



## Desenvolvimento de um sensor ótico biomimético para a deteção da proteína CA19-9

ANA XU  
outubro de 2024

# **Desenvolvimento de um sensor ótico biomimético para a deteção da proteína CA19-9**

**Ana Xu**

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

**Orientador: Professora Doutora Maria Arcelina Marques**

**Coorientador: Doutora Ana Margarida Piloto Cerqueira**

**Júri:**

Presidente:

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

Vogais:

José Adolfo Ribeiro, Investigador, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Maria Arcelina Marques, Professor Coordenador, Instituto Superior de Engenharia do Porto



## Resumo

A doença oncológica, nas últimas décadas, tem demonstrado uma tendência crescente, tornando-se num problema de saúde pública. Um dos pontos principais para um melhor prognóstico consiste na deteção precoce do cancro, contudo quando estes são assintomáticos, como o cancro do pâncreas, a deteção, muitas vezes, é tardia, deixando passar uma oportunidade para tratamento que seria importante. Esta deteção tardia traduz-se na alta taxa de mortalidade dos pacientes com cancro do pâncreas. Para colmatar esta lacuna foram desenvolvidas novas técnicas de deteção, como o desenvolvimento de sensores biomiméticos para biomarcadores, como o antígeno de carboidrato 19-9 (CA19-9, do inglês, *Carbohydrate antigen 19-9*).

O sensor biomimético foi criado pela técnica de impressão de superfície, criando um polímero molecularmente impresso (MIPs, do inglês, *molecularly imprinted polymers*), associado a pontos quânticos (QDs, do inglês, *quantum dots*) (MIP@QDs).

O sensor desenvolvido ao longo deste projeto demonstrou sensibilidade e especificidade na deteção do biomarcador do cancro do pâncreas, CA19-9, em solução. Perante a boa resposta do sensor em solução, durante este trabalho, foi realizado, ainda, um estudo em suporte sólido, em que também mostrou uma boa resposta aquando da presença do analito. Os estudos em membrana, visam testar a produção de um sensor que possa ser portátil, eficaz e sensível para chegar às diversas regiões do mundo, permitindo o acesso à saúde, promovendo a deteção precoce e um tratamento mais eficaz.

**Palavras-chave:** Cancro do pâncreas, proteína CA19-9, impressão de superfície, MIP@QDs, sensor biomimético



## Abstract

Over the past few decades, cancer has been on the rise, becoming a public health problem. One of the main points for a better prognosis is the early detection of cancer, but when cancers are asymptomatic, such as pancreatic cancer, detection is often late, missing an important opportunity for treatment. This late detection is reflected in the high mortality rate of pancreatic cancer patients. To bridge this gap, new detection techniques have been developed, such as the development of biomimetic sensors for biomarkers such as carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9).

The biomimetic sensor was created using the surface imprinting technique, creating a molecularly imprinted polymer (MIPs) associated with quantum dots (QDs) (MIP@QDs).

The sensor developed during this project showed sensitivity and specificity in detecting the pancreatic cancer biomarker CA19-9 in solution. Given the good response of the sensor in solution, during this work, a study was also carried out on solid support, which also showed a good response in the presence of the analyte. The membrane studies aim to test the production of a sensor that can be portable, effective and sensitive so that it can reach different regions of the world, allowing access to health, promoting early detection and more effective treatment.

**Keywords:** biomimetic sensor, CA19-9 protein, MIP@QDs, Pancreatic cancer, surface imprinting



## Agradecimentos

Ao longo desta dissertação, são várias as pessoas a quem tenho de agradecer.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, **Professora Doutora Maria Arcelina Marques**, pela prontidão com que aceitou integrar neste projeto, pelo voto de confiança no meu trabalho e pela sua disponibilidade.

Em segundo lugar, um agradecimento especial à minha coorientadora, **Doutora Margarida Cerqueira**, pela sua enorme dedicação, prontidão, preocupação e por todas as oportunidades que me proporcionou para o meu desenvolvimento na prática laboratorial e na partilha constante de conhecimentos.

Em terceiro lugar, um enorme agradecimento à **Daniela Oliveira** por todo o seu apoio, dedicação e amizade. E à **Eduarda Rodrigues** por todo o seu suporte e companheirismo.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à **Doutora Felismina** e a toda **equipa do LabRISE** pela simpatia e acolhimento.



# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Contextualização e Motivação	1
1.2	Objetivos	2
1.3	Estrutura do trabalho	2
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica</b>	<b>5</b>
2.1	Doenças oncológicas	5
2.2	Cancro pancreático	6
2.2.1	Biomarcadores	9
2.3	Biossensores	11
2.3.1	Transdução do sinal	12
2.3.2	Elementos de (bio)reconhecimento	13
2.3.3	Sensores Biomiméticos	14
2.4	Revisão da literatura de (bio)sensores óticos para a deteção de CA19-9	24
2.5	Nanomateriais	25
2.5.1	Metodologia de síntese	26
2.5.2	Pontos quânticos - QDs	28
2.6	Luminescência	31
2.6.1	Transições eletrónicas	33
2.6.2	Desvio de Stokes	34
2.6.3	Fluorescência em estado estacionário	35
<b>3</b>	<b>Parte experimental</b>	<b>39</b>
3.1	Materiais e Equipamentos	39
3.2	Metodologias	41
3.2.1	Síntese dos pontos quânticos	41
3.2.2	Síntese de MIP@QDs	42
3.2.3	Imobilização de MIP@QDs em suporte sólido	43
3.2.4	Deteção da CA19-9	43
3.2.5	Estudos de reprodutibilidade	44
3.2.6	Estudos de seletividade	44
3.3	Técnicas de caracterização	44
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>47</b>
4.1	Síntese de QDs e MIP@QDs	47
4.2	Imobilização do material biomimético em suporte sólido	51
4.3	Técnicas de caracterização	52
4.3.1	Análises por espectroscopia UV-vis	52
4.3.2	Análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	53
4.3.3	Análises SEM e EDS	54

4.3.4	Microscopia de fluorescência de campo amplo .....	55
4.4	Desempenho analítico em solução.....	56
4.4.1	Calibrações em PBS .....	56
4.4.2	Estudos de seletividade .....	58
4.4.3	Calibrações em soro humano .....	59
4.4.4	Estudos de reprodutibilidade .....	61
4.5	Desempenho analítico em suporte sólido.....	62
4.5.1	Calibrações em PBS .....	62
4.5.2	Calibrações em soro humano .....	62
<b>5</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>65</b>
5.1	Conclusões finais .....	65
5.2	Perspetivas futuras .....	66
	<b>Referências.....</b>	<b>67</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>81</b>
	Anexo A - Estudo da interação dos QDs com a proteína CA19-9 em função do tempo de incubação .....	81
	Anexo B - Otimização das melhores condições de polimerização .....	82
	Anexo C - Síntese e estabilidade do sensor biomimético em PBS, pH 5,8.....	84
	Anexo D - Síntese e avaliação do desempenho analítico do MIP@QDs com uma concentração de impressão mais elevada de proteína (10 kU mL <sup>-1</sup> ). .....	85

## Lista de Figuras

Figura 1 – Representação geral das estatísticas de neoplasia (PC) em 2022, incluindo a distribuição de novos casos, incidência regional e mortalidade por sexo. (A) Novos casos globais de neoplasia (PC) (510,992 casos). (B) Distribuição da incidência do cancro do pâncreas por continente. (C) Mortalidade por sexo, maior em homens (247,589) do que em mulheres (219,820), retirado de [3].	7
Figura 2 – Ilustração do pâncreas. É um órgão glandular com cerca de 15-20 cm, localizado na parte superior esquerda do abdómen dividido em cabeça, corpo e cauda, retirado de [23].	8
Figura 3 – Representação esquemática de um biossensor.	12
Figura 4 – Ilustração do processo de formação de polímeros molecularmente impressos.	15
Figura 5 – Fórmulas estruturais de agentes de reticulação comumente utilizados na fabricação de MIPs, adaptado de [78].	18
Figura 6 – Fórmulas estruturais de iniciadores comumente utilizados na fabricação de MIPs, adaptado de [78,87].	19
Figura 7 – Ilustração simples dos mecanismos cinéticos envolvidos na FRP.	22
Figura 8 – Escala dos nanomateriais, retirado de [102].	26
Figura 9 – Diagrama dos métodos de produção de nanomateriais <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> , retirado de [105].	27
Figura 10 – Ilustração do efeito de confinamento quântico, retirado de [116].	30
Figura 11 – Processos de desativação de uma molécula excitada, adaptado de [122].	33
Figura 12 – Diagrama Perrin-Jablonski com exemplos dos vários mecanismos de absorção e desexcitação. $S_0$ , $S_1$ e $S_2$ – estados eletrônicos singletos; $T_1$ e $T_2$ – estados eletrônicos tripleto; IC – conversão interna; ISC – cruzamento intersistemas, adaptado de [123].	34
Figura 13 – Representação do desvio de Stokes, adaptado de [122].	35
Figura 14 – Espectrômetro de fluorescência Lumina (Thermo Scientific).	40
Figura 15 – Ilustração da síntese dos QDs.	41
Figura 16 – Representação esquemática das etapas de construção do sensor biomimético para a detecção da proteína CA19-9: (1) Incubação da proteína CA19-9 com os QDs; (2) Polimerização da mistura reacional contendo o monómero e a molécula alvo; (3) Remoção da proteína CA19-9 da matriz polimérica, criando cavidades específicas; (4) Reconhecimento e religação específica da proteína CA19-9 à superfície do MIP@QDs.	42
Figura 17 – Ilustração das fases de construção do sensor biomimético em suporte sólido. Imobilização da solução MIP@QDs em membrana de <i>nylon</i> utilizando um sistema de filtração a vácuo, seguida pela incubação com diferentes concentrações de CA19-9 e medição do sinal.	43
Figura 18 – Representação das medições dos espectros de emissão de fluorescência obtidas nas diferentes fases da síntese dos MIP@QDs e NIP@QDs. Na imagem A, são apresentados os espectros de fluorescência dos QDs livres e após a polimerização dos MIP@QDs e dos NIP@QDs. A imagem B corresponde aos resultados obtidos após remoção da molécula alvo com CBB.	49
Figura 19 – Estabilidade dos QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs dispersos em PBS ao longo de 1, 7 e 14 dias, mostrando as diferenças na estabilidade dos materiais.	50

Figura 20 – Imobilização dos QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs na membrana de <i>nylon</i> . Na parte superior a membrana visualizada a olho nu, e na parte inferior sob a lâmpada UV. ....	51
Figura 21 – Espectros UV-vis obtidos durante a síntese dos MIP@QDs e NIP@QDs, e espectro de absorção UV-vis de uma solução da proteína CA19-9 em PBS 10 mM, pH 7,4. ....	52
Figura 22 – Espectros FTIR de amostras de QDs livres (linha vermelha), proteína CA19-9 (linha azul), MIP@QDs (linha roxo) e NIP@QDs (linha verde) após o tratamento com CBB.....	53
Figura 23 – Análise SEM e EDS das membranas de <i>nylon</i> preparadas: (A) Membrana de <i>nylon</i> sem modificação; (B) Membrana de <i>nylon</i> com NIP@QDs imobilizados; (C) Membrana de <i>nylon</i> com MIP@QDs imobilizados. ....	54
Figura 24 – Imagens de microscopia de campo amplo adquiridas em diferentes planos z da superfície das membranas <i>nylon</i> impressas com os MIP@QDs após remoção da proteína. O sinal de emissão dos QDs é apresentado utilizando uma "Lookup Table" (LUT) amarela.....	55
Figura 25 – Medições dos espectros de emissão de fluorescência com concentrações crescentes de CA19-9 em QDs livres (A), NIP@QDs (C) e MIP@QDs (E) preparadas em tampão PBS a pH 7,4. As imagens (B), (D) e (F) mostram a curva de calibração da resposta da intensidade relativa em função da concentração logarítmica de CA19-9 para QDs livres, NIP@QDs e MIP@QDs, respetivamente. ....	57
Figura 26 – Medições dos espectros de emissão de fluorescência obtidos para uma solução única de CA19-9, em comparação com soluções de espécies interferentes (MMP7, CREA e HSA) preparadas na presença de CA19-9 (A) ou ausência de CA19-9 (B).....	59
Figura 27 – Espectros de emissão de fluorescência com concentrações crescentes de CA19-9 em QDs livres (A), NIP@QDs (C) e MIP@QDs (E) preparadas em soro humano diluído. As imagens (B), (D) e (F) mostram a curva de calibração da resposta da intensidade relativa em função da concentração logarítmica de CA19-9 para QDs livres, NIP@QDs e MIP@QDs, respetivamente. ....	60
Figura 28 – Fotografias das calibrações das membranas em PBS para NIP@QDs (A) e MIP@QDs (B), com as respetivas curvas de calibração baseadas na intensidade da cor verde do <i>RGB</i> da aplicação do dispositivo móvel.....	62
Figura 29 – Fotografias das calibrações das membranas em soro humano diluído para NIP@QDs (A) e MIP@QDs (B), com as respetivas curvas de calibração baseadas na intensidade da cor verde do <i>RGB</i> da aplicação móvel. ....	63

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Moléculas alvo tipicamente aplicadas na síntese de MIP, adaptado de [78]. .....	17
Tabela 2 – Comparação de vários procedimentos de síntese e métodos de impressão de MIP, adaptado de [78,87].....	20
Tabela 3 – Diferentes (bio)sensores óticos relatados na literatura para a detecção de CA19-9. 25	
Tabela 4 – Tipos de luminescência e o modo de excitação respectivo, adaptado de [122]. .....	32
Tabela 5 – Tempos específicos dos processos de absorção e de desexcitação, adaptado de [124]. .....	34
Tabela 6 – Lista de reagentes utilizados e a respetiva origem comercial.....	40
Tabela 7 – Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, $k_{sv}$ e IF, para as calibrações dos QDs livres de emissão no amarelo, dos MIP@QDs e dos NIP@QDs, com concentrações crescentes de CA19-9 no intervalo de [3,96-5200] mU mL <sup>-1</sup> , em PBS 10 mM pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. ....	58
Tabela 8 – Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD, $k_{sv}$ e IF, para as calibrações dos QDs livres de emissão no amarelo, dos MIP@QDs e dos NIP@QDs, com padrões de CA19-9 no intervalo [0,0396-52] mU mL <sup>-1</sup> em soro humano diluído em PBS 10 mM pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente. ....	61
Tabela 9 – Estudos de reprodutibilidade com as taxas de recuperação e os correspondentes RSD (%), para três dopagens com padrões de CA19-9 em soro humano diluído. ....	61



# Acrónimos

## Lista de Acrónimos

<b>3-MPA</b>	<i>3-mercaptopropionic acid</i>
<b>AAm</b>	Acrilamida
<b>ACID</b>	Ácido 4,4'-azo(4-cianoaléxico)
<b>ADV N</b>	Azobisdimetilvaleronitrila
<b>AEMH.HCl</b>	Aminoetil-2 metacrilato hidrocloreto
<b>AIBN</b>	Azobisisobutironitrila
<b>APS</b>	<i>Ammonium persulfate</i>
<b>ATR</b>	<i>Attenuated total reflectance</i>
<b>ATRP</b>	<i>Atom transfer radical polymerization</i>
<b>CA125</b>	<i>Carbohydrate antigen 125</i>
<b>CA19-9</b>	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
<b>CA242</b>	<i>Carbohydrate antigen 242</i>
<b>CA72-4</b>	<i>Carbohydrate Antigen 72-4</i>
<b>CBB</b>	<i>Carbonate-bicarbonate buffer</i>
<b>CdS</b>	<i>Cadmium sulphide</i>
<b>CDs</b>	<i>Carbon dots</i>
<b>CdSe</b>	<i>Cadmium selenide</i>
<b>CdTe</b>	<i>Cadmium telluride</i>
<b>CdTe@QDs</b>	<i>Cadmium telluride quantum dots</i>
<b>CEA</b>	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
<b>CP</b>	Cancro pancreático
<b>CQDs</b>	<i>Carbon quantum dots</i>
<b>CRP</b>	<i>Controlled radical polymerization</i>

<b>CTA</b>	<i>Chain transfer agent</i>
<b>CVD</b>	<i>Chemical vapour deposition</i>
<b>CYS</b>	<i>Cysteine</i>
<b>DMF</b>	<i>N, N-dimetilformamida</i>
<b>EDS</b>	<i>Energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
<b>EGDMA</b>	<i>Ethylene glycol dimethacrylate</i>
<b>FRP</b>	<i>Free radical polymerization</i>
<b>FTIR</b>	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
<b>GSH</b>	<i>Glutathione</i>
<b>HSA</b>	<i>Human Serum Albumin</i>
<b>IF</b>	<i>Imprinting factor</i>
<b>LOD</b>	<i>Limit of detection</i>
<b>LSPR</b>	<i>Localized surface plasmon resonance</i>
<b>MAA</b>	<i>Methacrylic acid</i>
<b>MBAm</b>	<i>N,N'-metilenobis(acrilamida)</i>
<b>MIPs</b>	<i>Molecularly imprinted polymers</i>
<b>MMP7</b>	<i>Matrix Metalloproteinase 7</i>
<b>NIPs</b>	<i>Non-imprinted polymers</i>
<b>OMS</b>	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PET</b>	<i>Positron emission tomography</i>
<b>PoCTs</b>	<i>Point of care tests</i>
<b>POSTN</b>	<i>Periostin</i>
<b>QDs</b>	<i>Quantum Dots</i>
<b>RAFT</b>	<i>Reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
<b>RM</b>	<i>Ressonância magnética</i>

<b>RSD</b>	<i>Relative standard deviation</i>
<b>SEM</b>	<i>Scanning electronic microscopy</i>
<b>SERS</b>	<i>Surface enhanced Raman spectroscopy</i>
<b>SPR</b>	<i>Surface plasmon resonance</i>
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TGA</b>	<i>Thioglycolic acid</i>
<b>THF</b>	Tetrahidofurano
<b>US</b>	Ultrasonografia
<b>UV-Vis</b>	<i>Ultraviolet-visible</i>
<b>ZnS</b>	<i>Zinc sulphide</i>



# 1 Introdução

No presente capítulo será apresentada uma breve introdução à problemática e respetiva importância na deteção precoce do cancro do pâncreas. De seguida, serão descritos os principais objetivos deste estudo e a metodologia adotada. Por último, é indicada a estrutura utilizada no trabalho.

## 1.1 Contextualização e Motivação

O cancro do pâncreas (CP) é uma neoplasia maligna com origem nas células do pâncreas, um órgão glandular que produz hormonas que regulam os níveis de glicose no sangue e enzimas que auxiliam na digestão [1]. Esta doença caracteriza-se pela proliferação rápida e de ser assintomática, o que dificulta o diagnóstico precoce [2].

Segundo o Global Cancer Today, em 2022, o cancro pancreático correspondia à sexta causa de morte por cancro a nível global, sendo responsável mundialmente por cerca de 467.409 mortes por ano, das quais 138.644 na Europa, com uma taxa de sobrevivência média de 6 meses [3].

Neste contexto, a investigação destinada à deteção de biomarcadores do cancro, como a CA19-9, é extremamente importante devido à incidência crescente de doenças oncológicas, nomeadamente o cancro do pâncreas e à necessidade de métodos de acompanhamento mais sensíveis, fáceis e económicos [4].

A CA19-9 é um marcador tumoral associado ao cancro do pâncreas, que é frequentemente detetado em fases avançadas, deste modo as alterações consecutivas dos seus níveis permitem obter informações úteis para a monitorização em pacientes com o CP. Por conseguinte, a deteção precoce e a monitorização são cruciais para melhorar os resultados clínicos e a sobrevivência dos doentes [5].

Como solução inovadora, surgiu o tópico da deteção de biomarcadores utilizando MIPs e pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe@QDs, do inglês, *Cadmium telluride quantum dots*) [6,7].

Os MIPs são concebidos para reconhecer especificamente moléculas alvo, oferecendo uma elevada seletividade e sensibilidade [8]. A combinação de MIPs com QDs, que apresentam propriedades óticas únicas, permitem a criação de sistemas de deteção que podem ser utilizados em testes no local de prestação de cuidados (PoCTs, do inglês, *Point of care tests*), tornando a monitorização mais acessível e rápida [9].

## 1.2 Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo o desenvolvimento de um sensor ótico biomimético para monitorizar o cancro do pâncreas de forma rápida, seletiva, económica, simples e não invasiva.

Primeiramente, é desenvolvido um sensor biomimético para a CA19-9, um biomarcador associado ao CP, utilizando a seguinte metodologia:

- Combinação de polímeros utilizando a técnica de impressão molecular com a incorporação de QDs, visando a criação de cavidades específicas para o reconhecimento seletivo da proteína CA19-9.
- Avaliação do desempenho analítico do sensor em amostras de soro humano liofilizado diluído.

Posteriormente, o sensor é caracterizado a nível químico e morfológico utilizando espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-Vis, do inglês, *Ultraviolet-visible*), microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês, *Scanning electronic microscopy*), espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) e microscopia de fluorescência de campo amplo. Após a caracterização, são efetuados testes em solução, analisando as amostras por espectrometria de fluorescência. Nesta fase, é estudada a sensibilidade do sensor sintetizado.

Na fase final do projeto, o objetivo é desenvolver um sensor biomimético portátil. Para isso, o sensor será incorporado em um suporte sólido, utilizando membranas de *nylon*. Além disso, serão realizados estudos detalhados do desempenho analítico para avaliar a eficiência do sensor biomimético.

## 1.3 Estrutura do trabalho

Este documento está organizado em cinco capítulos, descrevendo o desenvolvimento de um sensor ótico biomimético para monitorização do cancro do pâncreas.

A dissertação inicia-se no Capítulo 1, onde é apresentada a relevância do trabalho desenvolvido, incluindo uma breve introdução, os principais objetivos e a organização estrutural do presente

documento. No Capítulo 2, são abordados os conceitos teóricos fundamentais e realizada uma revisão da literatura. Este capítulo começa com uma introdução concisa às doenças oncológicas, com destaque para o cancro do pâncreas e o biomarcador CA19-9, que constitui o alvo do sensor biomimético desenvolvido neste projeto. Seguidamente, o capítulo explora o papel dos sensores óticos na monitorização do cancro, com uma discussão sobre o método utilizado para a transdução do sinal. É também detalhada a síntese de materiais para elementos de (bio)reconhecimento, com ênfase na aplicação da tecnologia de impressão molecular. No Capítulo 3, são descritos de forma detalhada todos os aspetos experimentais relacionados com a preparação do sensor biomimético ótico e as metodologias de caracterização, incluindo a apresentação dos materiais e equipamentos utilizados, bem como, os reagentes e procedimentos específicos necessários para o processo. O Capítulo 4 apresenta os resultados experimentais obtidos no desenvolvimento do sensor ótico, com foco na sua construção e avaliação do desempenho analítico. Finalmente, o Capítulo 5 sintetiza as conclusões retiradas do estudo, identificando as suas limitações e explorando possíveis perspetivas futuras para o desenvolvimento de um sensor biomimético comercial.



## 2 Revisão bibliográfica

Ao longo deste capítulo será realizada uma revisão da literatura sobre os principais temas a desenvolver deste trabalho. Numa primeira fase será abordada a problemática da doença oncológica, nomeadamente o CP, seguindo-se possíveis métodos de deteção. Esta secção irá ainda conter assuntos como MIPs e nanomateriais.

### 2.1 Doenças oncológicas

Nas últimas décadas, o cancro atingiu uma dimensão crescente, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial. Atualmente, é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes por ano [10].

De acordo com a National Cancer Institute, o cancro é definido como “uma doença em que algumas células do corpo apresentam um crescimento descontrolado e se espalham para outras partes do corpo” [11].

A evolução da doença oncológica, ou cancro, é um processo complexo que envolve uma série de alterações genéticas e epigenéticas nas células normais, levando à sua transformação em células tumorais [12]. Estas alterações podem ser provocadas por mutações nos genes que regulam o crescimento, a divisão e a morte celular [13]. Além disso, estas mutações podem ser hereditárias ou adquiridas ao longo da vida devido a fatores ambientais, tais como a exposição a agentes cancerígenos, radiações e hábitos de vida como o tabagismo e a alimentação [14–16].

Os tumores são constituídos por uma população diversificada de células, que podem apresentar características genéticas e fenotípicas distintas [17,18]. Esta heterogeneidade intratumoral pode levar à resistência do tratamento, uma vez que algumas células podem sobreviver a terapias que eliminam outras células tumorais. Além disso, o microambiente em torno do tumor, que inclui células imunitárias, fibroblastos e a matriz extracelular, desempenha um papel crucial no

crescimento e sobrevivência das células tumorais. Por conseguinte, as interações entre as células tumorais e o microambiente podem promover a progressão do cancro, permitindo que as células tumorais invadam tecidos adjacentes e se espalhem para outras partes do corpo, o que complica o tratamento e o prognóstico [19]. Assim sendo, a deteção precoce representa um verdadeiro desafio, uma vez que muitos tipos de cancro não apresentam sintomas significativos nas fases iniciais [20].

Após diagnóstico, os tratamentos disponíveis, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia podem ter efeitos secundários significativos e nem sempre são eficazes devido à resistência das células tumorais [12]. Estes fatores tornam o cancro uma das doenças mais desafiadoras da medicina moderna, exigindo uma abordagem multidisciplinar e uma investigação constante para desenvolver estratégias de tratamento mais personalizadas e eficazes.

## **2.2 Cancro pancreático**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2022 surgiram 510,992 novos casos (Figura 1A) e com uma maior incidência na Ásia contabilizando 232,537 casos (Figura 1B), correspondendo a 45,5 % das incidências totais no mundo. Apesar da neoplasia afetar ambos os sexos, a mortalidade é superior nos homens do que em mulheres, correspondendo a 247,589 e 219,820 de mortes, respetivamente (Figura 1C). E verifica-se que a taxa de mortalidade se aproxima à incidência [3].

