: interleucina-6 (IL-6), a qual é produzida durante a astrogliose, a interleucina-1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que pode induzir neuro-toxicidade. Embora as citoquinas pró-inflamatórias possam provocar a morte celular e danos nos tecidos secundários, elas são necessárias para reparar o tecido danificado. Por exemplo, o TNF- α causa neuro-toxicidade na fase inicial da neuro-inflamação mas depois contribui para o crescimento dos tecidos em fases posteriores da inflamação.[7, 14]

➤ Envelhecimento

Envelhecimento é muitas vezes associado a enfraquecimento cognitivo e ao aumento da propensão para o desenvolvimento de doenças neuro degenerativas, tal como a DA.[15] Num cérebro envelhecido, sem doenças, existe um aumento dos níveis de citoquinas pró-

inflamatórias e uns níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias. O desequilíbrio homeostático entre citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias no envelhecimento é um fator principal de propensão para aumento do risco de doenças neuro degenerativas. Além disso, há um aumento do número de microglias ativadas em cérebros envelhecidos, cuja presença diminui a capacidade dos neurónios no hipocampo e, logo, reduz a capacidade de formar memórias.[7, 16, 17]

Na DA as principais alterações patológicas observadas são aparecimento de tranças fibrilares nos neurónios com filamentos helicoidais pela hiperfosforilação da proteína tau (ρ -tau) e a deposição extracelular de placas amiloides (placas senis) que impossibilitam a comunicação entre as células nervosas, o que provoca alterações ao nível do funcionamento global da pessoa.[5, 7, 18]

A DA tem sido especificamente caracterizada por estes dois biomarcadores típicos, mas atualmente, acredita-se que uma porção significativa da neuro degeneração na DA é devida à neuro-inflamação.

Em análises pós-morte a cérebros com DA, foram encontradas microglias ativadas em abundância. O pensamento atual é que, na presença de citocinas inflamatórias da microglia não é possível fagocitar a beta-amiloide, que pode contribuir para a acumulação de placa, em vez da libertação. Para além disso, a citocina inflamatória IL-1 β é regulada positivamente na DA e está associada com a diminuição da sinaptofisina e conseqüente perda sináptica. Outra evidência de que a inflamação está associada com a progressão da doença na DA, é que as pessoas que tomam fármacos anti-inflamatórios não-esteroides têm vindo a desenvolver resistência à DA, em idades mais avançadas.[7, 19]

Sendo assim, a monitorização de citocinas produzidas em resposta a uma neuro-inflamação, nomeadamente a IL-6, poderá constituir uma forma de rastreio à DA.

1.3 Monitorização da IL-6

Existem vários métodos de deteção da proteína IL-6 em diferentes níveis de concentração. Num estudo, efetuado aos biomarcadores da neuro-inflamação, entre os quais constava a IL-6, para a doença de Alzheimer (39 pessoas sem DA e 38 pessoas com DA), verificou-se que a presença de IL-6 em pessoas que não apresentam DA é em média 1,622pg/mL enquanto em pessoas com a DA aparece em valor superior, sendo este em média 2,343 pg/mL.[20] Por isso, a sensibilidade dos métodos é importante para detetar a IL-6. Existem vários métodos para a sua deteção e dos quais se destacam os métodos óticos, separativos e electro analíticos.

1.3.1 Métodos óticos

Os métodos óticos baseiam-se nos fenômenos de absorção, emissão, difração, refração, dispersão e polarização, em toda a gama do espectro eletromagnético, desde os raios X até às micro-ondas.[21]

O uso da fibra ótica como uma sonda ou elemento sensor nos biossensores é um dos métodos utilizados para a detecção da IL-6, devido a algumas das suas características como a capacidade de condução da luz e imunidade a interferências elétricas e magnéticas. Um biossensor ótico típico utiliza medições de absorvância para determinar uma mudança na concentração de analito que absorve a um determinado comprimento de onda da luz. A luz é transmitida através de uma fibra ótica para a amostra, a quantidade de luz absorvida pelo analito é detetada através da mesma fibra ou uma segunda fibra. Um exemplo consiste na imobilização de material biológico, este é imobilizado na extremidade da fibra ótica. Dos métodos mais sensíveis óticos destacam-se duas técnicas a fluorescência e os *Label-free* [22-26]. Os métodos baseados em fibra ótica conseguem detetar concentrações de IL-6 na ordem de 0,12 ng/mL.[22]

1.3.2 Métodos separativos

Entre os métodos separativos o mais usual encontrado para a detecção da IL-6 é o da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).[27-30] O princípio básico deste método consiste na separação de misturas, na qual os vários componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel, as separações dependem do movimento relativo entre as fases. Este método possui alta sensibilidade e é aplicável a diversos analitos.[21] Têm sido descritos, na literatura, trabalhos científicos com base em eletroforese capilar, espectrometria de massa e cromatografia de alta pressão para a monitorização de IL-6 em fluídos biológicos.[31-34]

1.3.3 Métodos bioquímicos

A grande parte dos métodos de natureza bioquímica baseia-se na reação de afinidade entre anticorpo e antígeno, cuja transdução pode recorrer a métodos químicos/físicos: óticos, separativos e/ou eletroanalíticos. Os métodos mais referidos na literatura para este efeito incluem Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Este método é um dos mais utilizados para a detecção desta citocina. Os limites de detecção para este método variam entre 0.39 pg/mL [35] e 2.5 pg/ml.[25] Estes trabalhos são no geral muito seletivos porque se baseiam na interação biológica anticorpo/antígeno, embora a sua seletividade efetiva dependa do grau de afinidade entre a IL6 e o anticorpo utilizado.[36-42]

Métodos de Radioimunoensaio (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*), Imunocromatografia [43] e Ressonância de *Plasmon* de Superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*) [44] têm sido descritos e encontram-se engobados nos métodos bioquímicos.

O recurso a anticorpos apresenta algumas limitações como estabilidade reduzida, tempos de resposta elevados e uma impossibilidade de reutilização dos materiais biológicos, uma vez que a ligação anticorpo/antígeno é de natureza irreversível. Para além disso apresenta um elevado custo inviabilizando a sua utilização em programas de rastreio ou em medições de rotina praticadas nos hospitais.

Em geral, estas limitações podem ser precavidas através da substituição dos anticorpos naturais por recetores artificiais, também reconhecidos como biomiméticos e obtidos habitualmente por técnicas de impressão molecular.[45, 46]

1.3.4 Métodos eletroanalíticos

A eletroanálise é uma técnica analítica usada como alternativa ou como complemento aos métodos óticos ou de separação, devido à sua elevada sensibilidade (limites de deteção baixos), rapidez de análise, à redução do tamanho e volume de amostra, e ainda devido ao baixo custo operativo, quando comparado com outros métodos analíticos.[21, 47]

Estes métodos apresentam diversas vantagens comparativamente às técnicas anteriores: i) a rápida informação de natureza quantitativa para quantidades vestigiais do analito; ii) uma utilização de baixo custo e de fácil miniaturização permitindo efetuar análises de campo; iii) fornecem informação sobre a estequiometria e constantes de equilíbrio dos compostos em estudo e; iv) recorrem a processos de preparação de amostra simples e amigos do ambiente.[48, 49]

Existem várias técnicas de electro análise para a deteção da proteína IL 6, como por exemplo a cronoamperometria [50], o estudo da voltametria cíclica [35, 51-53], a electrogravimetria, impedância [52] entre outras. Alguns dos métodos electro analíticos descritos na literatura IL-6 têm como base a impedância com baixos limites de deteção de 0,01 a 100 fg mL⁻¹ [52] e a amperometria com limites de deteção na ordem dos 1,75 a 500 pg/mL. [35, 54].

De uma forma geral, as técnicas eletroquímicas mais utilizadas no contexto da monitorização de biomoléculas são a voltametria cíclica (CV- *Cyclic Voltametry*), a voltametria de onda quadrada (SWV- *Square Wave Voltametry*) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS – *Electrochemical Impedance Spectroscopy*).

A voltametria cíclica (CV) permite explorar o comportamento de compostos eletroativos e o mecanismo de oxidação e redução. Permite verificar a reversibilidade de sistemas, assim

como detectar a presença de acontecimentos químicos associados à transferência de carga e verificar a ocorrência de adsorção de produtos no eletrodo. Os parâmetros mais importantes na voltametria é a direção do varrimento de potencial, a velocidade de varrimento, o potencial inicial, o potencial máximo, o potencial mínimo e o potencial final.[55]

A voltametria de onda quadrada (SWV) permite analisar através da forma da curva de corrente-potencial, proveniente da aplicação de um determinado potencial que varia de acordo com a amplitude do impulso e duração. A corrente elétrica é medida após impulsos positivos e negativos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante de forma diferencial, apresenta uma excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. Esta medida precede um tempo inicial onde o eletrodo de trabalho é polarizado a um potencial onde a reação Redox não ocorre. As curvas de corrente-potencial apresentam perfil bem definido e são, geralmente, simétricas, isto porque as correntes são medidas somente no fim de cada semi-período e as variações na altura e na largura do impulso de potencial são sempre constantes, para um determinado intervalo de potenciais. A altura dos picos produzidos é proporcional à concentração da espécie eletroativa.[56]

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) permite obter informações sobre as diferentes constantes de tempo associadas aos processos eletroquímicos que ocorrem na interface dos eletrodos. Nesta técnica é aplicada uma pequena perturbação ao eletrodo de trabalho e registada a sua resposta. O sinal aplicado ao eletrodo baseia-se numa corrente alternada. Normalmente, a perturbação é aplicada no potencial e é medida a corrente resultante. Esta pequena perturbação traz vantagens porque permite descrever fenómenos que ocorrem na aplicação da EIS através de equações matemáticas, que são normalmente lineares. A vantagem deste método é que é perturbado próximo do equilíbrio, enquanto nos métodos anteriores o sistema é perturbado longe do equilíbrio. A palavra impedância (Z) refere-se à resistência obtida através dos métodos de corrente alternada. A medição da impedância permite analisar um processo de eletrodo no que diz respeito às contribuições de difusão, da cinética, da dupla camada, de reações homogêneas acopladas, entre outros. Esta medição possibilita a quantificação da resistência ou capacitância do eletrólito no eletrodo de trabalho. A Impedância é o fator de proporcionalidade entre o Potencial e a Corrente ao longo do tempo e é medida em Ohm.[55] A

Figura 1.2 mostra um esquema representativo da impedância na forma exponencial e no plano complexo para a reação de eletrodo.

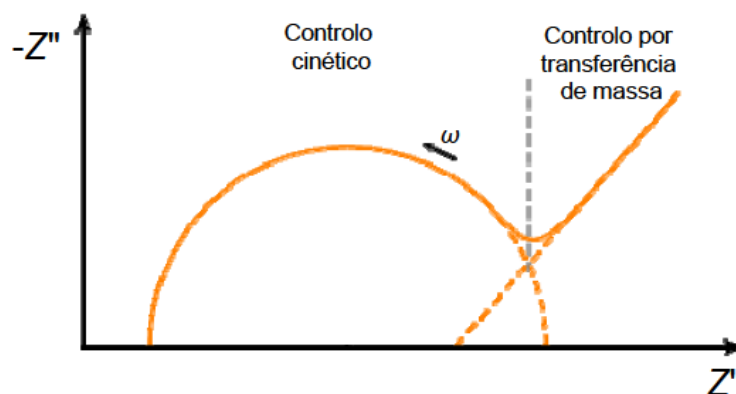


Figura 1.2 Representação esquemática da impedância na forma exponencial e no plano complexo para a reação de eletrodo. Adaptado da Ref.[55]

1.4 Biossensores

Os biossensores são uma alternativa promissora aos métodos convencionais, fornecendo resultados mais rápidos com uma leitura direta e sem a necessidade de transportar as amostras para um laboratório.

Um biossensor é um dispositivo analítico utilizado para a detecção de um analito. Este dispositivo combina uma substância biológica, o elemento sensor, com um detetor físico-químico, o transdutor. O elemento sensor que pode ser uma proteína, uma enzima, um anticorpo, um ácido nucleico ou um outro componente biológico ou derivado biomimético que interaja quimicamente com o analito em estudo, emitindo um sinal analítico (Figura 1.3). O tipo de transdutor classifica o biossensor.[57-59]

O sinal analítico pode ser medido recorrendo a métodos óticos (colorimétricos, fluorescência, luminescência e interferométricos, calorimétricos, magnéticos e eletroquímicos (potenciometria, amperometria, condutimetria/capacitiva e impedimétricos), calorimétrico diferencial de massa (piezoelétrico/ondas acústicas) ou magnéticos.[58, 60]

A construção do biossensor depende da sua aplicação e de vários aspetos analíticos pertinentes como sensibilidade, características da amostra, custo, tempo de vida útil e uso específico. Geralmente, o elemento mais importante do biossensor é o elemento de reconhecimento, uma vez que este determina o grau de seletividade ou especificidade do dispositivo. A gama de concentrações de analito para o qual o dispositivo é sensível encontra-se muitas vezes associada ao sistema de transdução utilizado. A seleção do material biológico/químico e do transdutor apropriados é por isso muito relevante aquando do desenvolvimento de um biossensor.

O biossensor é recorrentemente utilizado como um instrumento de análise devido a elevada seletividade, alargada gama de concentrações com resposta sensível, exatidão e precisão, curto tempo de resposta e de recuperação, elevada frequência de amostragem, e estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados.[58]

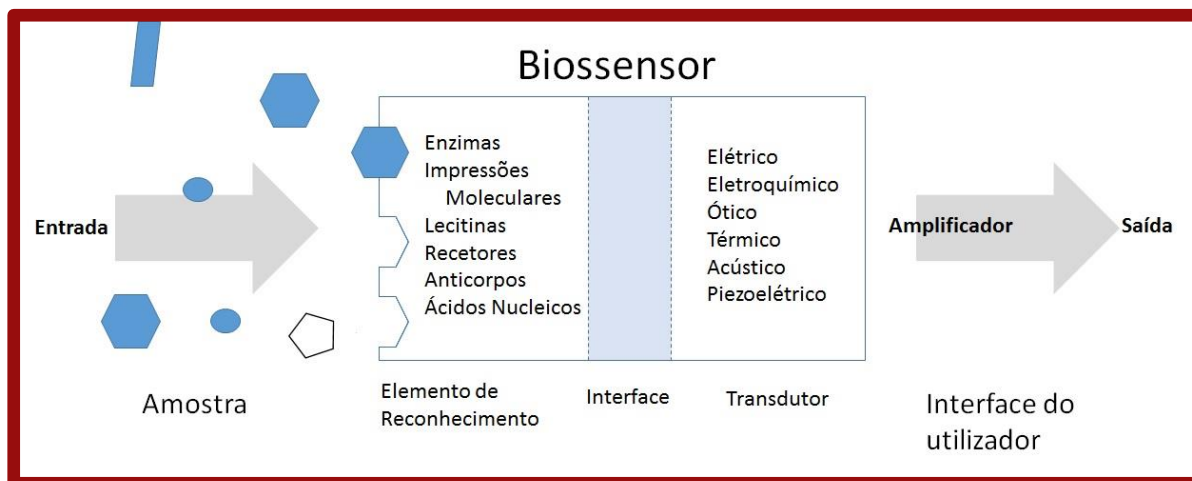


Figura 1.3 Configuração do sistema biossensor. Adaptado da Ref. [59]

1.4.1 Elementos de bioreconhecimento

O elemento de bioreconhecimento é um componente chave dos biossensores pois terá de ser específico para o analito que se pretende determinar. Este elemento pode ser uma enzima, um anticorpo, um aptâmero, um oligonucleótido ou um polímero de impressão molecular. Podendo ser obtido de natural ou sintetizado em laboratório.

➤ Enzimas

Os elementos de reconhecimento baseados em enzimas são bastante atrativos para aplicações de biossensores devido à variedade de reações que se podem medir baseadas nos processos catalíticos que ocorrem, que incluem prótons, elétrons, luminescência e calor.[59] O princípio deste biossensor baseia-se na resposta à adição do substrato e é determinada pela concentração de produto proveniente da reação enzimática que ocorre na superfície do sensor. Essa reação é controlada pelo contributo de dois processos em simultâneo, a conversão enzimática do substrato e a difusão do produto através da camada enzimática (Figura 1.4).[61]

Se existir uma elevada atividade enzimática, o decréscimo da concentração de substrato não é compensada pela transferência da solução resultante devido à limitação da difusão, e por isso, apenas uma fração de centros ativos da enzima participam na interação com o substrato. Neste caso, a sensibilidade da enzima imobilizada para a inativação, seja pelo efeito do calor ou pelo efeito inibidor, é inferior do que a enzima em solução. Determinados compostos

poluentes interferem de modo seletivo inibindo a atividade de algumas enzimas, afetando a concentração do produto final. Esta inibição é particularmente útil e utilizada como ferramenta analítica no fabrico de biossensores.[61]

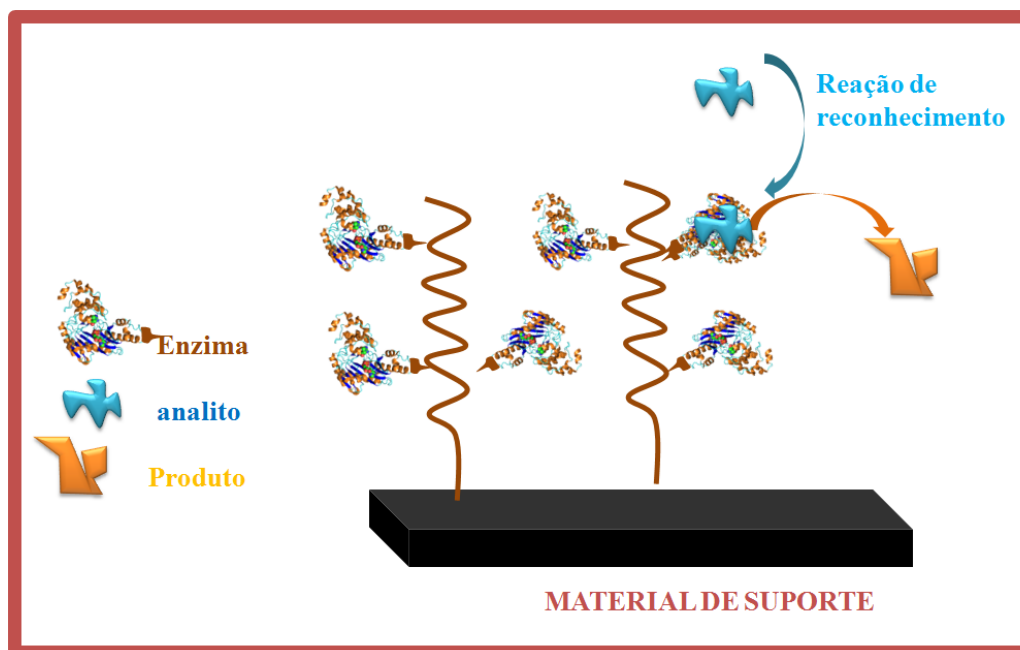


Figura 1.4 Biossensor enzimático

➤ Anticorpos

Quando se utilizam anticorpos como elemento de bioreconhecimento, os biossensores são normalmente designados por imunobiossensores e têm como particularidade a rápida detecção, identificação e quantificação de antígenos.[62]

Devido à sensibilidade e especificidade das ligações antígeno-anticorpo a utilização deste elemento de bioreconhecimento torna-se vantajosa, na medida em que não é necessária a purificação do analito antes da sua detecção.[59], [62]

Na maior parte dos casos, o elemento principal é a qualidade do anticorpo utilizado. Avanços na clonagem de genes de anticorpos e no seu comportamento conduziram ao desenvolvimento de anticorpos combinados com proteínas, fornecendo uma excelente seletividade ao antígeno e reduzindo os custos de produção (Figura 1.5).[62]

Para este tipo de biossensores é necessário ter em atenção as condições de ensaio que podem interferir na ligação do antígeno ao anticorpo, como por exemplo, o pH e a temperatura. [59]

Alguns trabalhos foram descritos na literatura para a detecção de IL-6 com anticorpo como elemento de reconhecimento[50, 63-65]. Deng e seus co- autores descrevem um método eletroquímico em que utilizam nanopartículas de ouro como amplificadores de sinal obtendo-se limites de detecção inferiores a 2 ng/mL.[66] Um outro trabalho recente descreve

um imunossensor desenvolvido na superfície de materiais de carbono modificados com partículas de prata. O sensor demonstrou ser bastante sensível com limite de detecção 0,059 pg/mL.[53]

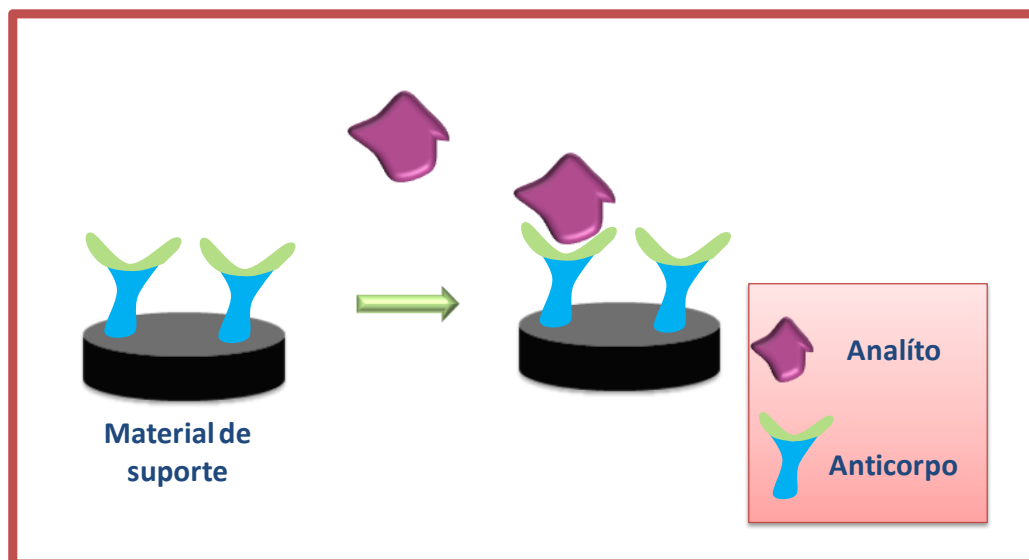


Figura 1.5 Biossensor com anticorpo como elemento de bioreconhecimento.

➤ Aptâmeros

Aptâmeros são moléculas funcionais (oligonucleótidos RNA, DNA) selecionadas *in vitro* que se ligam a moléculas-alvo específicas. Possuem uma elevada especificidade e afinidade para uma diversidade de potenciais alvos, devido à facilidade de estabelecer ligações desde pequenas moléculas, a grandes proteínas ou até mesmo células. Esta é uma das vantagens que apresenta este biossensor quando comparado com os imunobiossensores ou com os enzimáticos (Figura 1.6).[67]

Outra vantagem é a possibilidade de serem sintetizados com elevada reprodutibilidade e pureza, sendo também quimicamente muito estáveis. As propriedades alostéricas traduzem-se em alterações conformacionais após a ligação ao alvo, gerando sinais catalíticos observáveis, concedendo-lhes sensibilidade de detecção e seletividade. A especificidade destes biossensores é tão elevada que uma pequena variação no alvo pode perturbar a ligação.[67] No entanto, estes biossensores são sensíveis ao pH, porque por exemplo em condições ácidas estes depuram.[59]

Não existem na literatura biossensores descritos com aptâmeros como elementos de bioreconhecimento para detecção da IL-6.

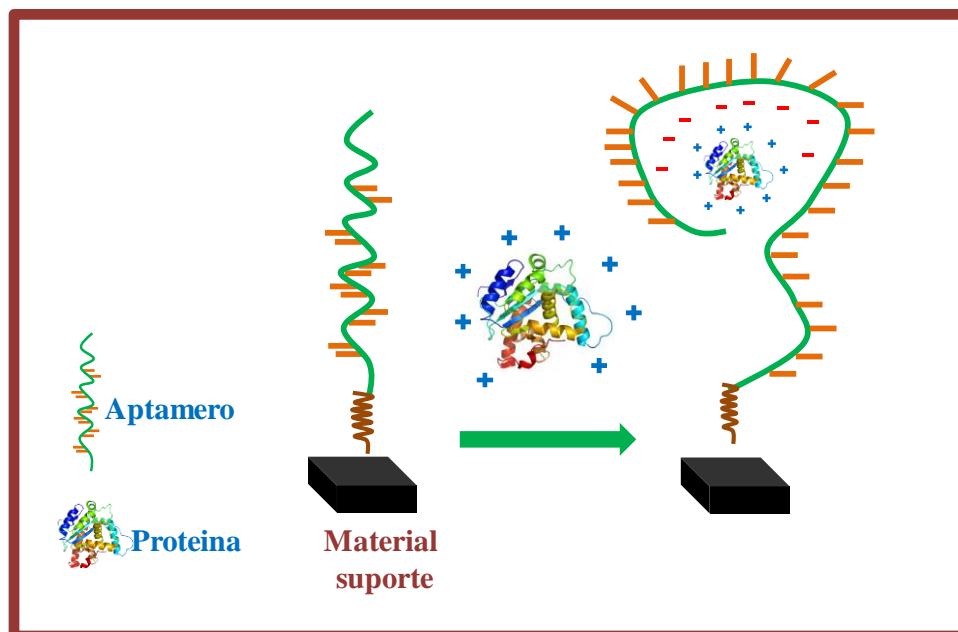


Figura 1.6 Biossensor com aptâmero como elemento de bioreconhecimento.

➤ Ácidos nucleicos

Os elementos de bioreconhecimento à base de ácidos nucleicos são uma alternativa aos aptâmeros. Estes elementos são estruturas sintetizadas análogas ao ADN, ou seja, estruturas biomiméticas com uma ligação de poliamida em vez de um açúcar fosfatado.[59] Funcionam através da hibridação da cadeia simples de ADN fragmentando-a, formando uma cadeia dupla com sequências complementares. Uma das cadeias simples é marcada com um indicador ótico para deteção. Ou seja, os oligonucleotídeos são imobilizados num substrato e utilizados como sondas para reconhecer a sequência alvo, por hibridização, esta ligação irá ser traduzida num sinal captado pelo transdutor, ótico ou eletroquímico.[68-71]

Este tipo de biossensor é muito específico e capaz de detetar mudanças em apenas um nucleótido e apresentando uma elevada sensibilidade.[69] Verifica-se uma maior estabilidade química e enzimática quando comparada aos aptâmeros. E ao contrário desses são bastante estáveis numa gama mais alargada de temperatura e pH.[59]

➤ Polímeros de Impressão Molecular

A Impressão Molecular é um método de preparação seletiva de locais de ligação em polímeros sintéticos utilizando moléculas modelo. Os Polímeros de Impressão Molecular, também designados por MIP's (do inglês, *Molecular Imprinted Polymers*) utilizam um material biomimético que oferece uma grande estabilidade. Nos últimos anos, esta tecnologia tem proliferado porque é um método barato, acessível e apresenta uma estratégia eficaz no que diz respeito ao desenvolvimento de materiais absorventes de elevada especificidade para um determinado substrato selecionado.[59]

Os MIP's têm como base a impressão de locais específicos de reconhecimento numa estrutura rígida tridimensional (um polímero) de forma a facilitar a interação entre a molécula alvo e o seu molde nessa mesma estrutura. Esta estrutura pode ser conseguida quer através da utilização de interações não covalentes tais como, ligações de hidrogénio, interações iónicas, etc. (impressão não covalente) como através de interações covalentes reversíveis (impressão covalente) entre o molde e o monómero funcional. Os complexos formados são incorporados por polimerização numa matriz macro porosa e reticulada. Durante este processo de polimerização são adicionadas moléculas molde idênticas ou semelhantes, em tamanho e funcionalidade, à molécula alvo. Após a remoção dessas moléculas surgem cavidades estáveis com as funcionalidades, forma e dimensão da molécula molde original. São essas cavidades que fazem a captura do analito de interesse na amostra, mesmo que em quantidades reduzidas, caracterizando-se pela elevada especificidade para o alvo. As metodologias disponíveis para a impressão molecular são robustas e flexíveis e a impressão pode ser feita recorrendo a uma grande variedade de moléculas, com a confiança de que os polímeros resultantes terão uma elevada afinidade e seletividade para o molde (Figura 1.7). [72-75]

A deteção da concentração do analito em estudo, utilizando MIP's, pode ser feita por métodos eletroquímicos, piezoelétricos, impedância e óticos, sendo dos métodos eletroquímicos o mais usual, através da amperometria.[73, 74, 76, 77]

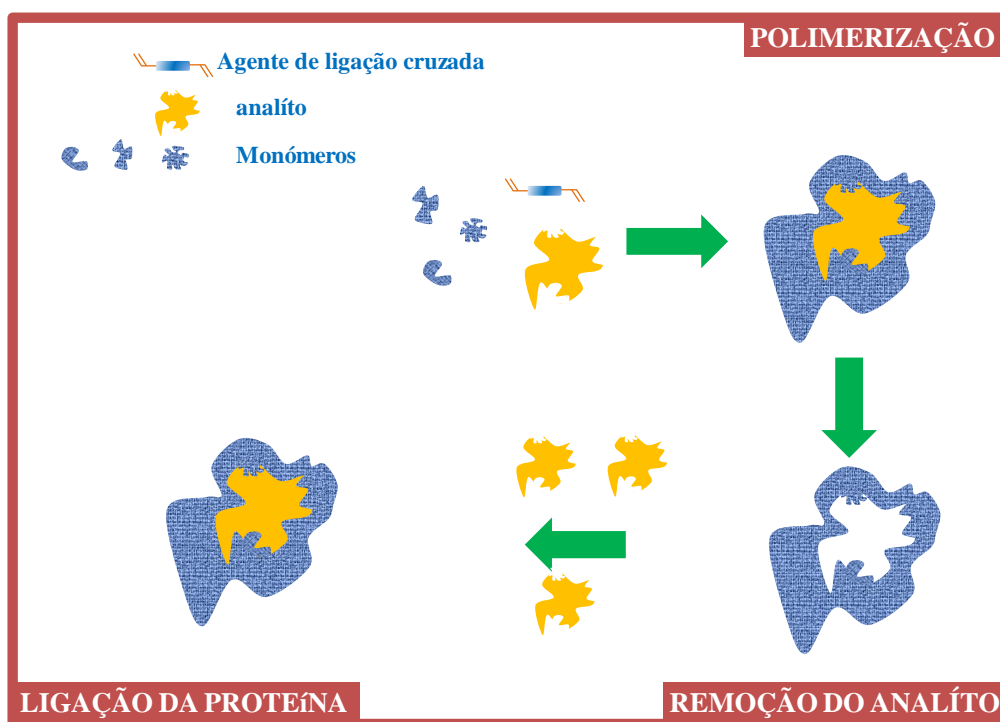


Figura 1.7 Processo de formação do polímero de impressão molecular.

Síntese do MIP

A impressão molecular de proteínas é considerada uma área promissora que recebe muita atenção, devido às dificuldades inerentes à impressão de compostos biológicos, tornando-se assim num grande desafio.[78] A principal razão de tal complexidade deve-se ao facto de se tratar de compostos solúveis em água, de estrutura frágil e flexível e a sua conformação se alterar facilmente devido à temperatura, pH e/ou natureza do solvente em que se encontra e ainda, também pelo facto de apresentarem vários grupos funcionais onde é possível fazer a ligação com os monómeros.[78, 79] Neste sentido, para que a impressão molecular de proteínas tenha sucesso é essencial que, para a síntese do MIP, se utilizem moléculas com afinidade elevada para a proteína alvo.[80]

Nos MIP's para proteínas pode-se considerar a impressão de toda a proteína ou de apenas parte dela recorrendo-se para isso à abordagem convencional de impressão em *Bulk* ou a técnicas mais sofisticadas de impressão em superfície.

Polimerização em Bulk

A polimerização em *Bulk* é a mais utilizada no que toca à produção de MIP's. Esta técnica de polimerização tem a vantagem de permitir obter grandes quantidades de material sensor. Na polimerização em *Bulk* os monómeros funcionais interagem com a molécula que é usada como molde (analito). A posição e composição adequada dos grupos funcionais permitem a sua confluência para a molécula molde de uma forma recíproca.

Caracteristicamente, a reação de polimerização é iniciada na presença de um solvente inerte e um iniciador de radical livre ou iónico. Na maioria dos casos, a remoção do molde é feita por extração (solventes orgânicos, ácida, básica ou proteolítica) ou por hidrólise, deixando locais complementares em tamanho e forma do analito. O polímero resultante é, então, pulverizado e peneirado, de modo a produzir partículas de recetores impressos de tamanho apropriado.[81, 82]

Esta técnica é simples, no entanto apresenta desvantagens relativamente ao controle do tamanho das partículas produzidas, muitas vezes com tamanhos e formas irregulares. Outras desvantagens são que alguns locais de ligação são destruídos a quando a moagem o que reduz o material obtido e apresenta características de transferência de massa reduzidas e possibilidade de imobilização permanente da molécula molde no polímero e de baixa integridade da estrutura polimérica resultante. Uma outra limitação é a escolha do solvente, por vezes é restrita, no caso das proteínas não poderão ser usados solventes orgânicos pois desnaturam a sua conformação.[83] Para colmatar algumas destas lacunas, surge a impressão molecular em superfície.

Polimerização em superfície

A polimerização em superfície é maioritariamente utilizada para a impressão molecular com proteínas pois apresenta uma elevada percentagem de eficiência na reocupação dos locais de ligação do analito tornando-se adequada para fins analíticos.[84]

A principal característica nesta técnica é dos locais de ligação da molécula molde ficarem na superfície de uma estrutura rígida de suporte. Nesta técnica o analito deverá ligar-se de forma covalente ou não, a um substrato plano ou esférico, de resto o processo de polimerização é semelhante à polimerização em *Bulk*.[85]

Este tipo de polimerização apresenta inúmeras vantagens relativamente à impressão em *Bulk*, como uma maior ocupação dos locais impressos, maior seletividade e sensibilidade assim simplicidade de preparação, alta reprodutibilidade e rápida transferência de massa. Adicionalmente, a vantagem de serem necessárias menos moléculas molde o que torna este tipo de MIP mais rentável e económico. A impressão em superfície é a mais utilizada na produção de materiais sensores plásticos.[82]

1.4.2 Transdutor

Um elemento de reconhecimento molecular pode ser interligado a um número diferente de transdutores de sinal. O transdutor converte o sinal molecular num sinal elétrico ou digital, que pode ser quantificada, exibido e analisados. O transdutor de um biossensor deve permitir a adaptação do elemento de reconhecimento, oferecer especificidade para a monitorização da propriedade medida e apresentar grande sensibilidade para a variação em curso na gama de concentração de interesse.

Os transdutores dividem-se em quatro categorias gerais: eletroquímicos (amperimétricos, impedimétricos e potenciométricos), óticos (colorimétricos, fluorescentes, luminescentes e interferometria), com base em massa (piezoelétricos e de ondas acústicas), e com base em temperatura (calorimetria). De uma forma geral, os mais utilizados no contexto da saúde são os eletroquímicos, dos quais o ícone máximo é o sistema de monitorização de glucose em pessoas com diabetes. Os conceitos gerais sobre as técnicas associadas foram já referidos na secção 1.3.4.

1.4.3 Plataformas sensoras

O *design* de um sensor eletroquímico é concebido no campo da eletroquímica no sentido de aumentar a eficiência analítica em termos de sensibilidade, seletividade, fiabilidade, baixo custo e de fácil utilização e fabrico. O aparecimento da tecnologia de *screen-printing* tem proporcionado novas oportunidades de aplicação de técnicas eletroquímicas para análises fora de um laboratório especificado. Na generalidade, elétrodos *screen-printed* (SPEs) são

feitos em substratos de plástico, cerâmica ou papel onde os elétrodos de trabalho, o contador e o eletrodo de referência são impressos. Estão comercialmente disponíveis e apresentam uma grande versatilidade, pois podem ser produzidos consoante a aplicação. Os SPEs podem ser ligados a um potenciômetro portátil e podem ser operados em modo estático (*drop sensor*), hidrodinâmico (célula eletroquímica) ou em sistemas de fluxo.[62]

Pode-se ainda melhorar as propriedades de biossensores de impressão molecular, combinando materiais funcionais. Para este efeito, vários materiais podem ser incorporados na impressão molecular, como por exemplo, polímeros de resposta-estímulo; derivados sol-gel, metais, sílica, nano partículas à base de carbono, *quantum dots* e óxidos metálicos.[86] Como material condutor utilizado no fabrico destes sensores pode-se encontrar desde a platina, ouro, a prata ou até mesmo o carbono, sendo a prata metálica e o ouro os mais recorridos devido às suas propriedades eletrónicas e comportamento na emissão de luz.[73, 86]

Os SPEs oferecem, por isso, uma série de vantagens relativamente aos elétrodos convencionais (ouro, carbono vítreo, prata, etc.) tais como a possibilidade de serem minúsculos, de baixo custo, de ser possível de produzir em massa, serem portáteis e descartáveis.[62, 86] Dentro deste contexto, os SPE's são de grande utilidade devido principalmente à sua versatilidade permitindo uma análise rápida, barata, simples de manipular e confiáveis.

1.5 Objetivos gerais e estrutura da dissertação

O principal objetivo desta dissertação foi desenvolver uma plataforma sensora autónoma de baixo custo, baseada em materiais biomiméticos, C-SPE, para o rastreio do biomarcador da resposta inflamatória, a proteína IL-6, uma vez que o início da doença/progressão de Alzheimer tem sido correlacionado com condições de neuro-inflamação.

No eletrodo de trabalho desta plataforma sensora foi impresso uma mistura reacional para o desenvolvimento do polímero de impressão molecular (em *bulk*). Esta mistura consiste no analito (IL-6), no monómero (Pirrol), no agente de ligação cruzada e no iniciador radical. A modificação da superfície do eletrodo ocorreu por polimerização eletroquímica, formando um polímero condutor na sua matriz. As técnicas eletroquímicas utilizadas para monitorização do processo foi o CV, SWV e a EIS. Foram estudados vários parâmetros para a eletropolimerização e efetuado ainda o estudo da estabilidade do MIP. Após isso, foi então efetuada uma curva de calibração para se identificar o declive e limite inferior de deteção da proteína IL-6, neste biossensor.

2 Descrição Experimental

Neste capítulo são descritos de modo detalhado os materiais e os equipamentos utilizados, bem como o procedimento experimental em que foi baseado o desenvolvimento deste biossensor eletroquímico sensível à proteína IL-6.

2.1 Materiais

2.1.1 Equipamento

Como equipamento principal foi utilizado um potenciostato/galvanostato da Metrohm Autolab (Figura 2.1), controlado pelo Software Nova 1.11. Os C-SPEs conectam-se a uma caixa conectora da DropSens (DRP-DSC) permitindo a interface com o equipamento Autolab.



Figura 2.1 Potenciostato /galvanostato PGSTAT302N

Foi utilizada a técnica de espectroscopia Raman para análise da estrutura do material e da superfície dos C-SPEs sendo o equipamento usado o Raman *Thermo Scientific* (DXR 532nm *filter* Figura 2.2). Para obtenção das imagens espectrais foi configurado o *Potential* em 5mW, a *Aperture* em 50 μ m slit, o *Photo-Bleach* em 5.0 min e selecionado *Common Scale*.



Figura 2.2 Thermo Scientific DXR Raman microscope 532nm Filter

As soluções foram preparadas em balões volumétricos classe A, de capacidades de 50mL e 100mL.

Para a medição de volumes até 5mL foram usadas pipetas automáticas VWR de volume regulável (2-20µL, 20-200 µL, 100-1000 µL e de 1000-5000 µL).

As pesagens foram efetuadas numa balança Mettler Toledo, modelo MS105DU com uma precisão de ± 0,0001g.

2.1.2 Reagentes e Materiais

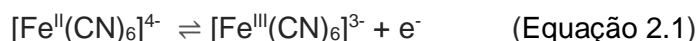
A lista de materiais e reagentes utilizados encontra-se listada na Tabela 2.1. Os reagentes foram utilizados conforme disponíveis no mercado, de qualidade analítica e sem qualquer purificação adicional.