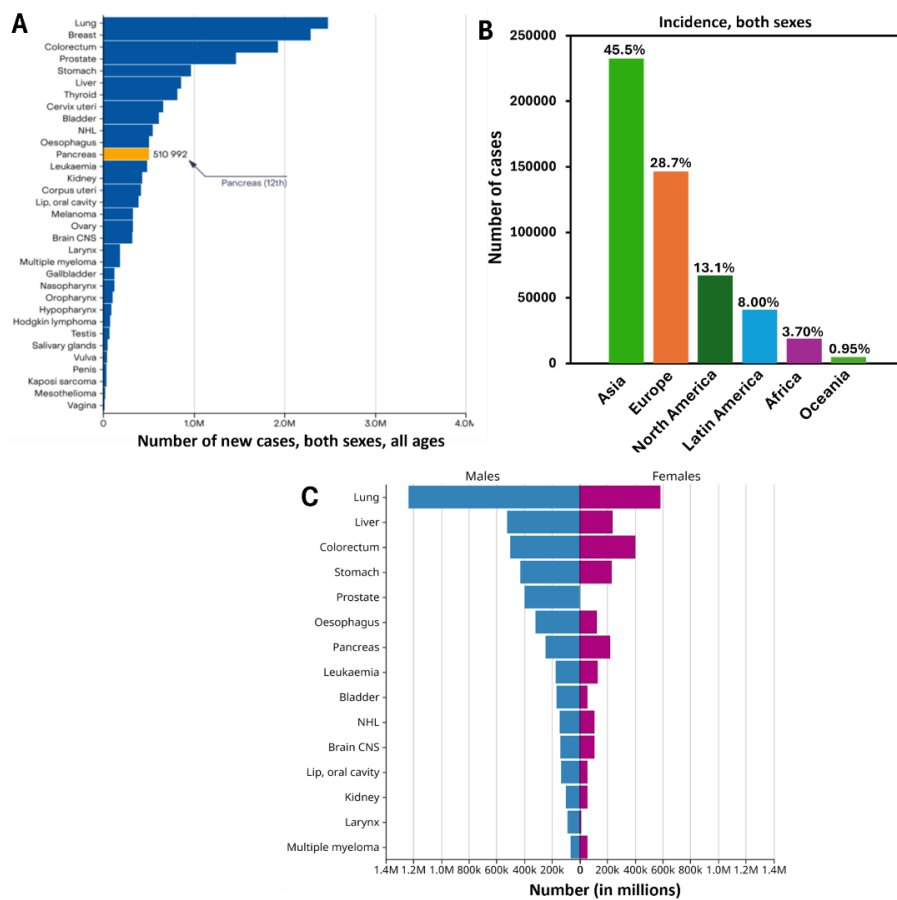


Figura 1 – Representação geral das estatísticas de neoplasia (PC) em 2022, incluindo a distribuição de novos casos, incidência regional e mortalidade por sexo. (A) Novos casos globais de neoplasia (PC) (510,992 casos). (B) Distribuição da incidência do cancro do pâncreas por continente. (C) Mortalidade por sexo, maior em homens (247,589) do que em mulheres (219,820), retirado de [3].

O pâncreas (Figura 2) é um órgão glandular localizado a nível retroperitoneal, na parte superior esquerda do abdómen [21]. É rodeado por outros órgãos, incluindo o intestino delgado, o fígado e o baço. Apresentando um aspeto esponjoso, com cerca de 15 a 20 cm de comprimento, e tem a forma de uma “pera achatada” ou de um peixe estendido horizontalmente sobre o abdómen. Este órgão é dividido em três secções, a parte mais larga designada a cabeça do pâncreas está localizada na junção entre o estômago e a parte inicial do intestino delgado; a região central é designada por corpo e a extremidade estreita é denominada por cauda e estende-se para o hemisfério esquerdo [22].

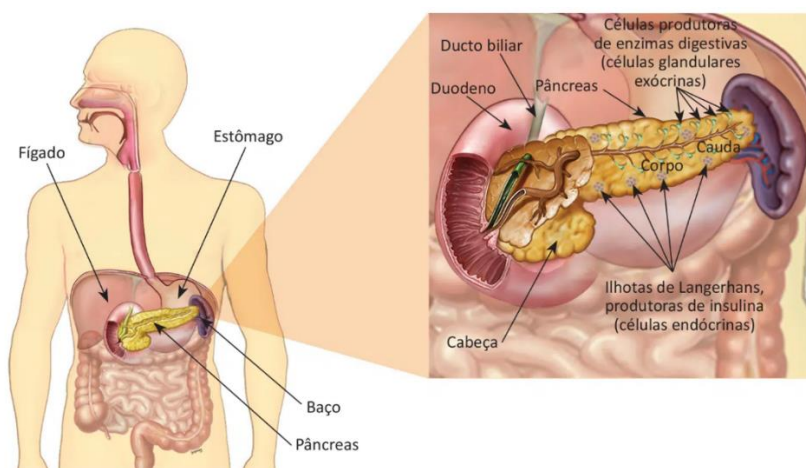


Figura 2 – Ilustração do pâncreas. É um órgão glandular com cerca de 15-20 cm, localizado na parte superior esquerda do abdômen dividido em cabeça, corpo e cauda, retirado de [23].

O pâncreas desempenha funções a nível exócrino e a endócrino [24]. A atividade exócrina do pâncreas é realizada por glândulas exócrinas que produzem enzimas importantes para a digestão, que incluem a tripsina e a quimotripsina para digerir as proteínas, a amilase para a decomposição dos hidratos de carbono e a lipase para decompor as gorduras. Ou seja, os sucos pancreáticos e a biliar são libertados no duodeno e auxiliam o organismo a digerir as gorduras, os hidratos de carbono e as proteínas. Por outro lado, a parte endócrina do pâncreas é constituída pelos ilhéus de Langerhans, que produzem e libertam hormonas importantes, diretamente na corrente sanguínea, como a insulina, responsável por baixar o nível de açúcar no sangue, e o glucagon por aumentar o nível de açúcar no sangue [21].

O cancro pancreático é um dos tipos de cancro mais mortais devido à ausência de sintomas nos estágios iniciais e à baixa precisão nos métodos de deteção, levando a diagnósticos, frequentemente, em fases avançadas e a uma taxa de sobrevivência de 5 anos inferior a 10 % [25]. A maioria dos CPs origina-se no pâncreas exócrino, com os adenocarcinomas ductais correspondendo a mais de 90 % dos casos, sendo mais sintomáticos quando localizados na cabeça do pâncreas [26]. Os tumores neuroendócrinos representam menos de 5 % dos casos e incluem subtipos como insulinomas, gastrinomas, glucagonomas e somatostatatomas, cada um associado à produção de hormonas específicas [27,28].

Os fatores de risco associados ao cancro do pâncreas incluem idade, sexo, hábitos alimentares (elevado consumo de gorduras saturadas, carnes vermelhas, carnes processadas e álcool), tabagismo, diabetes *mellitus* tipo II, obesidade, histórico familiar (cancro do pâncreas familiar, pancreatite hereditária, síndrome de Lynch, entre outros) e síndromes genéticas [29–34]. Os estudos indicam que os fumadores têm um risco duas a três vezes maior de desenvolver a doença em comparação com os não fumadores, possivelmente devido à nicotina, que se liga a recetores nas células do adenocarcinoma pancreático, estimulando a metástase e promovendo a resistência à quimioterapia e o risco aumenta em função da quantidade e duração do consumo do tabaco [35,36].

Para o diagnóstico do cancro pancreático, utilizam-se diversas técnicas que desempenham papéis cruciais na identificação da doença. Os testes laboratoriais, como análises de urina e sangue, são importantes para a deteção de anomalias. Além disso, recorre-se frequentemente a técnicas de imagiologia, incluindo tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM), tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês, *Positron emission tomography*), ultrassonografia (US) e radiografia. A confirmação definitiva do cancro é geralmente obtida através de uma biópsia [2,37].

No contexto do cancro do pâncreas, a biópsia é muitas vezes dificultada pela localização do órgão que impede a recolha de tecido para exame histológico. Deste modo, a confirmação do diagnóstico por histologia é baixa, destacando-se a necessidade de melhorar as estratégias de deteção mais fiáveis [38].

Além dos métodos tradicionais, é fundamental considerar a acessibilidade destas técnicas, especialmente para populações que vivem em áreas remotas ou com acesso limitado a instalações médicas avançadas. Para colmatar estas lacunas, tem havido um foco crescente no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico que sejam portáteis, rápidas, económicas e adequadas para utilização em locais com recursos limitados [39].

Os biossensores apresentam-se como uma solução promissora, pois permitem a deteção precoce de biomarcadores associados ao cancro de forma menos invasiva e a um custo mais reduzido em comparação com as técnicas tradicionais. A capacidade dos biossensores para realizar monitorizações frequentes e de baixo custo pode facilitar o rastreio precoce e a deteção de doenças antes de uma progressão significativa, melhorando potencialmente os resultados de tratamento e aumentando a taxa de sobrevivência dos pacientes [40].

Estas inovações procuram facilitar o diagnóstico, tornando-o mais acessível e eficiente, independentemente das condições de infraestrutura de saúde, contribuindo assim para uma melhor gestão do cancro pancreático.

### **2.2.1 Biomarcadores**

Os biomarcadores são definidos como características biológicas mensuráveis, possibilitando a diferenciação de processos biológicos normais de processos patogénicos, permitindo, ainda, avaliar respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica [41].

Com base nas suas aplicações clínicas, podem ser divididos em duas categorias principais: biomarcadores de exposição e biomarcadores de doença. Os biomarcadores de exposição são utilizados para prever o risco de desenvolvimento de patologias, recorrendo à medição da exposição a fatores ambientais ou comportamentais que possam estar associados à patogénese. Por outro lado, os biomarcadores são utilizados no diagnóstico, rastreio e monitorização da progressão da doença [42]. Capazes de serem detetados antes do aparecimento de sintomas, os biomarcadores têm desempenhado um papel cada vez mais relevante na deteção e monitorização precoce de doenças assintomáticas. Os sintomas do cancro do pâncreas

aparecem apenas em fase tardia, assim sendo, a sua deteção baseia-se na utilização em conjunto de vários biomarcadores que fornecem informações relevantes sobre a presença da doença, o seu estágio e as potenciais opções de tratamento. O diagnóstico e monitorização do CP tem por base alguns biomarcadores, sendo os principais: CA19-9, antigénio de carboidrato 72-4 (CA72-4, do inglês, *Carbohydrate antigen 72-4*), antigénio de carboidrato 125 (CA125, do inglês, *Carbohydrate antigen 125*), antigénio carcinoembrionário (CEA, do inglês, *Carcinoembryonic antigen*), antigénio de carboidrato 242 (CA242, do inglês, *Carbohydrate antigen 242*) e a metaloproteinase-7 da matrix extracelular (MMP7, do inglês, *Matrix Metalloproteinase 7*), entre outros [43].

### **2.2.1.1 Antigénio de carboidrato 19-9**

A CA19-9, também designado por Sialil Lewis-a, é uma glicoproteína de elevado peso molecular, cerca de 210 kDa [44], e está presente em níveis elevados no sangue de muitos doentes com cancro do pâncreas. Esta semelhança entre pacientes, torna esta proteína um dos biomarcadores mais utilizados no diagnóstico, prognóstico e monitorização desta doença [34,45–47].

A CA19-9 provém de uma via anómala para a produção de Disialil Lewis-a, que tem um resíduo de ácido siálico extra ligado através de uma ligação 2→6. Normalmente, o Disialil Lewis-a é expresso na superfície epitelial dos órgãos digestivos, atua como um ligando para monócitos e macrófagos e ajuda na vigilância imunitária. No entanto, no decurso da carcinogénese, o silenciamento epigenético do gene da 2→6 sialil transferase conduz a uma síntese anormal e à acumulação de Sialil Lewis-a, promovendo a formação de metástases hematogénicas. A expressão de CA19-9 relaciona-se com a presença da enzima 1,4-fucosiltransferase, que é codificada pelo gene de Lewis. E apenas se encontra presente em pacientes com grupos sanguíneos Lewis na forma de Le (a-b+) ou Le (a+b-) [48].

Em 1983, os investigadores Del Villano *et al.* avaliaram pela primeira vez a CA19-9 como um potencial biomarcador de cancro. Neste estudo utilizaram o valor fisiológico de 37 U mL<sup>-1</sup>, dado que esta concentração discriminava melhor os casos de doentes com cancro dos indivíduos normais ou de doentes com doenças benignas. Deste modo, este valor foi adotado para minimizar os resultados falsos positivos, otimizar o valor preditivo e a eficiência do ensaio [49]. Posteriormente, vários investigadores têm recorrido a este valor fisiológico quando se trata de utilizar a CA19-9 como meio auxiliar de diagnóstico de cancro, sendo que níveis superiores a 37 U mL<sup>-1</sup> indicam evolução tumoral [50,51]. A CA19-9 associada a outros biomarcadores, apresenta não só potencial de diagnóstico, mas também de monitorização [47,52–54].

O estudo de Yu *et al.* constatou que a deteção em simultâneo de CA19-9, CEA, CA125 e CA242 possibilita um diagnóstico e prognóstico mais sensível do cancro do pâncreas e apresenta uma sensibilidade de 90,4 % e uma especificidade de 93,8 % [55].

Noutra investigação, Dong *et al.* verificou que a combinação da CA19-9 com os biomarcadores periostina (POSTN, do inglês, *periostin*) e CA242, possibilitou obter resultados distintos para os

pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático e indivíduos saudáveis. Esta análise concomitante revelou uma sensibilidade de deteção de 92 % e especificidade de 97 % [56].

## 2.3 Biossensores

Os biossensores são componentes integrados da tecnologia moderna, representam um papel fundamental numa ampla gama de domínios, desde a automação industrial à biomedicina. Estes dispositivos são projetados para medir diretamente, de forma contínua e reversível, parâmetros físicos, concentrações químicas ou biomoléculas, fornecendo informações cruciais para monitorização, controlo e análise [57].

A evolução da tecnologia de sensores tem sido impulsionada pela necessidade de aumentar a precisão, a sensibilidade e a eficiência, conduzindo ao desenvolvimento de vários tipos de sensores, nomeadamente dos biossensores [58].

A investigação sobre biossensores foi iniciada por Clark e Lyons em 1962 com a síntese de um biossensor de glucose [59]. Na sequência desta descoberta, o interesse pela tecnologia dos biossensores tem vindo a aumentar em várias áreas, incluindo a deteção de contaminantes, a monitorização de doenças, a descoberta de fármacos e marcadores que indicam doenças nos fluidos corporais, tais como sangue, saliva, suor e urina [60].

Os biossensores consistem em pequenos dispositivos analíticos que permitem a deteção e quantificação de componentes biológicos denominados analitos (vários tipos de proteínas, enzimas ou anticorpos). A estrutura mais comum de um biossensor apresenta componentes como: um elemento de (bio)reconhecimento/(bio)recetor, um analito de interesse, uma estrutura de transdução de sinal e um componente de amplificação ou processamento (Figura 3) [61]. Ou seja, um analito, ou um grupo de analitos, é reconhecido pelo elemento de (bio)reconhecimento através da formação de complexos antigénio-anticorpo, enzima-substrato e anticorpos plásticos, seguidamente a interação dos complexos é detetado por um transdutor físico que converte num sinal elétrico, ótico ou térmico e por fim o sinal do transdutor é amplificado e processado por circuitos e/ou filtros [62]. A resposta do transdutor pode ser amplificada, processada e visualizada por um circuito, e de acordo com o sistema de transdução, destacam-se os biossensores eletroquímicos, acústicos (resposta piezoelétrica), óticos e colorimétricos como os mais comuns [63,64].

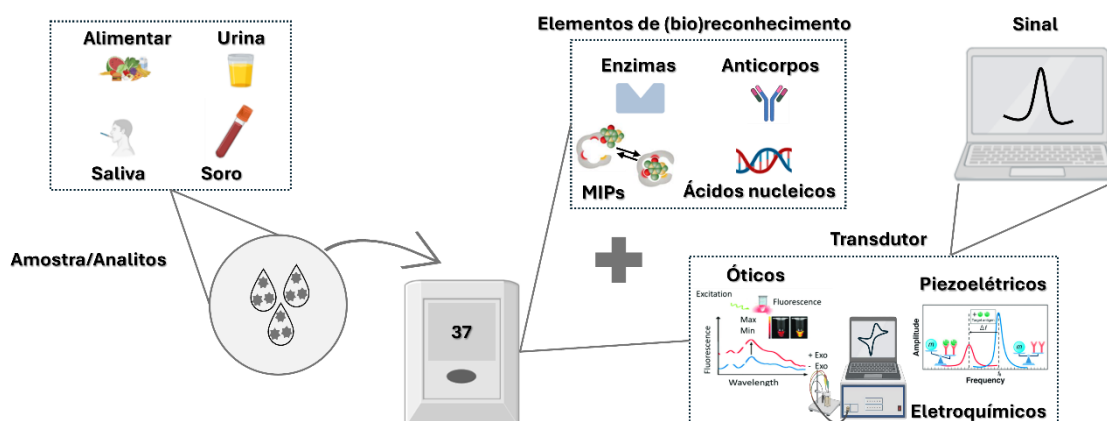


Figura 3 – Representação esquemática de um biossensor.

Os biossensores oferecem uma variedade de vantagens, designadamente o desempenho excepcional, facilidade de uso, resposta rápida, portabilidade, reprodutibilidade, tamanho reduzido, análise em tempo real, elevada sensibilidade e especificidade [62,65]. Ao longo do tempo, o interesse no desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico precoce do cancro tem aumentado significativamente devido à sua elevada sensibilidade, permitindo a deteção de biomarcadores em baixas concentrações [66].

As metodologias convencionais mais utilizadas para o diagnóstico do cancro são a biópsia e a imagiologia por ultrassons, por outro lado os biomarcadores são utilizados para a monitorização da neoplasia, nomeadamente respostas aos tratamentos [37,67]. De um modo geral, em comparação com os métodos convencionais, os biossensores são excelentes ferramentas para análise de biomarcadores [66].

De seguida, serão abordados com maior detalhe os elementos de (bio)reconhecimento e a transdução do sinal.

### 2.3.1 Transdução do sinal

Um transdutor é um instrumento analítico que deteta e quantifica a alteração que ocorre durante a interação entre o recetor biológico e o analito, tendo a capacidade de transformar a resposta biológica num sinal mensurável que pode ser eletroquímico, ótico ou piezoelétrico [68,69].

Os biossensores piezoelétricos são baseados no acoplamento do (bio)elemento com um componente piezoelétrico, frequentemente um cristal de quartzo revestido com eléctrodos de ouro ou de prata [68]. Ou seja, são sensores sensíveis à massa que utilizam ondas acústicas ou mecânicas como sistema de deteção e microbalanças de cristal de quartzo, e no momento de interação com a molécula alvo provocam alterações mecânicas ou elétricas que têm como resultado mudanças na massa, condutividade, elasticidade e propriedades dielétricas [70]. No campo da medicina, os biossensores piezoelétricos são conhecidos por serem fáceis de fabricar, rápidos de analisar, económicos e altamente sensíveis [69,71].

Enquanto, os biossensores eletroquímicos operam recorrendo a um transdutor eletroquímico para monitorizar as alterações que ocorrem na superfície do eléctrodo, devido à interação entre a biomolécula imobilizada e o analito (como a corrente elétrica ou o potencial) [68]. Estes biossensores são classificados em amperimétricos (biossensores que detetam alterações na corrente), potenciométricos (biossensores que medem alterações no potencial), de condutividade (biossensores que avaliam variações na condutância) e os termométricos (os biossensores menos comuns, que medem as alterações de temperatura resultantes da interação entre o analito-alvo e o elemento de (bio)reconhecimento). Possuem uma elevada sensibilidade e são adequados para detetar pequenas alterações nas propriedades da substância a analisar [69,72].

Por último, os biossensores óticos destinam-se a detetar alterações óticas provenientes da interação entre a molécula alvo e o elemento de (bio)reconhecimento, utilizando a luz para detetar alterações das propriedades óticas (como a absorvância, a transmitância, a refletância ou a luminescência) [73] no material biológico, proporcionando uma elevada especificidade e tempos de resposta rápidos [74]. As técnicas de biossensorização ótica são geralmente baseadas em vários fenómenos óticos e envolvem normalmente propriedades óticas complexas dos nanomateriais, nomeadamente ressonância plasmónica de superfície (SPR, do inglês, *Surface plasmon resonance*), ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, do inglês, *Localized surface plasmon resonance*) e a espectroscopia Raman melhorada pela superfície (SERS, do inglês, *Surface-enhanced Raman Spectroscopy*). Estes sensores, se forem associados a sondas fluorescentes, quimiluminescentes ou bioluminescentes, oferecem uma gama maior de estratégias de (bio)sensibilidade [69,75]. Em geral, os biossensores óticos comparativamente às técnicas analíticas convencionais oferecem muitas vantagens em termos de desempenho, seletividade e versatilidade na deteção de uma ampla gama de substâncias [75]. Sendo deste modo, um dos sistemas analíticos mais utilizados, cujas aplicações no diagnóstico médico são numerosas [76]. No subcapítulo 2.4 serão abordados de forma mais detalhada os (bio)sensores óticos combinados com MIPs.

### 2.3.2 Elementos de (bio)reconhecimento

Os elementos de (bio)reconhecimento são uma componente essencial no biossensor, responsáveis pela identificação do analito. Para estes elementos terem uma alta sensibilidade e seletividade, é necessário haver uma forte afinidade entre o elemento de (bio)reconhecimento e a substância a analisar [69].

Existem diferentes tipos de elementos de (bio)reconhecimento utilizados para o desenvolvimento de biossensores, que se classificam em elementos de (bio)reconhecimento biológicos (ácidos nucleicos, anticorpos, enzimas, células e outras proteínas) e elementos de (bio)reconhecimento sintéticos, ou também denominados por biomiméticos (MIPs, aptâmeros e nanomateriais sintéticos) [76,77].

A seleção dos elementos de (bio)reconhecimento tem alguns critérios a ter em consideração, tais como, o analito alvo específico para formar o conjugado, o custo do elemento de (bio)reconhecimento ser economicamente rentável para aplicações em larga escala e a facilidade e estabilidade de armazenamento. Desta forma, são preservadas as suas propriedades funcionais em circunstâncias variadas, tais como alterações de temperatura, pH ou a presença de ambientes oxidantes. Além disso, garante uma vida útil prolongada e um desempenho consistente do biossensor ao longo do tempo [77].

### **2.3.3 Sensores Biomiméticos**

O conceito da técnica de impressão molecular como forma de construção de um elemento de (bio)reconhecimento artificial, foi inspirado nas primeiras teorias sobre a interação entre enzimas-substrato e antigénio-anticorpo. O local ativo de uma enzima liga-se seletivamente a uma molécula de substrato específico, de maneira semelhante à combinação de uma chave com uma fechadura [78]. Em analogia com a interação de reconhecimento enzima-substrato, surgiram os MIPs, cuja interação com a molécula alvo resulta da formação de uma cavidade molecularmente estruturada de polímero à volta da molécula, o qual funciona como um molde artificial de reconhecimento e de funcionalidade da molécula alvo [78,79].

Em 1930, a primeira tentativa de impressão molecular num substrato sólido foi realizada por Polyakov aplicada à impressão de hidrocarbonetos aromáticos em gel de sílica [78,80]. Na década de 1970, os polímeros orgânicos vieram substituir o substrato sólido de gel de sílica e a impressão covalente era muito utilizada pela adição de grupos funcionais ao polímero impresso [78]. Em 1973, os investigadores Wulff e Sarhan destacam-se no desenvolvimento da técnica de impressão molecular, nomeadamente nas interações covalentes entre os grupos funcionais do polímero e a molécula alvo [78,80].

Posteriormente, Mosbach provou que interações não covalentes também podem ser utilizadas na técnica de impressão, conhecida como impressão não covalente [81].

#### **2.3.3.1 Principais vias de síntese dos MIPs**

Na sua base, os MIPs são definidos como a criação de um local de ligação sintético específico dentro de uma matriz polimérica complementar à forma, tamanho, posição dos grupos funcionais e funcionalidade da molécula alvo com a qual foram sintetizados. As cavidades formadas na matriz polimérica são frequentemente designadas como recetores artificiais ou anticorpos plásticos, devido à sua semelhança com os recetores naturais, aproximando-se de sistemas como anticorpo-antigénio ou enzima-substrato [82,83]. Por esta razão, são denominados polímeros biomiméticos, pois mimetizam os processos naturais de (bio)reconhecimento. Tendo estas características, os MIPs são concebidos para atuarem como sensores de (bio)reconhecimento sobre bactérias, vírus, proteínas, enzimas e outros (bio)analitos [69,84].

A síntese de um MIP inicia com a reação entre monómeros monofuncionais ou multifuncionais e a molécula alvo, promovendo a interação através de ligações covalentes ou não covalentes, formando um complexo estável. Durante a complexação, as interações mais comuns são as não covalentes, que se baseiam em forças eletrostáticas, como forças de *Van der Waals*, ligações de hidrogénio ou ligações iónicas, que estabelecem as interações entre os monómeros e a molécula alvo. Segue-se a reação de polimerização com um agente reticulante, que resulta na formação de uma matriz polimérica tridimensional em torno do complexo. Após a polimerização, a molécula alvo é removida da matriz polimérica, remanescendo na matriz as cavidades de reconhecimento como a presença de grupos funcionais à superfície das cavidades para estabelecimento do reconhecimento da molécula alvo impressa (Figura 4) [78].

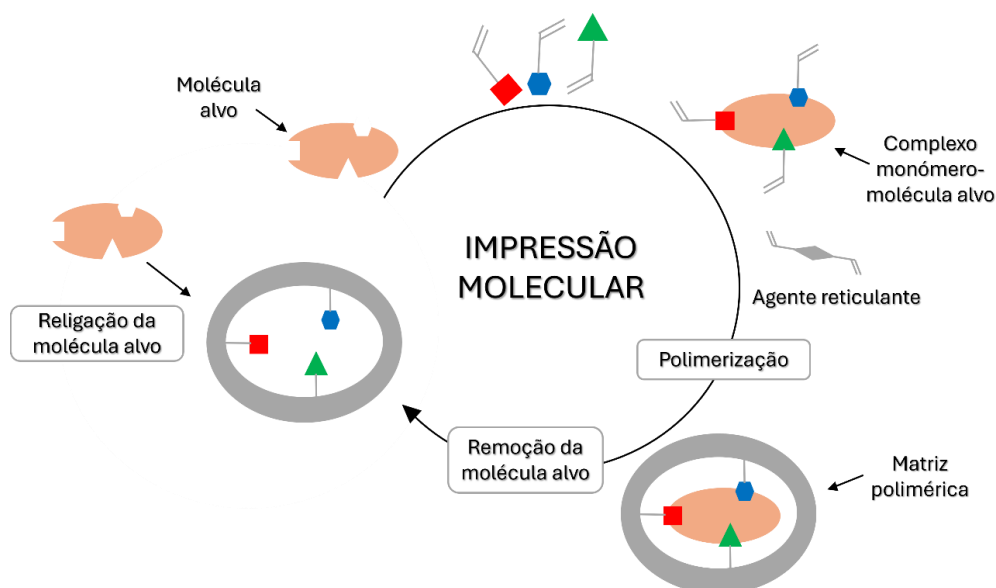


Figura 4 – Ilustração do processo de formação de polímeros molecularmente impressos.

O MIP deve apresentar uma elevada especificidade e seletividade para a molécula alvo, simultaneamente com uma baixa afinidade para moléculas análogas. Porém, deve-se considerar outros aspetos como, o método, o tempo de polimerização e o solvente a utilizar. Portanto, a escolha de vários parâmetros no processo de MIP é fulcral, uma vez que a seleção dos monómeros, das proporções relativas e das funcionalidades químicas é determinante para a obtenção de uma ótima cavidade impressa [78,80].

As principais vias para a produção de MIPs podem ser divididas em dois grupos, covalente e não covalente, com base no tipo de interações entre a molécula alvo e os grupos funcionais dos monómeros na etapa de pré-polimerização [78].