Tabela 2.1: Lista de materiais e reagentes utilizados e sua origem

| Reagentes/Materiais | Origem |
|--|----------------|
| Ácido Oxálico di-hidratado (C ₂ H ₂ O ₄ ·2H ₂ O) | Merck |
| Ácido pirrol-2-carboxílico (C ₅ H ₅ NO ₂) – Py-COOH | Alfa Aesar |
| Cloreto de potássio (KCl) | Merck |
| Soro (Fetal Bovine Serum) | Fluka |
| Hexacianoferrato (II) de potássio (K ₄ [Fe(CN) ₆]), | Riedel-de Haën |
| Hexacianoferrato (III) de potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆]), | Riedel-de Haën |
| IL-6 Human, recombinant animal component free | Sigma Aldrich |
| Pirrol (C ₄ H ₅ N) - Py | TCI |
| Tampão Fosfato-Salino - PBS (Phosphate Buffered Saline) | Amresco |
| Acetonitrilo (CH ₃ CN) | Carlo Erba |
| Etanol (C ₂ H ₅ OH) | Carlo Erba |
| Screen-printed Carbon Electrodes (C-SPE) | Dropsens |

2.1.3 Soluções

De uma forma geral, as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura, purificada através do sistema Milli-Q. Os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando a solução padrão redox de ferro, constituída por K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆].3H₂O, 5,0×10⁻³M, preparada num eletrólito de suporte de KCl, a 0,1M. A equação redox envolvida encontra-se identificada na Equação 2.1.



A solução de Ácido Oxálico di-hidratado foi preparada numa concentração igual a 0,1M, em água desionizada. As soluções de Py-COOH e Py foram preparadas em PBS (pH=6). A concentração da solução de Py foi preparada numa concentração igual a $1,0 \times 10^{-2}$ M e a solução de PyCOOH foi igual a 20 μ g/mL. A proteína IL-6 foi diluída e usou-se a concentração de 2 μ g/mL em PBS (pH=6).

2.2 Procedimentos analíticos

As leituras CV, SWV e EIS foram efetuadas em triplicado, com a solução padrão redox ($K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, em KCl), cujos picos de oxidação e redução ocorrem aproximadamente a 0,2V. Os registos de CV foram obtidos de -0.4 a +0.7V, com 6 ciclos; 50 mV/s. Os registos de SWV foram obtidos de -0.2 a +0.6 V, para um impulso de 0,005 V, numa amplitude de 0,02 V e uma frequência de 1 Hz. Os registos de EIS foram obtidos para um OCP a 120s (tempo máximo), ao longo de uma gama de 0,1 a 100 KHz, para 50 valores de frequência e uma amplitude de 0,01V.

2.2.1 Preparação do C-SPE

Os chips de C-SPE (Figura 2.2) foram adquiridos à DropSens e apresentam as seguintes características: Substrato em cerâmica, 33 \times 10 \times 0.5 mm; Contactos Elétricos: Prata; elétrodo de trabalho de Carbono (4mm de diâmetro); elétrodo Auxiliar de Carbono; e elétrodo de referência de prata.



Figura 2.3 Screen-Printed Carbon Electrodes (DropSens)

Estes C-SPEs foram sujeitos a um pré-tratamento eletroquímico, sendo o objetivo deste procedimento a remoção de possíveis contaminantes que estejam na superfície do elétrodo e fomentar o aparecimento de grupos funcionais. [85] Assim, efetuou-se uma limpeza eletroquímica por Cronoamperometria a -1,7V durante 200s, utilizando a solução de KCl 0,1M.

Para verificar o estado inicial do SPE foram efetuadas leituras do CV, SWV e EIS, com a solução padrão redox. O volume utilizado desta solução, em cada ensaio, foi sempre de 70 μ L.

2.2.2 Estudo das condições de trabalho do NIP

Pretendeu-se efetuar a síntese de um NIP e de um MIP, para se avaliar o efeito da presença do polímero no C-SPE sem a presença da proteína IL-6, o antígeno (NIP) e avaliar o mesmo efeito após a adição da proteína IL-6 no C-SPE (MIP), comparando-se em seguida as diferenças. A representação esquemática da síntese do MIP pode ser observada na Figura 2.4.

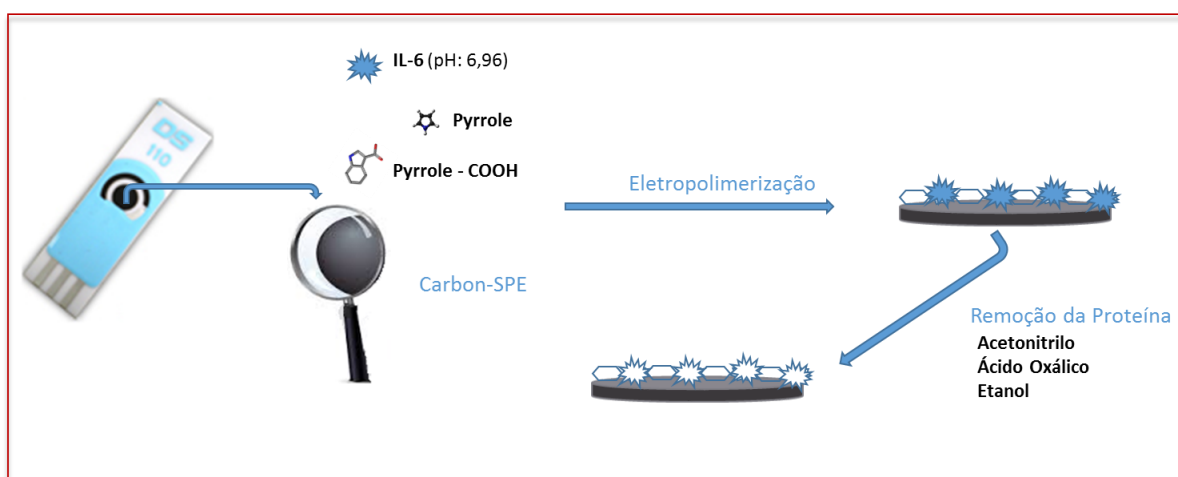


Figura 2.4 Representação esquemática da síntese do MIP

Para avaliar o efeito da adição da proteína foi necessário garantir que as condições de trabalho, no NIP, fossem estáveis durante a eletropolimerização por CV do monómero Py. Antes de se efetuar a eletropolimerização colocou-se 10 μL de solução de Py-COOH (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS pH6) no eletrodo de trabalho e deixou-se a incubar durante 30 min, no fim, lavou-se com a solução tampão de PBS. Aplicou-se em seguida uma gota de 70 μL da solução de Py (1×10^{-2} M preparada em PBS pH6) deixou-se incubar por 5min e efetuou-se a eletropolimerização.

A polimerização eletroquímica foi o método utilizado na formação do polímero condutor, para a modificação da superfície do eletrodo. A vantagem do uso deste polímero é que as suas propriedades (área superficial, porosidade e condutividade) podem ser controladas e funcionalizadas pelas condições experimentais. Assim, de modo a garantir a estabilidade química da eletropolimerização efetuou-se um estudo dos parâmetros: Potencial de Oxidação do Pirrol, Gama de Potencial de trabalho, Número de Ciclos de eletropolimerização, Velocidade de Varrimento, Efeito do Solvente no polímero e a Concentração de Py na polimerização, que são abordados em seguida.

Estudo do Potencial de Oxidação do Monómero - Pirrol

Fez-se o estudo do potencial de oxidação do monómero de forma a se proceder à identificação do potencial que é necessário fornecer aos elétrodos para que a oxidação do Py ocorra na superfície do eletrodo de trabalho. Para tal, utilizou-se a técnica CV para a sua determinação, aplicando uma gama de potencial entre $-0,8V$ a $+1,6V$.

Estudo da Gama de Potencial de Trabalho

Mediante o valor obtido no ponto anterior, foi-se verificar qual a gama de potencial em que o polímero formado é mais estável e para tal utilizou-se as três técnicas já descritas: CV, SWV e EIS. Fixando-se a velocidade de varrimento em $0,05 V/s$ e o número de ciclos de eletropolimerização em 10. A gama de potenciais estudados foram de $[-0,8V$ a $0,65V]$, $[-0,8V$ a $0,8V]$ e $[-0,8V$ a $1,1V]$.

Estudo do Número de Ciclos de Eletropolimerização

Efetou-se um estudo do número de ciclos de eletropolimerização para verificar o número a partir do qual há estabilidade do polímero. Neste caso, fixou-se a velocidade de varrimento em $0,05V/s$ e usou-se a gama de Potencial determinada no ponto anterior. O número de ciclos estudados foram de 5, 10 e 20 ciclos.

Estudo da Velocidade de Varrimento

Para verificar qual a velocidade de varrimento em que o polímero formado é mais estável. Fixou-se o número de ciclos e a gama de potencial de trabalho obtidos nos pontos anteriores e variou-se a velocidade de varrimento em $0,025V/s$, $0,050 V/s$ e $0,100 V/s$.

Estudo do efeito do Solvente no Polímero

Para a remoção da proteína o solvente utilizado é de extrema importância, pois este não pode interferir com o polímero, mas apenas deve remover a proteína formando-se as cavidades características.

Assim, após a eletropolimerização nos parâmetros definidos anteriormente, colocou-se uma gota de $10 \mu L$ de solvente na superfície de trabalho do C-SPE e deixou-se atuar durante 3h. Lavou-se com PBS e colocou-se $70\mu L$ de PBS pH7 a incubar por 30min, para estabilização do pH. Por fim, a leitura do CV, SWV e EIS com a solução padrão redox e verificou-se a existência de alterações.

Os solventes testados foram o Acetonitrilo, o Etanol e o Ácido Oxálico.

Para o Acetonitrilo, testou-se ainda o seu efeito através de limpeza por CV com os seguintes parâmetros: $[-0.3V$ a $+1V]$, 10 ciclos e $0,050V/s$.

Na fase da eletropolimerização verificou-se novamente o número de ciclos que permitem leituras de menor resistência e melhor estabilização, este estudo foi repetido para 5 ciclos e 10 ciclos. O NIP foi utilizado como sendo o “Branco” no efeito de impressão molecular.

Estudo da concentração de Pirrol a usar na polimerização

Estudou-se o efeito da concentração de Pirrol na polimerização. Para tal, testou-se a polimerização com várias concentrações de Pirrol, iguais a $1,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-4}$; e $1,0 \times 10^{-5}$ M.

2.2.3 Preparação do MIP

A impressão molecular foi efetuada por eletropolimerização do monómero Pirrol, usando proteína IL-6 como antígeno, pelo método de CV. Para a síntese do MIP foram utilizados dois métodos diferentes de impressão da Proteína IL-6. Impressão na superfície do C-SPE (2-D) e impressão da proteína em solução, *Bulk* (3-D).

Impressão na Superfície (2-D)

O C-SPE foi inicialmente pré-tratado, conforme descrito no ponto 2.2.1. Posteriormente, incubou-se 10 μ L de IL-6 na área de trabalho do C-SPE durante 2h, um tempo espectável para uma adsorção significativa da proteína na superfície do eletrodo. Em seguida, lavou-se a superfície com PBS para remover as moléculas não adsorvidas e fez-se a incubação de 10 μ L do Py-COOH. Efetuou-se novamente a lavagem com PBS e fez-se a incubação de 70 μ L do Py por mais 5min, antes de se iniciar a eletropolimerização. No final da eletropolimerização, lavou-se novamente com PBS.

Para garantir a limpeza da superfície removendo quaisquer monómeros soltos e de forma ter-se o polímero mais estável, efetuou-se ainda uma limpeza com 70 μ L de PBS, usando a técnica de CV com os seguintes parâmetros: [-0.3V a +0.3 V], 10 ciclos a uma velocidade de varrimento de 0,05V/s.

Por fim, efetuou-se a leitura da solução padrão redox de ferro através de CV, SWV e EIS. Em seguida, efetuou-se a remoção da proteína, incubando 10 μ L do solvente escolhido por 3h. Antes de fazer a leitura final com a solução padrão redox, efetuou-se uma limpeza com 10 μ L de solução de PBS (pH=7) e incubou-se por mais 30min, de forma a ajustar o pH.

Impressão por polimerização em Bulk (3-D)

Preparou-se o C-SPE conforme descrito no ponto 2.2.1. Preparou-se uma solução com 10 μ L IL-6, 45 μ L Py a 1×10^{-2} M e 45 μ L de Py-COOH a 20 μ L/mL. E deixou-se repousar por

30min. Em seguida fez-se a incubação de 70 μ L desta solução por 5min no C-SPE e efetuou-se a eletropolimerização. Depois, efetuou-se uma limpeza com 70 μ L de PBS, usando a técnica de CV com os seguintes parâmetros: [-0.3V a +0.3 V], 10 ciclos a uma velocidade de varrimento de 0,05V/s.

E por fim, a leitura do CV, SWV e EIS com a solução padrão redox. Em seguida, efetuou-se a remoção da proteína, incubando 10 μ L do solvente escolhido por 3h. Antes de fazer a leitura final com a solução padrão redox, efetuou-se uma limpeza com 10 μ L de solução de PBS (pH=7) e colocou-se a incubar por mais 30min, de forma a ajustar o pH.

2.2.4 Parâmetros analíticos - Limite de detecção IL-6

Depois da construção do MIP verificou-se a capacidade do mesmo adsorver de novo a Proteína IL-6 nas cavidades geradas após a sua remoção. Para tal utilizou-se como método de cálculo as curvas de calibração, que expressam a relação entre o sinal medido e a concentração do analito. Para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta foi necessário recorrer a um determinado suficiente de padrões (5 a 8 padrões, sem incluir o branco, ou seja, o zero), procurando abranger todas as gamas das concentrações esperadas.[21]

Assim os ensaios foram conduzidos adicionando soluções padrão de IL-6 numa gama entre 0,02pg/mL a 2,0 μ g/mL, preparados numa solução tampão de PBS (pH=6). Entre cada leitura de CV, SWV e EIS com a solução padrão redox, foi colocado um volume de 10 μ L de solução padrão de IL-6 a incubar por 15min, lavando-se posteriormente com PBS.

Estes ensaios foram repetidos preparando-se soluções padrão de IL-6 em soro sintético (Fetal Bovine Serum) na mesma gama de concentrações (sem diluição), de forma a poder-se estudar o comportamento do biossensor numa situação real. Assim, as curvas de calibração para a IL-6 foram realizadas pelos métodos de SWV e EIS, entre 0,02 pg/mL e 2,0 μ g/mL, em solução de PBS pH 6. O valor de concentração escolhido teve em consideração o nível fisiológico da IL-6: num indivíduo saudável rondará os 1,6 pg/mL e num indivíduo com neuro-inflamação os 2,3 pg/mL.

2.2.5 Análise Qualitativa dos Materiais

A técnica de espectroscopia Raman foi utilizada para análise da estrutura química do material e da superfície dos C-SPEs, do NIP e do MIP. O equipamento usado foi o Raman *Thermo Scientific* (DXR 532nm *filter*) com microscópio confocal. Para obtenção das imagens

espectrais foram configurados os seguintes parâmetros: *Potential*: 5Mw; *Aperture*: 50 μm slit; *Photo-Bleach*: 5.0 min e *Common Scale*.

Todas as análises foram conduzidas diretamente sobre os C-SPEs sem qualquer pré-tratamento.

3 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os dados obtidos relativos ao desenvolvimento do biossensor para detecção da proteína IL-6: A preparação dos elétrodos de trabalho, o estudo das condições ótimas de funcionamento, o estudo da seletividade e a aplicação em amostras de soro sintético. Apresenta-se ainda a análise à superfície dos materiais sensores.

3.1 Caracterização dos C-SPEs

Nesta análise pretendeu-se verificar qual o comportamento do elétrodo de trabalho limpo, identificando os picos de oxidação e de redução na técnica de CV, o pico obtido na SWV e a impedância obtida na EIS, para a solução padrão Redox. Estas leituras permitiram identificar os valores de referência de modo a se poder efetuar o estudo comparativo das modificações efetuadas nos passos seguintes.

3.1.1 Preparação do C-SPE

Após limpeza eletroquímica por Cronoamperometria a $-1.7V$ durante 200s, utilizando a solução de KCl 0,1M, efetuaram-se leituras do CV, SWV e EIS, com a solução padrão Redox. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 3.1.

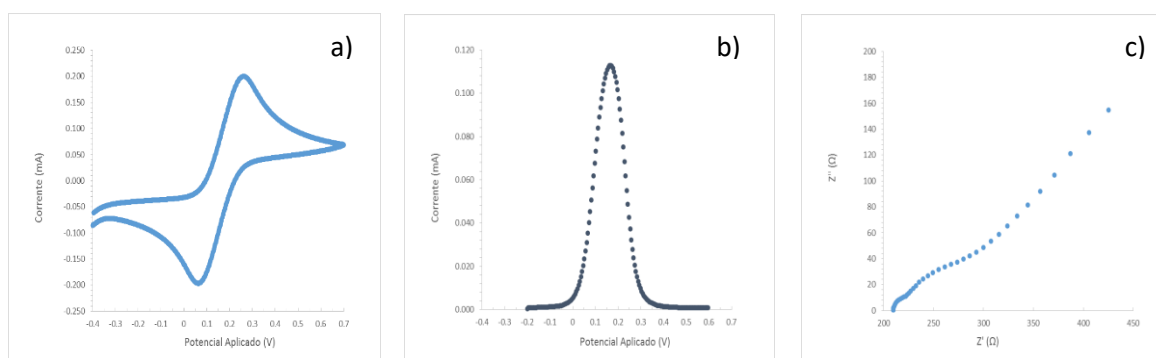


Figura 3.1 Leituras da solução padrão redox no C-SPE inicial (sem modificações): CV (a), SWV(b) e EIS(c).

Da interpretação dos resultados obtidos na Figura 3.1a, os picos de oxidação e redução da solução padrão redox neste elétrodo de trabalho (C-SPE) aparecem com uma corrente igual a, respetivamente, $-0,2$ e $+0,2mA$ e a um valor de potencial igual a, respetivamente, 60 e $250mV$. Do ponto da corrente produzida, o sistema comporta-se de forma reversível, uma vez que as correntes dos picos de oxidação e de redução apresentam valores muito

semelhantes. Relativamente ao potencial de pico, o valor esperado seria igual a 59mV, uma vez que a reação de eletrodo envolve apenas um eletrão. Sendo assim, o sistema apresentado detém um comportamento *quasi-reversível*, uma vez que a separação de picos correspondeu a 190mV. Do ponto de vista de SWV, Figura 3.1b, o pico obtido foi semelhante ao esperado, com um valor de corrente igual a 0,113mA (SWV).

Em EIS, Figura 3.1c o registo indicou duas ligeiras variações de impedância que induzem a presença de resistência à transferência de carga em dois pontos distintos de frequência. Estes valores foram, porém, indefinidos do ponto de vista métrico, uma vez que não foi possível estabelecer uma medida para estes, nem identificar um circuito que se adaptasse ao sistema.

3.2 Condições de polimerização

O objetivo nesta fase foi efetuar a síntese de um NIP e avaliar o efeito da presença do polímero formado pelo Pirrol, no C-SPE e sem a presença da proteína IL-6. Pretendeu-se que as condições fossem estáveis de modo a poderem ser controladas e monitorizadas nos processos seguintes, após a adição da proteína.

3.2.1 Potencial de Oxidação do Pirrol

A primeira fase de estudo de polimerização requer a identificação do potencial que é necessário fornecer aos eletrodos para que a oxidação do Py ocorra na superfície do eletrodo de trabalho. Por outro lado, a técnica de eletropolimerização escolhida para este trabalho foi o CV, uma vez que surgem vários trabalhos na literatura que recorrem a esta técnica, até para outros monómeros eletropolimerizáveis.

Os resultados obtidos podem ser observados na

Figura 3.2. O registo de CV indicou que a máxima oxidação de Py acontece a um potencial de 0,98V, iniciando o processo de oxidação a 0,58V e terminando a 1,37V. Face ao exposto, foram estabelecidos posteriormente vários intervalos de polimerização, nos quais se incluíram sempre valores de potencial passíveis de promoverem a oxidação do Py.

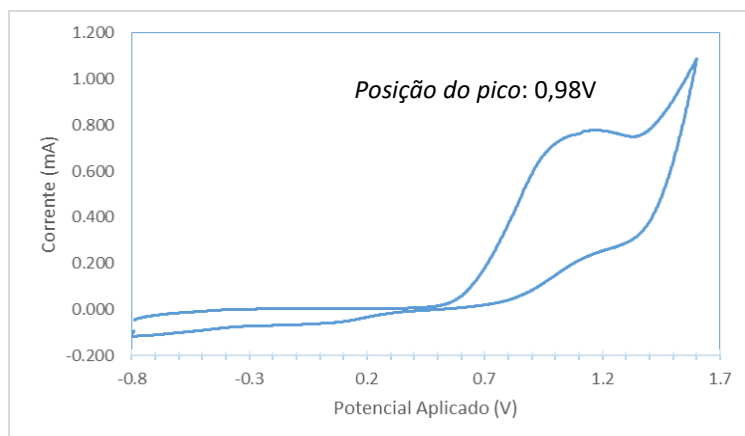


Figura 3.2 Estudo do potencial de oxidação do Pirrol.

3.2.1 Gama de Potencial de Trabalho

Pretendeu-se verificar qual a gama de potencial em que o polímero é mais estável, utilizando as técnicas de CV, SWV e EIS. Para tal, fixou-se a velocidade de varrimento em 0,05V/s, 10 ciclos e a gama de potenciais estudados foi entre [-0,8V a +0.65V], [-0,8V a +0,8V] e [-0,8V a +1.1V]. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Gama de Potencial: [-0,8V a +0.65V]

Na Figura 3.3 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização numa gama de potencial [-0,8V a +0.65V]. Para obtenção destes resultados foram necessárias 6 leituras, estão representadas as ultimas 3 aquando da estabilização.

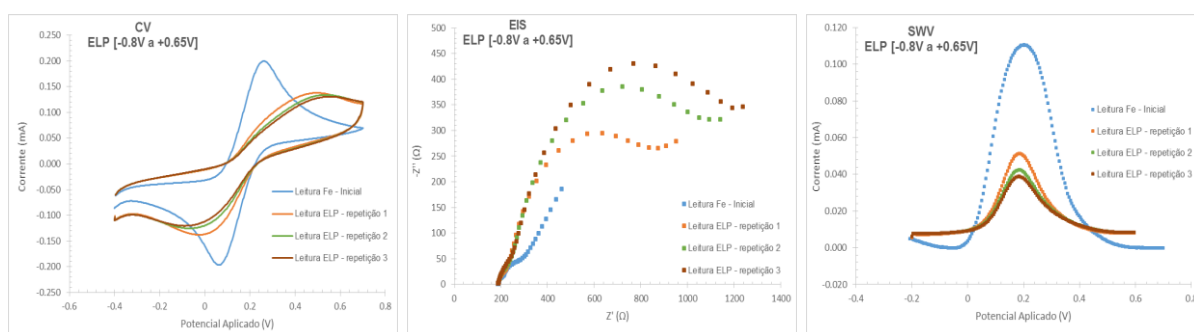


Figura 3.3 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização numa gama de potencial de estudo [-0,8V a +0.65V].

Verifica-se que após a eletropolimerização os picos de oxidação/redução diminuem, na CV, passando dos valores de leitura inicial (antes da polimerização) de -0,2 e +0,2mA e com

um valor de potencial igual a, respetivamente, 60mV e 250mV, para $-0,07$ a $+0,05$ mA, com o respetivo valor de potencial de 0,01V e 0,45V. Os resultados de EIS também vêm confirmar a presença do polímero na superfície do eletrodo uma vez que ocorre um acréscimo da resistência de transferência de eletrões, passando de um valor de $162,40\Omega$ para um máximo de $1,11\text{K}\Omega$. Na SWV a altura do pico diminuiu de 1,14 para 0,03mA, e esta diminuição da corrente indica também a presença do polímero, pois houve uma redução da corrente elétrica na superfície transdutora. Esta variação de valores (entre o eletrodo inicial e após a polimerização) são expectáveis pois indicam a presença da formação do polímero.

No entanto, não se conseguiu obter estabilidade na formação do polímero como se observa na Figura 3.3, em EIS, por exemplo. Ao se observar as 3 leituras efetuadas no NIP, verifica-se que a resistência após a formação do polímero tem uma variação de cerca de 18% (varia entre 765Ω e $1,11\text{K}\Omega$).

Gama de Potencial: [-0,8V a +0,8V]

Na Figura 3.4 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão Redox após se efetuar a eletropolimerização numa gama de potencial $[-0,8\text{V}$ a $+0,8\text{V}]$. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras, estão representadas as ultimas 3 aquando da estabilização.

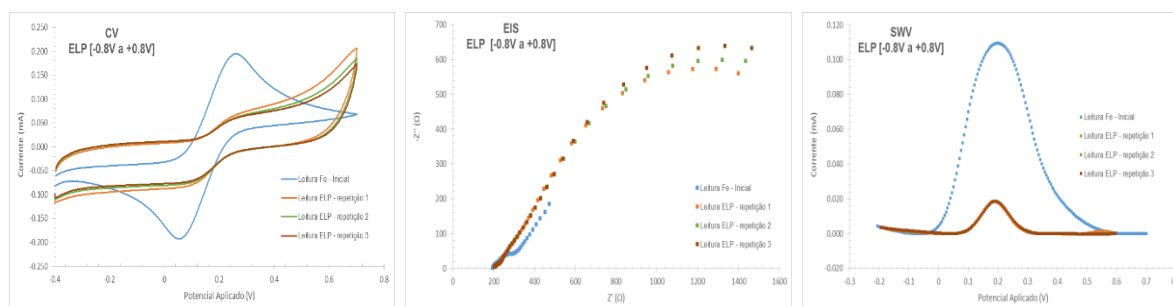


Figura 3.4 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização numa gama de potencial de estudo $[-0,8\text{V}$ a $+0,8\text{V}]$.

Também aqui se observa um comportamento similar ao anterior. Verifica-se que após polimerização picos de oxidação redução diminuem. Os resultados de EIS confirmam a presença do polímero na superfície do eletrodo uma vez que ocorreu um acréscimo da resistência de transferência de eletrões, passou de um valor de $162,40\Omega$ para um máximo de $2.06\text{K}\Omega$. No SWV a altura do pico diminuiu de 1,14mA para 0,019mA, esta diminuição da corrente também indica a presença do polímero, pois houve uma redução da corrente elétrica na superfície transdutora.

Contrariamente ao anterior verifica-se uma melhor estabilização do polímero, os valores obtidos das 3 leituras são bem mais próximos. Comparando as resistências, em EIS, o valor

menor obtido foi de 1,86K Ω e o valor maior foi de 2,08K Ω , que dá uma diferença de apenas 5,6%.

Gama de Potencial: [-0,8V a +1.1V]

Na Figura 3.5 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização numa gama de potencial [-0,8V a +1.1V]. Para obtenção destes resultados foram necessárias apenas 3 leituras para a estabilização.

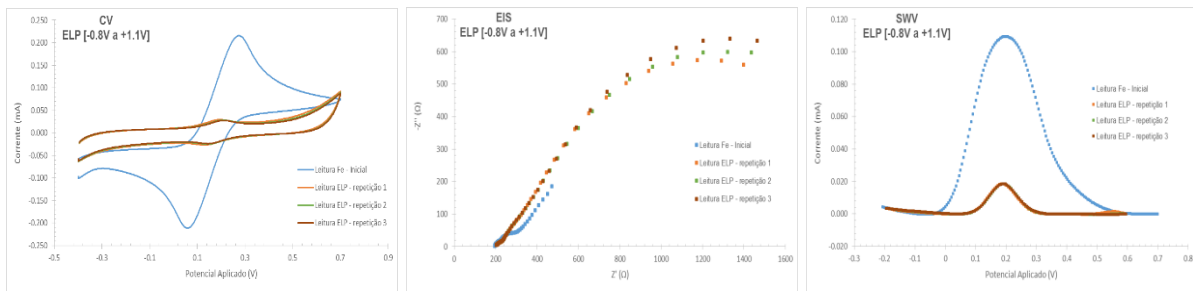


Figura 3.5 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização numa gama de potencial de estudo [-0,8V a +1.1V].

Também nesta gama de potencial se observa um comportamento similar aos anteriores. Verifica-se que após polimerização picos de oxidação redução diminuem. Os resultados de EIS confirmam novamente a presença do polímero na superfície do eletrodo uma vez que ocorreu um acréscimo da resistência de transferência de elétrons. No SWV também se verificou a diminuição da altura do pico o que indica novamente a presença do polímero. Observa-se uma boa estabilização do polímero, os valores obtidos das 3 leituras são muito próximos, no CV e no SWV mesmo coincidentes.

Escolha da Gama Potencial de trabalho

Depois das leituras individuais de cada C-SPE, efetuou-se um estudo comparativo de modo a se poder decidir qual a gama de potencial de trabalho a utilizar que se pode observar na Figura 3.6

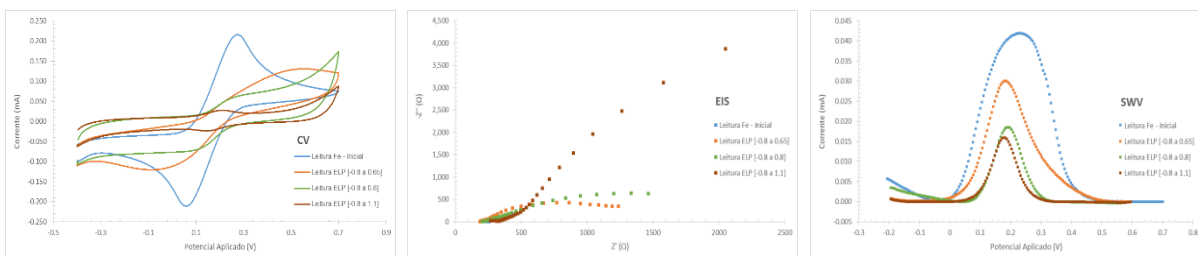


Figura 3.6 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS. Comparação da modificação do eletrodo após eletropolimerização nas gamas de potencial entre [-0,8V a +0,65V], [-0,8V a +0,8V] e [-0,8V a +1.1V].

Da análise comparativa pode-se concluir que a melhor gama de potencial é entre $[-0,8V$ a $0,8V]$, pois apresenta uma boa estabilidade e uma mais baixa resistência elétrica, comparativamente com a gama $[-0,8V$ a $+1.1V]$. Pretende-se que a resistência seja o mais baixa possível pois quando se efetuar a calibração, a adição de proteína irá subir a resistência. Daí que quanto mais baixa for, mais sensível será.

3.2.2 Número de Ciclos na Eletropolimerização

Pretendeu-se verificar qual o número de ciclos de polimerização que permite obter o polímero mais estável, utilizando as técnicas de CV, SWV e EIS. Para tal, fixou-se a velocidade de varrimento em $0,05 V/s$ e a gama de potencial de trabalho entre $[-0,8V$ a $+0,8V]$, selecionada no ponto anterior. O número de ciclos estudados foram 5, 10 e 20 ciclos. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Resultados para 5 ciclos

Na Figura 3.7 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão Redox após se efetuar a eletropolimerização alterando o número de ciclos para 5. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras para a estabilização, estando representadas as últimas 3.

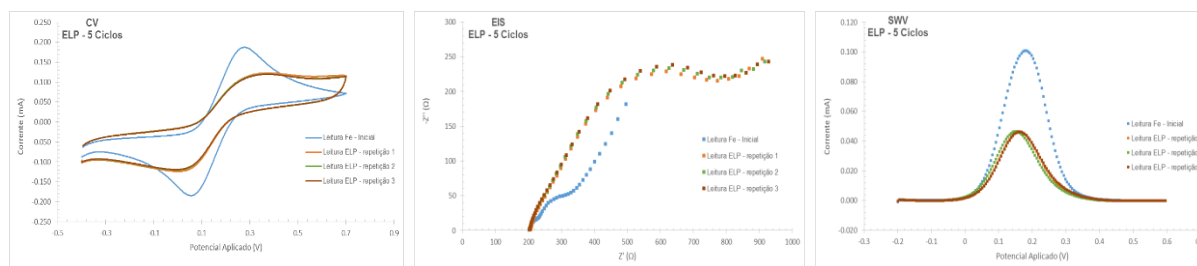


Figura 3.7 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com um número de 5 ciclos.

Tal como foi visto no estudo da gama de potencial também aqui se observa a formação do polímero, a resistência aumenta (EIS), existe uma diminuição do valor da corrente dos picos (CV, SWV).

Resultados para 10 ciclos

Na Figura 3.8 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão Redox após se efetuar a eletropolimerização alterando o número de ciclos para 10. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras para a estabilização, estando representadas as últimas 3.

Com 10 ciclos, comparativamente ao de 5 não se observa uma estabilidade tão boa. No CV consegue-se visualizar uma maior variação nas curvas do CV e EIS, o que não se verifica no anterior. Nas leituras da Figura 3.7 observam-se as 3 leituras após polimerização praticamente coincidentes.

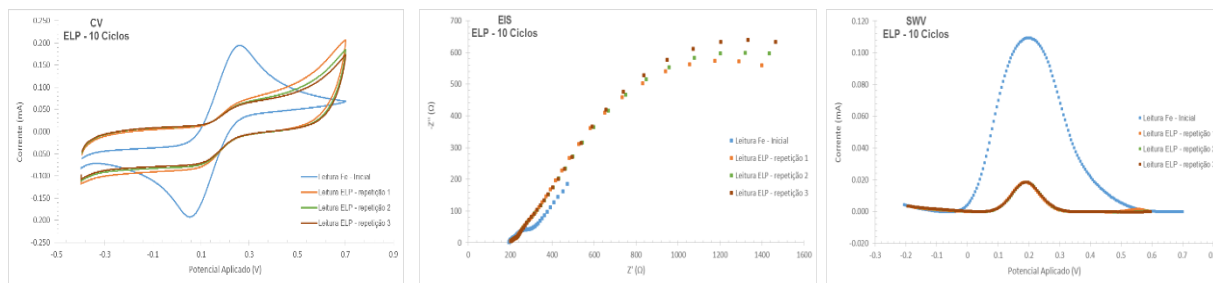


Figura 3.8 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com um número de 10 ciclos.

Resultados para 20 ciclos

Na Figura 3.9 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização alterando o número de ciclos para 20. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras para a estabilização, estando representadas as ultimas 3. Também com 20 ciclos se observa a formação do polímero e a sua estabilização. Os picos do SWV diminuem relativamente à leitura inicial o que indica uma maior resistência à transferência de carga o que também se verifica no aumento da impedância, EIS.

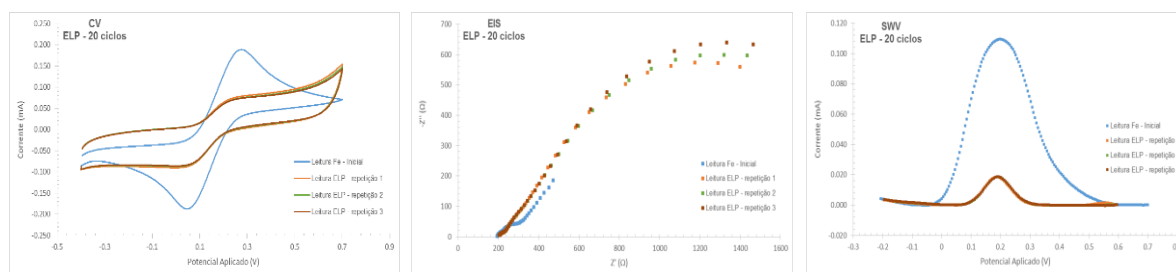


Figura 3.9 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com um número de 20 ciclos.

Escolha do número de ciclos de eletropolimerização

Efetuuou-se em seguida, um estudo comparativo de modo a se decidir qual o número de ciclos a fazer na eletropolimerização, os resultados podem ser observados na Figura 3.10.

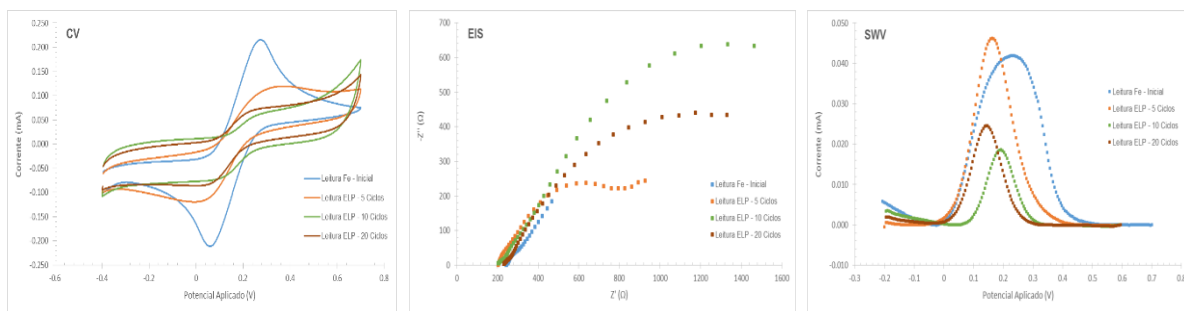


Figura 3.10 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS. Comparação da modificação do eletrodo após eletropolimerização variando o número de ciclos em 5, 10 e 20.

As resistências obtidas pelos 3 ensaios (EIS) são respetivamente de 1,711K Ω para 20 ciclos, 2,083 K Ω para 10 ciclos e 759 Ω para 5 ciclos.

Assim, o número de ciclos escolhido foi de 5 ciclos para a eletropolimerização, pois é o que apresenta boa estabilização e a menor resistência comparativamente aos restantes, o que será o ideal para quando se fizer a calibração, com a adição da proteína. Apresenta o sistema mais sensível.

3.2.3 Velocidade de Varrimento (V/s)

Pretendeu-se verificar qual a velocidade de varrimento que permite obter o polímero mais estável, utilizando as técnicas de CV, SWV e EIS. Para tal, fixou-se os parâmetros seleccionados nos pontos anteriores, 5 ciclos e usou-se a gama de potencial entre [-0,8V a +0,8V]. As velocidades de varrimento estudadas foram de 0,025V/s, 0,050V/s e 0,100V/s. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Velocidade de varrimento: 0,025V/s

Na Figura 3.11 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização alterando a velocidade de varrimento para 0,025V/s. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras para a estabilização, estando representadas as ultimas 3. Como se pode observar pelas figuras do CV, EIS e SWV, as estabilizações da formação do polímero não foram as ideais.

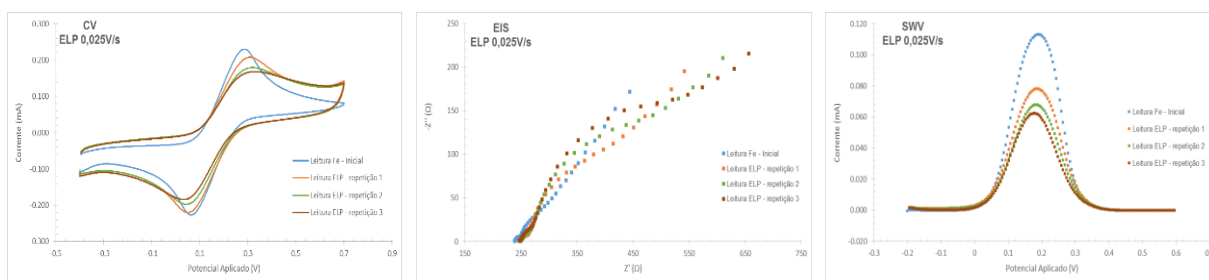


Figura 3.11 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com uma velocidade de varrimento de 0,025V/s.