### ***Impressão Covalente***

Os investigadores G. Wulff *et al.* desenvolveram a abordagem de impressão covalente, na qual o complexo monómero e molécula alvo em solução, antes da polimerização, é ligado por ligações covalentes reversíveis e o reconhecimento molecular é conseguido pela formação e quebra destas ligações [85]. Neste processo, a polimerização ocorre na presença de uma grande

quantidade de agente reticulante para formar uma rede rígida e insolúvel. A quebra das ligações covalentes é necessária para extrair a molécula alvo através da interação química, resultando em cavidades de ligação bem definidas com topografia estérica e funcional, complementar à molécula alvo. Contudo, a aplicação da impressão covalente está limitada a uma escolha restrita de monómeros funcionais e moléculas alvo, tais como álcoois, aminas, aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos. Outras limitações incluem a necessidade de sintetizar o complexo monómero e molécula alvo antes da polimerização, um maior esforço exigido para a clivagem da molécula alvo após a síntese do MIP, bem como para a sua utilização continuada, e uma cinética de religação mais lenta devido à necessidade de restabelecer a ligação covalente para o reconhecimento do alvo [78].

### ***Impressão não covalente***

A abordagem de impressão não covalente baseia-se na ligação não covalente entre a molécula alvo e a matriz polimérica, desenvolvida pela equipa de investigação de Mosbach [81,86]. Neste caso, o complexo molécula alvo e monómero é formado através de interações não covalentes fracas, tais como forças de *van der Waals*, ligações de hidrogénio, interações  $\pi$ - $\pi$ , interações dipolo-dipolo, interações ião-dipolo, entre outras. Estas vias de ligação utilizam blocos de construção básicos e requerem um reduzido esforço de síntese. As moléculas alvo são facilmente removidas da matriz polimérica por meio de técnicas de extração simples. De entre os sistemas de impressão não covalentes mais utilizados, destaca-se a combinação do ácido metacrílico (MAA, do inglês, *Methacrylic acid*) como monómero funcional e o dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA, do inglês, *Ethylene glycol dimethacrylate*) como agente de reticulação, no qual o MAA tem a capacidade de formar ligações de hidrogénio com várias moléculas alvo [78,82]. Esta metodologia de impressão é amplamente aplicada em diferentes domínios da ciência e tecnologia. As principais vantagens da impressão não-covalente incluem, a fácil fixação e remoção da molécula alvo da matriz polimérica, devido à participação de ligações não-covalentes fracas durante as fases de formação e quebra; um processo simples, evitando a necessidade de derivatização química da molécula alvo antes da polimerização. Em contrapartida, a principal desvantagem desta abordagem é a instabilidade do composto monómero e molécula alvo, uma vez que não mantém a relação estequiométrica e requer uma quantidade excessiva de monómero funcional para a ligação completa das moléculas alvo, resultando na formação de muitos locais de ligação não específicos nos MIPs [78].

#### **2.3.3.2 Componentes e parâmetros com impacto na eficiência do MIP**

Para maximizar a impressão molecular, é crucial que a funcionalidade da molécula alvo seja complementar à do monómero funcional. Geralmente, este monómero é composto por uma unidade de reconhecimento e outra polimerizável (grupos vinil ou grupos silano), é combinado com a molécula alvo, agente reticulante, iniciador e solvente no processo de desenvolvimento dos MIPs.

### **Molécula alvo**

Na síntese de MIPs, as propriedades e funcionalidades da molécula alvo são cruciais, pois determinam as interações com os monómeros funcionais escolhidos para criar cavidades de reconhecimento específicas. A molécula alvo deve estar disponível em grandes quantidades a baixo custo, solúvel nas condições de impressão, e possuir grupos funcionais que permitam uma boa interação com o monómero, facilitando a criação de cavidades específicas para o analito. É importante destacar que, em processos de polimerização por radicais livres, a molécula alvo deve ser quimicamente inerte, para evitar interferências na síntese. A utilização de pequenas moléculas orgânicas, como pesticidas, aminoácidos, esteróides, fármacos, péptidos de baixo peso molecular (até 100 kDa) e açúcares, está bem estabelecida neste contexto. Exemplos de moléculas alvo comumente utilizadas na produção de MIPs estão apresentados na Tabela 1 [78].

Tabela 1 – Moléculas alvo tipicamente aplicadas na síntese de MIP, adaptado de [78].

<b>Tipos de moléculas alvo</b>	<b>Exemplo</b>
(Bio)macromoléculas	Lisozima; adenosina; 3,5- monofosfato cíclico; albumina de soro bovino
Moléculas orgânicas	Pesticidas: atrazina; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; fungicida benzimidazol
	Químicos desreguladores endócrinos: Bisfenol A; oestradiol; oestrona; hidrocarbono policíclico aromático
	Explosivo: 2,4,6,-trinitrotolueno
	Fármacos: tetraciclina; quinolonas; sulfonamidas
	Aminoácidos e peptídeos: tirosina; alanina; tripeptídeos; peptídeos helicoidais; alcaloides cinchona; sequência de dipeptídeos de Histidina N-terminal
	Açúcares: D-frutose; D-glucose; D-galactose
Iões	Pb(II); Sr(II); Hg(II); CH <sub>3</sub> Hg(I); Cd(II); Cu(II); Cr(III); Fe(III); Ni(II); UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup> ; Th(IV); Eu(III); As(III); PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
Células e vírus	Vírus do mosaico do tabaco; vírus de leucemia bovina; vírus da dengue

As moléculas de tamanhos maiores, como os compostos orgânicos de alto peso molecular, as proteínas ou as células, cuja flexibilidade tridimensional tende a ser baixa, podem comprometer a síntese de MIPs para que tenham zonas de ligação bem definidas durante o processo de impressão. Adicionalmente, estas moléculas são difíceis de remover e não conseguem penetrar na rede polimérica durante o passo de religação, podendo danificar a sua estrutura nativa e tornar os MIPs menos seletivos para estas moléculas. Com vista a ultrapassar estes problemas, a técnica de *surface imprinting* é geralmente adotada para imprimir estas moléculas com maiores dimensões [78].

### Agentes reticulantes

No processo de polimerização dos MIPs, é utilizado um agente reticulante para a fixação dos monómeros funcionais em torno das moléculas alvo, formando assim um polímero altamente rígido e reticulado, mesmo depois da remoção da molécula alvo. Ao longo do processo de impressão, o agente reticulante desempenha três funções principais como: controlo da morfologia da rede polimérica, seja macroporosa, microgel em pó ou gel, estabilização do local de ligação impresso e estabilidade mecânica da rede polimérica [78].

Por outro lado, o tipo e a quantidade, de agente reticulante têm uma influência significativa na seletividade e na capacidade de ligação do MIP. Se a quantidade de agente reticulante for inferior, as propriedades mecânicas serão instáveis devido ao baixo grau de reticulação, enquanto uma quantidade demasiado elevada reduzirá o número de sítios de reconhecimento por unidade de massa do MIP. Existem vários agentes de reticulação adequados para a impressão molecular, alguns dos quais podem complexar-se de imediato com a molécula alvo, funcionando assim como monómeros funcionais ou promovendo a reticulação da estrutura do polímero. Dentre os agentes de reticulação comumente utilizados na polimerização, destacam-se os acrilatos e as acrilamidas, apresentados na Figura 5 [78].

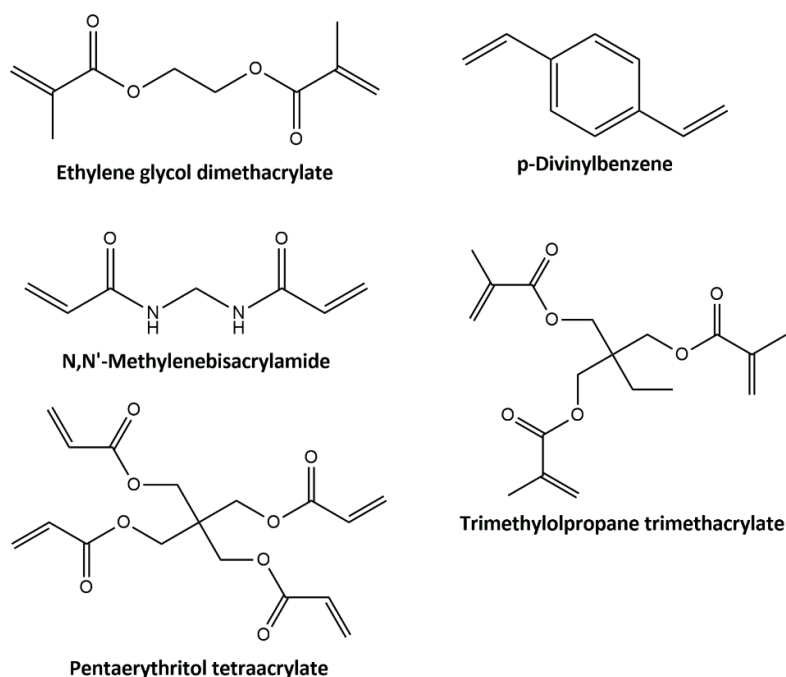


Figura 5 – Fórmulas estruturais de agentes de reticulação comumente utilizados na fabricação de MIPs, adaptado de [78].

### Iniciadores

Os MIPs são maioritariamente fabricados por polimerização de radicais livres, eletropolimerização e fotopolimerização. A polimerização de radicais livres pode ser iniciada fotoquimicamente ou termicamente para vários monómeros funcionais e moléculas alvo. Para além dos compostos peróxidos, os derivados azóicos são largamente utilizados como

iniciadores e que incluem azobisdimetilvaleronitrilo (ADVN, do inglês, *azobisdimethylvaleronitrile*), azobisisobutironitrilo (AIBN, do inglês, *azobisisobutyronitrile*) e o ácido 4,4'-azo(4-cianovalérico) (ACID) [78,87] (Figura 6).

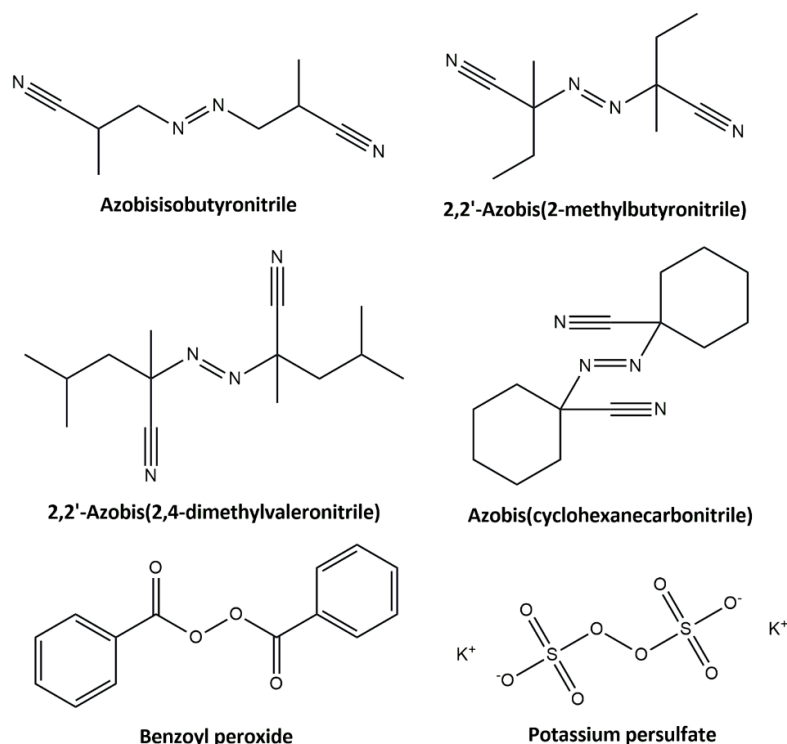


Figura 6 – Fórmulas estruturais de iniciadores comumente utilizados na fabricação de MIPs, adaptado de [78,87].

O AIBN pode ser decomposto por fotólise (UV) ou termólise de forma a produzir radicais estáveis centrados no carbono com capacidade para iniciar a polimerização de vários monómeros vinílicos e os quais podem ser aplicados de forma apropriada a temperaturas de decomposição de 50-70 °C. Para assegurar uma reação de polimerização ideal, é essencial remover o oxigénio dissolvido das soluções de polimerização antes da propagação. A remoção do oxigénio dissolvido pode ser feita por ultrassons ou por desoxigenação de um gás inerte (azoto ou árgon) [78].

### **Solvente**

Os solventes porogénicos intervêm como meios de dispersão e agentes formadores de poros no processo de polimerização, contribuindo de forma determinante para a formação da estrutura macroporosa dos MIPs. Os solventes frequentemente utilizados na síntese de MIPs incluem acetonitrilo, 2-metoxietanol, metanol, clorofórmio, tetrahidrofurano (THF), dicloroetano, tolueno e N, N-dimetilformamida (DMF). Na síntese de MIPs é necessário que o solvente satisfaça os seguintes requisitos, ser capaz de dissolver a molécula alvo, o monómero, o iniciador e o agente reticulante; gerar poros grandes; ter baixa polaridade para minimizar a interferência durante a formação do complexo pré-polimerizado [78]. Na impressão não covalente, são habitualmente utilizados solventes orgânicos não polares e de baixa polaridade,

como o tolueno, o clorofórmio e o acetonitrilo, para alcançar a máxima eficiência de impressão, visto que a morfologia dos polímeros e as propriedades de adsorção dependem dos tipos de solventes utilizados [78].

### ***Temperatura de polimerização***

De acordo com os resultados de algumas investigações, a polimerização durante a síntese de MIPs a baixas temperaturas (<60 °C) produz polímeros com maior seletividade do que os polímeros preparados a temperaturas mais elevadas [88]. Dado que, a uma temperatura elevada, o início da reação de polimerização pode ser demasiado rápido e difícil de controlar, resultando numa baixa reprodutibilidade do MIP. Em contrapartida, uma temperatura comparativamente mais baixa e um tempo de reação prolongado favorecem uma polimerização mais reprodutível [78].

### **2.3.3.3 Mecanismos de polimerização**

Para a produção de MIPs com as propriedades pretendidas, a seleção do mecanismo de polimerização é decisiva. Os principais mecanismos para a síntese de MIPs incluem a polimerização radicalar e os processos sol-gel (Tabela 2) [78,87]. Entre os processos radicalares, o mais utilizado é a polimerização radicalar livre, o qual será abordado na subsecção 2.3.3.4.

Tabela 2 – Comparação de vários procedimentos de síntese e métodos de impressão de MIP, adaptado de [78,87].

<b>Mecanismo</b>	<b>Método de Impressão</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Polimerização radicalar livre	Polimerização em massa	Fácil e rápido de preparar; pureza na produção do MIP; não requer instrumentos sofisticados ou caros; controlo simples sobre o tamanho das partículas do MIP.	Moagem demorada; necessita de peneiração; locais de baixa afinidade; partículas irregulares em forma e tamanho.
	Polimerização por emulsão	Rendimento elevado; polímeros solúveis em água; partículas poliméricas esféricas monodispersas; procedimentos de moagem e peneiração são evitados.	Baixa capacidade de impressão; afetada com a presença de surfactantes remanescentes.

Tabela 2 – Comparação de vários procedimentos de síntese e métodos de impressão de MIP, adaptado de [78,87]. (continuação)

Mecanismo	Método de Impressão	Vantagens	Desvantagens
Polimerização radicalar livre	Polimerização por precipitação	Partículas uniformes e esféricas; um único passo de preparação; alta qualidade; processos de moagem e peneiramento são evitados.	Alto fator de diluição.
	Polimerização por suspensão	Processo simples com um passo de polimerização; partículas esféricas de forma regular.	Partículas de grandes dimensões; reconhecimento fraco.
	Polimerização de sementes	Partículas esféricas regulares controláveis; adequado para HPLC; monodispersão.	Baixa sensibilidade; processo demorado e trabalhoso.
Processo Sol-gel	Sol-gel	Solvente de reação ecológico; fácil de fabricar à temperatura ambiente.	Baixa sensibilidade; ausência de método de polimerização e monômero funcional.

Sucintamente, a polimerização por transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT, do inglês, *Reversible addition-fragmentation chain transfer*) é uma técnica de polimerização radicalar controlada que permite a síntese de polímeros com pesos moleculares bem definidos e distribuições limitadas de peso molecular. Esta polimerização envolve a utilização de um agente de transferência de cadeia (CTA, do inglês, *Chain transfer agent*) que controla o processo de polimerização através de reações reversíveis de adição-fragmentação [89]. Por outro lado, a polimerização radicalar controlada por transferência de átomo (ATRP, do inglês, *Atom transfer radical polymerization*) é também uma técnica de polimerização radicalar controlada, porém recorre à utilização de um catalisador de metal de transição e de um agente redutor para controlar o processo de polimerização [82,90].

#### 2.3.3.4 Polimerização Radicalar Livre (FRP)

O método convencional para a síntese de MIPs utiliza a polimerização radicalar livre (FRP, do inglês, *Free radical polymerization*) que consiste num processo que segue a descrição do

mecanismo cinético da polimerização por radicais livres e é constituído por três fases, iniciação, propagação e terminação (Figura 7) [91]. A fase de iniciação é composta pela dissociação do iniciador (local de criação dos radicais livres) e associação de uma molécula de monómero com os radicais livres (Figura 7A e 7B). Por sua vez, na fase de propagação do monómero ocorre a adição de um radical do polímero a uma unidade de monómero (Figura 7C). O passo seguinte (Figura 7D), a reticulação das ligações duplas pendentes do agente de reticulação, distingue a principal diferença entre uma polimerização radicalar linear (formação de polímeros solúveis) e uma polimerização radicalar não linear (origina hidrogéis insolúveis). Por último, na fase de terminação, pode-se realizar de duas formas diferentes, uma por combinação (Figura 7E), que leva à formação de uma molécula de polímero inativa, e a outra por dismutação (Figura 7F), formando duas moléculas inativas [91].

De um ponto de vista geral, a FRP é um mecanismo simples e escalável de grande importância para a preparação de muitos polímeros de elevado peso molecular, permitindo a utilização de diferentes condições de reação (massa, suspensão e solução), compatibilidade com muitos grupos funcionais e utilização numa gama larga de temperaturas [92]. A FRP apresenta algumas limitações, nomeadamente transferência de massa lenta, perdas significativas de polímero durante o processo de produção e heterogeneidade dos produtos obtidos, devido à elevada incidência de reações de terminação [91,92].

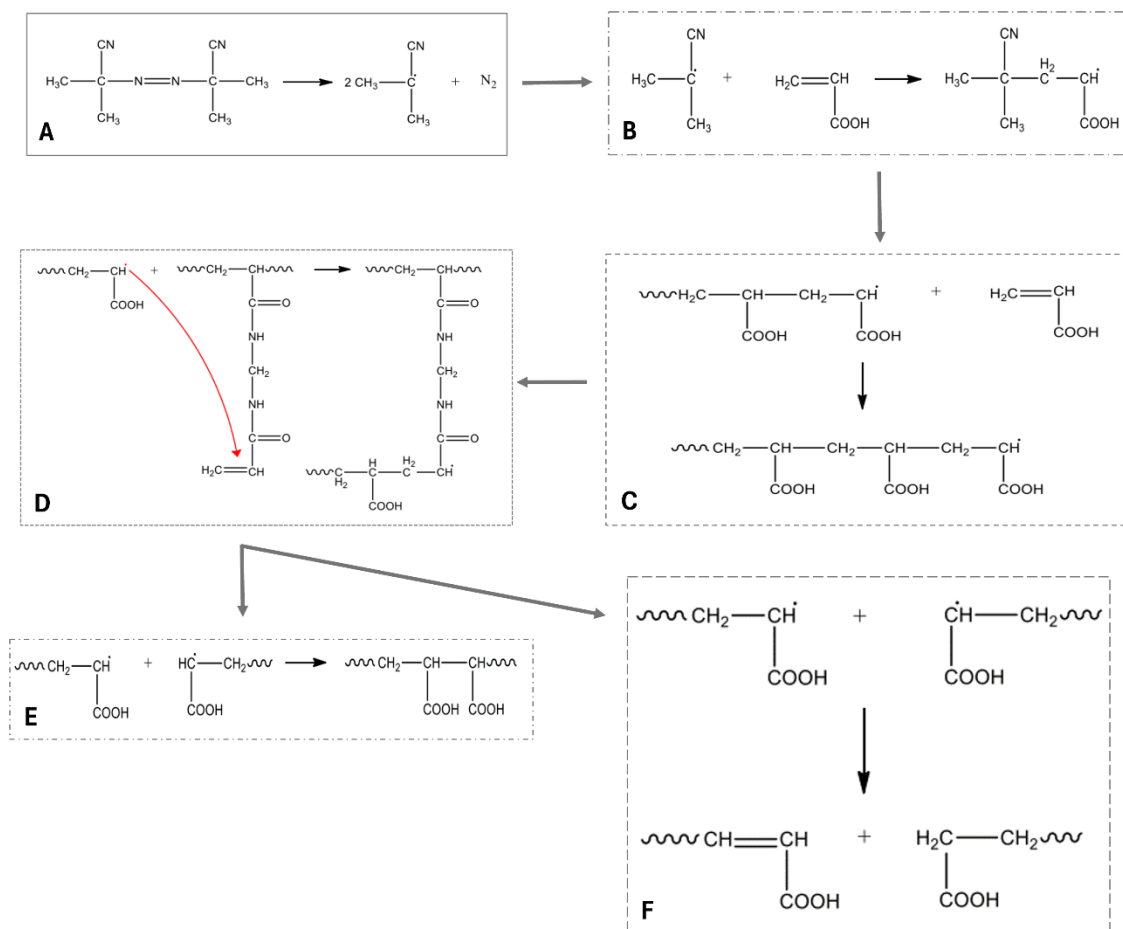


Figura 7 – Ilustração simples dos mecanismos cinéticos envolvidos na FRP.

### **Métodos em FRP**

A FRP recorre essencialmente a dois métodos para sintetizar MIPs, a impressão em massa (do inglês, *bulk imprinting*) e a impressão à superfície (do inglês, *moni imprinting*) [78,93–95].

No método *bulk imprinting*, misturam-se as moléculas alvo, monómeros funcionais, iniciadores e agentes reticulantes num solvente. Após a polimerização, toda a mistura é convertida num polímero sólido e as moléculas alvo são removidas. Este método é simples e produz materiais impressos de elevada pureza, mas implica etapas de pós-tratamento, como trituração mecânica, moagem e peneiração, de modo a obter o tamanho de partícula desejável e expor os locais de reconhecimento [95,96]. Embora, a técnica *bulk imprinting* seja mais simples e produza materiais de elevada pureza, tem limitações como originar tamanhos e formas não uniformes, bem como a heterogeneidade na distribuição dos sítios de ligação. Além disso, pode dificultar a difusão de moléculas maiores (proteínas, células vivas e microrganismos) para os locais de impressão, consequentemente menor sensibilidade e seletividade para (bio) aplicações [94,95]. Há ainda outras limitações, como o baixo rendimento e o menor número de sítios de ligação, devido aos danos causados pela trituração e à dificuldade de remover a molécula alvo do interior das partículas MIP [96]. Para ultrapassar as dificuldades deste método, alguns processos foram acrescentados tendo como base este método e que permitiram obter os MIPs num formato final que os torna mais eficientes. É o caso de membranas, partículas de MIPs, microesferas de MIPs, monocamadas de MIPs e monólitos de MIPs [78].

O método *surface imprinting* centra-se no posicionamento da molécula alvo na superfície da matriz polimérica ou próximo desta. A impressão em superfície envolve etapas cruciais que permitem a criação de MIPs, com alta especificidade para reconhecer e ligar-se a moléculas alvo. A primeira etapa consiste na imobilização da matriz polimérica num substrato (normalmente uma superfície sólida) através do estabelecimento de interações entre o substrato e a molécula alvo. Essa interação pode ser via utilização de grupos químicos para estabelecimento de ligações covalentes com a molécula alvo ou de outro tipo de interação não covalente. Em seguida, a polimerização é iniciada com a mistura dos monómeros funcionais e dos agentes reticulantes na presença do iniciador, ajudando a criar uma rede tridimensional estável ao redor da molécula alvo. Dessa forma, este método de impressão molecular aprimora a acessibilidade da matriz polimérica aos locais de ligação da molécula alvo, possibilitando um reconhecimento mais preciso e com maior especificidade [95].

O método de *surface imprinting* oferece uma melhor acessibilidade e eficiência de ligação comparativamente ao *bulk imprinting*, tornando-o mais adequado para aplicações que envolvem moléculas maiores. Além disso, permite maximizar a remoção das moléculas alvo, sendo quase completa, enquanto mantém a conformação das mesmas. Esta combinação de fatores possibilita reconhecer de forma mais eficaz as moléculas alvo durante o processo de

religação, o que proporciona um melhor desempenho dos MIPs como sensores biomiméticos [94–96].

## 2.4 Revisão da literatura de (bio)sensores óticos para a detecção de CA19-9

A aplicação de (bio)sensores para a detecção do biomarcador CA19-9 tem vindo a ser amplamente utilizada, com um alto destaque para os sensores óticos, dada a sua elevada sensibilidade e capacidade de detecção em tempo real.

O grupo de cientistas Lin *et al.*, centrou-se no desenvolvimento de um novo imunossensor quimiluminescente para a detecção da CA19-9, com a utilização de uma membrana de quitosano reticulado para a imobilização do antigénio, possibilitando uma combinação de ensaio imunológico não competitivo com a análise por injeção em fluxo. Este imunossensor atingiu um limite de detecção de  $1,0 \text{ U mL}^{-1}$  e funcionou eficazmente num intervalo de concentração de 2,0 a  $25 \text{ U mL}^{-1}$  (Tabela 3). A caracterização das membranas foi realizada através de microscopia de força atómica e espectroscopia de infravermelho, realçando o potencial do sensor para aplicações clínicas práticas na detecção de biomarcadores tumorais em comparação com as limitações dos métodos tradicionais de imunoensaio [97].

Os investigadores Gu *et al.*, em 2011, desenvolveram um imunoensaio altamente sensível que recorreu a QDs de óxido de zinco (ZnO) como marcadores para detetar o CA19-9. O método envolveu um processo de imobilização baseado na adsorção eletrostática, levando à formação de uma estrutura em sanduíche através de imunorreacções. A detecção da proteína CA19-9 foi efetuada por fotoluminescência dos QDs, demonstrando uma gama de detecção de 0,1 a  $180 \text{ U mL}^{-1}$  (Tabela 3) [98].

Em 2018, um grupo de investigadores conceberam um nanocompósito de pontos quânticos de carbono (CQDs, do inglês, *Carbon Quantum Dots*) e nanopartículas de ouro, através de uma síntese simples e ecológica utilizando CQDs derivados da glicose. O método demonstrou uma elevada sensibilidade e um limite de detecção de  $7 \text{ mU mL}^{-1}$  (Tabela 3), superando as técnicas prévias. A investigação destaca a eficácia do imunossensor na identificação de baixas concentrações da proteína CA19-9, contribuindo para a detecção precoce e práticas de investigação sustentáveis no domínio biomédico [99].

A aplicação contínua de MIPs em conjunto com QDs permitiu a Bahari *et al.* desenvolverem um imunossensor de fluorescência de superfície sólida para a detecção do biomarcador tumoral CA19-9. Este imunossensor, baseado num MIP ecológico, utiliza *nanoclusters* de níquel como emissores fluorescentes e demonstra capacidades analíticas robustas. A gama de detecção do antigénio abrange concentrações entre  $[1 \text{ pg mL}^{-1}-48 \text{ ng mL}^{-1}]$  (Tabela 3) [6].