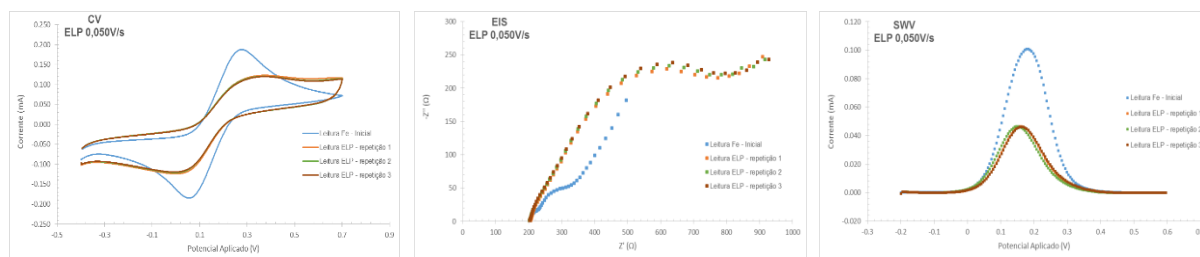
Velocidade de varrimento: 0,050V/s

Figura 3.12 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com uma velocidade de varrimento de 0,050V/s.

Na Figura 3.12 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização alterando a velocidade de varrimento para 0,050V/s. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras para a estabilização, estando representadas as ultimas 3. Como se pode observar nas figuras do CV, EIS e SWV, verifica-se a formação do polímero e observa-se uma boa estabilização.

Velocidade de varrimento: 0,100V/s

Na Figura 3.13 pode-se observar os resultados obtidos pela leitura da solução padrão Redox após se efetuar a eletropolimerização alterando a velocidade de varrimento para 0.100V/s. Para obtenção destes resultados foram necessárias 4 leituras para a estabilização, estando representadas as ultimas 3. Pela observação das curvas obtidas no CV, EIS e SWV não se verifica uma tão boa estabilização como se observou com a velocidade 0,050V/s.

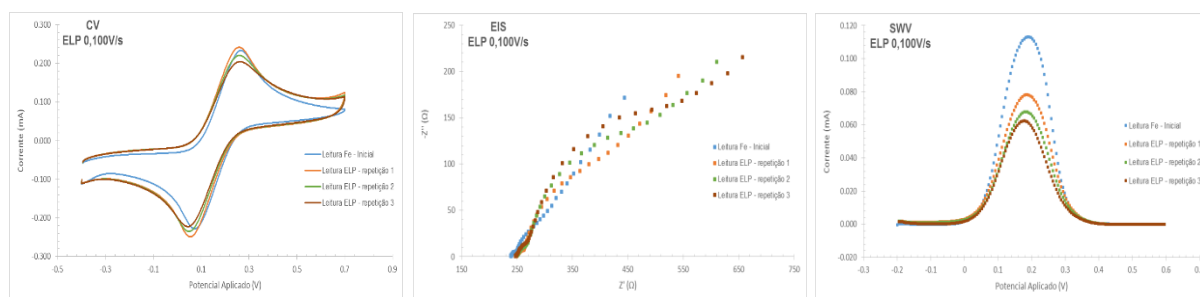


Figura 3.13 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com uma velocidade de varrimento de 0,100V/s.

Escolha da velocidade de varrimento

Para definir qual a velocidade de varrimento na qual se obtêm melhores resultados, fez-se um estudo comparativo de modo que pode ser observado na Figura 3.14. A velocidade de varrimento escolhida neste caso foi a que apresentou melhor estabilidade após a formação do polímero, que das figuras anteriores se verificou ser a 0,050V/s. Na Figura 3.14 pode-se verificar ainda que a formação do polímero mais estável foi observada quando se utilizou uma velocidade de varrimento de 0,050V/s isto pode ser verificado também pelas curvas do CV, a separação de picos é maior nessa velocidade do que por exemplo na velocidade de

0,100V/s onde se observa uma separação menor e próxima à leitura de Ferro inicial. Neste caso, observa-se que quanto maior a resistência (EIS), maior a quantidade de polímero formada na superfície do eletrodo.

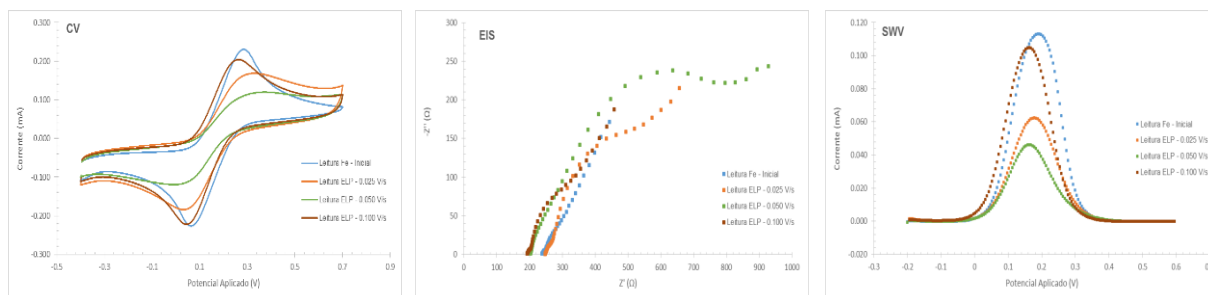


Figura 3.14 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS. Comparação da modificação do eletrodo após eletropolimerização variando a velocidade de varrimento em 0,025V/s, 0,050V/s e 0,100V/s.

3.2.4 Condições de funcionamento do NIP

Assim, pelos resultados obtidos nos pontos anteriores, define-se como gama de potencial de trabalho $[-0,8V$ a $+0,8V]$; velocidade de varrimento de $0,050V/s$ e número de ciclos 5. Embora também se possa concluir que para 20 ciclos o NIP formado obteve boa estabilidade. Pelo que, nos próximos ensaios, se decidiu repetir o ensaio deste parâmetro com o fim de definir com que número de ciclos a estabilidade seria melhor.

3.2.5 Estudo do efeito do solvente no NIP

Pretendeu-se escolher um solvente que não interferisse no polímero, mas que removesse a proteína quando esta fosse adicionada. Assim, testaram-se 3 solventes, o Acetonitrilo, o Etanol e o Ácido Oxálico e verificou-se o efeito destes no NIP. Testou-se novamente a variação do efeito do número de ciclos de eletropolimerização na estabilização do polímero (5 e 20 ciclos).

Acetonitrilo

A remoção de IL-6 por intermédio do Acetonitrilo foi testada por dois meios: incubação direta na superfície impressa por um tempo definido e limpeza eletroquímica por CV. Na Figura 3.15 e Figura 3.16 podem observar-se os resultados obtidos na incubação, onde se apresentam as leituras da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização com 5 e 20 ciclos, respetivamente (resultados das 3 últimas leituras após estabilização) e a última leitura após estabilização depois de aplicação do solvente por incubação ao fim de 3h. Na Figura 3.17 apresentam-se os resultados da limpeza eletroquímica.

Relativamente ao número de ciclos, a comparação das Figura 3.15 e Figura 3.16 indica que se obtém uma melhor estabilização quando se utilizam 20 ciclos na eletropolimerização em vez dos 5.

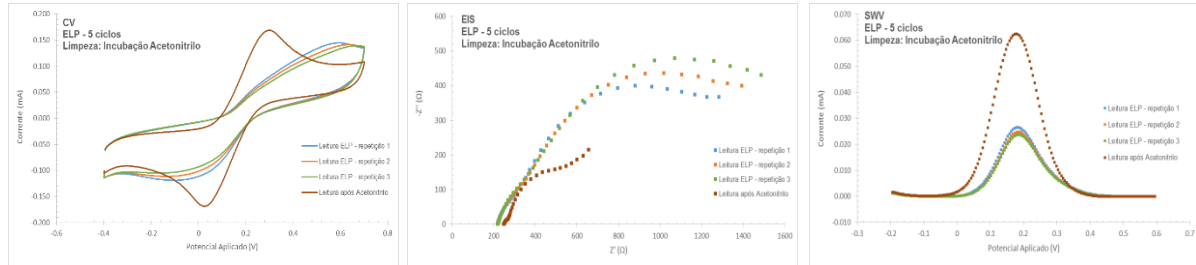


Figura 3.15 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 5 ciclos e após a aplicação do Acetonitrilo.

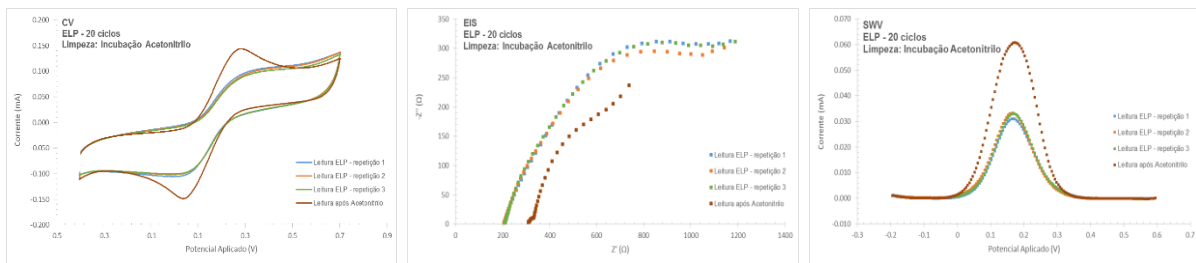


Figura 3.16 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a aplicação do Acetonitrilo por incubação.

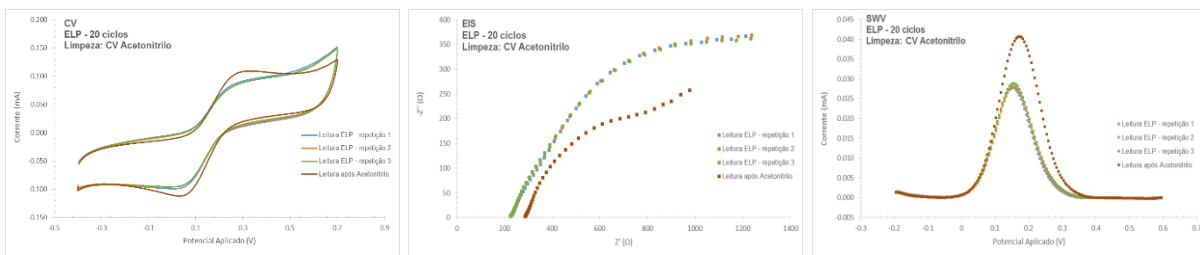


Figura 3.17 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a limpeza com Acetonitrilo por CV.

Pode-se ainda concluir que a limpeza com Acetonitrilo modifica a superfície sensora, quer seja aplicado por incubação quer seja feita por limpeza usando a técnica CV. Tal pode ser observado por exemplo na Figura 3.15 onde no CV se verifica que houve uma alteração dos picos, estes ficaram mais estreitos e mais definidos, o que implica que tenha havido remoção de polímero, uma vez que o sistema se tornou mais reversível. No EIS pode-se observar uma redução significativa da resistência, passando de 1904 para 328 Ω . Além disso,

no SWV observa-se também um aumento de corrente, de 0,025 para 0,065mA. Este registo indica que existiu uma maior transferência carga no transdutor, o que sugere que o polímero terá sido destruído. Situação idêntica se verifica na Figura 3.16 e Figura 3.17.

Etanol

Na Figura 3.18 e Figura 3.19 pode-se observar os resultados obtidos, pela leitura da solução padrão redox após se efetuar a eletropolimerização com 5 ciclos e 20 ciclos, respetivamente. Os resultados representam as 3 últimas leituras após estabilização, para 5 ciclos foram necessárias 6 leituras e para 20 ciclos, 4 leituras. Na Figura 3.18 optou-se por representar apenas o valor final obtido após estabilização por eletropolimerização com 5 ciclos, pois ao fim de 6 leituras o polímero não estava completamente estável. Está ainda representada a última leitura após estabilização efetuada depois da aplicação do solvente por incubação ao fim de 3h.

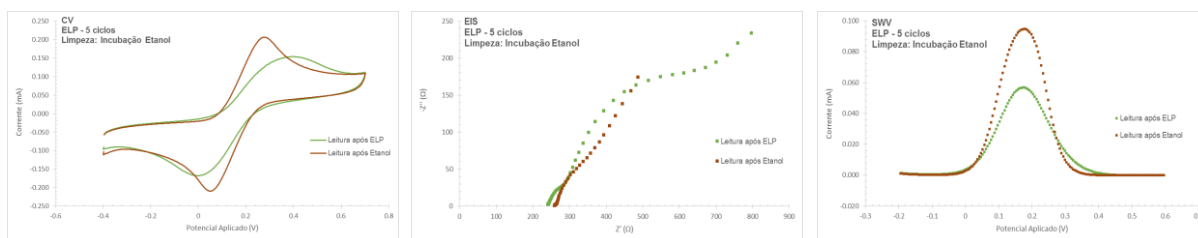


Figura 3.18 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 5 ciclos e após a limpeza com Etanol por incubação durante 3h.

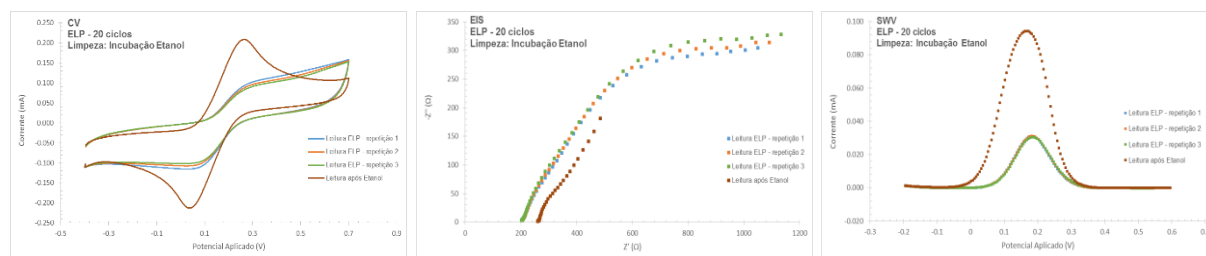


Figura 3.19 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a limpeza com Etanol por incubação durante 3h.

Nas figuras acima pode-se novamente observar que se obtém uma boa estabilização quando se utilizam 20 ciclos (4 leituras) na eletropolimerização. Nos 5 ciclos, foram necessárias mais leituras para se obter a estabilização (6 leituras). Observa-se no CV um aumento da corrente e um estreitamento nos picos de oxidação-redução do Fe. Passou de +0,018mA (oxidação) e -0,085mA (redução) para +0,118mA (oxidação) e -0,189mA (redução) – aumento da corrente; e a sua posição passou de 0,270 (oxidação) e 0,076 (redução) para 0,271V (oxidação) e 0,057V (redução) – estreitamento dos picos. Também se observa uma redução significativa da resistência em EIS 1,324KΩ para 201Ω. Na SWV

observa-se ainda um aumento da corrente, passou de 0,031mA para 0,095mA. Conclui-se que a limpeza com Etanol modifica a superfície do eletrodo.

Ácido Oxálico

Nas figuras abaixo estão representadas as 3 ultimas leituras da solução Redox após eletropolimerização e a leitura da solução redox após de aplicar o solvente. Quando se usam 5 ciclos na eletropolimerização, nem sempre se consegue uma boa estabilização do polímero, como se pode observar na Figura 3.20. No entanto, pode-se concluir que utilizando 20 ciclos de eletropolimerização e o ácido oxálico como solvente este não interfere significativamente na superfície sensora e tal facto pode ser observado na Figura 3.21.

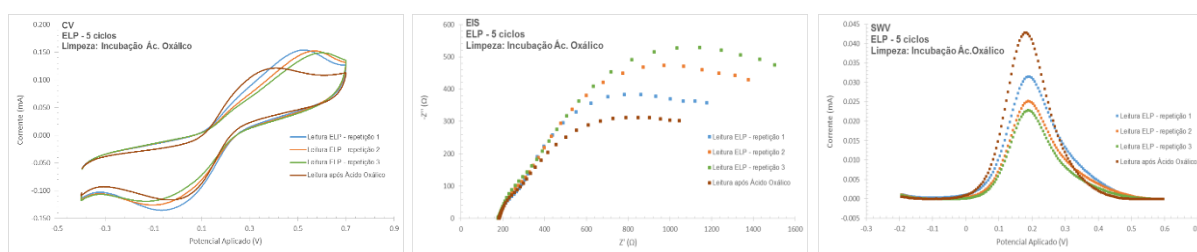


Figura 3.20 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 5 ciclos e após a limpeza com Ácido Oxálico por incubação durante 3h.

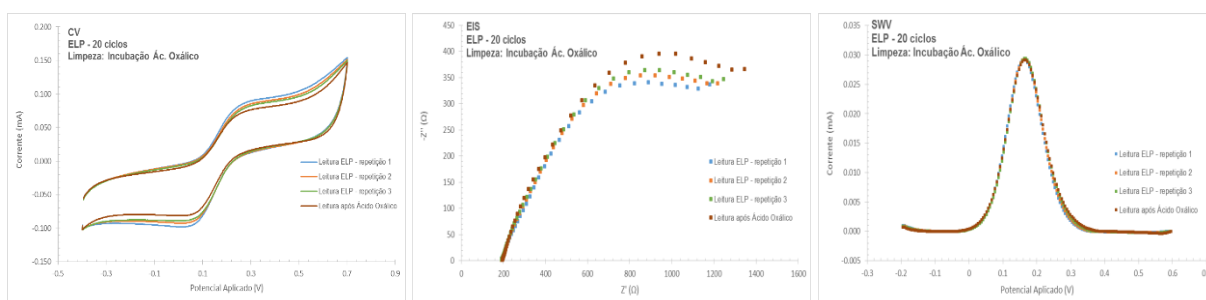


Figura 3.21 Leituras obtidas com a solução padrão redox do CV, SWV e EIS, após eletropolimerização com 20 ciclos e após a limpeza com Ácido Oxálico por incubação durante 3h.

3.2.6 Estudo da Gama de Concentração do Pirrol

Procedeu-se ao estudo do efeito da concentração de Pirrol para avaliar qual o seu efeito na condutividade do polímero, utilizando as técnicas de CV, SWV e EIS. Para tal, utilizou-se 4 gamas de concentração diferentes: $[1,0 \times 10^{-2}M]$, $[1,0 \times 10^{-3}M]$, $[1,0 \times 10^{-4}M]$ e $[1,0 \times 10^{-5}M]$.

Das 4 concentrações estudadas, onde se verifica o maior efeito na condutividade do polímero é usando a concentração de $1,0 \times 10^{-2}M$ de Pirrol, como se pode observar na Figura 3.22. Neste caso, a concentração mais elevada de monómero conduziu a uma maior modificação na superfície sensora, o que indica a presença da formação do polímero.

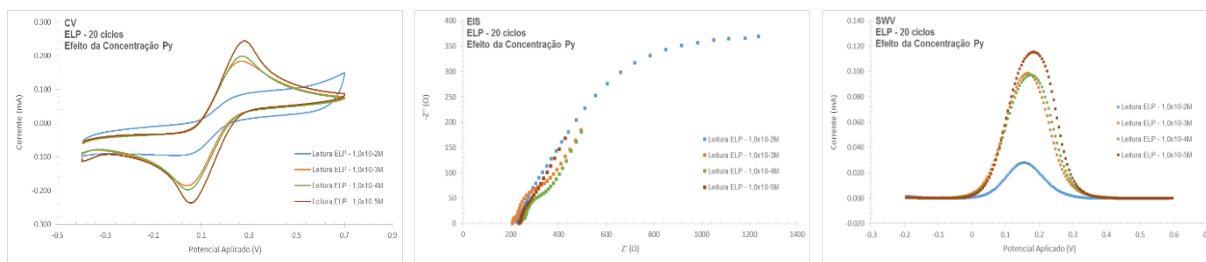


Figura 3.22 Comparação do efeito de diferentes concentrações de Pirrol na eletropolimerização, pelas leituras obtidas com a solução padrão redox em CV, SWV e EIS.

3.2.7 Parâmetros selecionados para a preparação do NIP

Dos pontos anteriormente descritos, conclui-se que os parâmetros a utilizar na eletropolimerização são: gama de potencial $[-0,8V$ a $+0,8V]$, nº de ciclos 20, velocidade de varrimento de $0,05V/s$ e a concentração do monómero deverá ser de $1,0 \times 10^{-2}M$.

3.3 Síntese do MIP

3.3.1 MIP por impressão na superfície

Prepararam-se 3 elétrodos de Carbono (C-SPE) e verificou-se as modificações que foram ocorrendo na superfície em cada fase do processo de preparação do MIP.

(1ª Fase): Iniciou-se por efetuar uma limpeza por cronoamperometria ($-1,7V$, 200s) com a solução de KCl, ao C-SPE; Depois fizeram-se as leituras de CV, SWV e EIS da solução padrão redox.

(2ª Fase): Incubou-se a proteína IL-6 (2 horas) e depois de lavar com PBS, incubou-se o Py-COOH (30 min); Ao fim deste tempo, após lavar com PBS, efetuou-se a eletropolimerização Py $[-0,8V$ a $+0,8V$; 20 ciclos; $0,050V/s$], seguida depois de uma limpeza com CV usando PBS nas condições: $[-0,3V$ a $+0,3V$; 10 ciclos; $0,050V/s$]; Fizeram-se depois as leituras de CV, SWV e EIS com solução padrão redox.

(3ª Fase): Incubou-se $10 \mu L$ de Ácido Oxálico (3 horas) e depois de lavar, deixou-se a incubar uma solução de PBS pH=7,0 (30 min). Por fim, efetuaram-se as leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox.

Na Figura 3.23, Figura 3.24 e Figura 3.25, estas mostram o estudo da estabilização do sensor em cada fase de preparação para obtenção do MIP.

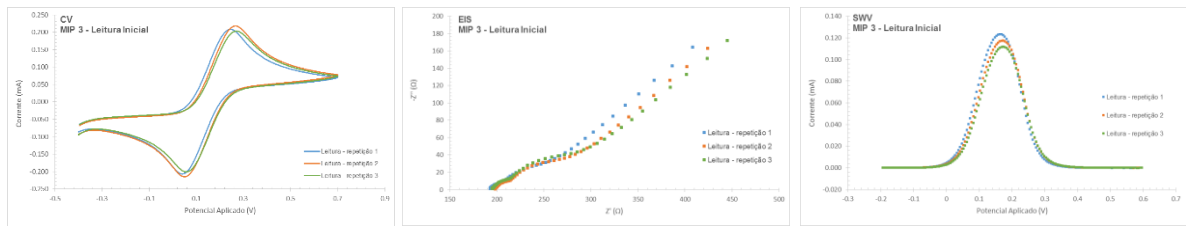


Figura 3.23 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE inicial (sem modificações) após a limpeza com KCl, no ensaio do MIP 3 (1ª fase).

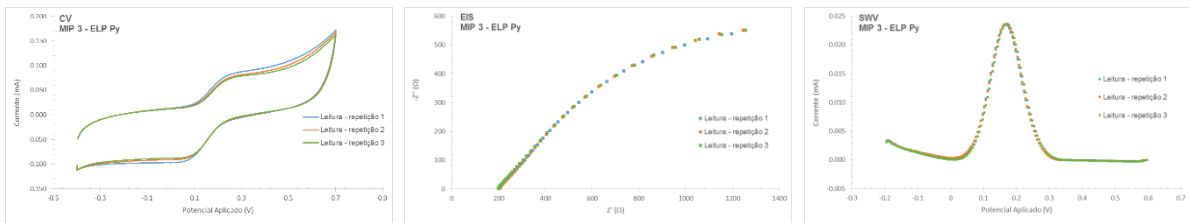


Figura 3.24 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, após incubação da proteína e eletropolimerização do Pirrol, no ensaio do MIP 3 (2ª fase).

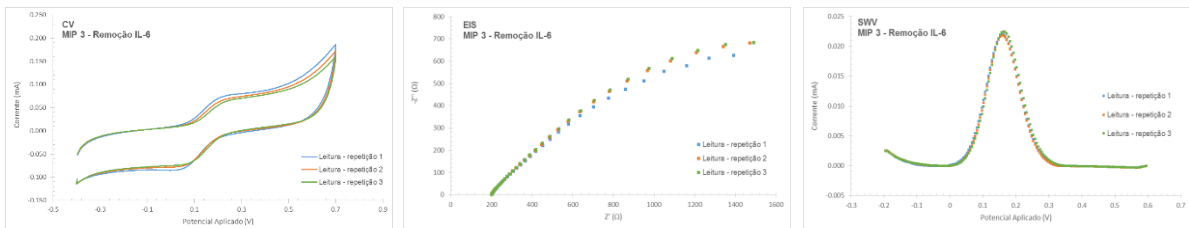


Figura 3.25 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão Redox no C-SPE, após remoção da proteína com Ácido Oxálico, no ensaio do MIP 3 (3ª fase).

Em seguida, efetuou-se uma análise comparativa de cada fase, para se avaliar o efeito da proteína na superfície sensora. Na Figura 3.26, Figura 3.27 e Figura 3.28 estão representados os comportamentos observados em cada um dos 3 MIPs preparados.

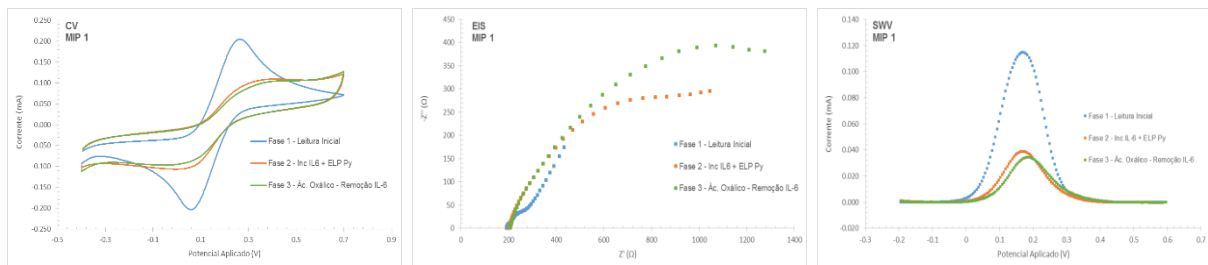


Figura 3.26 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 1.

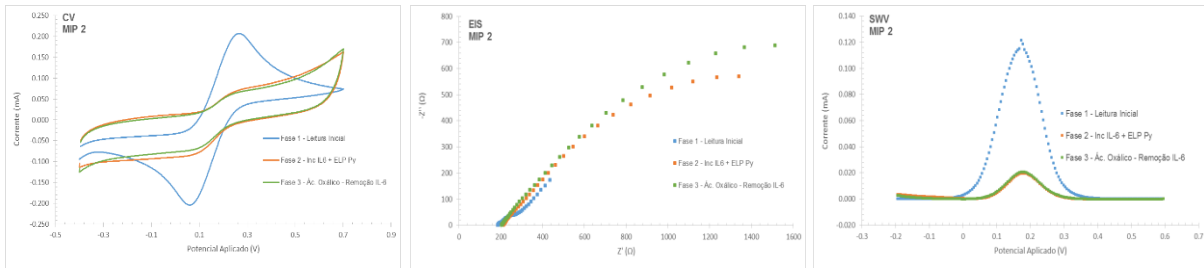


Figura 3.27 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 2.

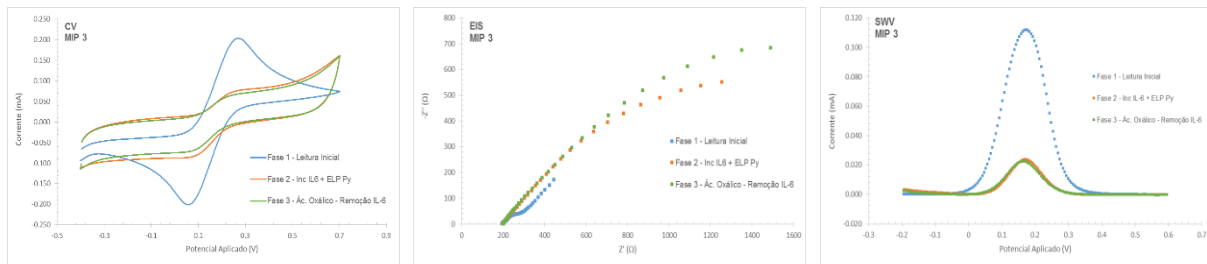


Figura 3.28 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 3.

Desta análise comparativa, pode-se observar que quase não se verifica uma diferença significativa entre a Fase 2 e a Fase 3, o que levou a questionar se a Proteína realmente incubou na superfície sensora. Assim, preparou-se um novo C-SPE e efetuou-se uma análise com leituras da solução padrão redox, do sensor limpo e após a incubação da proteína e nesta fase não se verificou quaisquer alterações, o que indica que a proteína não se liga diretamente à superfície do sensor. Essa análise pode ser observada na Figura 3.29.

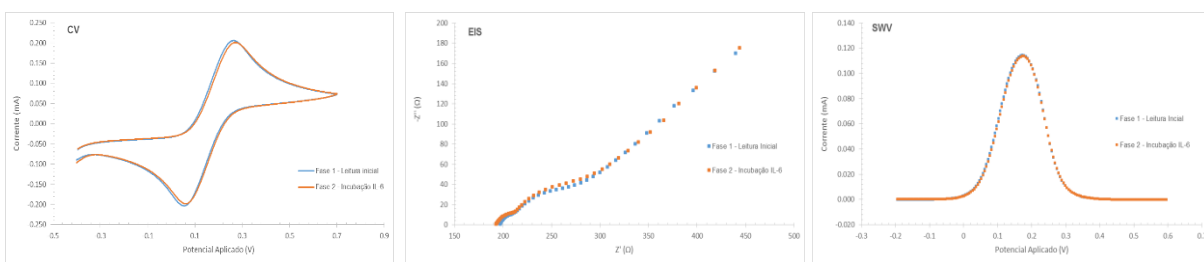


Figura 3.29 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, antes e depois da Incubação da proteína IL-6.

Assim, suspendeu-se este método de sintetizar o MIP (em superfície) e optou-se por preparar o MIP usando o método de polimerização em *Bulk*, para que os monómeros de Pirrol interagissem numa fase inicial com a proteína e em seguida se efetuar a eletropolimerização.

3.3.2 MIP por impressão por polimerização em Bulk (3-D)

Preparou-se 3 elétrodos de Carbono (C-SPE) e verificou-se as modificações que foram ocorrendo na superfície em cada fase do processo de preparação do MIP.

(1ª Fase): Efetuou-se uma limpeza por cronoamperometria ($-1,7V$, 200s) com a solução de KCl, ao C-SPE. Fizeram-se depois as leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox.

(2ª Fase): Preparou-se uma solução: 10 μ L Proteína IL-6 (2 μ g/mL), com 45 μ L de Py-COOH (20 μ g/mL) e 45 μ L Py ($1,0 \times 10^{-2}M$), e deixou-se repousar por 30min. E em seguida, incubou-se no C-CPE, 70 μ L (5min). Efetuou-se depois a eletropolimerização [$-0,8V$ a $+0,8V$; 20 ciclos; 0,050V/s], seguida de uma limpeza com CV usando PBS nas condições: [$-0,3V$ a $+0,3V$; 10 ciclos; 0,050V/s]. Fizeram-se depois as leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox.

(3ª Fase): Incubou-se 10 μ L de Ácido Oxálico (3 horas) e depois de lavar, colocou-se a incubar uma solução de PBS pH=7,0 (30min). E no fim, efetuaram-se as leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox.

Na Figura 3.30, Figura 3.31 e Figura 3.32 pode-se observar o estudo da estabilização do sensor em cada fase de preparação para obtenção do MIP.

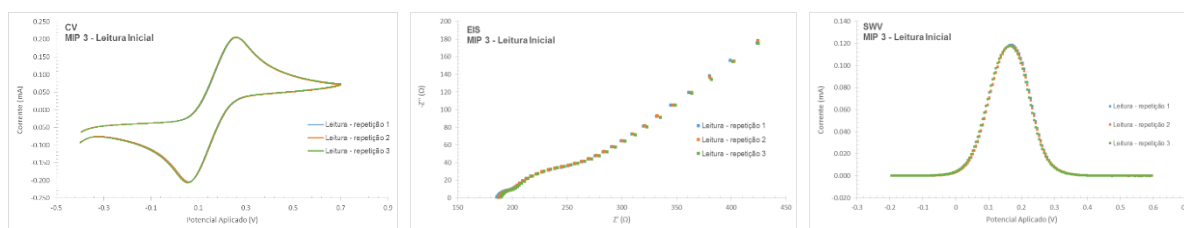


Figura 3.30 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE inicial (sem modificações) após a limpeza com KCl, no ensaio do MIP 3 (1ª fase).

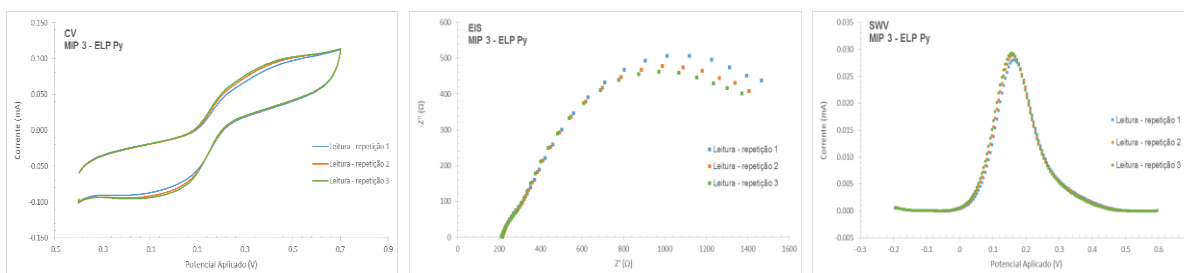


Figura 3.31 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, após a eletropolimerização da solução (IL-6 + Py-COOH + Py), no ensaio do MIP 3 (2ª fase).

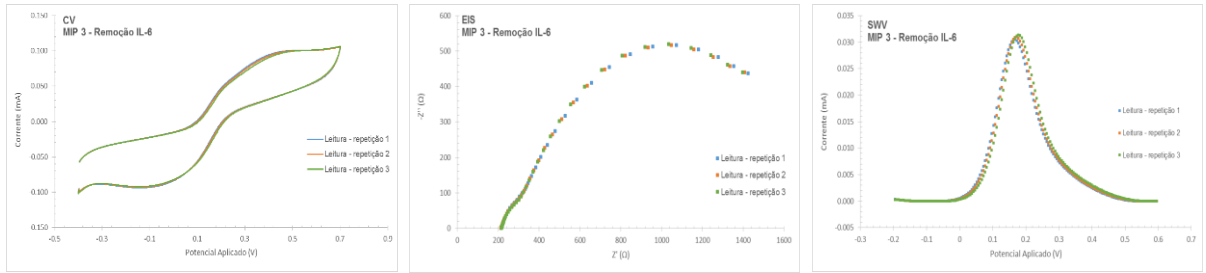


Figura 3.32 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, após remoção da proteína com Ácido Oxálico, no ensaio do MIP 3 (3ª fase).

Em seguida, efetuou-se uma análise comparativa de cada fase, para se avaliar o efeito da proteína na superfície sensora. Na Figura 3.33, Figura 3.34 e Figura 3.35 pode-se observar os comportamentos de cada um dos 3 MIPs preparados.

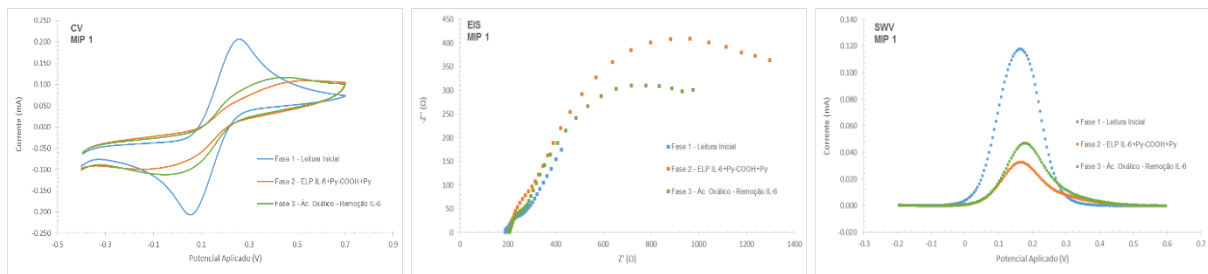


Figura 3.33 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 1

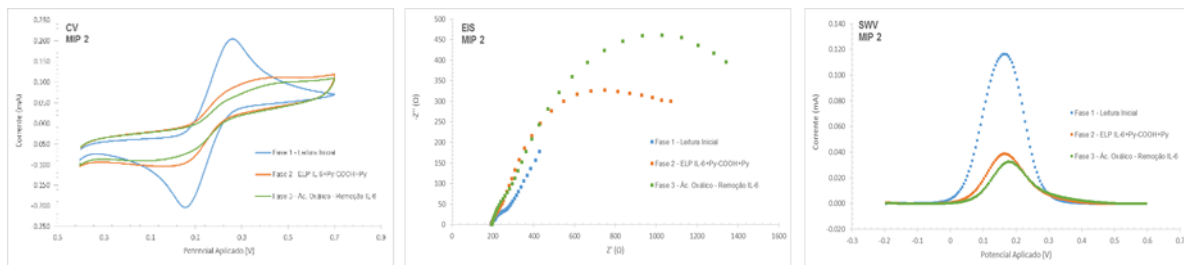


Figura 3.34 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 2.

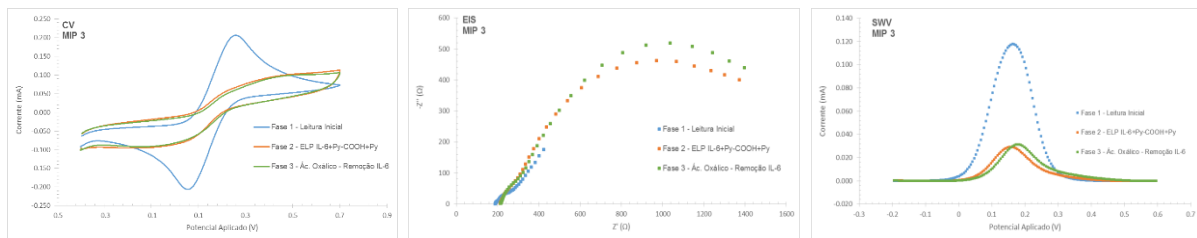


Figura 3.35 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, comparação de cada uma das fases de preparação MIP, no ensaio do MIP 3.

Na Figura 3.34, analisando os gráficos verifica-se que a remoção da proteína promove um aumento da corrente ou uma diminuição, consoante o dispositivo em estudo. Em termos práticos, este resultado não é expectável, uma vez que para elétrodos iguais o resultado esperado seria o mesmo. A única justificação que eventualmente se pode encontrar para este registo reside o facto do ponto isoelétrico da proteína (pI 6,17, [87]) poder estar muito próximo do valor de pH da solução tampão de PBS (pH 6,0). Efetivamente, as biomoléculas de proteína a um valor de pH inferior ao seu ponto isoelétrico encontram-se protonadas predominantemente com carga positiva e a pH superior com carga negativa. Ora, quando a proteína detém uma carga global negativa, ela contribui para repelir a solução padrão redox de ferro, que detém também carga negativa, originando com isso um aumento da resistência à transferência de carga. O contrário é também aplicável, com a proteína a atrair para si o padrão redox quando detém carga positiva e a diminuir, com isso, a resistência à transferência de carga. Uma vez que o valor de pH da solução tampão é próximo ao valor de pH, pequenas flutuações da protonação do meio onde se encontra a solução padrão de IL-6 podem causar respostas opostas do ponto de vista de resistência.

Comparativamente aos ensaios em superfície, os registos em *bulk* são inequívocos relativamente à remoção da proteína da matriz polimérica aquando do seu tratamento com ácido oxálico. Neste sentido, e nesta fase do trabalho, considerou-se mais adequado prosseguir os estudos com a polimerização em *bulk*.

3.3.3 Estudo da reprodutibilidade

Na Figura 3.36 e Figura 3.37 estão representadas as mesmas leituras efetuadas anteriormente, neste caso analisando o efeito da aplicação das mesmas condições em C-SPE's diferentes. De referir que os C-SPE's das leituras M1 e M3 pertencem ao mesmo lote e o M2 pertence a um lote diferente.