Uma investigação mais recente de Piloto *et al.* aborda o desenvolvimento de um MIP conjugado com QDs para a detecção do biomarcador proteico CA19-9. A investigação destaca a montagem

dos MIPs ao redor dos QDs, os quais são utilizados como sondas óticas, dentro de um hidrogel de celulose mantendo a estrutura conformacional nas cavidades de ligação. O (bio)sensor apresenta uma boa resposta analítica demonstrando uma boa estabilidade e seletividade para CA19-9, com um limite de detecção significativo (Tabela 3). Os resultados sugerem que esta abordagem pode ser aplicada em PoCTs oferecendo uma metodologia sensível e de baixo custo para a detecção e diagnóstico precoce do cancro do pâncreas, com o potencial de melhorar a acessibilidade e a rapidez dos testes de diagnóstico [44].

A tabela seguinte apresenta um resumo dos principais (bio)sensores óticos utilizados ao longo do tempo para a detecção da proteína CA19-9, destacando os seus princípios de funcionamento, intervalos de detecção e desempenho.

Tabela 3 – Diferentes (bio)sensores óticos relatados na literatura para a detecção de CA19-9.

Elemento de (bio)reconhecimento	Tipo de detecção	Intervalo de detecção linear	LOD	Referência
Anticorpo CA19-9	Quimiluminescência	2-25 U mL <sup>-1</sup>	1,0 U mL <sup>-1</sup>	[97]
	Fotoluminescência	1-180 U mL <sup>-1</sup>	0,25 U mL <sup>-1</sup>	[98]
	Fluorescência	0,01-350 U mL <sup>-1</sup>	7 mU mL <sup>-1</sup>	[99]
MIP	Fluorescência	1 pg mL <sup>-1</sup> -48 ng mL <sup>-1</sup>	0,13 pg mL <sup>-1</sup>	[6]
	Fluorescência	0,0276 -0,3363 U mL <sup>-1</sup>	0,583 mU mL <sup>-1</sup>	[44]

## 2.5 Nanomateriais

Os nanomateriais são materiais que têm dimensões à escala nanométrica, entre 1 e 100 nanómetros (Figura 8). Estes materiais têm propriedades físicas e químicas únicas devido à sua pequena dimensão, o que os diferencia dos materiais com a mesma composição à escala micro ou macroscópica [100,101].

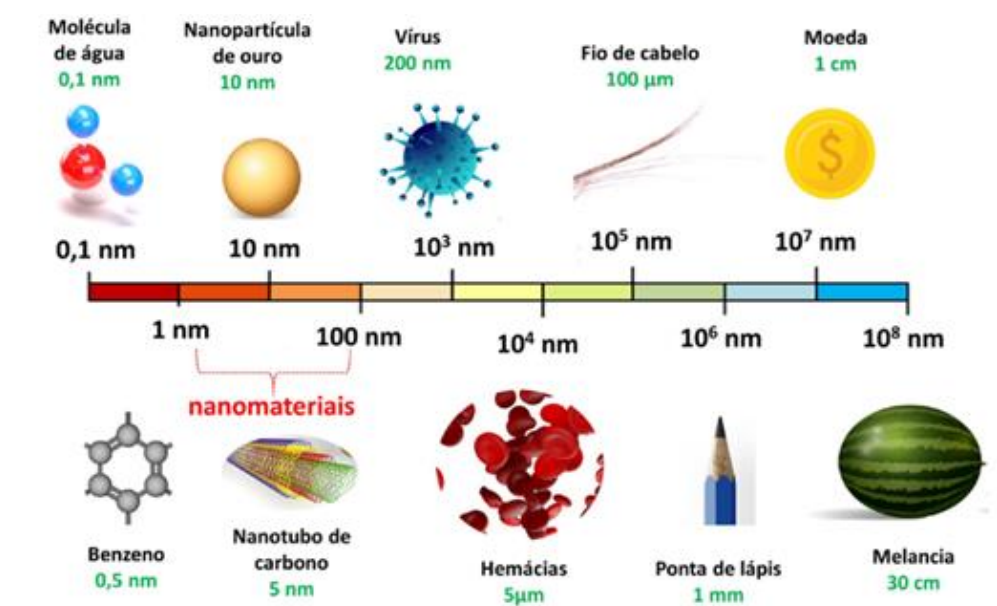


Figura 8 – Escala dos nanomateriais, retirado de [102].

Os nanomateriais são classificados de várias formas, de acordo com as suas características e aplicações. Os nanomateriais relativamente à complexidade da estrutura, podem ser classificados em nanopartículas (complexo nanométrico de átomos e moléculas inter-relacionados) e nanoestruturas (conjunto de nanopartículas). Um dos critérios de classificação baseia-se na origem dos nanomateriais, que se divide em duas categorias: naturais e sintéticos. Os nanomateriais naturais incluem substâncias presentes na natureza como argilas, sílica, vírus e proteínas. Em contraste, os nanomateriais sintéticos são produzidos artificialmente, através de processos controlados [100]. Quanto ao tamanho, os nanomateriais podem ser classificados como, dimensão zero (0D) (nanopartículas e os QDs); unidimensional (1D) (os nanotubos); bidimensional (2D) (grafeno) e tridimensional (3D) [100,101,103,104]. A tipologia dos nanomateriais também pode ser classificada com base nas suas propriedades, que incluem características magnéticas, óticas, elétricas e mecânicas. Estas propriedades são influenciadas pelo tamanho e forma dos nanomateriais, dando origem a comportamentos que não se verificam em materiais de maior escala, como por exemplo, as nanopartículas de ouro mudam de cor consoante o seu tamanho, ou seja, à medida que o tamanho diminui o pico de emissão passa para comprimentos de onda mais curtos [100,101].

Os nanomateriais têm uma grande variedade de aplicações em diversas áreas, como na eletrónica, medicina, energia, indústria da construção, aplicações ambientais e indústria têxtil [100,103,104].

### 2.5.1 Metodologia de síntese

Em nanotecnologia, as diferentes abordagens à produção e manipulação de estruturas à escala nanométrica são designadas por *top-down* e *bottom-up* (Figura 9) [104].

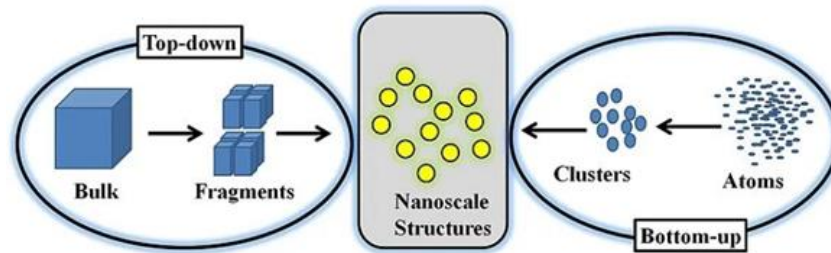


Figura 9 – Diagrama dos métodos de produção de nanomateriais *top-down* e *bottom-up*, retirado de [105].

### 2.5.1.1 *Top-down*

O método *top-down* baseia-se na teoria da decomposição de estruturas maiores em partículas de tamanho nanométrico por meio de um processo subtrativo, ou seja, um material em estado sólido é processado de forma mecânica ou química para se obter as dimensões nanométricas pretendidas [100,104]. As técnicas comuns nesta categoria incluem a moagem mecânica, também conhecida como moagem por bolas, que utiliza forças mecânicas para triturar materiais em pós finos; litografia, um processo que utiliza luz para transferir padrões para um substrato, criando características em escala nanométrica; e gravação química, que envolve a remoção de material de uma superfície para criar formas e tamanhos desejados [100].

A abordagem *top-down* possui benefícios como o controlo preciso da dimensão, forma e estrutura dos nanomateriais produzidos, originando nanomateriais com estruturas e propriedades complexas. Contudo, tem limitações, nomeadamente na resolução das técnicas utilizadas, que podem afetar a capacidade de criar elementos extremamente pequenos, pode gerar resíduos durante o processo de redução de estruturas maiores para dimensões nanométricas, levando a defeitos e imperfeições estruturais, além de enfrentar desafios na obtenção de uniformidade no produto final e necessitar no geral mais energia e recursos [104].

### 2.5.1.2 *Bottom-up*

No método *bottom-up*, as estruturas nanométricas são construídas a partir de átomos e moléculas individuais, que se organizam em estruturas maiores e mais complexas, permitindo um controlo preciso da estrutura final [100,104]. As principais técnicas aplicadas são o método sol-gel, um processo químico húmido que faz a transição de uma solução para uma fase sólida em gel; deposição química de vapor (do inglês: *chemical vapour deposition*, CVD), onde reagentes gasosos formam um material sólido num substrato; e síntese hidrotérmica, que utiliza alta temperatura e pressão em soluções aquosas para sintetizar materiais [100].

As principais vantagens do método *bottom-up*, incluem a montagem de nanomateriais com precisão atómica, resultando em estruturas altamente uniformes, o que possibilita um controlo preciso do tamanho das nanopartículas e criação de estruturas e materiais complexos que não se verificam em materiais em grande escala. Porém, pode exigir condições de síntese mais complexas e tempos de processamento mais longos, e a escalabilidade pode ser desafiadora

para alguns métodos, com potencial de contaminação durante a síntese [104]. Dadas as vantagens da metodologia *bottom-up* na produção de nanopartículas esféricas e monodispersas, a síntese hidrotérmica destaca-se como uma rota eficaz para a produção de QDs.

Este método envolve alta temperatura e pressão, o que permite a dissolução de precursores e promove a nucleação e o crescimento de QDs de maneira controlada. O ambiente hidrotérmico possibilita a uniformidade, uma vez que as condições podem ser ajustadas com precisão para alcançar um tamanho e forma de partículas consistentes, o que é crucial para as propriedades óticas dos QDs. Além disso, a síntese hidrotérmica pode ser escalada para uma produção maior, mantendo a qualidade dos QDs [106]. O *bottom-up*, especialmente por meio da síntese hidrotérmica, é vantajosa para a produção de QDs de alta qualidade com propriedades desejáveis para várias aplicações, incluindo optoeletrônica e campos biomédicos [107].

### 2.5.2 Pontos quânticos – QDs

Os QDs são nanocristais semicondutores, compostos por alguns milhares de átomos e têm dimensões na faixa de 2 a 10 nanômetros [108–110]. Estes nanomateriais segundo a sua composição podem ser divididos em dois grupos: QDs inorgânicos e QDs orgânicos. Os QDs orgânicos são constituídos por carbono, com estruturas gráficas (grafeno e pontos de carbono). Por sua vez, os QDs inorgânicos são materiais que podem ter na sua constituição o carbono, mas majoritariamente baseados em materiais inorgânicos e podem ser encontrados em diferentes configurações (estruturas binárias, ternárias e núcleo-casca) [9,100].

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os QDs inorgânicos, com destaque para os nanocristais semicondutores binários dos grupos II–VI, III–V e IV–VI da tabela periódica, amplamente aplicados em sensores MIP@QDs. Os QDs com estrutura núcleo-casca (do inglês: *core-shell*) oferecem maiores rendimentos quânticos e melhor fotoestabilidade, graças à presença de uma camada adicional que envolve o núcleo metálico primário [9,108,111].

Os QDs exibem efeitos quânticos devido ao seu tamanho nanométrico, que resulta em propriedades óticas e eletrônicas distintas em comparação com materiais semicondutores de tamanho macroscópico. A sua capacidade de conduzir a corrente elétrica de forma controlada, condicionam as suas propriedades elétricas, as quais podem ser explicadas pela teoria de bandas [111]. A teoria das bandas é um conceito fundamental da física do estado sólido que descreve o comportamento dos elétrons nos sólidos cristalinos. De acordo com esta teoria, os elétrons num sólido ocupam níveis de energia discretos ou bem individualizados, as quais se associam bandas de energia. Existem duas bandas de energia principais nos sólidos: a banda de valência (onde os elétrons estão fortemente ligados aos átomos e não contribuem para a condutividade elétrica); a banda de condução (onde os elétrons se podem mover livremente e contribuem para a passagem da corrente elétrica). A diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução é designada por intervalo de energia ou *gap* energético [109,112,113]. De acordo com esta teoria e com base nas propriedades das suas bandas de

energia, os materiais podem ser classificados como condutores, isolantes ou semicondutores [114].

Nos condutores, metais como o cobre, a prata e o ouro têm bandas de valência e de condução sempre preenchidas, permitindo que os elétrons se movam facilmente através do material, resultando numa elevada condutividade elétrica. Por outro lado, os isolantes têm um largo intervalo de energia entre as bandas de valência e de condução, o que impede o movimento dos elétrons, devido à falta de energia suficiente para transitar de uma para a outra [114].

Por sua vez, nos semicondutores ocorre o efeito de confinamento quântico que se relaciona com o raio de Bohr, devido à influência que o tamanho do material tem nas propriedades eletrónicas dos elétrons [109,112,113]. O raio de Bohr é uma medida da distância média a que um elétron orbita em torno do núcleo de um átomo no seu estado fundamental. Quando a dimensão do material semiconductor é reduzida para uma escala comparável ao raio de Bohr, os elétrons no interior do material sofrem um confinamento espacial significativo, resultando num aumento do intervalo de energia entre as bandas de valência e de condução, devido à quantização das energias permitidas para os elétrons confinados [112]. Num material semiconductor de dimensão macroscópica, os elétrons da banda de valência estão distribuídos em estados energéticos contínuos e a banda de condução está separada da banda de valência por um intervalo de energia relativamente pequeno. No entanto, quando o material é reduzido a uma escala nanométrica, o confinamento quântico provoca uma discretização das energias permitidas para os elétrons na banda de condução, resultando num aumento do intervalo de energia (Figura 10). Esta discretização das energias eletrónicas devido ao confinamento quântico tem um impacto significativo nas propriedades óticas e eletrónicas do material semiconductor, particularmente nas alterações das propriedades de emissão de luz e nas transições eletrónicas [109,112].

As propriedades macroscópicas dos materiais são condicionadas não apenas pelas suas propriedades elétricas à nanoescala, mas também pelas suas propriedades físicas e óticas dos materiais. A distribuição dos átomos na estrutura tridimensional desempenha um papel crucial na determinação das propriedades macroscópicas dos materiais, como o caso das propriedades óticas, que são modeladas pelo rácio da carga superficial e o tamanho das nanopartículas, que permite compreender o comportamento dos QDs como sensores óticos fluorescentes [109,115].

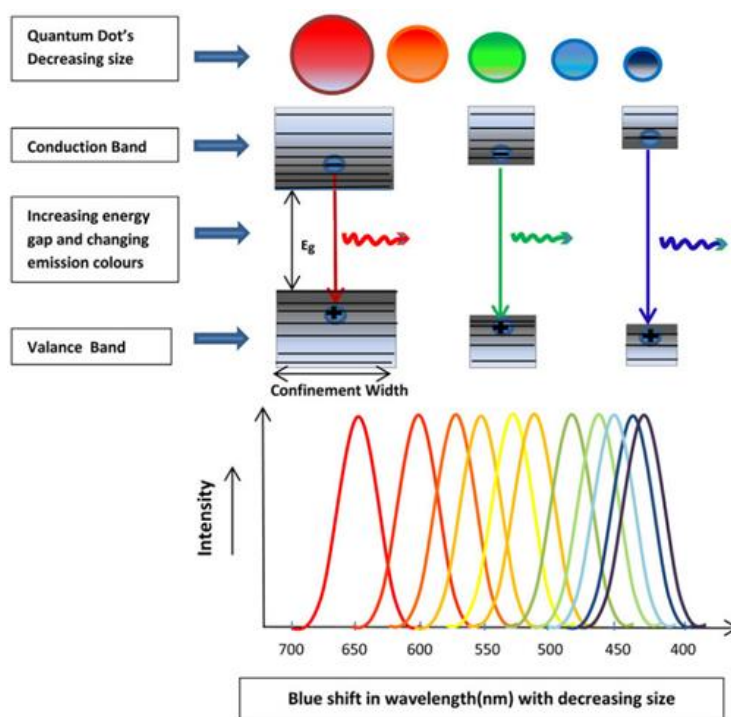


Figura 10 – Ilustração do efeito de confinamento quântico, retirado de [116].

A superfície dos materiais assume uma importância crucial na definição das suas propriedades à nanoescala, em particular nos materiais nanocristalinos, onde existe uma elevada quantidade de defeitos superficiais. Os defeitos podem ser falhas atômicas ou átomos com valência incompleta, que geram estados energéticos capazes de aprisionar portadores de carga, diminuindo a probabilidade de recombinação excitónica e aumentando a probabilidade de eventos não radiativos. Com o objetivo de atenuar esse efeito, utiliza-se a passivação de defeitos superficiais, seja por meio de bases de Lewis que se ligam a zonas da superfície, ou pelo crescimento de uma camada inorgânica de um material semiconductor com um grande *gap* [111,112,117]. Esta camada inorgânica cria um poço de energia potencial que concentra os portadores de carga no interior da partícula, reduzindo o impacto dos defeitos da superfície na emissão de luz. Uma aplicação exemplar é o caso das nanopartículas de Seleneto de cádmio (CdSe, do inglês: *Cadmium selenide*), cuja superfície pode ser revestida com camadas de semicondutores (estruturas *core-shell*) com maior energia de intervalo de banda, como o Sulfureto de zinco (ZnS, do inglês: *Zinc sulphide*) ou o Sulfureto de cádmio (CdS, do inglês: *Cadmium sulphide*). Estes materiais isolam o núcleo de CdSe, mas em simultâneo protegem-no da oxidação em condições ambientais, uma vez que o ião  $S^{2-}$  tem um potencial de redução mais elevado do que o  $Se^{2-}$ , atenuando a degradação foto-oxidativa da superfície [109,113,115].

Os QDs são muito utilizados em aplicações como ecrãs de alta-definição, células solares e sistemas de imagiologia biomédica, evidenciando a importância desta classe de materiais na investigação e desenvolvimento atuais [100,118].

O telureto de cádmio foi o material utilizado na síntese dos QDs neste trabalho. Trata-se de um material cristalino semiconductor composto por elementos dos grupos 12 e 16 da Tabela

periódica [108], na proporção de 1:1 (Cd:Te). Quando sintetizado em escala nanométrica, esse material exibe propriedades óticas lineares e não lineares excepcionais, como alta eficiência quântica e um espectro ajustável ao visível pela alteração do seu tamanho. Devido ao seu tamanho tão reduzido, a carga superficial desses materiais torna-se um parâmetro crucial, influenciando diretamente o comportamento elétrico dos nanocristais em solução. Isso confere mobilidade eletroforética, capacidade de dispersão e de adsorção de íons e/ou moléculas orgânicas na sua superfície. As alterações nessas cargas provocadas pela presença de algum analito, podem afetar a solubilidade dos QDs e originar um aumento ou supressão da sua luminescência, permitindo que os nanocristais tenham aplicação em diversificadas áreas [115].

Os CdTe@QDs estão entre os nanocristais semicondutores com maior diversidade de aplicações. Na síntese dos nanocristais, os ligantes de superfície mais comuns são compostos que contêm grupos tióis, como o ácido tioglicólico (TGA, do inglês, *Thioglycolic acid*), o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA, do inglês, *3-mercaptopropionic acid*), a glutatona (GSH) e a cisteína (CYS, do inglês, *Cysteine*) [117,119]. Esses ligantes de tiol proporcionam aos QDs estabilidade em meio aquoso, prevenindo a agregação, além de adicionar funcionalidades químicas específicas, como grupos amina ou carboxílicos. Isso permite interações eletrostáticas ou covalentes com superfícies macroscópicas, nanopartículas ou biomoléculas [117]. Diante estas características, neste estudo foram sintetizados nanocristais de CdTe@MPA, utilizando as características dos CdTe@QDs e o ligante de superfície com o grupo tiol. A escolha desse ligante foi motivada pela presença de grupos nitrilo, amino e hidroxilo na molécula alvo, que facilitam interações que alteram a carga superficial no ligante destes QDs na presença do analito.

A conjugação de QDs com MIPs representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de sensores biomiméticos com elevada seletividade e sensibilidade, permitindo a detecção eficiente de biomarcadores e outras substâncias de interesse, com respostas rápidas e precisas [120,121].

## 2.6 Luminescência

A luminescência é a emissão de luz ultravioleta, visível ou infravermelha por uma espécie química a partir de um estado excitado gerado por um estímulo luminoso na sequência de uma reação química ou de radiação ionizante. O termo “luminescência” tem origem no latim *lumen*, que significa luz, e foi introduzido em 1888 pelo físico e historiador da ciência Eilhardt Wiedemann. Ele aplicou o termo para descrever todos os fenômenos de emissão de luz, exceto a incandescência, que resulta de altas temperaturas de um corpo. Também sendo muitas vezes referida como “luz fria”, em contraste com a incandescência, que é considerada uma “luz quente”. E pode-se enquadrar em várias categorias, dependendo da forma como ocorre a excitação da espécie química que exibe esta propriedade, conforme ilustrado na Tabela 4 [122].

Tabela 4 – Tipos de luminescência e o modo de excitação respetivo, adaptado de [122].

Fenómeno	Modo de Excitação
Fotoluminescência (Fluorescência ou Fosforescência)	Absorção de luz (fotões)
Radioluminescência	Radiação de ionização (raios-X)
Catodoluminescência	Raios catódicos
Eletroluminescência	Campos elétricos
Termoluminescência	Aquecimento após pré-armazenamento de energia (irradiação radioativa)
Quimiluminescência	Processos químicos (oxidação)
Bioluminescência	Processo bioquímico
Triboluminescência	Forças de fricção e eletrostáticas
Sonoluminescência	Ultrassons

As espécies químicas luminescentes podem ser de diferentes tipos, incluindo compostos orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos, a fluoresceína, a rodamina, a cumarina, as oxazinas, os polienos e os aminoácidos (triptofano, tirosina, fenilalanina); compostos inorgânicos, como uranilo, iões lantanídeos ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ), vidros dopados (com Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), nanocristais (CdTe, ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, GaS, GaP,  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cr}^{3+}$ ); compostos organometálicos, nomeadamente complexos de ruténio, complexos com iões lantanídeos, complexos com agentes quelantes[122].

A fluorescência e a fosforescência são casos particulares de fotoluminescência, em que a emissão luminescente é desencadeada pela absorção de fotões de luz. Uma molécula, quando absorve a energia de um fotão, transita de um estado de energia fundamental para um estado de energia excitado, correspondente à ocupação de níveis de energia mais elevados por um eletrão de valência. O retorno da molécula ao seu estado fundamental pode ser acompanhado de emissão luminescente, porém existem também outras possibilidades de decaimento não radiativo (com diferentes probabilidades de ocorrência), nomeadamente a conversão interna, o cruzamento entre sistemas e a transferência de carga intermolecular (Figura 11). De entre estes processos de desexcitação, alguns resultam da interação com outras moléculas, como a transferência de eletrões, a transferência de prótons e a transferência de energia [122].

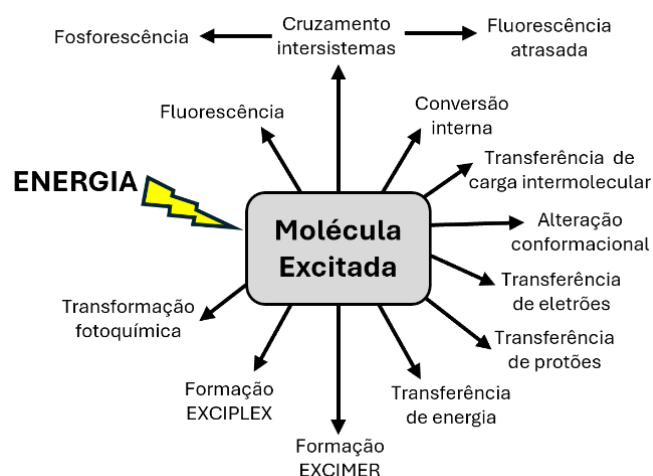


Figura 11 – Processos de desativação de uma molécula excitada, adaptado de [122].

No sentido de melhor compreender o fenômeno de fluorescência que suporta a metodologia utilizada para sintetizar MIPs como sensores biomiméticos para a proteína CA19-9, são apresentados alguns aspectos fotofísicos básicos.

### 2.6.1 Transições eletrônicas

As moléculas absorvem energia, o que resulta na excitação de um elétron de valência, provocando uma transição eletrônica entre dois níveis de energia distintos e bem definidos. A energia absorvida tem de ser igual à diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado para que esta transição ocorra. A quantidade de energia ( $E$ ) absorvida pode ser expressa da seguinte forma (Equação 1) [123]:

$$E = h\nu \quad (1)$$

onde:

- $h$  corresponde à constante de Planck ( $6.67 \times 10^{-27}$  erg.s)
- $\nu$  corresponde à frequência (em Hertz) da radiação

O diagrama simplificado de Perrin-Jablonski (Figura 12) permite visualizar as possíveis transições eletrônicas causadas pela absorção de um fóton e os diferentes processos de desexcitação que podem ocorrer. Os estados eletrônicos singletos são denominados  $S_0$  (estado fundamental),  $S_1$  (primeiro estado excitado) e  $S_2$  (segundo estado excitado), enquanto os estados eletrônicos tripleto são designados  $T_1$  e  $T_2$ . Cada um destes estados eletrônicos contém diversos níveis vibracionais, representados por linhas horizontais mais finas [123].

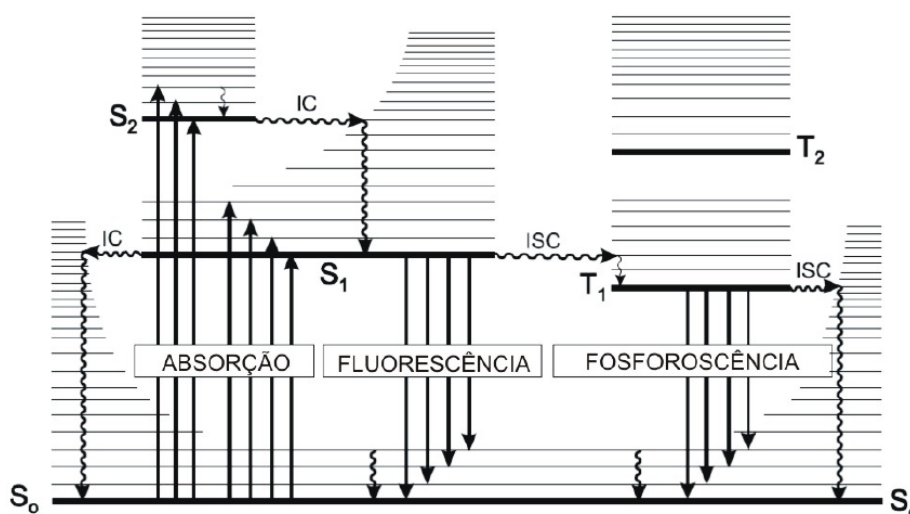


Figura 12 – Diagrama Perrin-Jablonski com exemplos dos vários mecanismos de absorção e desexcitação.  $S_0$ ,  $S_1$  e  $S_2$  – estados eletrônicos singletos;  $T_1$  e  $T_2$  – estados eletrônicos tripleto; IC – conversão interna; ISC – cruzamento intersistemas, adaptado de [123].