Assim, após a eletropolimerização, verifica-se que a reação é idêntica nos três elétrodos, no entanto verifica-se uma maior discrepância quando se analisa a remoção da proteína num dos elétrodos, isto aconteceu porque a estabilização após a remoção com ácido oxálico, não foi idêntica nos três ensaios, para o MIP 3 foi necessário efetuar mais uma leitura para se obter a estabilização. Durante este trabalho o que se verificou foi que quanto menos leituras fossem necessárias à estabilização do MIP em cada uma das fases, melhores resultados na performance foram obtidos, talvez devido a um menor desgaste do C-SPE.

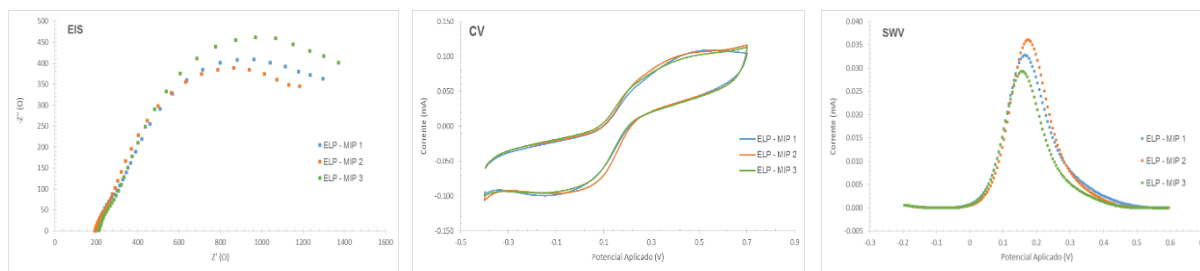


Figura 3.36 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, estudo da reprodutibilidade de C-SPE's diferentes após a eletropolimerização.

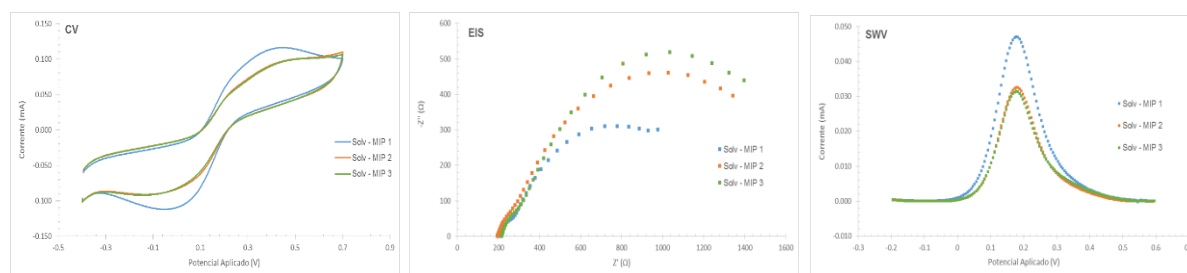


Figura 3.37 Leituras do CV, SWV e EIS da solução padrão redox no C-SPE, estudo da reprodutibilidade de C-SPE's diferentes após a remoção da proteína com ácido oxálico.

3.3.4 Curva de calibração da IL-6

Para avaliar a performance do biossensor determinou-se os parâmetros da curva de calibração da proteína, o declive e limite inferior de deteção. Fez-se ainda o estudo da seletividade através da curva de calibração em soro. Este processo baseia-se na adição de diferentes quantidades de 10µL de proteína na superfície do sensor, deixando-se a incubar por 15min. Entre adições é efetuada uma leitura com a solução padrão redox. O objetivo é a observação da ligação da proteína ao polímero nas cavidades produzidas pelo processo anterior.

As concentrações das soluções preparadas em PBS de IL-6 utilizadas estão representadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Concentração das soluções preparadas de IL-6

| Solução Padrão | IL-6 [ng/mL] |
|----------------|--------------|
| 0 | 0 |
| 1 | 0,000020 |
| 2 | 0,00020 |
| 3 | 0,0020 |
| 4 | 0,0200 |
| 5 | 0,2000 |
| 6 | 2,0000 |
| 7 | 20,0000 |
| 8 | 200,0000 |
| 9 | 2000,0000 |

Foram efetuadas leituras em paralelo com as diferentes soluções de IL-6 num NIP. Calculou-se a média e desvio padrão das três calibrações para o MIP e para o NIP e determinou-se o limite inferior de resposta e o declive das leituras. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.38 e na Figura 3.39.

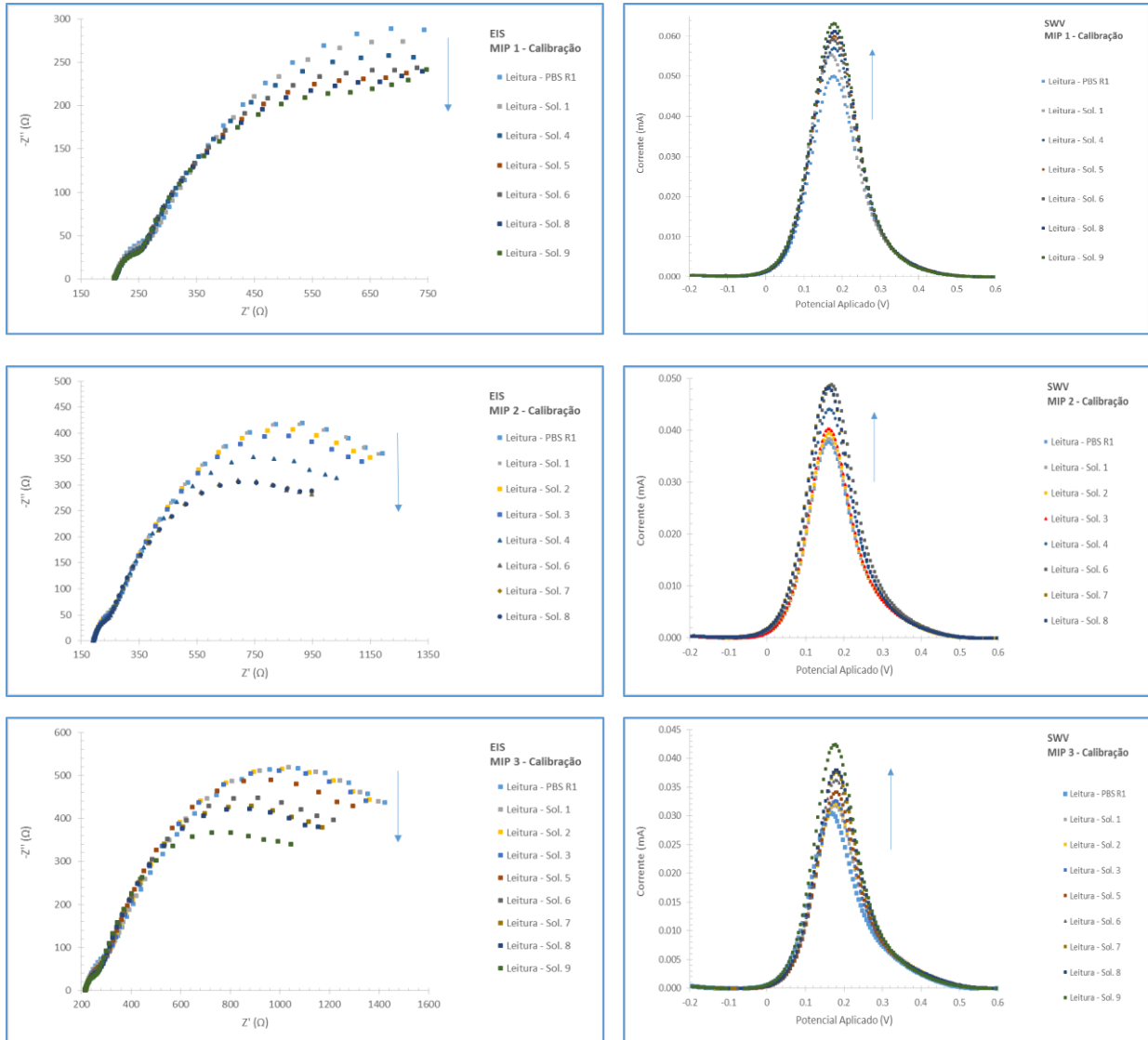


Figura 3.38 Leituras do, EIS e SWV da solução padrão redox no C-SPE, adição de diferentes concentrações de IL-6 preparada em PBS em 3MIP's.

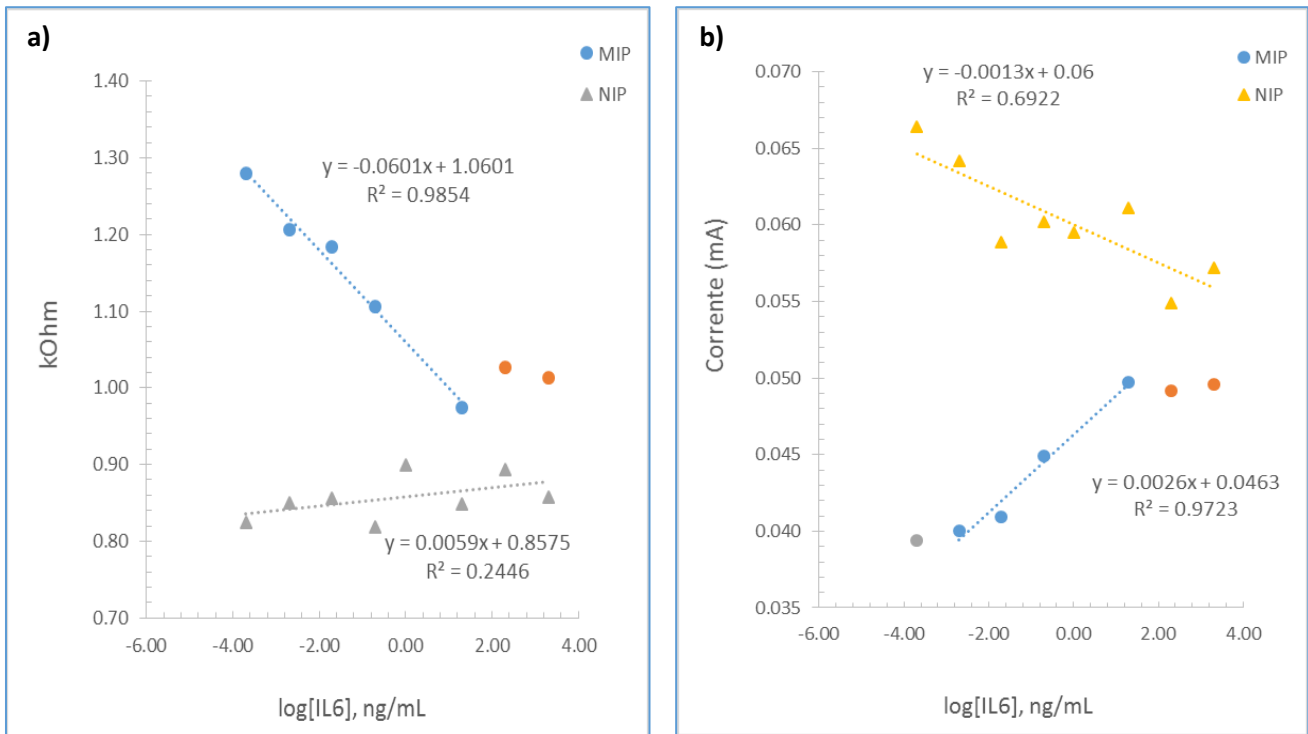


Figura 3.39 Retas de calibração obtidas com concentrações de IL-6 preparadas em PBS para MIP e NIP, pelas técnicas EIS (a) e SWV (b).

3.3.5 Testes em soro

As concentrações das soluções preparadas em soro de IL-6 utilizadas foram as mesmas que as preparadas para a calibração em PBS (ver Tabela 3.1.).

Foram ainda efetuadas leituras em paralelo com as diferentes soluções de IL-6 num NIP. Os resultados obtidos para a calibração do NIP e MIP com concentrações de IL-6 preparadas em soro estão representados na Figura 3.40 e Figura 3.41.

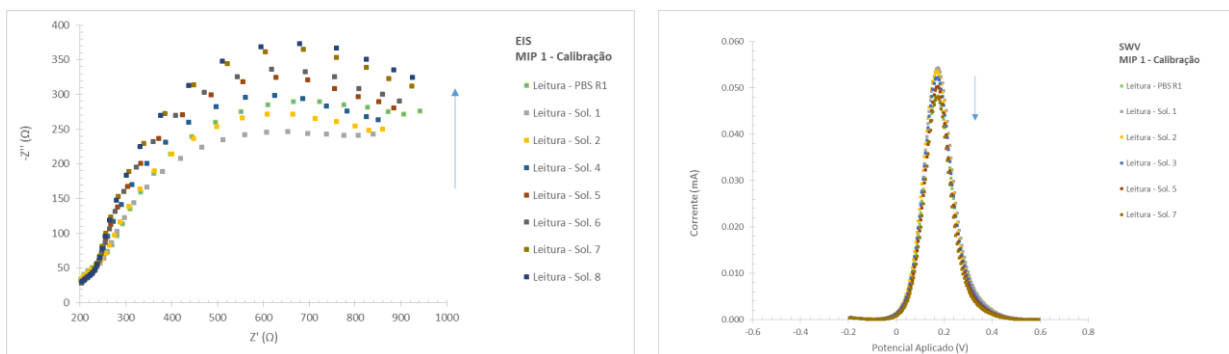


Figura 3.40 Leituras do, EIS e SWV da solução padrão redox no C-SPE, adição de diferentes concentrações de IL-6 preparada em soro no MIP's.

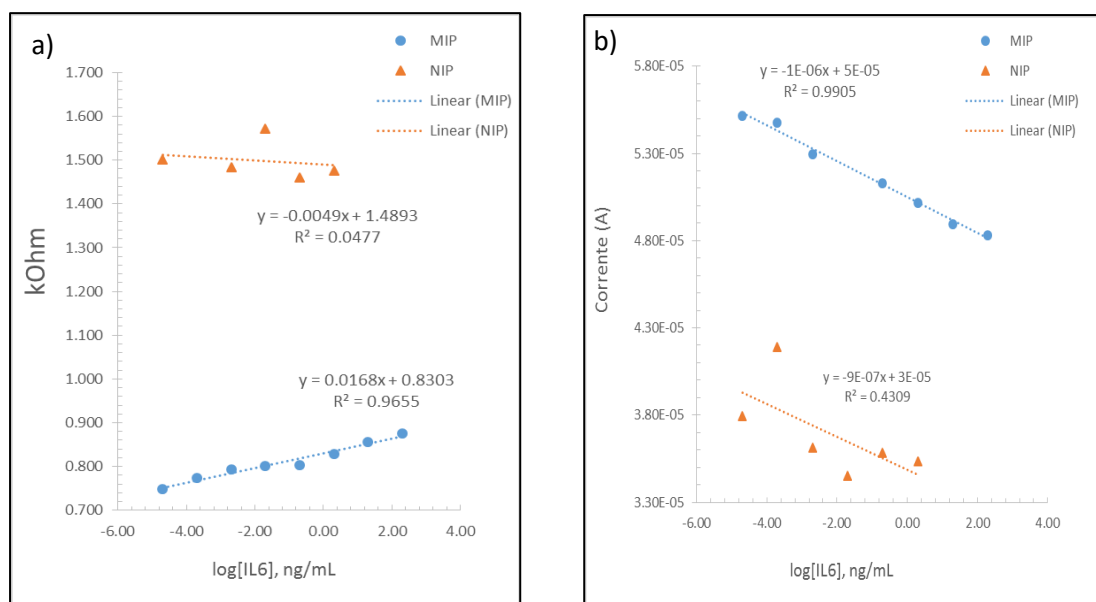


Figura 3.41 Retas de calibração obtidas com concentrações de IL-6 preparadas em soro para MIP e NIP, pelas técnicas EIS (a) e SWV (b).

3.4 Caracterização dos Materiais

3.4.1 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de alta resolução que permite obter informação química e estrutural de um material, composto orgânico ou inorgânico permitindo assim sua identificação.

O espectro obtido por Raman apresenta 3 picos distintos, o primeiro corresponde à banda D, que representa a desordem estrutural dos materiais, o segundo corresponde à banda G, que representa as ligações de Carbono (C=C) e finalmente o terceiro corresponde à banda 2D que constitui um prolongamento da banda G a frequências mais altas.

A Figura 3.42 mostra os espectros obtidos por espectroscopia Raman realizada na superfície dos elétrodos e os valores obtidos encontram-se na Tabela 3.2.

C-SPE – Eléctrodo inicial sem tratamento

MIP – MIP (Bulk) após a remoção da proteína IL-6 com o solvente ácido oxálico

MIP –P – MIP após calibração (adições de proteína IL-6)

NIP – Eléctrodo obtido após a limpeza com ácido oxálico (neste não houve a introdução da Proteína IL-6 em nenhuma das fases)

Tabela 3.2: Valores obtidos por espectroscopia Raman na superfície de diferentes C-SPE em diferentes fases de estudo.

| | | G | D | IG/ID |
|--------------|-----------------|----------|----------|--------------|
| C-SPE | Posição do Pico | 1590,4 | 1351,3 | 1,04 |
| | Altura do Pico | 24,73 | 239,556 | |
| MIP | Posição do Pico | 1588,6 | 1355,1 | 1,11 |
| | Altura do Pico | 375,37 | 337,38 | |
| MIP-P | Posição do Pico | 1588,66 | 1355,15 | 1,14 |
| | Altura do Pico | 397,77 | 349,59 | |
| NIP | Posição do Pico | 1588,6 | 1351,3 | 1,09 |
| | Altura do Pico | 366,038 | 335,27 | |

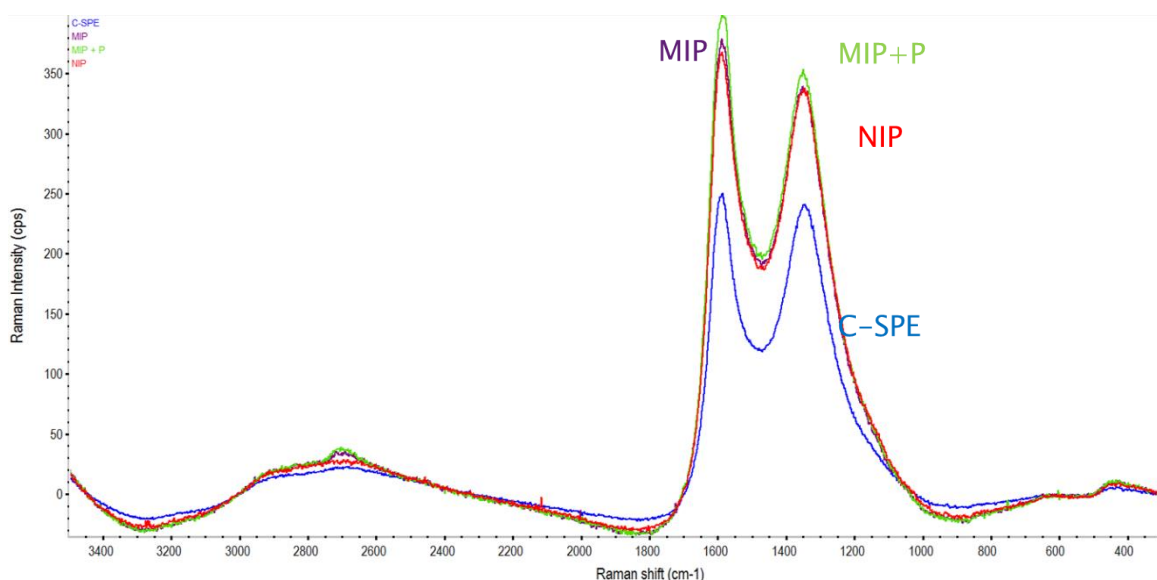


Figura 3.42 Espectro de Raman da superfície dos C-SPE's em diferentes fases de estudo.

Comparando as razões dos picos IG/ID pode-se concluir que esta aumenta com o número de alterações introduzidas. O MIP tem um IG/ID superior ao da grafite (C-SPE) devido as ligações saturadas (C=C), uma vez que a estrutura é um polímero, tendo formando uma superfície mais cristalina e menos amorfa. O MIP e o NIP apresentam valores próximos, o que é espectável pois a matriz polimérica é a mesma. No entanto, no MIP são introduzidos defeitos estruturais na superfície devido à presença de cavidades promovidas pela remoção da proteína o que leva a um ligeiro aumento da razão IG/ID. Já o MIP-P tem um valor maior (1,14) que o MIP, devido à presença da proteína na matriz polimérica.