No caso do decaimento  $S_1 \rightarrow S_0$  seja acompanhado pela emissão de um fóton, o processo é designado por fluorescência. O tempo de duração da emissão de um fóton é da mesma ordem de grandeza que o da absorção de um fóton em torno de  $10^{-15}$  s. Contudo, os elétrons permanecem no estado excitado até emitirem um fóton ou passarem por outro processo de desexcitação (Tabela 5). Na sequência da excitação de um certo número de moléculas, estas sofrerão um decaimento exponencial da sua intensidade fluorescente em função do tempo médio passado no estado excitado [123].

Tabela 5 – Tempos específicos dos processos de absorção e de desexcitação, adaptado de [124].

Processos de absorção e de desexcitação	Tempo (s)
Absorção	$10^{-15}$ s
Relaxamento vibracional	$10^{-14}$ a $10^{-11}$ s
Fluorescência	$10^{-9}$ a $10^{-7}$ s
Cruzamento intersistemas	$10^{-8}$ a $10^{-3}$ s
Conversão interna	$10^{-14}$ a $10^{-11}$ s
Fosforescência	$10^{-4}$ a $10^{-1}$ s

### 2.6.2 Desvio de Stokes

Na Figura 13 é apresentado o comprimento de onda máximo,  $\lambda_a \text{ max}$ , que reflete a transição mais provável de ocorrer. Do mesmo modo, o espectro de emissão representa as transições eletrônicas que ocorrem do nível vibracional mais baixo do  $S_1$  para qualquer nível vibracional do  $S_0$ . A menor diferença de energia entre os estados no processo de desexcitação significa que a radiação fluorescente tem comprimentos de onda mais longos do que a radiação utilizada para excitar as moléculas. Assim, existe um desvio entre os espectros de absorção e de emissão,

o desvio de Stokes é medido geralmente pela diferença de comprimento de onda entre o pico máximo do espectro de absorção e o pico máximo do espectro de emissão [122].

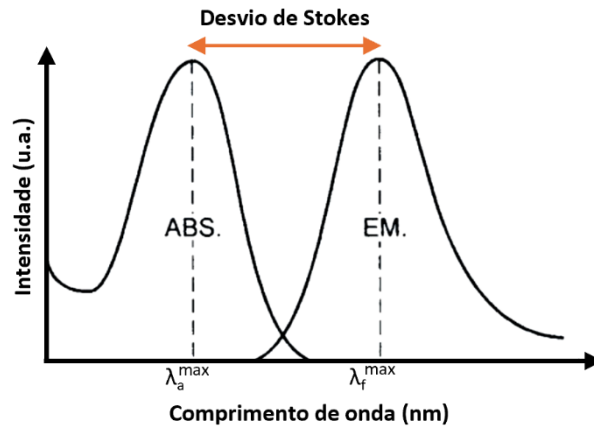


Figura 13 – Representação do desvio de Stokes, adaptado de [122].

É de salientar que os dois espectros podem exibir uma região de sobreposição, o que indica que algumas transições de excitação necessitam de menos energia do que a libertada nas transições de regresso ao estado fundamental. Para avaliar o desvio de Stokes, o espectro de absorção é obtido através da medição da radiação absorvida por um material. Por outro lado, o espectro de emissão é obtido excitando a amostra com um comprimento de onda fixo e analisando o espectro de fluorescência resultante. Também é comum obter espectros de excitação para caracterizar materiais fluorescentes. Esses espectros são frequentemente semelhantes aos espectros de absorção, mas fornecem informações diferentes. A leitura destes espectros é efetuada fixando o comprimento de onda da intensidade de fluorescência e analisando o comprimento de onda da radiação de excitação [122].

### 2.6.3 Fluorescência em estado estacionário

Segue-se uma breve descrição da fluorescência em estado estacionário, utilizada para avaliar o desempenho do sensor biomimético na deteção da proteína CA19-9 desenvolvido neste estudo.

A medição da intensidade de fluorescência em estado estacionário pressupõe a existência de uma fonte de radiação com emissão constante sobre a amostra e a medição contínua da intensidade de fluorescência. Dado que a absorção ocorre numa escala de tempo de femtossegundos, o estado estacionário é alcançado de imediato após a radiação atingir a amostra [122]. A intensidade de fluorescência é uma medida adimensional associada ao número de fótons de emissão que incidem no fotodetector. No caso de o fotodetector ser um espectrómetro, para além da intensidade, é também possível obter informações sobre o espectro de emissão. O espectro de emissão informa-nos que nem todos os fótons emitidos têm a mesma energia, refletindo as várias transições que ocorrem do nível vibracional mais baixo de  $S_1$  para

os vários níveis vibracionais de  $S_0$ , o que justifica a forma sinusoidal da curva de emissão de fluorescência com o comprimento de onda (Figura 13) [125].

### 2.6.3.1 Supressão da fluorescência

A supressão ou inibição da fluorescência (*quenching*) é qualquer processo de diminuição da intensidade da emissão fluorescente de uma molécula. Estes processos de decaimento de elétrons no estado excitado podem ser intrínsecos à própria molécula ou intramoleculares ou resultar da interferência com moléculas vizinhas, sendo por isso designados intermoleculares. Em geral, a supressão é um processo fotofísico, não existem reações químicas para formar novos produtos. Assim, após o decaimento, o fluoróforo não se converte num novo produto mantendo a sua estrutura molecular. Dos processos de interação com moléculas vizinhas, apenas será considerado o que ocorre por colisão entre o fluoróforo e o supressor. Ao interagir com o analito, os QDs sofrem o efeito de supressão de fluorescência [122]. Este trabalho apresenta os QDs como um fluoróforo e o CA19-9 como um supressor, um processo dependente do tempo, pois requer uma colisão com o supressor durante o tempo de vida do estado excitado dos QDs, resultando em um retorno ao estado fundamental com emissão de calor, sendo classificado como supressão dinâmica e depende da difusão das moléculas no meio. Por outro lado, a supressão estática difere da supressão dinâmica na medida em que um par fluoróforo-supressor é formado no estado fundamental e é independente das colisões entre as moléculas e pode ocorrer nos casos em que a difusão das moléculas é limitada pela elevada viscosidade do meio ou em matrizes rígidas. Em ambos os processos de supressão, a intensidade fluorescente apresenta um decaimento exponencial que é proporcional à concentração do supressor, dada pela equação de Stern-Volmer (Equação 2) [122,125,126]:

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

Onde:

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

De um modo geral, quando a relação  $F_0/F$  é representada graficamente em função da concentração do supressor, obtém-se uma relação linear em que o declive ( $k_{sv}$ ) representa a constante de Stern-Volmer, a pressão e temperatura constantes [122,125,126].

Pela equação de Stern-Volmer é possível demonstrar a acessibilidade e a resistência à transferência de massa da molécula alvo através da matriz polimérica, sendo este valor fornecido pelo fator de impressão (IF, do inglês: *Imprinting factor*). Este dado é fornecido pela razão entre as constantes de Stern-Volmer do MIP e do NIP, como mostra a Equação 3 [127]:

$$IF = \frac{k_{sv}MIP}{k_{sv}NIP} \quad (3)$$

No caso da supressão estática (Equação 4), a constante representa a constante de equilíbrio de formação do complexo ( $k_s$ ) [122].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv}[Q] = 1 + k_s[Q] \quad (4)$$

A supressão também depende da concentração do supressor a uma determinada pressão e temperatura. E por vezes, a supressão dinâmica e estática pode ocorrer simultaneamente, o que leva a um desvio da linearidade de  $F_0/F$  em função da concentração do supressor [Q] [122].



## 3 Parte experimental

Neste capítulo, serão descritos os procedimentos experimentais necessários para que todos os objetivos sejam alcançados. O trabalho experimental iniciou-se com a síntese dos QDs da cor pretendida, neste caso o amarelo. Após a síntese dos QDs, seguiu-se com o processo de polimerização dos MIPs e consequente imobilização dos mesmos numa membrana de *nylon*. Após a preparação do biossensor, procedeu-se aos estudos de deteção, reprodutibilidade e seletividade da CA19-9 para testar o sensor biomimético.

### 3.1 Materiais e Equipamentos

Os espectros de fluorescência foram adquiridos utilizando um espectrómetro de fluorescência Lumina (Figura 14) (Thermo Scientific) com uma lâmpada de descarga de arco de xénon de onda contínua de 150 W como fonte de luz, a uma velocidade de varrimento de  $600 \text{ nm min}^{-1}$ , um tempo de integração de 50 ms e um tempo de resposta de 0,02 s. A tensão do tubo fotomultiplicador foi de 330 PMT, com as fendas de excitação e de emissão reguladas para 20 nm e os filtros regulados para o ar. A amostra foi excitada a 380 nm ( $\lambda_{\text{ex}}=380 \text{ nm}$ ) e a emissão foi registada entre [485-680] nm. As medições de fluorescência foram realizadas com uma célula de precisão com um trajeto de luz de 1 mm em quartzo suprasil® da HELLMA®Analytics.



Figura 14 – Espectrômetro de fluorescência Lumina (Thermo Scientific).

Os reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho e a sua origem comercial são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Lista de reagentes utilizados e a respectiva origem comercial.

Reagentes	Origem comercial
Pó de telúrio (200 mesh, 99,8 %)	Alfa Aesar
Borohidreto de sódio (NaBH <sub>4</sub> , 99 %)	Fisher Chemical
Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	Fisher Chemical
Cloreto de cádmio hemi (penta-hidratado) (CdCl <sub>2</sub> . 2. 5H <sub>2</sub> O, 98 %)	Acros Organics
Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	Panreac Química SA
Carbonato de sódio deca-hidratado (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . 10H <sub>2</sub> O)	Riedel-de Haën
Proteína humana CA19-9 sem conjugação de antígeno	Biorbyt
MMP7	Abnova
Creatinina (CREA, do inglês, <i>creatinine</i> )	Fluka
Albumina de soro humano (HSA, do inglês, <i>Human serum albumin</i> )	Sigma-Aldrich
Etanol (96 %)	LabChem
3-MPA	Sigma-Aldrich
Cloridrato de aminoetil-2 metacrilato (AEMH.HCl)	Sigma-Aldrich
Acrilamida (AAm)	Sigma-Aldrich
N, N-metilenobis(acrilamida) (MBAm)	Sigma-Aldrich
Tampão fosfato salino (PBS, do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i> )	VWR Life Science
Persulfato de amônio (APS, do inglês: <i>Ammonium persulfate</i> )	VWR Life Science
Soro humano HN	PZ CORMAY S. A.

## 3.2 Metodologias

Foram realizados vários procedimentos para obter o sensor biomimético final, começando com a síntese dos nanomateriais e MIPs, depois a sua caracterização, terminando com testes de seletividade e eficácia.

### 3.2.1 Síntese dos pontos quânticos

Os QDs solúveis em água foram preparados de acordo com Zhou *et al.*, mas com pequenas modificações. Inicialmente, desoxigenou-se 250 ml de água ultrapura com azoto. De seguida, pesou-se para o gobelé, 360 mg de borohidreto de sódio, 76,2 mg de telúrio em pó e juntou-se 5 ml de água ultrapura, previamente saturada com azoto. Num balão de três tubuladuras, dissolveu-se cloreto de cádmio (6,6 mmol) em 60 mL de água ultrapura desoxigenada. Com uma solução transparente adicionou-se, 30 mL de água ultrapura e de 3-MPA (10,2 mmol). De seguida, o pH foi ajustado entre 11-11,5 com adição gota-a-gota de hidróxido de sódio 1 M, e a solução foi desoxigenada com azoto e colocou-se sob refluxo. A solução aquosa de NaBH<sub>4</sub> e telúrio foi mergulhada de imediato num banho, previamente aquecido a 80 °C, e deixou-se em agitação 5-10 minutos, até se observar a formação de uma forte cor púrpura. A razão molar (Cd<sup>2+</sup>/Te<sup>2-</sup>/3-MPA) foi otimizada para (1:0,1:1,5). Foram obtidos diferentes tamanhos de QDs de telureto de cádmio, funcionalizados com o ácido 3-mercaptopropiónico, CdTe@MPA, com o tempo de refluxo. A solução de QDs foi precipitada com etanol 96 %, a razão (solução de QDs/etanol) foi (1:1), e o precipitado foi recolhido por centrifugação a 8000 rpm a 5 minutos, à temperatura ambiente (22 °C) (Figura 15). O passo final foi a secagem dos *pellets* num exsiccador à temperatura ambiente. Os QDs sólidos resultantes do processo foram triturados e armazenados num frasco escuro protegido da luz.

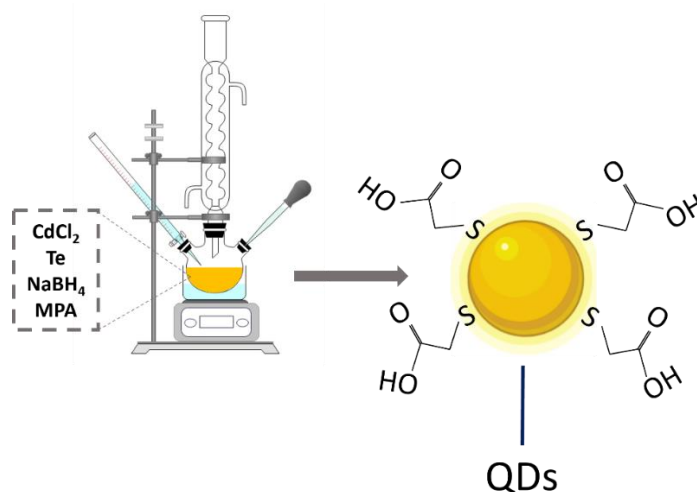


Figura 15 – Ilustração da síntese dos QDs.

### 3.2.2 Síntese de MIP@QDs

Os polímeros impressos foram preparados pela estratégia de impressão de superfície recorrendo ao método de polimerização de radicais livres (Figura 16).

Foram testadas diferentes condições de polimerização, onde se estudou o efeito da variação de alguns constituintes da FRP, como tempo de polimerização, quantidade de iniciador APS, catalisador TEMED, monómero AAm e do agente reticulante MBAm. Os gráficos de fluorescência obtidos para cada testagem estão representados em anexo (Tabela B1). De uma forma sintética, incubou-se  $1 \text{ kU mL}^{-1}$  da proteína alvo CA19-9 com  $200 \mu\text{L}$  de CdTe@MPA QDs emissores de fluorescência no comprimento de onda da luz amarela, em PBS  $10 \text{ mM}$  pH 7,4 (Figura 16-1). Seguidamente, foram adicionados à mistura o agente vinílico AEMH ( $0,0242 \text{ mM}$ ), o monómero funcional AAm ( $0,101 \text{ mM}$ ) e o reticulante MBAm ( $0,109 \text{ mM}$ ), sob agitação durante 10 minutos em PBS. No passo seguinte, adicionou-se APS ( $19,9 \text{ mM}$ ) juntamente com o TEMED ( $39,8 \text{ mM}$ ) e incubou-se durante 30 minutos sob agitação a  $650 \text{ rpm}$  (Figura 16-2). Depois da polimerização as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em  $1 \text{ mL}$  de PBS, e a fluorescência de NIP@QDs e MIP@QDs foi medida.

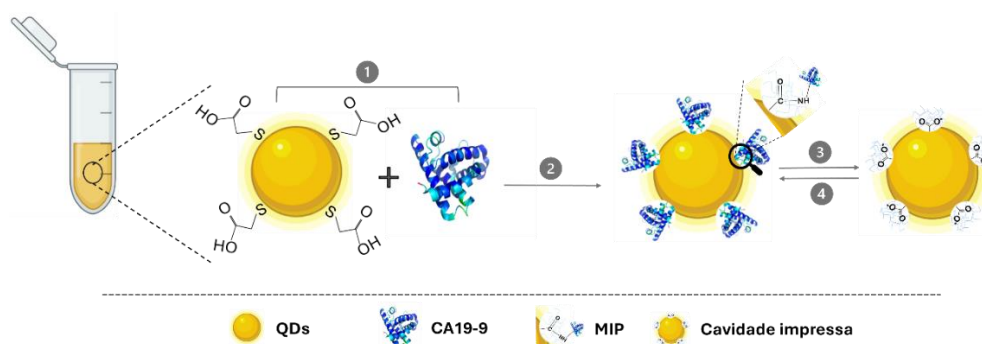


Figura 16 – Representação esquemática das etapas de construção do sensor biomimético para a detecção da proteína CA19-9: (1) Incubação da proteína CA19-9 com os QDs; (2) Polimerização da mistura reacional contendo o monómero e a molécula alvo; (3) Remoção da proteína CA19-9 da matriz polimérica, criando cavidades específicas; (4) Reconhecimento e ligação específica da proteína CA19-9 à superfície do MIP@QDs.

No passo do tratamento com CBB, a proteína foi removida das cavidades impressas no polímero. Os MIPs@QDs foram centrifugados e ressuspensionados em  $1 \text{ mL}$  de tampão carbonato/bicarbonato (CBB, do inglês: *Carbonate-bicarbonate buffer*) pH 9,8 e deixados a incubar durante 24 horas no frigorífico (Figura 16-3). Seguidamente foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em  $1 \text{ mL}$  de PBS  $10 \text{ mM}$  e designado de MIP@QDs. A suspensão obtida foi utilizada nas calibrações por medição da variação da sua intensidade de fluorescência com a concentração da proteína alvo CA19-9 (Figura 16-3). Repetiu-se o protocolo, excluindo o passo da incubação da proteína alvo, para a síntese dos materiais não impressos (NIP@QDs).

### 3.2.3 Imobilização de MIP@QDs em suporte sólido

O estudo da imobilização no suporte sólido foi realizado para complementar e comprovar a investigação desenvolvida em solução, para os QDs livres, os MIP@QDs e os NIP@QDs. Este estudo, baseou-se na utilização de uma membrana de *nylon* com 47 mm de diâmetro e 0,45  $\mu\text{m}$  de dimensão dos poros, sobre a qual a solução do MIP@QDs foi adsorvida e impregnada, conforme ilustrado na Figura 17.

Posteriormente, colocaram-se as membranas sob lâmpada UV (365 nm) e foi capturada a fotografia. Após a aquisição das imagens, estas foram submetidas a análise das coordenadas de cor numa aplicação de Red, Green and Blue (RGB) do dispositivo móvel (Figura 17).

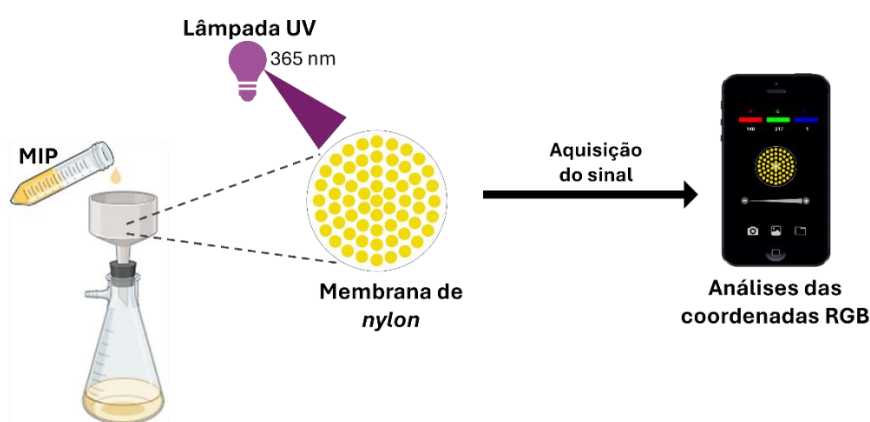


Figura 17 – Ilustração das fases de construção do sensor biomimético em suporte sólido. Imobilização da solução MIP@QDs em membrana de *nylon* utilizando um sistema de filtração a vácuo, seguida pela incubação com diferentes concentrações de CA19-9 e medição do sinal.

### 3.2.4 Deteção da CA19-9

Os MIP@QDs desenvolvidos no presente trabalho foram testados como sensores biomiméticos para a proteína alvo CA19-9. Estes estudos foram efetuados, através de calibrações dos MIP@QDs removidos de proteína e cujo sinal foi seguido por espectroscopia de fluorescência em modo estático, ou seja, por medição da sua intensidade de emissão de fluorescência. Todas as calibrações foram executadas para os MIP@QDs e os correspondentes polímeros não impressos NIP@QDs.

#### *Em solução*

Efetuuou-se a calibração dos MIP@QDs em PBS 10 mM pH 7,4, na presença de soluções padrão de CA19-9 preparadas neste tampão. Resumidamente, adicionaram-se a 190  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de MIP@QDs, 2  $\mu\text{L}$  de solução padrão de CA19-9 na gama de concentrações [3,96-5200]  $\text{mU mL}^{-1}$ , ajustando-se o volume final a 200  $\mu\text{L}$  com PBS. Por fim, mediu-se o sinal de fluorescência da suspensão de MIP@QDs na presença de cada padrão de CA19-9 em PBS.

Repetiram-se as calibrações para os padrões de CA19-9 no intervalo de concentrações [0,0396-52] mU mL<sup>-1</sup> em soro humano liofilizado, o qual foi previamente filtrado com membranas 50 kDa de *cut-off* de peso molecular e diluído a 100 vezes em PBS 10 mM pH 7,4.

#### *Em suporte sólido*

As calibrações dos MIPs em suporte sólido foram realizadas pela adsorção numa membrana de *nylon* de MIP@QDs e de seguida incubados com diferentes concentrações de CA19-9 em PBS e soro humano diluído 100 vezes. No caso, da calibração em PBS, os 1000 µL de MIP@QDs foram diluídos com PBS, ajustando-se o volume final para 5000 µL. Esta solução final foi vertida para um filtro de membrana de *nylon*, à qual se adsorveu diferentes concentrações padrão de CA 19-9 em PBS 10 mM pH 7,4, numa gama de intervalo [3,96-5200] mU mL<sup>-1</sup>. De seguida, selecionaram-se seis pontos semelhantes da membrana do MIP@QDs e NIP@QDs, e incubou-se com 3 µL de concentrações padrão da proteína CA19-9 em PBS e seguidas de secagem numa estufa a 37°C durante 16 minutos. Para a calibração em soro humano diluído, efetuou-se o mesmo procedimento.

### **3.2.5 Estudos de reprodutibilidade**

Avaliou-se a reprodutibilidade dos MIP@QDs sintetizados neste trabalho com soro humano diluído, em PBS 10 mM pH 7,4. De seguida, adicionaram-se aos 190 µL de MIP@QDs 2 µL de solução padrão CA19-9 de 3,96 mU mL<sup>-1</sup> em soro humano diluído, tendo o volume final sido ajustado a 200 µL. Este procedimento foi repetido para as concentrações de 1390 e 5200 mU mL<sup>-1</sup> e a fluorescência dos MIP@QDs foi medida na presença de cada padrão CA19-9.

### **3.2.6 Estudos de seletividade**

Os ensaios de seletividade de MIP@QDs foram realizados, para três interferentes, na presença e ausência de CA19-9 10 U mL<sup>-1</sup> em PBS 10 mM pH 7,4. Resumidamente, misturaram-se a 190 µL de uma suspensão de MIP@QDs 2 µL de solução padrão CA19-9. Seguidamente, foi adicionada uma solução padrão de CREA a 0,06 µg mL<sup>-1</sup> e o volume final foi ajustado para 200 µL. O processo foi repetido para a proteína albumina de soro humano (HSA, do inglês, *Human serum albumin*) a 0,4 mg mL<sup>-1</sup> e para um biomarcador do cancro do pâncreas, MMP7 a 0,065 ng mL<sup>-1</sup>. As suspensões foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. O protocolo descrito acima foi repetido para os NIP@QDs.

## **3.3 Técnicas de caracterização**

Na caracterização dos materiais sintetizados, os QDs, MIP@QDs e os controlos NIP@QDs, foram utilizadas várias técnicas, nomeadamente o espectrofotómetro Evolution 220 UV-vis (Thermo Scientific) para obter espectros UV-Vis numa gama de comprimentos de onda [190-600] nm.

A análise por FTIR, foi efetuada com recurso a um espectrómetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific) acoplado a um acessório de amostragem de refletância total atenuada (ATR) de cristal de contacto de diamante com uma resolução de  $32\text{ cm}^{-1}$  para uma gama espectral de  $[3900-600]\text{ cm}^{-1}$ .

As imagens de SEM e as de espectroscopia de raios X por dispersão de energia EDS foram adquiridas num modelo FEI Quanta 400 FEG operado a uma voltagem de aceleração de 15 kV.

A análise de microscopia de fluorescência de campo amplo foi feita por deconvolução das imagens tridimensionais obtidas da análise da microestrutura das membranas de *nylon* adsorvidas com os MIP@QDs. As amostras foram excitadas a 395 nm com uma fonte de luz LED Lumencor SpectraX, e o sinal emitido foi filtrado por um filtro quádruplo DA/FI/TRIC/CY5 (Semrock, EUA). As imagens dos planos z representativos de cada condição foram ajustadas no brilho e contraste utilizando o software de código aberto *ImageJ*.



## 4 Resultados e Discussão

No desenvolvimento do sensor ótico biomimético para a detecção de CA19-9, foram utilizadas duas abordagens distintas: a impressão molecular em solução e a imobilização molecular em suporte sólido utilizando membranas de *nylon*. Na primeira abordagem, baseada em solução, a CA19-9 foi incubada por 10 minutos para formar os complexos moleculares desejados. Para a segunda abordagem, as membranas de *nylon* foram utilizadas como suporte para a imobilização dos MIP@QDs, seguida de incubação com diferentes concentrações de CA19-9. Os estudos para avaliação do desempenho analítico do sensor foram conduzidos em tampão PBS e em soro humano diluído, para verificar a eficácia e a sensibilidade em diferentes matrizes. Além disso, foram realizados estudos de seletividade para confirmar a especificidade do sensor biomimético na detecção da CA19-9 na presença de outras moléculas interferentes.

Para controlo, foram preparados NIP@QDs em ambas as abordagens. Todos os estudos e testes foram realizados em triplicado para garantir a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados obtidos, assegurando a eficácia do sensor biomimético na detecção da CA19-9.

### 4.1 Síntese de QDs e MIP@QDs

Os QDs livres de emissão amarela são nanocristais semicondutores que exibem uma fluorescência intensa quando excitados por luz num determinado comprimento de onda, o qual foi escolhido para maximizar a sua emissão de fluorescência, no intervalo [485 – 685] nm (Figura 18A, linha contínua verde). Esta fluorescência resulta da recombinação de elétrons e lacunas energéticas geradas pela excitação dos QDs. Antes de avançar para a polimerização dos MIP@QDs, foi realizado um estudo preliminar da interação dos QDs com a molécula alvo (CA19-9), com o objetivo de compreender o comportamento cinético entre ambos. Foram realizadas medições da intensidade de fluorescência em intervalos de 10 minutos, durante 40 minutos (Anexo A, Figura 1A). Observou-se que a intensidade de fluorescência foi mais elevada nos primeiros 10 minutos, seguida por uma diminuição contínua até aos 40 minutos. Este fenómeno

pode ser explicado pelo *quenching* da interação entre os QDs e a CA19-9, onde a molécula alvo pode absorver ou dissipar a energia excitada dos QDs ou, ainda, pela agregação dos QDs, uma vez que emitem uma fluorescência menos intensa em comparação com os QDs livres.