4 Conclusão

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um dispositivo analítico com integração de técnicas eletroquímicas e impressão molecular de proteínas. O analito em estudo foi um biomarcador associado à neuro-inflamação, a proteína IL-6, que poderá ser um indício da presença da doença de Alzheimer, quando associado a outros sintomas. O material sensor foi sintetizado por eletropolimerização com o monómero Py e com a proteína, IL-6 no seio da mistura reacional (polimerização em *bulk*). A remoção da proteína deu-se por clivagem ácida dando origem aos locais impressos.

No estudo da polimerização verificou-se que as melhores condições para a eletropolimerização do Py foi usando uma gama de potencial de $[-0,8V$ a $+0,8V]$, 20 ciclos e uma velocidade de varrimento de $0,050V/s$. A concentração do monómero também é importante e foi otimizado o seu valor para $1,0 \times 10^{-2}M$.

Para o desenvolvimento do MIP, foi estudado um solvente que não alterasse a superfície do polímero e o escolhido foi o Ácido Oxálico. Na síntese do MIP o método adotado foi por impressão em *bulk* uma vez que são mais visíveis os efeitos do solvente na remoção da proteína.

De uma forma geral, o sensor demonstrou boas características operacionais em termos de limite de detecção (na ordem dos pg por mL em IL-6), reprodutibilidade, tempo de resposta (com máximo tempo de incubação de 15 minutos) e seletividade. A adsorção da proteína IL-6 sobre uma superfície condutora foi observada com sucesso, com limites de resposta entre $0,02$ pg/mL e $2,0$ µg/mL, uma gama que inclui os valores fisiológicos (num indivíduo saudável o valor ronda os $1,6$ pg/mL e num indivíduo com neuro-inflamação os $2,3$ pg/mL).

Estes materiais biomiméticos são muito mais estáveis e robustos quando comparados com os tradicionais imunossensores e métodos ELISA. Em geral, o biossensor apresentado aqui mostrou simplicidade na conceção, tempo de medição curto, reutilização, alta precisão, baixo limite de detecção e boa seletividade. Esta nova promissora abordagem abre horizontes para o rápido diagnóstico de biomarcadores associados à DA ou a outro tipo de doenças nos locais de cuidado.

Assim, tendo em conta uma perspetiva futura, seria importante realizar testes em amostras reais. Tal como, efetuar a comparação deste método com outro método validado, como por exemplo o ELISA.

Para este trabalho seria importante reavaliar a impressão do MIP em superfície e avaliar também o efeito do acompanhamento por CV e SWV ao longo da construção do biossensor.

5 Referências Bibliográficas

- [1] Alzheimers.net, <<http://www.alzheimers.net/resources/alzheimers-statistics/>>, (accessed March.2016).
- [2] J. Miguel Rubio-Perez, J. Maria Morillas-Ruiz, A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines, Scientific World Journal (2012).
- [3] Y. Huang, L. Mucke, Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies, Cell 148(6) (2012) 1204-1222.
- [4] World Health Organization. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en>>, (accessed March.2016).
- [5] A. Portugal, Associação Portuguesa dos familiares e amigos dos doentes de Alzheimer. <<http://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-30-14-a-doenca-de-alzheimer>>, (accessed March.2016).
- [6] H.E. Gendelman, Neural immunity: Friend or foe?, Journal of Neurovirology 8(6) (2002) 474-479.
- [7] Wikipedia. <<https://en.wikipedia.org/wiki/Neuroinflammation>>, (accessed March.2016).
- [8] J. Das Sarma, Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology, Journal of Neurovirology 20(2) (2014) 122-136.
- [9] B.A. t Hart, W.F. den Dunnen, Commentary on Special Issue: CNS Diseases and the Immune System, Journal of Neuroimmune Pharmacology 8(4) (2013) 757-759.
- [10] H. Fernandes, Apresentação: Neuroinflamação. <<http://cloud.fciencias.com/wp-content/uploads/2014/12/Presentation.pdf>>, 2014/2015 (accessed March.2016).
- [11] G.A. Garden, Epigenetics and the Modulation of Neuroinflammation, Neurotherapeutics 10(4) (2013) 782-788.
- [12] W.J. Streit, R.E. Mrak, W.S.T. Griffin, Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective, Journal of Neuroinflammation 1 (2004).
- [13] C.L. Mayer, B.R. Huber, E. Peskind, Traumatic Brain Injury, Neuroinflammation, and Post-Traumatic Headaches, Headache 53(9) (2013) 1523-1530.
- [14] G. Ramesh, A.G. MacLean, M.T. Philipp, Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain, Mediators of Inflammation (2013).
- [15] S.G. da Silva, P.S. Rodrigues Simoes, R.A. Mortara, F.A. Scorza, E.A. Cavalheiro, M.d.G. Naffah-Mazzacoratti, R.M. Arida, Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats, Journal of Neuroinflammation 10 (2013).
- [16] R.A. Kohman, T.K. Bhattacharya, E. Wojcik, J.S. Rhodes, Exercise reduces activation of microglia isolated from hippocampus and brain of aged mice, Journal of Neuroinflammation 10 (2013).
- [17] M.A. Lynch, Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function, Frontiers in Aging Neuroscience 1 (2010).

- [18] M.A. Meraz-Rios, D. Toral-Rios, D. Franco-Bocanegra, J. Villeda-Hernandez, V. Campos-Pena, Inflammatory process in Alzheimer's Disease, *Frontiers in integrative neuroscience* 7 (2013) 59-59.
- [19] T.C. Frank-Cannon, L.T. Alto, F.E. McAlpine, M.G. Tansey, Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?, *Molecular Neurodegeneration* 4 (2009).
- [20] Y.Y. Wu, J.L. Hsu, H.C. Wang, S.J. Wu, C.J. Hong, I.H.J. Cheng, Alterations of the Neuroinflammatory Markers IL-6 and TRAIL in Alzheimer's Disease, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra* 5(3) (2015) 424-434.
- [21] M.L.S.S. Gonçalves, Métodos Instrumentais para Análise de Soluções, Fundação Calouste Gulbenkian - 3ª ed.1996.
- [22] R. Kapoor, C.-W. Wang, Highly specific detection of interleukin-6 (IL-6) protein using combination tapered fiber-optic biosensor dip-probe, *Biosensors & Bioelectronics* 24(8) (2009) 2696-2701.
- [23] C.W. Wang, U. Manne, V.B. Reddy, R. Kapoor, Quantitative Estimation of IL-6 in Serum/Plasma Samples Using a Rapid and Cost-Effective Fiber-Optic dip-probe, *Conference on Optical Fibers and Sensors for Medical Diagnostics and Treatment Applications X*, San Francisco, CA, 2010.
- [24] B. Gregory, R. Savino, G. Ciliberto, A fast and sensitive colorimetric assay for IL-6 in Hepatoma-cells based on the production of a secreted form of alkaline-phosphate (SEAP), *Journal of Immunological Methods* 170(1) (1994) 47-56.
- [25] S. Manie, A. Proudfoot, B. Ferrua, Human Interleukin-6- Detection of 10 attomoles by colorimetric sandwich ELISA using Immunopurified polyclonal anti-IL-6 antibodies, *European Cytokine Network* 4(1) (1993) 51-56.
- [26] M. Ohno, T. Abe, Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and Interleukin-6 (IL-6), *Journal of Immunological Methods* 145(1-2) (1991) 199-203.
- [27] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1357 (2014) 36-52.
- [28] R.E. Frye, V.M. Schneider, C.S. Frye, A.M. Feldman, Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure, *Journal of Cardiac Failure* 8(5) (2002) 315-319.
- [29] D. Novick, H. Engelmann, D. Wallach, M. Rubinstein, Soluble cytokine-receptors are present in normal Human urine, *Physiological and Pathological Effects of Cytokines* 10 (1990) 413-421.
- [30] S.X. Wang, H.R. Jing, H.Y. Yang, Z.D. Liu, H. Guo, L.J. Chai, L.M. Hu, Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease, *Journal of Ethnopharmacology* 164 (2015) 247-255.
- [31] Interleukin 6 receptor refining method for e.g. reinforcing immuno:reaction|involves performing cation exchange chromatography and hydrophobic interaction chromatography, Tosoh Corp.
- [32] A.M. Williams, Method for obtaining pure human Interleukin-6|comprises 3-step purification method using chromatography techniques, Allelix Biopharmaceuticals Inc.

- [33] J. Gysler, M. Mazereeuw, B. Helk, M. Heitzmann, U. Jaehde, W. Schunack, U.R. Tjaden, J. van der Greef, Utility of isotachopheresis-capillary zone electrophoresis, mass spectrometry and high-performance size-exclusion chromatography for monitoring of interleukin-6 dimer formation, *Journal of Chromatography A* 841(1) (1999) 63-73.
- [34] K. Tsumoto, D. Ejima, K. Nagase, T. Arakawa, Arginine improves protein elution in hydrophobic interaction chromatography - The cases of human interleukin-6 and activin-A, *Journal of Chromatography A* 1154(1-2) (2007) 81-86.
- [35] I. Ojeda, M. Moreno-Guzman, A. Gonzalez-Cortes, P. Yanez-Sedeno, J.M. Pingarron, Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(25) (2014) 6363-6371.
- [36] E. Solary, M. Guiguet, V. Zeller, R.O. Casasnovas, D. Caillot, P. Chavanet, H. Guy, G. Mack, Radioimmunoassay for the measurement of serum IL-6 and its correlation with tumor-cell mass parameters in multiple-myeloma, *American Journal of Hematology* 39(3) (1992) 163-171.
- [37] S.J. Capper, G.A. Gordon, S. Kalinka, J.A. Symons, G.W. Duff, Radioimmunoassay of IL-6 - Application to culture samples and plasma, *Lymphokine Research* 9(4) (1990) 590-590.
- [38] C. Liu, Y. Wang, K. Zou, Y. Han, F. Yang, F. Liu, M. Gao, J. Shi, Z. Yang, New interleukin (IL)-6/sIL-6R combined molecular model establishing by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method in vitro, useful for screening medicine for blocking the IL-6/sIL-6R combination, *Univ Sanxia; Univ Three Gorges*.
- [39] T. Matsuda, T. Hirano, Establishment of the ELISA for murine soluble GP130, a signal transducer for the IL-6 family cytokine, and its detection in the ascitic fluids of tumor-bearing mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202(1) (1994) 637-642.
- [40] S.F. Orencole, M. Mirchevsky, L.A. Beausang, A sensitive and specific two-site sandwich ELISA for the detection of rat IL-6, *Faseb Journal* 13(5) (1999) A1148-A1148.
- [41] K. Martin, K. Viera, C. Petr, N. Marie, T. Eva, Simultaneous analysis of cytokines and costimulatory molecules concentrations by ELISA technique and of probabilities of measurable concentrations of interleukins IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, IL-13 occurring in plasma of healthy blood donors, *Mediators of Inflammation* (2006).
- [42] T.L. Wu, Y.C. Sun, C.C. Hung, P.Y. Chang, J.T. Wu, Development of an ELISA for serum IL-6 and determination of its serum level in healthy person and patients with type 2 diabetes, *Clinical Chemistry* 51 (2005) A72-A72.
- [43] Y. Man, X. Lv, J. Iqbal, G. Peng, D. Song, C. Zhang, Y. Deng, Microchip based and immunochromatographic strip assays for the visual detection of interleukin-6 and of tumor necrosis factor alpha using gold nanoparticles as labels, *Microchimica Acta* 182(3-4) (2015) 597-604.
- [44] M. Tsuneyasu, C. Sasakawa, N. Naruishi, Y. Tanaka, Y. Yoshida, K. Tawa, Sensitive detection of interleukin-6 on a plasmonic chip by grating-coupled surface-plasmon-field-enhanced fluorescence imaging, *Japanese Journal of Applied Physics* 53(6) (2014).
- [45] R.M.M. N. Masqué, F. Borrell, New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water., *Trends in Analytical Chemistry* 17 (1998) 384 - 394.

- [46] K.M. A. G. Mayes, Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?, *Trends in Analytical Chemistry* 16(321 - 332) (1997).
- [47] B. Uslu, S.A. Ozkan, Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments, *Analytical Letters* 44(16) (2011) 2644-2702.
- [48] S.A.O. B. Uslu, Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments, *Electrochemistry* 44 (2011) 2644 - 2702.
- [49] S.A. Ozkan, Principles and techniques of electroanalytical stripping methods for pharmaceutically active compounds in dosage forms and biological samples., *Current Pharmaceutical Analysis*. 5 (2009) 127 - 143.
- [50] G. Wang, H. Huang, G. Zhang, X. Zhang, B. Fang, L. Wang, Dual Amplification Strategy for the Fabrication of Highly Sensitive Interleukin-6 Amperometric Immunosensor Based on Poly-Dopamine, *Langmuir* 27(3) (2011) 1224-1231.
- [51] J. Peng, L.-N. Feng, Z.-J. Ren, L.-P. Jiang, J.-J. Zhu, Synthesis of Silver Nanoparticle-Hollow Titanium Phosphate Sphere Hybrid as a Label for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Human Interleukin-6, *Small* 7(20) (2011) 2921-2928.
- [52] T. Yang, S. Wang, H. Jin, W. Bao, S. Huang, J. Wang, An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen, *Sensors and Actuators B-Chemical* 178 (2013) 310-315.
- [53] Y. Lou, T. He, F. Jiang, J.-J. Shi, J.-J. Zhu, A competitive electrochemical immunosensor for the detection of human interleukin-6 based on the electrically heated carbon electrode and silver nanoparticles functionalized labels, *Talanta* 122 (2014) 135-139.
- [54] L. Wang, W. Wen, H. Xiong, X. Zhang, H. Gu, S. Wang, A novel amperometric biosensor for superoxide anion based on superoxide dismutase immobilized on gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid biocomposite film, *Analytica Chimica Acta* 758 (2013) 66-71.
- [55] Caridade, C. Isabel, M.G.B., Eléctrodos de filme de carbono – caracterização e aplicação em sensores e biossensores eletroquímicos, Tese de Douturamento em Electroquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2008.
- [56] Souza, Djenaine, S.A.S.A. Machado, Luis A., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos, *Química Nova*, 2003, pp. 81-89.
- [57] S. Rodriguez-Mozaz, M.P. Marco, M.J.L. de Alda, D. Barcelo, Biosensors for environmental applications: Future development trends, *Pure and Applied Chemistry* 76(4) (2004) 723-752.
- [58] D.P. Addy, T.D. Gehman, M.H. Rashid, Ieee, *Bioelectronics: Biosensors*, 2011 Ieee Industry Applications Society Annual Meeting (Ias) (2011).
- [59] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, *Current Issues in Molecular Biology* 10 (2008) 1-12.
- [60] M. Pohanka, P. Skladai, Electrochemical biosensors - principles and applications, *Journal of Applied Biomedicine* 6(2) (2008) 57-64.
- [61] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, G. Palleschi, Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring, *Biosensors & Bioelectronics* 21(8) (2006) 1405-1423.

- [62] U. Jarocka, R. Sawicka, A. Gora-Sochacka, A. Sirko, W. Dehaen, J. Radecki, H. Radecka, An electrochemical immunosensor based on a 4,4'-thiobisbenzenethiol self-assembled monolayer for the detection of hemagglutinin from avian influenza virus H5N1, *Sensors and Actuators B-Chemical* 228 (2016) 25-30.
- [63] K. Liang, W. Mu, M. Huang, Z. Yu, Q. Lai, Interdigitated Conductometric immunosensor for determination of interleukin-6 in humans based on dendrimer G4 and colloidal gold modified composite film, *Electroanalysis* 18(15) (2006) 1505-1510.
- [64] J. Pan, Direct and rapid monitoring the biochemical reaction of interleukin-6 in human using a flow-injection capacitive immunosensor in clinical immunoassay (Retracted article. See vol. 129, pg. 991, 2008), *Sensors and Actuators B-Chemical* 125(2) (2007) 517-525.
- [65] G.A. Messina, N.V. Panini, N.A. Martinez, J. Raba, Microfluidic immunosensor design for the quantification of interleukin-6 in human serum samples, *Analytical Biochemistry* 380(2) (2008) 262-267.
- [66] C. Deng, F. Qu, H. Sun, M. Yang, Sensitive electrochemical immunosensor based on enlarged and surface charged gold nanoparticles mediated electron transfer, *Sensors and Actuators B-Chemical* 160(1) (2011) 471-474.
- [67] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, Aptamer-based biosensors, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27(2) (2008) 108-117.
- [68] J. Spadavecchia, M.G. Manera, F. Quaranta, P. Siciliano, R. Rella, Surface plasmon resonance imaging of DNA based biosensors for potential applications in food analysis, *Biosensors & Bioelectronics* 21(6) (2005) 894-900.
- [69] X.F. Wang, U.J. Krull, Tethered thiazole orange intercalating dye for development of fibre-optic nucleic acid biosensors, *Analytica Chimica Acta* 470(1) (2002) 57-70.
- [70] J. Xu, H. Li, Z.-S. Wu, J. Qian, C. Xue, L. Jia, Double-stem Hairpin Probe and Ultrasensitive Colorimetric Detection of Cancer-related Nucleic Acids, *Theranostics* 6(3) (2016) 318-27.
- [71] A. Langer, M. Schraeml, R. Strasser, H. Daub, T. Myers, D. Heindl, U. Rant, Polymerase/DNA interactions and enzymatic activity: multi-parameter analysis with electro-switchable biosurfaces, *Scientific Reports* 5 (2015).
- [72] A.G. Mayes, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 16(6) (1997) 321-332.
- [73] F.T.C. Moreira, R.A.F. Dutra, J.P.C. Noronha, A.L. Cunha, M.G.F. Sales, Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces, *Biosensors & Bioelectronics* 28(1) (2011) 243-250.
- [74] F.T.C. Moreira, V.A.P. Freitas, M.G.F. Sales, Biomimetic norfloxacin sensors made of molecularly-imprinted materials for potentiometric transduction, *Microchimica Acta* 172(1-2) (2011) 15-23.
- [75] Y. Lv, T. Tan, F. Svec, Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules, *Biotechnology Advances* 31(8) (2013) 1172-1186.
- [76] K. Haupt, Molecularly imprinted polymers as recognition elements in sensors, *Ultrathin Electrochemical Chemo- and Biosensors: Technology and Performance* 2 (2004) 23-39.

- [77] F.T.C. Moreira, S. Sharma, R.A.F. Dutra, J.P.C. Noronha, A.E.G. Cass, M.G.F. Sales, Smart plastic antibody material (SPAM) tailored on disposable screen printed electrodes for protein recognition: Application to myoglobin detection, *Biosensors & Bioelectronics* 45 (2013) 237-244.
- [78] A. Bossi, F. Bonini, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art, *Biosensors & Bioelectronics* 22(6) (2007) 1131-1137.
- [79] F. Bonini, S. Piletsky, A.P.F. Turner, A. Speghini, A. Bossi, Surface imprinted beads for the recognition of human serum albumin, *Biosensors & Bioelectronics* 22(9-10) (2007) 2322-2328.
- [80] S.K. Mishra, A.K. Srivastava, D. Kumar, Rajesh, Bio-functionalized Pt nanoparticles based electrochemical impedance immunosensor for human cardiac myoglobin, *Rsc Advances* 4(41) (2014) 21267-21276.
- [81] S.A. A. Merkoçi, New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 717 - 725.
- [82] H.S. F. Qiao, H. Yan, et al, Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction, *Chromatographia* 64 (2006) 625 - 634.
- [83] R.A.F.D. F. T. C. Moreira, J. P. C. Noronha, et al, Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces, *Biosensors and Bioelectronics* 28 (2011) 243– 250.
- [84] Z.Z. Y. Wang, V. Jain, et al, Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses, *Sensors and Actuators B: Chemical* 146 (2010) 381 - 387.
- [85] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia* 8(2) (2012).
- [86] L. Uzun, A.P.F. Turner, Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential, *Biosensors & Bioelectronics* 76 (2016) 131-144.
- [87] Protein Page:IL-6 (human).<<http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=18622&showAllSites=true>>, (accessed Novembro.2016).