A síntese de MIP@QDs envolve etapas cruciais que garantem a funcionalidade e a eficácia dos sensores biomiméticos concebidos para a detecção do biomarcador CA19-9, o qual foi descrito detalhadamente no subcapítulo 3.2.2.

Para definir o protocolo ideal, foram testadas diferentes condições de síntese de materiais biomiméticos, com o objetivo de otimizar a reação e a sensibilidade do sensor. Foram explorados diferentes raios de monómero, agentes reticulantes e tempos de polimerização (Anexo B, Tabela B1). Verificou-se uma relação equilibrada entre o monómero e o agente reticulante obtendo uma rede polimérica mais estável e homogênea. No entanto, quando estas concentrações não eram idênticas, ocorreram agregações, resultando numa rede polimérica mais densa. Esta densidade excessiva dificultou a remoção completa da molécula alvo, deixando resíduos após o tratamento com CBB, o que resultou numa fluorescência inferior à esperada, pois as cavidades de reconhecimento não ficaram completamente livres (Anexo B, Figura B2). Além disso, o tempo de polimerização e as concentrações do iniciador APS e catalisador TEMED, também influenciaram a eficiência dos MIP@QDs.

Após definir o rácio ótimo e o tempo de polimerização, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de iniciador e catalisador (Anexo B, Tabela B1). Observou-se que o aumento destas concentrações melhorou a afinidade de reconhecimento molecular dos MIP@QDs para a molécula alvo, permitindo uma remoção mais eficiente da molécula e a formação de cavidades específicas livres. Isto foi evidenciado pelo aumento da intensidade de fluorescência dos MIP@QDs após o tratamento com CBB, em comparação com a fluorescência medida após a polimerização (Anexo B, Figura B1). Subsequentemente, foi realizado um estudo mantendo as condições de polimerização de MIP@QDs, mas alterando o pH de 7,4 para 5,8, a fim de avaliar a viabilidade da polimerização em meio ácido (Anexo C, Tabela C1). Contudo, após 24 horas, os MIP@QDs apresentaram um efeito de *quenching*, indicando instabilidade e tornando-os inadequados para aplicação como sensores biomiméticos (Anexo C, Figura C1).

Finalmente, foi testada uma concentração mais elevada de CA19-9 ( $10 \text{ kU mL}^{-1}$ ), com o objetivo de aumentar o número de locais de impressão na matriz polimérica, aumentando assim a sensibilidade do sensor. Os resultados indicaram uma polimerização eficaz e uma remoção parcial satisfatória da molécula alvo (Anexo D, Figura D1). No entanto, a resposta analítica dos MIP@QDs foi inferior à observada nos controlos (Anexo D, Figura D2C). Este comportamento pode ser atribuído à saturação da proteína CA19-9 na matriz polimérica, sugerindo que o processo de remoção da molécula alvo não foi suficientemente eficaz para a eliminar por completo. Como consequência, verificou-se uma resposta não linear (Anexo D, Figura D2D), evidenciando uma baixa especificidade dos MIP@QDs para a proteína, o que comprometeu a capacidade de reconhecimento seletivo do sensor biomimético.

Este conjunto de estudos evidencia a complexidade inerente à otimização dos MIP@QDs, sublinhando a relevância de um controle rigoroso sobre as condições de síntese para assegurar a especificidade e a sensibilidade do sensor biomimético. As condições ótimas de síntese, estabelecidas com base nestes ensaios, estão representadas na Figura 18.

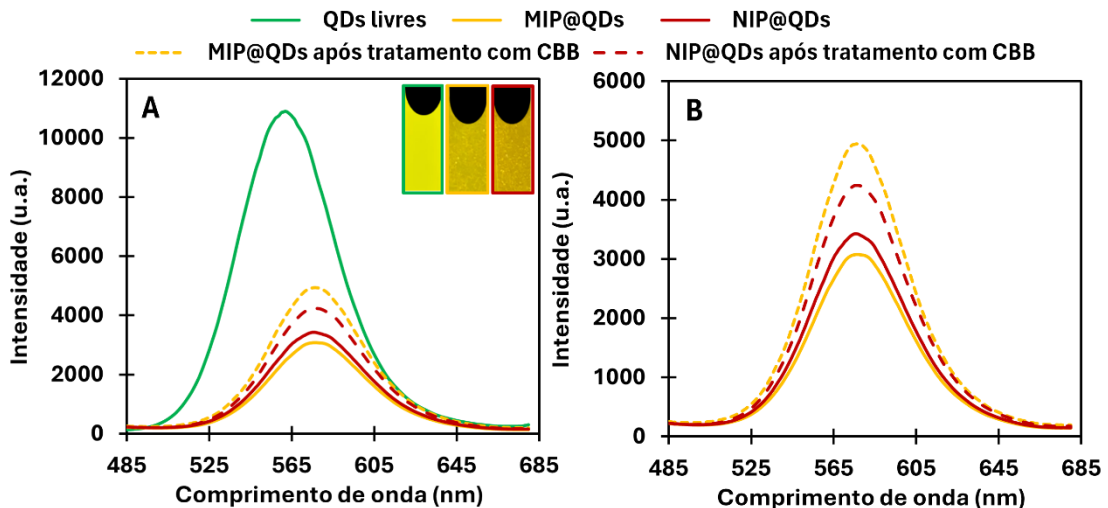


Figura 18 – Representação das medições dos espectros de emissão de fluorescência obtidas nas diferentes fases da síntese dos MIP@QDs e NIP@QDs. Na imagem A, são apresentados os espectros de fluorescência dos QDs livres e após a polimerização dos MIP@QDs e dos NIP@QDs. A imagem B corresponde aos resultados obtidos após remoção da molécula alvo com CBB.

Após polimerização, os MIP@QDs (Figura 18B, linha contínua amarela) e os respectivos polímeros não impressos NIP@QDs (Figura 18B, linha contínua vermelha), apresentaram uma diminuição significativa da sua intensidade de fluorescência em relação aos QDs livres (Figura 18A, linha contínua verde). Este efeito conhecido por *quenching*, é mais acentuado nos MIPs do que nos NIPs, o que poderá ser explicado pela presença da proteína à superfície dos QDs. Atendendo ao valor previsto do ponto isoelétrico da proteína ser aproximadamente 9,0 [128], esta pode estar carregada positivamente à superfície do tampão PBS 10mM pH 7,4 usado na polimerização. De acordo com esta previsão, a predominância de carga superficial positiva na superfície da proteína favorece as interações eletrostáticas com as nanopartículas de QDs, as quais possuem carga negativa atendendo à funcionalização da sua superfície com ácido mercaptopropiônico, com o pKa de 4,34 para o grupo carboxílico e 10,84 para o grupo tiol [129]. Por outro lado, poderá formar-se um complexo não fluorescente entre a CA19-9 e os QDs livres de natureza eletrostática por aproximação de cargas opostas, o qual atuará como supressor de fluorescência dos QDs, dado que este fenómeno de *quenching* também se verifica durante a calibração dos QDs livres com o aumento da concentração de proteína, como será discutido na subsecção 4.4.

Depois da lavagem com o CBB pH 9,8, observamos um maior aumento da intensidade de fluorescência dos MIP@QDs (Figura 18B, linha tracejada amarela) relativamente aos seus controlos não impressos NIP@QDs (Figura 18B, linha tracejada vermelha). Tal poderá dever-se em parte à remoção de compostos em solução que não reagiram completamente e estariam a

bloquear a emissão de fluorescência, por efeito de filtro interno. No entanto a maior recuperação de sinal nos MIP@QDs foi 1866,47 de intensidade de fluorescência e em relação aos NIP@QDs foi 815,66 de intensidade de fluorescência, reforçando a anterior previsão de ser a proteína a responsável pelo restante efeito de supressão de fluorescência nos MIP@QDs. Deste modo, a remoção da proteína nas cavidades dos MIP@QDs pode ser facilitada pelo pH 9,8 do tampão CBB, uma vez que a proteína tende a adquirir uma carga superficial negativa, favorecendo a sua libertação da matriz polimérica devido à repulsão eletrostática em relação à carga superficial negativa dos QDs neste tampão. Como resultado, a intensidade de fluorescência dos MIP@QDs, que foi parcialmente perdida durante a polimerização, é recuperada em maior proporção no processo de lavagem, comparativamente aos NIP@QDs.

Neste trabalho foi feito um estudo de estabilidade dos QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs, durante 14 dias à temperatura de 4 °C (Figura 19).

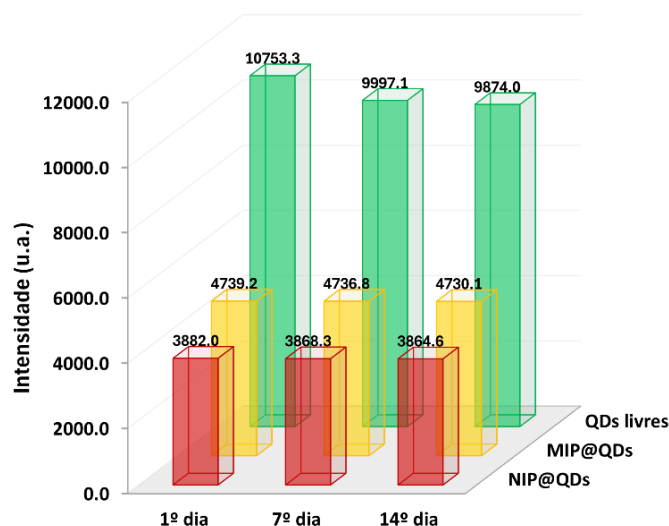


Figura 19 – Estabilidade dos QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs dispersos em PBS ao longo de 1, 7 e 14 dias, mostrando as diferenças na estabilidade dos materiais.

Nos QDs livres (Figura 19, barras verdes) observou-se uma descida da intensidade do 1º dia para 7º dia correspondente a 756,2 e do 1º dia para o 14º dia de 879. Por outro lado, os MIP@QDs (Figura 19, barras amarelas) tiveram uma diminuição da intensidade de fluorescência relativamente baixa entres os 14 dias, visualizando-se uma descida de 2,4 do 1º dia para o 7º dia e de 9,1 do 1º dia para o 14º dia. No caso dos NIP@QDs (Figura 18, barras vermelhas), também houve uma alteração mínima da intensidade de fluorescência ao longo dos 14 dias, com uma diferença de intensidade entre o 1º dia e 7º dia de 13,7 e do 1º dia ao 14º dia de 17,4.

## 4.2 Imobilização do material biomimético em suporte sólido

Realizou-se a imobilização dos QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs na membrana de *nylon* (Figura 20). Após filtração em membranas de *nylon* sob vácuo controlado, observou-se que os QDs livres não ficaram adsorvidos na membrana, uma vez que o tamanho dos QDs amarelos se situa na gama dos nanómetros, cerca de 3 nm [130] e os poros da membrana de *nylon* na gama dos micrómetros, 0,45µm [131]. As suspensões de QDs livres estavam bem dispersas e homogêneas em PBS, mas tal não foi o caso com os MIP@QDs, que formaram suspensões mais heterogêneas. O que poderá indicar a presença de pequenos agregados, mais ou menos dispersos, que são maiores do que os poros da membrana de *nylon*, permitindo que tanto os MIP@QDs como os seus controlos NIP@QDs ficassem retidos.

Na prática, quando as membranas de *nylon* brancas foram observadas sob a lâmpada UV, adquiriram uma cor azulada. Esta coloração deve-se à luz UV emitir um comprimento de onda mais curto do que o visível, que é absorvido pela membrana de *nylon*, e os eletrões das moléculas dessa superfície são excitados, reemitindo luz no comprimento de onda seguinte, correspondente ao azul. No entanto, os MIP@QDs apresentaram adsorção na superfície da membrana de *nylon*, com pontos amarelo-alaranjados a olho nu e uma cor amarelada sob a lâmpada UV (Figura 20). Os NIP@QDs também apresentaram pontos adsorvidos na membrana, mas com menor intensidade na cor a olho nu e sob a lâmpada UV (Figura 19).

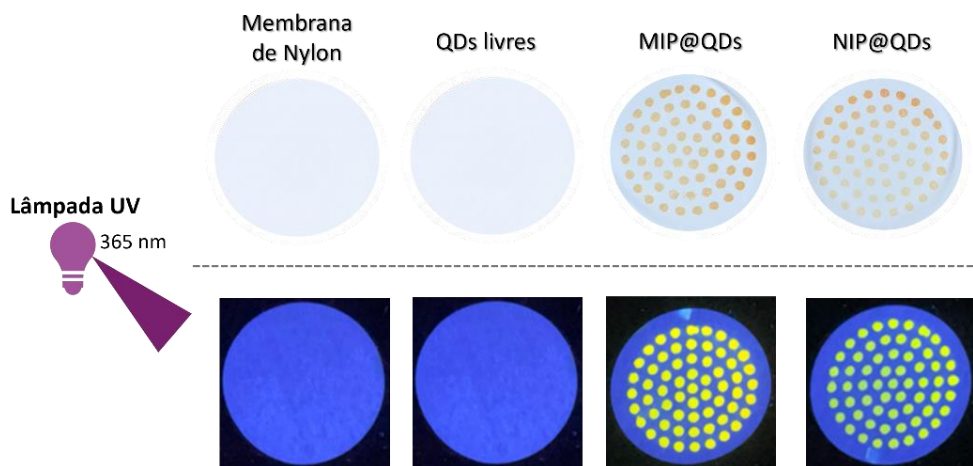


Figura 20 – Imobilização dos QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs na membrana de *nylon*. Na parte superior a membrana visualizada a olho nu, e na parte inferior sob a lâmpada UV.

Após a seleção dos seis pontos nos MIP@QDs e NIP@QDs, foram efetuadas calibrações com padrões CA19-9 em PBS e soro humano diluído 100 vezes. Posteriormente, procedeu-se à análise das coordenadas *RGB*.

## 4.3 Técnicas de caracterização

Os QDs livres, os MIP@QDs e os NIP@QDs foram caracterizados utilizando uma combinação de técnicas, incluindo espectroscopia UV-Vis, espectroscopia FTIR, SEM e microscopia de fluorescência de campo amplo, tanto para estudos em solução e em suporte sólido. Os sobrenadantes dos MIP@QDs e NIP@QDs foram analisados por espectroscopia UV-Vis de modo a confirmar que a molécula alvo foi eficazmente removida após o processo de polimerização. Adicionalmente, os QDs livres, MIP@QDs e NIP@QDs foram caracterizados por espectroscopia FTIR, permitindo a identificação das modificações químicas que ocorreram durante os processos de polimerização e remoção da molécula alvo. A caracterização morfológica das superfícies das membranas de *nylon*, de NIP@QDs e MIP@QDs foram realizadas por microscopia SEM e microscopia de fluorescência de campo amplo, fornecendo uma visão detalhada das mudanças estruturais.

### 4.3.1 Análises por espectroscopia UV-vis

A espectroscopia UV-vis (Figura 21) apresenta espectros de absorção UV-vis de uma solução de QDs livres em PBS 10mM, uma solução de CA19-9, soluções dos sobrenadantes NIP@QDs e MIP@QDs e após tratamento dos mesmos com CBB.

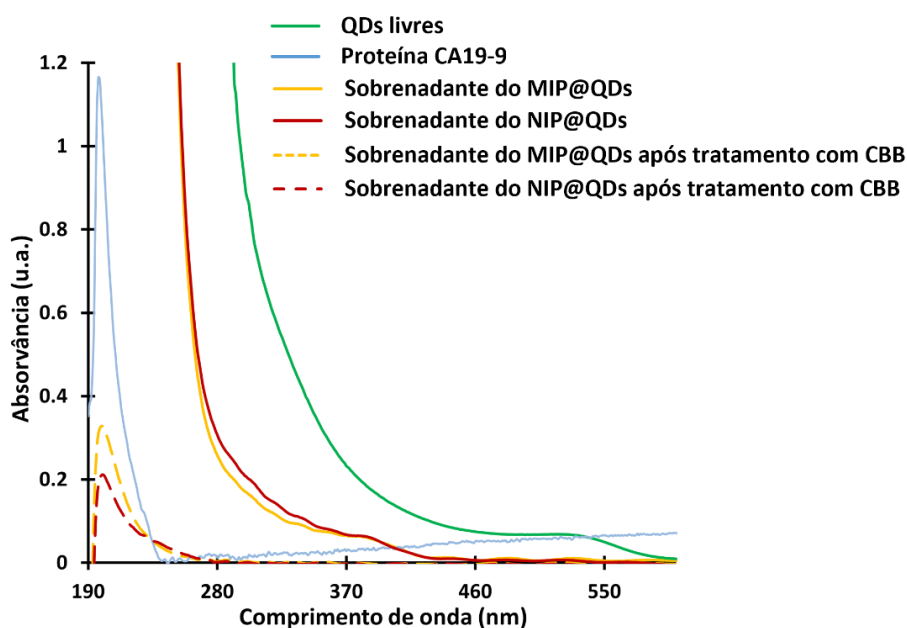


Figura 21 – Espectros UV-vis obtidos durante a síntese dos MIP@QDs e NIP@QDs, e espectro de absorção UV-vis de uma solução da proteína CA19-9 em PBS 10 mM, pH 7,4.

Como se pode ver na Figura 21, a ausência de sobreposição entre o espectro de absorção do CA19-9 (Figura 21, linha sólida azul) e a emissão de fluorescência dos QDs livres (Figura 21, linha sólida verde) sugere que a transferência de energia não é o motivo da supressão da fluorescência. Em alternativa, pode estar a ocorrer um fenómeno de transferência de carga, uma vez que o pico de absorção do CA19-9 (210 nm) coincide com a zona de absorção dos QDs

livres e dos MIP@QDs, que apresentam uma absorção contínua nesta região do UV. Por conseguinte, é possível que os eletrões sejam transferidos da banda de condução dos QDs (orbitais HOMO) para a banda de valência do CA19-9 (orbitais LUMO), o que causa a supressão adicional da fluorescência observada no MIP@QDs (Figura 21, linha sólida amarela)[112,122].

#### 4.3.2 Análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Todas as amostras analisadas foram previamente secas num exsiccador à temperatura ambiente. Nas amostras dos MIP@QDs e dos seus controlos não impresso NIP@QDs, os espectros FTIR foram adquiridos após a lavagem dos materiais com CBB.

Nos espectros de FTIR (Figura 22) visualiza-se a banda larga localizada entre  $3250\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$ , referente ao grupo OH presente em todos os materiais (Figura 22, linhas vermelha, azul, roxo e verde), enquanto o pico localizado a  $3285\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento N-H observado nas proteínas devido ao grupo de ligação peptídica (Figura 22, linha azul).

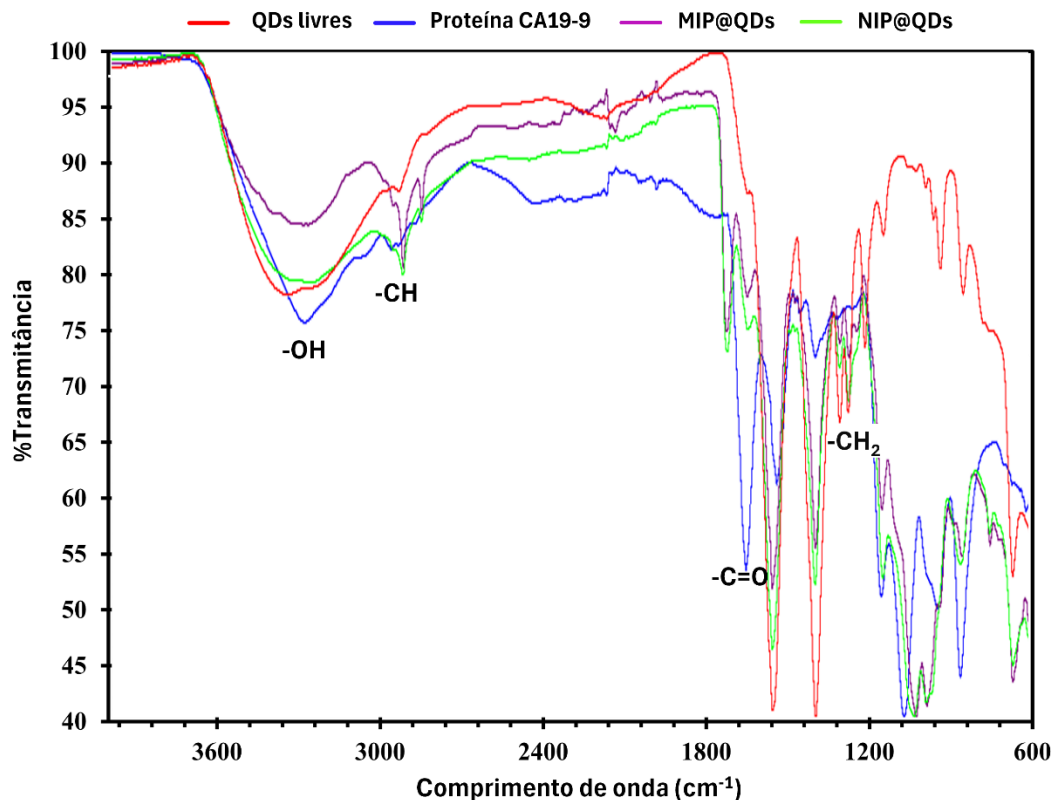


Figura 22 – Espectros FTIR de amostras de QDs livres (linha vermelha), proteína CA19-9 (linha azul), MIP@QDs (linha roxo) e NIP@QDs (linha verde) após o tratamento com CBB.

O espectro FTIR da proteína CA19-9 (Figura 22, linha azul) mostra bandas a  $1640\text{ cm}^{-1}$  correspondentes à ligação C=O do grupo amida e a banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$  da ligação C-N (Figura 22, linha azul). E ainda o pico a  $1185\text{ cm}^{-1}$  associado às ligações N-H e C-N. Nas amostras MIP@QDs (Figura 22, linha roxo) e NIP@QDs (Figura 22, linha verde), os picos a  $1285\text{ cm}^{-1}$  e  $990\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídos à presença das ligações C=C devido a grupos vinílicos insaturados, provavelmente de

monómeros que não reagiram, mas que ficaram aprisionados na rede polimérica, após a lavagem com CBB. Nos MIP@QDs (Figura 22, linha roxo), o pico a  $1718\text{ cm}^{-1}$  está associado à ligação C=O do reticulante e à presença de proteínas na matriz polimérica.

### 4.3.3 Análises SEM e EDS

Foram obtidas as imagens de SEM das membranas adsorvidas com os conjugados MIP@QDs e NIP@QDs e as respectivas imagens de EDS (Figura 23).

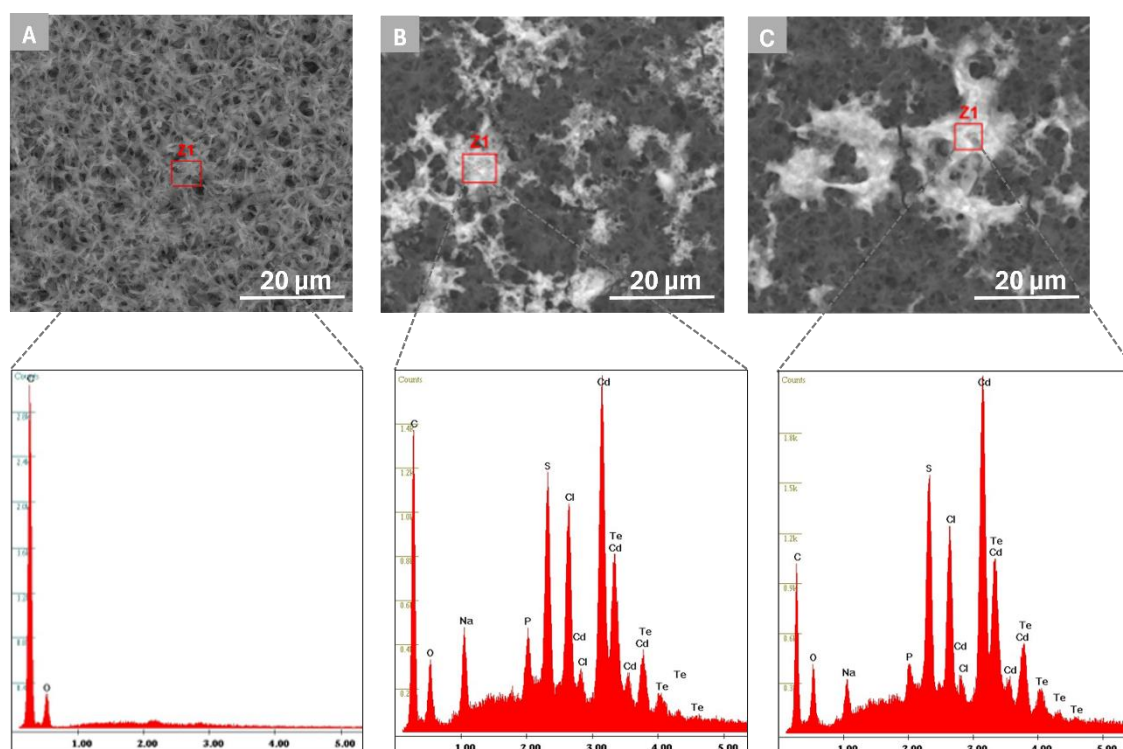


Figura 23 – Análise SEM e EDS das membranas de *nylon* preparadas: (A) Membrana de *nylon* sem modificação; (B) Membrana de *nylon* com NIP@QDs imobilizados; (C) Membrana de *nylon* com MIP@QDs imobilizados.

De acordo com as imagens de SEM, a membrana de *nylon* apresenta-se como um polímero poroso, com tamanhos de poros entre 0,5 e 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 23A). Após a impressão com os MIP@QDs (Figura 23C), alguns destes poros são parcialmente preenchidos e a membrana torna-se menos porosa. Em simultâneo, surgem zonas mais brilhantes, correspondendo na técnica de SEM a materiais com um número atómico mais elevado, estando associados aos QDs. Como os QDs estão conjugados aos MIPs na forma de MIP@QDs, as zonas mais cinzentas podem corresponder a zonas de material polimérico com menos QDs distribuídos no polímero, uma vez que a membrana é mais densa e menos porosa (Figura 23C) em comparação com a membrana isolada (Figura 23A). O aspeto das membranas adsorvidas com os NIP@QDs (Figura 23B) é semelhante em aglomerados de QDs, cujo diâmetro é impossível de determinar com precisão recorrendo à ampliação utilizada pelo SEM. A análise EDS das membranas com os MIP@QDs (Figura 23C-z1) revela uma menor percentagem do

elemento carbono em comparação com a análise EDS com os NIP@QDs adsorvidos na membrana numa zona de aquisição equivalente (Figura 23B-z1) Isto pode dever-se, em parte, à maior porosidade dos MIPs@QDs em comparação com os NIPs@QDs, devido à presença de cavidades de impressão nos MIPs, formadas durante a remoção de proteínas. Ambas as análises EDS mostram que os elementos cádmio e enxofre estão presentes nas membranas no MIP@QDs e NIP@QDs, ao contrário do que se verifica nas membranas de *nylon* isoladas, o que comprova a associação dos QDs às zonas mais brilhantes nas imagens SEM.

#### 4.3.4 Microscopia de fluorescência de campo amplo

De modo a visualizar a forma como os QDs estão distribuídos nas membranas impressas com MIP@QDs, procedeu-se à microscopia de fluorescência de campo amplo (Figura 24). As imagens das microestruturas dos materiais desenvolvidos foram adquiridas após secagem a 60 °C e com montagem em etanol 98 % numa placa de vidro.

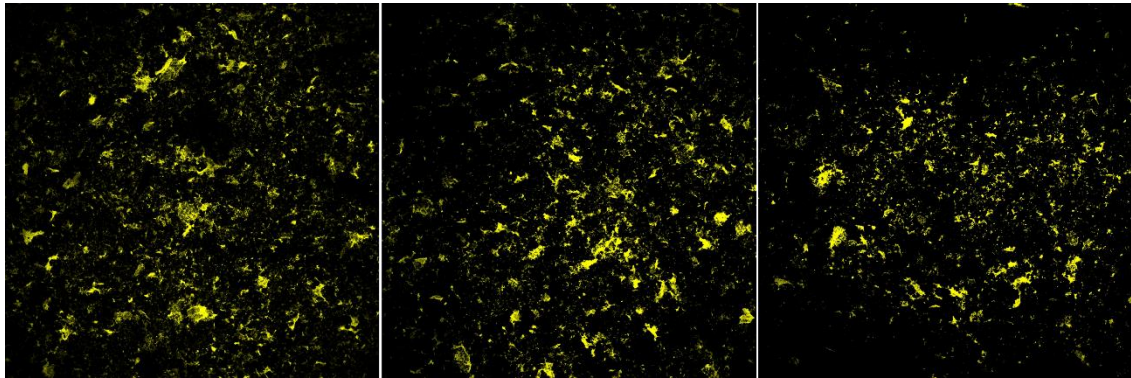


Figura 24 – Imagens de microscopia de campo amplo adquiridas em diferentes planos z da superfície das membranas *nylon* impressas com os MIP@QDs após remoção da proteína. O sinal de emissão dos QDs é apresentado utilizando uma "Lookup Table" (LUT) amarela.

As mesmas definições de histograma foram aplicadas a todas as condições experimentais, garantindo a consistência na análise das imagens obtidas. A emissão de fluorescência foi representada utilizando uma "Lookup Table" (LUT) amarela do software de código aberto *ImageJ*, que facilita a visualização e comparação de diferentes áreas fluorescentes dentro do mesmo círculo nas membranas de *nylon* adsorvidas com os MIP@QDs. A emissão de fluorescência realçada nas imagens é claramente atribuída à presença de QDs na estrutura do MIP@QDs adsorvido na superfície das membranas, caracterizadas pela cor amarela no mapa de emissão. Apesar dos agregados de QDs, visualiza-se uma boa distribuição de MIP@QDs nos diferentes planos z analisados na membrana adsorvida, o que reflete o seu comportamento homogêneo de adsorção na superfície da membrana. Esta distribuição homogênea dos MIP@QDs é um importante indicador na avaliação do desempenho final do sensor biomimético desenvolvido neste trabalho.

## 4.4 Desempenho analítico em solução

O desempenho do sensor biomimético desenvolvido neste trabalho foi avaliado na presença do biomarcador alvo, CA19-9. Recorreu-se ao método da curva de calibração, pelo qual é possível expressar a relação entre o sinal ótico do sensor biomimético e as diferentes concentrações da solução de CA19-9 em PBS 10mM, pH 7,4 e em soro humano diluído em PBS. Os desvios-padrão e as barras de erro associados a cada ponto da linha de calibração foram calculados (S/N)=3.

### 4.4.1 Calibrações em PBS

As calibrações foram realizadas com soluções padrão de CA19-9 em PBS e a gama de concentrações variou de [3,96-5200] mU mL<sup>-1</sup>. Durante o processo, cada solução padrão foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Os espectros de emissão de fluorescência e curvas de calibração resultantes estão apresentados na Figura 25, ajustadas de acordo com a Equação 2.

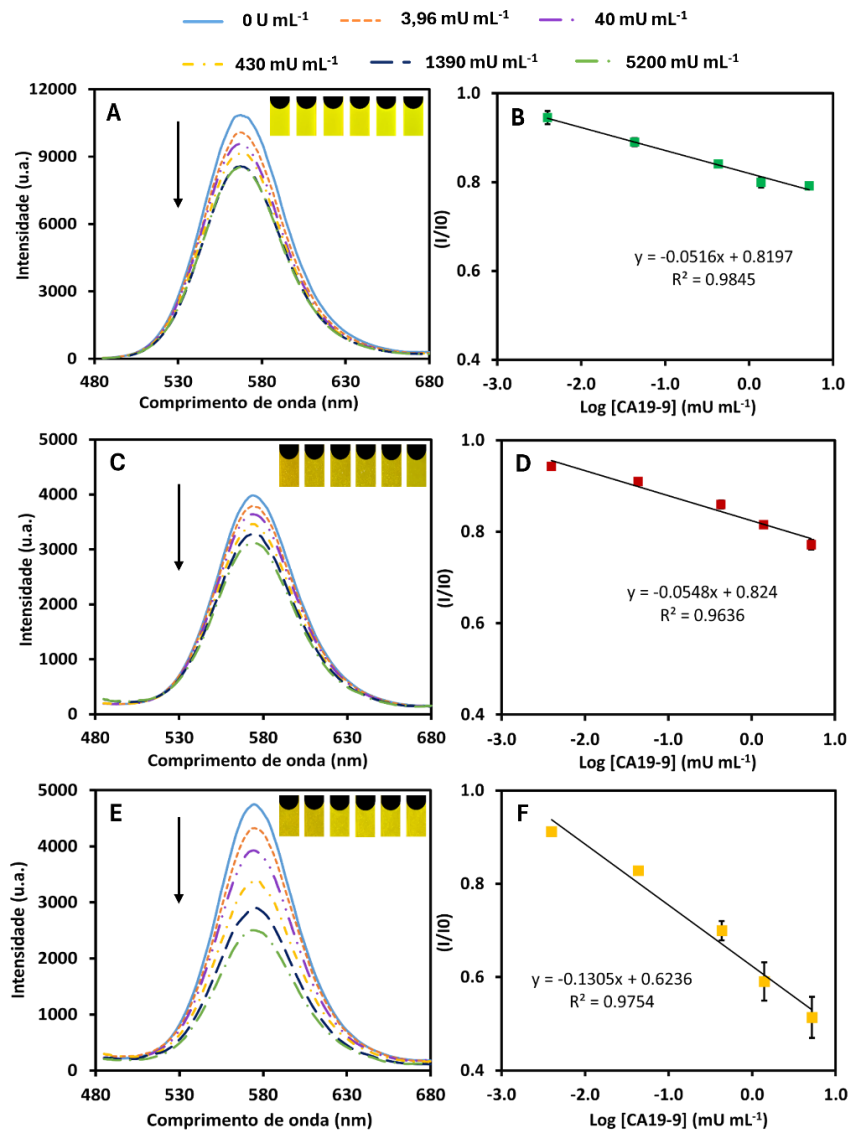


Figura 25 – Medições dos espectros de emissão de fluorescência com concentrações crescentes de CA19-9 em QDs livres (A), NIP@QDs (C) e MIP@QDs (E) preparadas em tampão PBS a pH 7,4. As imagens (B), (D) e (F) mostram a curva de calibração da resposta da intensidade relativa em função da concentração logarítmica de CA19-9 para QDs livres, NIP@QDs e MIP@QDs, respectivamente.

Os MIP@QDs apresentaram a melhor resposta analítica (Figura 25E e 25F), em comparação com os NIP@QDs (Figura 25D) e os QDs (Figura 25B). Os MIP@QDs obtiveram (Tabela 7) um LOD de  $1,63 \text{ mU mL}^{-1}$  ( $S/N=3$ ), IF de 2,38 e um  $k_{SV}$  de  $-0,1305$ . E o intervalo de linearidade (do inglês: *Linear range*, LR) foi compreendido entre  $[3,96-5200] \text{ mU mL}^{-1}$ , este valor é inferior ao *cut-off* para a detecção do cancro pancreático ( $\text{CA19-9} > 37 \text{ U mL}^{-1}$ ) [132], como mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD,  $k_{sv}$  e IF, para as calibrações dos QDs livres de emissão no amarelo, dos MIP@QDs e dos NIP@QDs, com concentrações crescentes de CA19-9 no intervalo de [3,96-5200] mU mL<sup>-1</sup>, em PBS 10 mM pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Parâmetro Analítico	QDs Livres	MIP@QDs	NIP@QDs
LR (mU mL <sup>-1</sup> )	[3,96-5200]	[3,96-5200]	[3,96-5200]
LOD (mU mL <sup>-1</sup> )	0,0199	1,63	1,30
$k_{sv}$	-0,0516	-0,1305	-0,0548
IF	-----	2,38	-----

O valor LOD inferior apresentado pelos QDs livres durante a calibração em PBS (0,0199 mU mL<sup>-1</sup>) (Figura 25B), em comparação com o dos MIP@QDs (Figura 25F), pode estar relacionado com a adsorção da molécula alvo à superfície dos QDs livres devido à atração eletrostática de cargas, uma vez que os QDs livres e a proteína têm cargas de superfície opostas no tampão de calibração. Este valor não está necessariamente relacionado com uma resposta seletiva dos QDs livres à proteína, mas a uma resposta geral a uma molécula de carga positiva na superfície negativa dos QDs livres. Além disso, os QDs livres apresentaram uma cinética de reconhecimento mais lenta para a molécula alvo ( $k_{sv}=-0,0516$ ) em contraste com os MIP@QDs ( $k_{sv}=-0,1305$ ). A fim de reforçar a nossa hipótese, foram realizados estudos de seletividade.

#### 4.4.2 Estudos de seletividade

O desempenho analítico dos MIP@QDs foi avaliado em PBS 10 mM pH 7,4, na presença e ausência de CA19-9. Os três interferentes selecionados foram o biomarcador do cancro do pâncreas MMP7, a CREA e a HSA. A intensidade de fluorescência da solução de MIP@QDs com a solução de CA19-9 a 10 U mL<sup>-1</sup> observou-se uma diminuição de 39 % (Figura 26A, barras amarelas) no sinal de fluorescência em relação à intensidade inicial. A proteína CA19-9 quando combinada com cada um dos interferentes teve uma diminuição da intensidade da fluorescência, relativamente à intensidade inicial, 39 % para o MMP7 a 0,065 ng mL<sup>-1</sup>, 38 % para a CREA a 0,06 µg mL<sup>-1</sup> e 35 % para HSA a 0,4 mg mL<sup>-1</sup> (Figura 26A, barras amarelas). Em comparação à variação de fluorescência dos MIP@QDs na ausência do padrão de CA19-9, considerando apenas a presença isolada de cada interferente, não se observou grandes alterações, em que a fluorescência diminuiu 3 % na presença de MMP7 e CREA e 2 % na presença de HSA (Figura 26B, barras amarelas). Considerando o ponto isoelétrico da HSA, cerca de 5,7 [133], esta pode atuar como um dador de elétrons para os QDs que são carregadas negativamente, promovendo o aumento da intensidade de fluorescência.

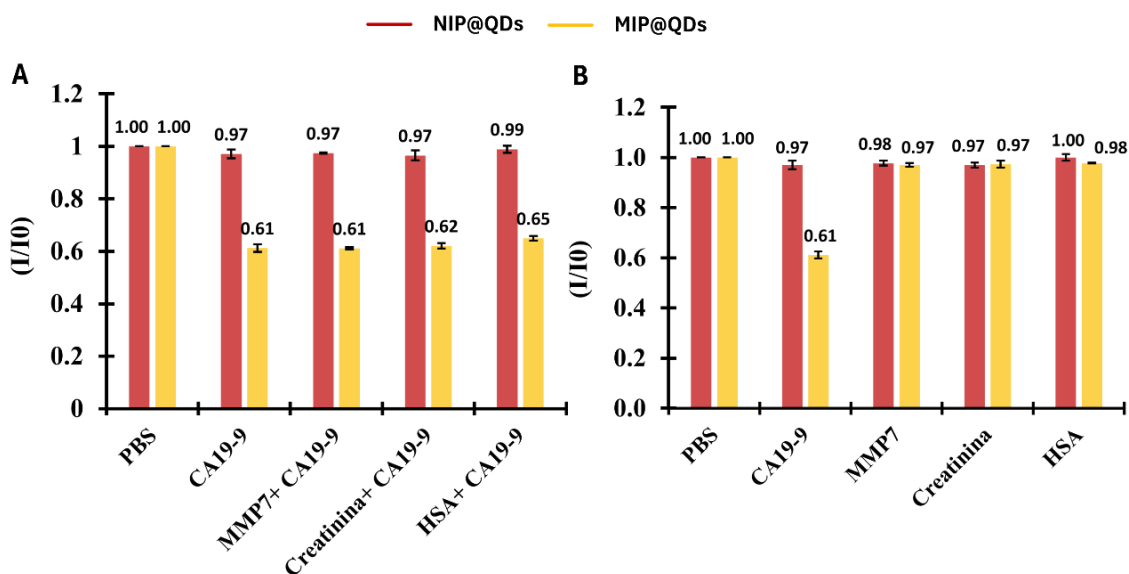


Figura 26 – Medições dos espectros de emissão de fluorescência obtidos para uma solução única de CA19-9, em comparação com soluções de espécies interferentes (MMP7, CREA e HSA) preparadas na presença de CA19-9 (A) ou ausência de CA19-9 (B).

No caso dos NIP@QDs não houve grandes variações da intensidade da fluorescência com os três interferentes estudados, na presença e ausência de CA19-9 a  $10 \text{ U mL}^{-1}$  (Figura 26A e 26B, barras vermelhas), estando essas variações na ordem de grandeza dos desvios padrão relativos (RSD, do inglês: *relative standard deviation*),  $S/N=3$ .

#### 4.4.3 Calibrações em soro humano

Realizaram-se as calibrações dos QDs livres, MIP@QDs, e respectivos controlos NIP@QDs em soro humano diluído em PBS 10mM pH 7,4. As soluções padrão de CA19-9 foram preparadas neste meio de solução numa gama de  $[0,0396-52] \text{ mU mL}^{-1}$ , e incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente (Figura 27A, 27C e 27E). As curvas de calibração são apresentadas na Figura 27B, 27D e 27F, segundo a Equação 2. Pela análise dos resultados mostra uma correlação linear da extinção de fluorescência com as nanopartículas de QDs livres (Figura 27B), NIP@QDs (Figura 27D) e MIP@QDs (Figura 27F).

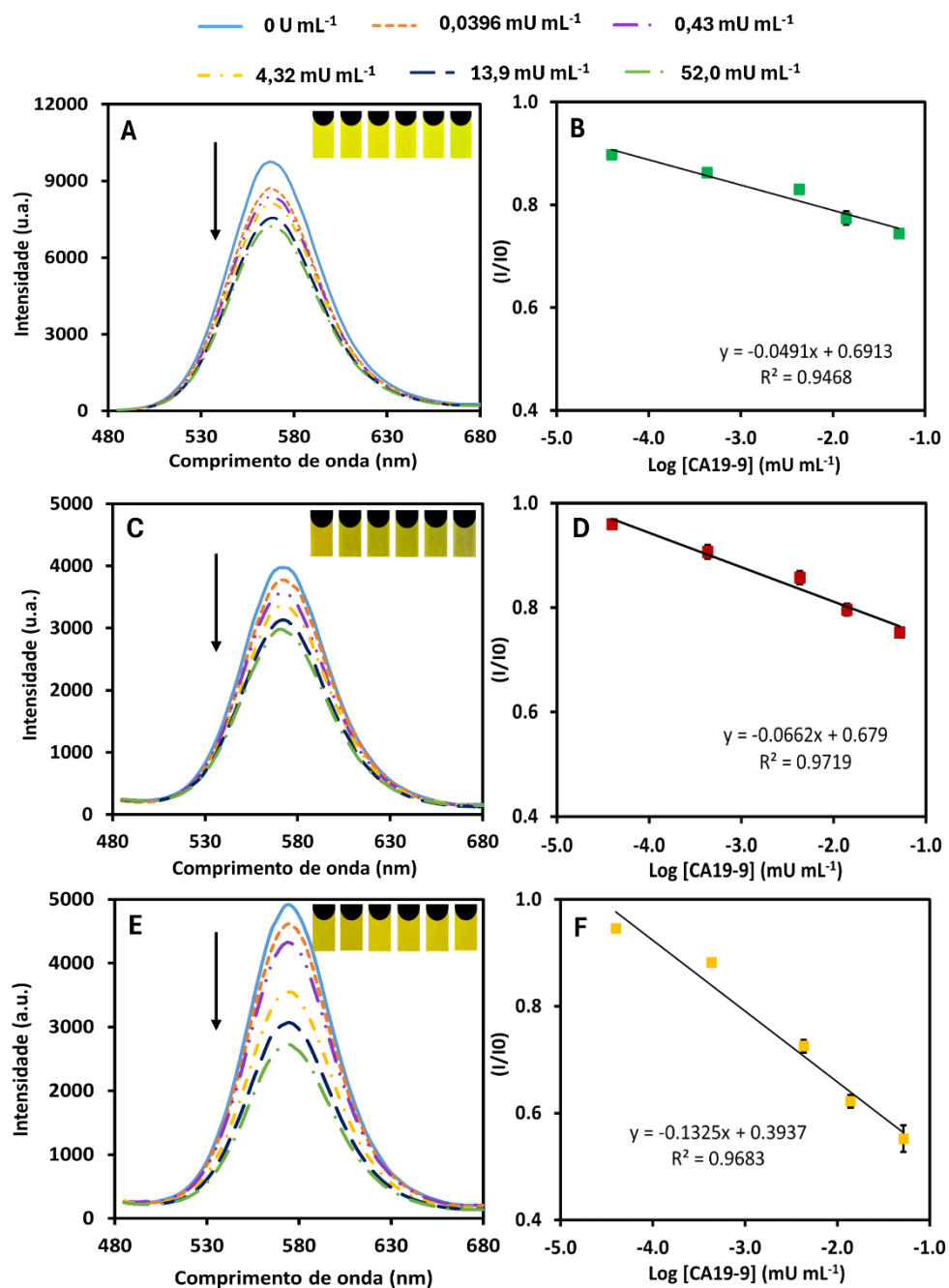


Figura 27 – Espectros de emissão de fluorescência com concentrações crescentes de CA19-9 em QDs livres (A), NIP@QDs (C) e MIP@QDs (E) preparadas em soro humano diluído. As imagens (B), (D) e (F) mostram a curva de calibração da resposta da intensidade relativa em função da concentração logarítmica de CA19-9 para QDs livres, NIP@QDs e MIP@QDs, respectivamente.

Os MIP@QDs apresentam uma melhor resposta analítica, evidenciada pela melhor gama linear, (Tabela 8) em comparação com as NIP@QDs e os QDs livres, comprovando a capacidade de detecção superior dos MIP@QDs para o analito alvo. A explicação pode ser dada com base no pressuposto de que as cavidades impressas contêm grupos funcionais que interagem com os grupos complementares da matriz polimérica através de ligações não covalentes. O

desempenho analítico apresentou um IF de 2, um LOD de  $36,0 \mu\text{U mL}^{-1}$  ( $S/N=3$ ) e um  $k_{sv}$  de  $-0,1325$  (Tabela 8).

Tabela 8 – Cálculo dos parâmetros analíticos, LR, LOD,  $k_{sv}$  e IF, para as calibrações dos QDs livres de emissão no amarelo, dos MIP@QDs e dos NIP@QDs, com padrões de CA19-9 no intervalo  $[0,0396-52]$   $\text{mU mL}^{-1}$  em soro humano diluído em PBS 10 mM pH 7,4, após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente.

Parâmetro Analítico	QDs Livres	MIP@QDs	NIP@QDs
LR ( $\text{mU mL}^{-1}$ )	$[0,0396-52]$	$[0,0396-52]$	$[0,0396-52]$
LOD ( $\mu\text{U mL}^{-1}$ )	0,138	36,0	8,19
$k_{sv}$	-0,0491	-0,1325	-0,0662
IF	-----	2	-----

Em comparação com as calibrações de MIP@QDs realizadas em PBS, verificou-se uma ligeira diminuição no IF (Tabelas 7 e 8), possivelmente atribuída à presença de constituintes do soro que podem adsorver-se à superfície dos materiais por meio de interações não específicas. Este efeito é igualmente observado nos NIP@QDs correspondentes, sujeitos às mesmas condições.

Por outro lado, observou-se uma diminuição menos acentuada do sinal de fluorescência nos NIP@QDs com concentrações crescentes da CA19-9 (Figura 27C). O valor de LOD é  $8,19 \mu\text{U mL}^{-1}$  ( $S/N=3$ ) e o  $k_{sv}$  é  $-0,0662$  (Tabela 8). Quanto às calibrações com os QDs livres, verificou-se também uma diminuição contínua do sinal de fluorescência em todas as gamas de concentração (Figura 27A). Este resultado reforçou a não seletividade dos QDs livres em relação ao analito alvo, ao contrário da seletividade observada quando as nanopartículas são conjugadas com MIP@QDs (Figura 27).

#### 4.4.4 Estudos de reprodutibilidade

Os MIP@QDS foram testados com três concentrações diferentes dopadas de CA19-9 em soro humano diluído. As taxas de recuperação e os respectivos erros foram calculados (RSD, %,  $S/N=3$ ) (Tabela 9). As taxas de recuperação foram de  $63,92 \pm 1,51$  % para uma dopagem com CA19-9 a  $4,32 \text{ mU mL}^{-1}$  e entre  $90,50 \pm 0,24$  % para uma dopagem a  $13,9 \text{ mU mL}^{-1}$ .

Tabela 9 – Estudos de reprodutibilidade com as taxas de recuperação e os correspondentes RSD (%),  $S/N=3$ ), para três dopagens com padrões de CA19-9 em soro humano diluído.

Concentração teórica de CA19-9 ( $\text{mU mL}^{-1}$ )	Concentração real de CA19-9 ( $\text{mU mL}^{-1}$ )	Recuperação $\pm$ RSD (%)
4,32	2,76	$63,92 \pm 1,51$
13,9	12,6	$90,50 \pm 0,24$
52,0	39,4	$75,80 \pm 3,05$

## 4.5 Desempenho analítico em suporte sólido

Na sequência do desenvolvimento do sensor biomimético em solução, procedeu-se à avaliação do seu desempenho em suporte sólido, utilizando membranas de *nylon*. Foram incubadas diferentes concentrações de CA19-9 em soro humano diluído, nos seis pontos selecionados da membrana, previamente escolhidos com intensidades de fluorescência semelhantes. As imagens resultantes foram processadas pela aplicação *RGB* do dispositivo móvel, e a avaliação do sensor biomimético foi realizada com base na curva de calibração.

### 4.5.1 Calibrações em PBS

Nas membranas dos MIP@QDs em PBS verificou-se uma diminuição da cor amarela, ao longo das calibrações com padrões de CA19-9, na gama de [0,4–400 U mL<sup>-1</sup>] (Figura 28B). E obteve-se uma resposta analítica com um R<sup>2</sup>=0,9943 e um declive negativo de 28,677.

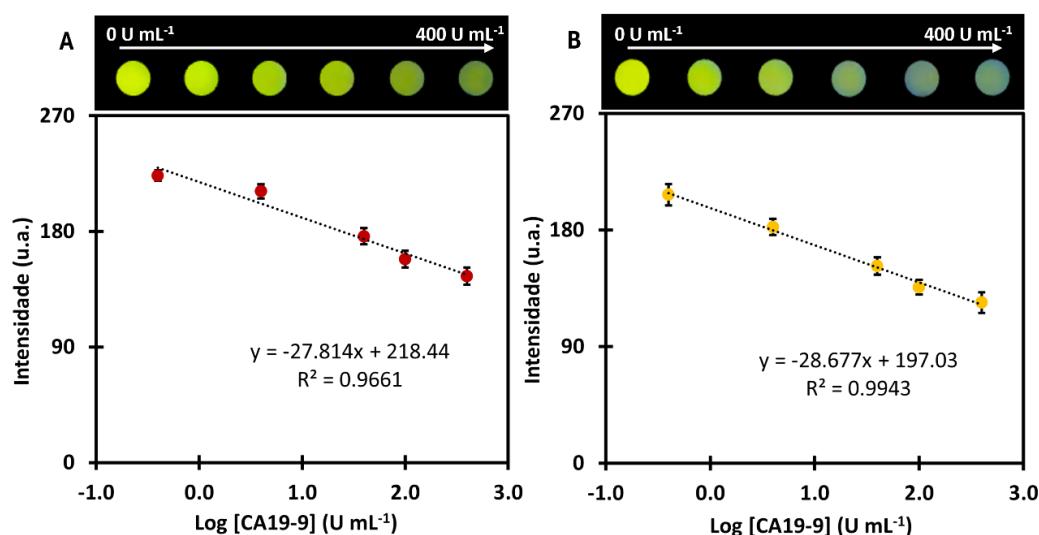


Figura 28 – Fotografias das calibrações das membranas em PBS para NIP@QDs (A) e MIP@QDs (B), com as respetivas curvas de calibração baseadas na intensidade da cor verde do *RGB* da aplicação do dispositivo móvel.

Por outro lado, nos NIP@QDs também se observou um decréscimo da intensidade da cor amarela ao longo da calibração com os padrões de CA19-9 (Figura 28A). No entanto, estes obtiveram uma pior resposta analítica em relação aos MIP@QDs, o que se pode verificar pelo valor do seu declive negativo de 27,814 e do seu coeficiente de correlação linear, R<sup>2</sup>= 0,9661.

### 4.5.2 Calibrações em soro humano

Na calibração das membranas de *nylon* adsorvidas com os MIP@QDs em soro humano diluído, foi possível observar uma diminuição da cor amarela com padrões de CA19-9 na gama de intervalo [0,4–400 U mL<sup>-1</sup>] (Figura 29B). Os resultados obtidos indicaram que o sensor biomimético desenvolvido neste trabalho obteve uma resposta favorável em relação à CA19-9,

obtendo-se uma resposta analítica com  $R^2 = 0,9977$  e um declive negativo de 31,932. Os NIP@QDs também evidenciaram uma diminuição da cor amarela com o decréscimo das concentrações de CA19-9 em soro humano diluído (Figura 29A). O desempenho analítico comparativamente aos MIP@QDs foi mais baixo, com o  $R^2 = 0,9597$  e um declive de -26,233.

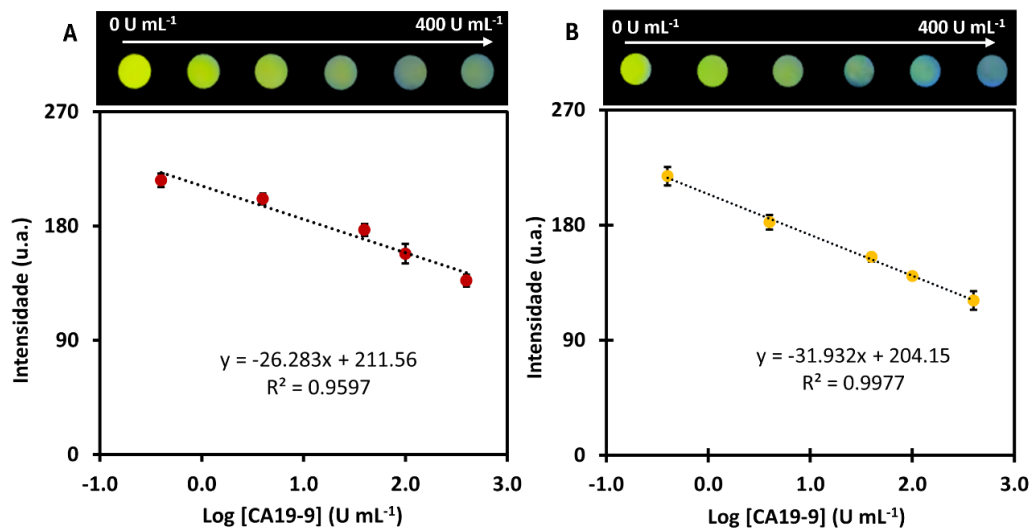


Figura 29 – Fotografias das calibrações das membranas em soro humano diluído para NIP@QDs (A) e MIP@QDs (B), com as respetivas curvas de calibração baseadas na intensidade da cor verde do RGB da aplicação móvel.

Os resultados obtidos nas calibrações em suporte sólido em soro humano diluído representam um avanço significativo na deteção do biomarcador CA19-9 de uma forma prática e eficiente.

O gradiente de cor observado tanto para os MIP@QDs como para os NIP@QDs, pode-se associar a um resultado quantitativo da presença da proteína alvo. Neste contexto, os NIP@QDs desempenham um papel crucial, atuando como indicadores de respostas não específicas geradas por outros biomarcadores ou biomoléculas presentes na amostra. Desta forma, são essenciais para a eliminação de falsos positivos, permitindo identificar pontos de cor que, embora semelhantes, não correspondem ao (bio) reconhecimento específico da proteína CA19-9. Esta abordagem melhora a credibilidade do sensor, assim como simplifica a interpretação dos resultados, permitindo uma despistagem mais rápida e precisa de possíveis interferentes, reforçando a sua aplicação em contextos de diagnóstico clínico.



## 5 Conclusões

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

### 5.1 Conclusões finais

No tratamento do cancro do pâncreas, um dos pontos-chave é a sua deteção precoce. Sendo conhecido pela ausência de sintomas nas fases iniciais, é uma neoplasia de difícil diagnóstico e com uma baixa taxa de sobrevivência aos 5 anos, com uma taxa de mortalidade muito próxima da taxa de incidência. Para além da dificuldade de rastreio, existem cuidados de saúde precários em várias regiões do mundo, o que dificulta a deteção de várias neoplasias. De forma a responder a estas necessidades, a tecnologia de deteção de biomarcadores tem vindo a crescer, dando origem a sensores biomiméticos, caracterizados pela sua sensibilidade, baixo custo e portabilidade. Estes podem ser sintetizados de acordo com a molécula alvo que queremos detetar, tornando esta tecnologia fácil de aplicar a vários tipos de patologias.

No âmbito desta dissertação de mestrado, o principal objetivo foi criar um sensor que detete o biomarcador do cancro do pâncreas, CA19-9, uma proteína utilizada para avaliar a resposta dos doentes ao tratamento.

O sensor biomimético desenvolvido foi sintetizado pela estratégia de impressão em superfície que visa minimizar a encapsulação total da molécula alvo, CA19-9, dentro da matriz polimérica, o que facilita a remoção do mesmo comparativamente com outros mecanismos de impressão. Ao otimizar as condições de impressão e remover efetivamente o alvo impresso da matriz, conseguiu-se criar locais de ligação eficientes para a molécula em estudo durante o processo de religação, funcionando como unidades de reconhecimento biomiméticas.

Este sensor foi testado e mostrou uma resposta eficaz e sensível na deteção do biomarcador, revelando-se eficiente em PBS 10 mM a pH 7,4. Foi também submetido a testes de sensibilidade e reprodutibilidade, apresentando uma boa capacidade de (bio)reconhecimento e seletividade para o analito CA19-9. Em seguida, procedeu-se à transformação do sensor em solução num sensor em suporte sólido, através da adsorção deste numa membrana de *nylon* e, posteriormente, foi submetido a testes de deteção. Destes testes, foi possível obter um gradiente de cores, sob luz UV, que pode servir como uma abordagem inicial de quantificação, sem a necessidade de protocolos analíticos mais dispendiosos, dentro da gama de concentrações testada.

A eficácia do MIP é influenciada por vários fatores, tais como as concentrações dos monómeros, agentes de reticulação, iniciadores, agente catalisador, molécula alvo e tempos de polimerização, verificou-se que tempos mais curtos favorecem a acessibilidade às cavidades de reconhecimento. Além disso, os sensores biomiméticos MIP@QDs apresentaram uma boa estabilidade fotoluminescente ao longo do tempo, mantendo uma elevada percentagem da resposta inicial, o que é promissor para aplicações práticas.

Ao comparar o intervalo de linearidade do sensor biomimético desenvolvido neste trabalho com outros relatados na literatura para o mesmo biomarcador, verificamos que o nosso sensor apresenta um intervalo de linearidade mais amplo. Este fator pode ser particularmente útil para a monitorização da doença, permitindo a deteção de diferentes concentrações do biomarcador. Além disso, o limite de deteção obtido é inferior ao *cut-off* estabelecido para a CA19-9 no diagnóstico do cancro pancreático, o que demonstra a potencial aplicação do sensor em amostras reais, reforçando a sua viabilidade para deteção precoce e acompanhamento clínico.

## 5.2 Perspetivas futuras

Esta investigação permitiu desenvolver um protótipo de um sensor de membrana em suporte sólido capaz de detetar o biomarcador em soro humano, mostrando assim potencial como teste para a deteção de CA19-9 em doentes com o cancro do pâncreas.

No futuro seria interessante testar o sensor em amostras reais e desenvolver um modelo portátil e que não recorra a equipamentos dispendiosos. Este sensor conseguiria chegar a diferentes regiões e apoiar toda a população. Isto permitiria às equipas de saúde utilizar o dispositivo para monitorizar os pacientes com esta doença a nível mundial, possibilitando a sua deteção precoce. Esta abordagem em estágios iniciais da patologia aumentaria o acesso a cuidados de saúde em fases precoces da doença levando a um incremento na eficácia dos tratamentos e consequentemente o aumento da sobrevivência a 5 anos.

## Referências

1. Grant, T.J.; Hua, K.; Singh, A. Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **2016**; *144*, 241–275, doi:10.1016/bs.pmbts.2016.09.008.
2. Kamisawa, T.; Wood, L.D.; Itoi, T.; Takaori, K. Pancreatic Cancer. *The Lancet* **2016**, *388*, 73–85, doi:10.1016/S0140-6736(16)00141-0.
3. J. Ferlay; M. Ervik; F. Lam; M. Laversanne; M. Colombet; L. Mery; M. Piñeros; A. Znaor; I. Soerjomataram; F. Bray Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Available online: <https://gco.iarc.who.int/today> (accessed on 11 July 2024).
4. Boeck, S.; Stieber, P.; Holdenrieder, S.; Wilkowski, R.; Heinemann, V. Prognostic and Therapeutic Significance of Carbohydrate Antigen 19-9 as Tumor Marker in Patients with Pancreatic Cancer. *Oncology* **2006**, *70*, 255–264, doi:10.1159/000094888.
5. Tanaka, N.; Okada, S.; Ueno, H.; Okusaka, T.; Ikeda, M. The Usefulness of Serial Changes in Serum CA19-9 Levels in the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Pancreas* **2000**, *20*, 378–381, doi:10.1097/00006676-200005000-00007.
6. Bahari, D.; Babamiri, B.; Salimi, A. An Eco-Friendly MIP-Solid Surface Fluorescence Immunosensor for Detection of CA 19-9 Tumor Marker Using Ni Nanocluster as an Emitter Labels. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2020**, *17*, 2283–2291, doi:10.1007/s13738-020-01924-z.
7. He, X.; Gao, J.; Gambhir, S.S.; Cheng, Z. Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes for Cancer Molecular Imaging: Status and Challenges. *Trends in Molecular Medicine* **2010**, *16*, 574–583, doi:10.1016/j.molmed.2010.08.006.

8. Chen, L.; Xu, S.; Li, J. Recent Advances in Molecular Imprinting Technology: Current Status, Challenges and Highlighted Applications. *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 2922–2942, doi:10.1039/c0cs00084a.
9. Díaz-álvarez, M.; Martín-Esteban, A. Molecularly Imprinted Polymer-Quantum Dot Materials in Optical Sensors: An Overview of Their Synthesis and Applications. *Biosensors (Basel)* **2021**, *11*, 36-43, doi:10.3390/bios11030079.
10. World Health Organization Cancer Available online: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1) (accessed on 7 July 2024).
11. National Cancer Institute What Is Cancer? Available online: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed on 11 July 2024).
12. Lambert, A.W.; Pattabiraman, D.R.; Weinberg, R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **2017**, *168*, 670–691, doi:10.1016/j.cell.2016.11.037.
13. Ujvari, B.; Klaassen, M.; Raven, N.; Russell, T.; Vittecoq, M.; Hamede, R.; Thomas, F.; Madsen, T. Genetic Diversity, Inbreeding and Cancer. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **2018**, *285*, doi:10.1098/rspb.2017.2589.
14. Poon, S.L.; McPherson, J.R.; Tan, P.; Teh, B.T.; Rozen, S.G. Mutation Signatures of Carcinogen Exposure: Genome-Wide Detection and New Opportunities for Cancer Prevention. *Genome Med* **2014**, *6*, doi:10.1186/gm541.
15. Antwi, S.O.; Eckert, E.C.; Sabaque, C. V.; Leof, E.R.; Hawthorne, K.M.; Bamlet, W.R.; Chaffee, K.G.; Oberg, A.L.; Petersen, G.M. Exposure to Environmental Chemicals and Heavy Metals, and Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Causes and Control* **2015**, *26*, 1583–1591, doi:10.1007/s10552-015-0652-y.
16. Trafialek, J.; Kolanowski, W. Dietary Exposure to Meat-Related Carcinogenic Substances: Is There a Way to Estimate the Risk? *Int J Food Sci Nutr* **2014**, *65*, 774–780, doi:10.3109/09637486.2014.917146.
17. Ajani, J.A.; Song, S.; Hochster, H.S.; Steinberg, I.B. Cancer Stem Cells: The Promise and the Potential. *Seminars in Oncology* **2015**, *42*, S3–S17, doi:10.1053/j.seminoncol.2015.01.001.
18. Brown, J.S.; Amend, S.R.; Austin, R.H.; Gatenby, R.A.; Hammarlund, E.U.; Pienta, K.J. Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research* **2023**, *21*, 1142–1147, doi:10.1158/1541-7786.MCR-23-0411.

19. Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nature Medicine* **2013**, *19*, 1423–1437, doi:10.1038/nm.3394.
20. Upadhyay, A. Cancer: An Unknown Territory; Rethinking before Going Ahead. *Genes & Diseases* **2021**, *8*, 655–661, doi:10.1016/j.gendis.2020.09.002.
21. Karpińska, M.; Czauderna, M. Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology* **2022**, *13*, doi:10.3389/fphys.2022.807632.
22. Deshmukh, S.; Roth, C.G. MRI of the Pancreaticobiliary System. *Fundamentals of Body MRI*; Elsevier, **2012**; 129–197, doi:10.1016/b978-1-4160-5183-1.00003-5.
23. Instituto Vencer o Câncer Câncer de Pâncreas | O Que é Available online: <https://vencerocancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas-o-que-e/> (accessed on 2 September 2024).
24. Valente, R.; Coppola, A.; Scandavini, C.M.; Halimi, A.; Magnusson, A.; Lauro, A.; Sotirova, I.; Arnelo, U.; Franklin, O. Interactions between the Exocrine and the Endocrine Pancreas. *Journal of Clinical Medicine* **2024**, *13*, doi:10.3390/jcm13041179.
25. Amaral, M.J.; Oliveira, R.C.; Donato, P.; Tralhão, J.G. Pancreatic Cancer Biomarkers: Oncogenic Mutations, Tissue and Liquid Biopsies, and Radiomics—A Review. *Digestive Diseases and Sciences* **2023**, *68*, 2811–2823, doi:10.1007/s10620-023-07904-6.
26. Zijlstra, M.; Bernards, N.; De Hingh, I.H.J.T.; Van De Wouw, A.J.; Goey, S.H.; Jacobs, E.M.G.; Lemmens, V.E.P.P.; Creemers, G.J. Does Long-Term Survival Exist in Pancreatic Adenocarcinoma? *Acta Oncology* **2016**, *55*, 259–264, doi:10.3109/0284186X.2015.1096020.
27. Batcher, E.; Madaj, P.; Gianoukakis, A.G. Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocrine Research* **2011**, *36*, 35–43, doi:10.3109/07435800.2010.525085.
28. Reid, M.D.; Balci, S.; Saka, B.; Adsay, N.V. Neuroendocrine Tumors of the Pancreas: Current Concepts and Controversies. *Endocrine Pathology* **2014**, *25*, 65–79, doi:10.1007/s12022-013-9295-2.
29. Huxley, R.; Ansary-Moghaddam, A.; Berrington De González, A.; Barzi, F.; Woodward, M. Type-II Diabetes and Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis of 36 Studies. *British Journal of Cancer* **2005**, *92*, 2076–2083, doi:10.1038/sj.bjc.6602619.
30. Duell, E.J.; Lucenteforte, E.; Olson, S.H.; Bracci, P.M.; Li, D.; Risch, H.A.; Silverman, D.T.; Ji, B.T.; Gallinger, S.; Holly, E.A.; et al. Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Pooled Analysis in the International Pancreatic Cancer

- Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology* **2012**, *23*, 2964–2970, doi:10.1093/annonc/mds140.
31. McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R.C.; Jones, C.; Coleman, H.G.; McCain, R.S. Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes. *World Journal of Gastroenterology* **2018**, *24*, 4846–4861, doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846.
  32. Welinsky, S.; Lucas, A.L. Familial Pancreatic Cancer and the Future of Directed Screening. *Gut and Liver* **2017**, *11*, 761–770, doi:10.5009/gnl16414.
  33. Diaz, K.E.; Lucas, A.L. Familial Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *American Journal of Pathology* **2019**, *189*, 36–43, doi:10.1016/j.ajpath.2018.06.026.
  34. Zhao, Z.Y.; Liu, W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment* **2020**, *19*, doi:10.1177/1533033820962117.
  35. Iodice, S.; Gandini, S.; Maisonneuve, P.; Lowenfels, A.B. Tobacco and the Risk of Pancreatic Cancer: A Review and Meta-Analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery* **2008**, *393*, 535–545, doi:10.1007/s00423-007-0266-2.
  36. Bertuccio, P.; La Vecchia, C.; Silverman, D.T.; Petersen, G.M.; Bracci, P.M.; Negri, E.; Li, D.; Risch, H.A.; Olson, S.H.; Gallinger, S.; et al. Cigar and Pipe Smoking, Smokeless Tobacco Use and Pancreatic Cancer: An Analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of Oncology* **2011**, *22*, 1420–1426, doi:10.1093/annonc/mdq613.
  37. Lee, E.S.; Lee, J.M. Imaging Diagnosis of Pancreatic Cancer: A State-of-the-Art Review. *World Journal of Gastroenterology* **2014**, *20*, 7864–7877, doi:10.3748/wjg.v20.i24.7864.
  38. Artinyan, A.; Soriano, P.A.; Prendergast, C.; Low, T.; Ellenhorn, J.D.I.; Kim, J. The Anatomic Location of Pancreatic Cancer Is a Prognostic Factor for Survival. *Hepato-Pancreato-Biliary* **2008**; *10*, 371–376, doi:10.1080/13651820802291233.
  39. Chu, Q.D.; Hsieh, M.C.; Gibbs, J.F.; Wu, X.C. Social Determinants of Health Associated with Poor Outcome for Rural Patients Following Resected Pancreatic Cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology* **2021**, *13*, 2567–2578, doi:10.21037/jgo-20-583.
  40. Jiménez-Rodríguez, M.G.; Silva-Lance, F.; Parra-Arroyo, L.; Medina-Salazar, D.A.; Martínez-Ruiz, M.; Melchor-Martínez, E.M.; Martínez-Prado, M.A.; Iqbal, H.M.N.; Parra-Saldívar, R.; Barceló, D.; et al. Biosensors for the Detection of Disease Outbreaks through Wastewater-Based Epidemiology. *Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *155*, doi:10.1016/j.trac.2022.116585.

41. Strimbu, K.; Tavel, J.A. What Are Biomarkers? *Current Opinion in HIV AIDS* **2010**, *5*, 463–466, doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
42. Mayeux, R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2004**, *1*, 182–188, doi:10.1602/neurorx.1.2.182
43. O'Neill, R.S.; Stoita, A. Biomarkers in the Diagnosis of Pancreatic Cancer: Are We Closer to Finding the Golden Ticket? *World Journal of Gastroenterology* **2021**, *27*, 4045–4087, doi:10.3748/wjg.v27.i26.4045.
44. Piloto, A.M.L.; Ribeiro, D.S.M.; Rodrigues, S.S.M.; Santos, J.L.M.; Sampaio, P.; Sales, M.G.F. Cellulose-Based Hydrogel on Quantum Dots with Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of CA19-9 Protein Cancer Biomarker. *Microchimica Acta* **2022**, *189*, doi:10.1007/s00604-022-05230-8.
45. Luo, G.; Jin, K.; Deng, S.; Cheng, H.; Fan, Z.; Gong, Y.; Qian, Y.; Huang, Q.; Ni, Q.; Liu, C.; et al. Roles of CA19-9 in Pancreatic Cancer: Biomarker, Predictor and Promoter. *Biochimica et Biophysica Acta- Reviews on Cancer* **2021**, *1875*, doi:10.1016/j.bbcan.2020.188409.
46. Azizian, A.; Rühlmann, F.; Krause, T.; Bernhardt, M.; Jo, P.; König, A.; Kleiß, M.; Leha, A.; Ghadimi, M.; Gaedcke, J. CA19-9 for Detecting Recurrence of Pancreatic Cancer. *Scientific Reports* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41598-020-57930-x.
47. Xiao, D.; Dong, Z.; Zhen, L.; Xia, G.; Huang, X.; Wang, T.; Guo, H.; Yang, B.; Xu, C.; Wu, W.; et al. Combined Exosomal GPC1, CD82, and Serum CA19-9 as Multiplex Targets: A Specific, Sensitive, and Reproducible Detection Panel for the Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Research* **2020**, *18*, 1300–1310, doi:10.1158/1541-7786.MCR-19-0588.
48. Ballehaninna, U.K.; Chamberlain, R.S. The Clinical Utility of Serum CA 19-9 in the Diagnosis, Prognosis and Management of Pancreatic Adenocarcinoma: An Evidence Based Appraisal. *Journal of Gastrointestinal Oncology* **2012**, *3*, 105–119, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021.
49. Del Villano, B.C.; Brennan, S.; Brock, P.; Bucher, C.; Llu, V.; McClure, M.; Rake, B.; Space, S.; Westrick, B.; Schoemaker, H.; et al. Radioimmunometric Assay for a Monoclonal Antibody-Defined Tumor Marker, CA 19-9. *Clinical Chemistry* **1983**; *29*, 549-552, doi: 10.1093/clinchem/29.3.549.
50. Su, S.B.; Qin, S.Y.; Chen, W.; Luo, W.; Jiang, H.X. Carbohydrate Antigen 19-9 for Differential Diagnosis of Pancreatic Carcinoma and Chronic Pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* **2015**, *21*, 4323–4333, doi:10.3748/wjg.v21.i14.4323.

51. Ahmadipour, M.; Bhattacharya, A.; Sarafbidabad, M.; Syuhada Sazali, E.; Krishna Ghoshal, S.; Satgunam, M.; Singh, R.; Rezaei Ardani, M.; Missaoui, N.; Kahri, H.; et al. CA19-9 and CEA Biosensors in Pancreatic Cancer. *Clinica Chimica Acta* **2024**, *554*, doi:10.1016/j.cca.2024.117788.
52. Chen, Y.; Gao, S.G.; Chen, J.M.; Wang, G.P.; Wang, Z.F.; Zhou, B.; Jin, C.H.; Yang, Y.T.; Feng, X.S. Serum CA242, CA199, CA125, CEA, and TSGF Are Biomarkers for the Efficacy and Prognosis of Cryoablation in Pancreatic Cancer Patients. *Cell Biochemistry and Biophysics* **2015**, *71*, 1287–1291, doi:10.1007/s12013-014-0345-2.
53. Song, J.; Sokoll, L.J.; Chan, D.W.; Zhang, Z. Validation of Serum Biomarkers That Complement CA19-9 in Detecting Early Pancreatic Cancer Using Electrochemiluminescent-Based Multiplex Immunoassays. *Biomedicines* **2021**, *9*, doi:10.3390/biomedicines9121897.
54. EDOO, M.I.; Chutturghoon, V.K.; ANSAH, G.K.W.; Zhu, H.; ZHEN, T.Y.; XIE, H.Y.; Zheng, S.S. Serum Biomarkers AFP, CEA and CA19-9 Combined Detection for Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Iranian Journal of Public Health* **2019**; *48*:314–322.
55. Gu, Y.L.; Lan, C.; Pei, H.; Yang, S.N.; Liu, Y.F.; Xiao, L.L. Applicative Value of Serum CA19-9, CEA, CA125 and CA242 in Diagnosis and Prognosis for Patients with Pancreatic Cancer Treated by Concurrent Chemoradiotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2015**, *16*, 6569–6573, doi:10.7314/APJCP.2015.16.15.6569.
56. Dong, D.; Jia, L.; Zhang, L.; Ma, N.; Zhang, A.; Zhou, Y.; Ren, L. Periostin and CA242 as Potential Diagnostic Serum Biomarkers Complementing CA19.9 in Detecting Pancreatic Cancer. *Cancer Science* **2018**, *109*, 2841–2851, doi:10.1111/cas.13712.
57. Naresh, V.; Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Switzerland)* **2021**, *21*, 1–35, doi:10.3390/s21041109.
58. Javaid, M.; Haleem, A.; Rab, S.; Pratap Singh, R.; Suman, R. Sensors for Daily Life: A Review. *Sensors International* **2021**, *2*, doi: 10.1016/j.sintl.2021.100121.
59. Clark, L.C.; Lyons, C. Eletrode Systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *ANNALS of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102*, 29-45, doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
60. Metkar, S.K.; Girigoswami, K. Diagnostic Biosensors in Medicine – A Review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2019**, *17*, 271–283, doi:10.1016/j.bcab.2018.11.029.

61. Pearson, J.E.; Gill, A.; Vadgama, P. Analytical Aspects of Biosensors. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* **2000**, *37*, 119-145, doi:10.1258/0004563001899131.
62. Bhalla, N.; Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P. Introduction to Biosensors. *Essays in Biochemistry* **2016**, *60*, 1–8, doi:10.1042/EBC20150001.
63. Zhang, X.; Zambrano, A.; Lin, Z.T.; Xing, Y.; Rippy, J.; Wu, T. Immunosensors for Biomarker Detection in Autoimmune Diseases. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **2017**, *65*, 111–121, doi:10.1007/s00005-016-0419-5.
64. Rubab, M.; Shahbaz, H.M.; Olaimat, A.N.; Oh, D.H. Biosensors for Rapid and Sensitive Detection of Staphylococcus Aureus in Food. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *105*, 49–57, doi:10.1016/j.bios.2018.01.023.
65. Saylan, Y.; Erdem, Ö.; Ünal, S.; Denizli, A. An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. *Biosensors (Basel)* **2019**, *9*, doi:10.3390/bios9020065.
66. Jayanthi, V.S.P.K.S.A.; Das, A.B.; Saxena, U. Recent Advances in Biosensor Development for the Detection of Cancer Biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*, 15–23, doi:10.1016/j.bios.2016.12.014.
67. Tothill, I.E. Biosensors for Cancer Markers Diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2009**, *20*, 55–62, doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.015.
68. Monošík, R.; Stredánský, M.; Šturdík, E. Biosensors - Classification, Characterization and New Trends. *Acta Chimica Slovaca* **2012**, *5*, 109–120, doi:10.2478/v10188-012-0017-z.
69. Perumal, V.; Hashim, U. Advances in Biosensors: Principle, Architecture and Applications. *Journal of Applied Biomedicine* **2014**, *12*, 1–15, doi:10.1016/j.jab.2013.02.001.
70. Rapp, B.E.; Gruhl, F.J.; Länge, K. Biosensors with Label-Free Detection Designed for Diagnostic Applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 2403–2412, doi:10.1007/s00216-010-3906-2.
71. Narita, F.; Wang, Z.; Kurita, H.; Li, Z.; Shi, Y.; Jia, Y.; Soutis, C. A Review of Piezoelectric and Magnetostrictive Biosensor Materials for Detection of COVID-19 and Other Viruses. *Advanced Materials* **2021**, *33*, doi:10.1002/adma.202005448.
72. Mittal, S.; Kaur, H.; Gautam, N.; Mantha, A.K. Biosensors for Breast Cancer Diagnosis: A Review of Bioreceptors, Biotransducers and Signal Amplification Strategies. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *88*, 217–231, doi:10.1016/j.bios.2016.08.028.

73. Wolfbeis, O.S. Fluorescence Optical Sensors in Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* **1985**, *4*; 184-188, doi:10.1016/0165-9936(85)88027-4.
74. Walt, D.R. Optical Methods for Single Molecule Detection and Analysis. *Analytical Chemistry* **2012**, *85*, 1258–1263, doi:10.1021/ac3027178.
75. Pirzada, M.; Altintas, Z. Recent Progress in Optical Sensors for Biomedical Diagnostics. *Micromachines (Basel)* **2020**, *11*, doi:10.3390/mi11040356.
76. Patel, S.; Nanda, R.; Sahoo, S.; Mohapatra, E. Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis. *Biochemistry Research International* **2016**, doi:10.1155/2016/3130469.
77. Morales, M.A.; Halpern, J.M. Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*, 3231–3239, doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00592.
78. Sajini, T.; Mathew, B. A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: Highlighting Computational Design, Nano and Photo-Responsive Imprinting. *Talanta Open* **2021**, *4*, doi:10.1016/j.talo.2021.100072.
79. Herrera-Chacón, A.; Cetó, X.; Manel Del Valle, Molecularly Imprinted Polymers - towards Electrochemical Sensors and Electronic Tongues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2021**, *413*, 6117-6140, doi:10.1007/s00216-021-03313-8.
80. Bahrani, S.; Aslani, R.; Hashemi, S.A.; Mousavi, S.M.; Ghaedi, M. Introduction to Molecularly Imprinted Polymer. *Interface Science and Technology* **2021**, *33*, 511–556, doi:10.1016/B978-0-12-818805-7.00006-0.
81. Mosbach, K. Molecular Imprinting. *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*, 9–14, doi:10.1016/0968-0004(94)90166-X.
82. Chen, L.; Wang, X.; Lu, W.; Wu, X.; Li, J. Molecular Imprinting: Perspectives and Applications. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45*, 2137–2211, doi:10.1039/C6CS00061D.
83. Vasapollo, G.; Sole, R. Del; Mergola, L.; Lazzoi, M.R.; Scardino, A.; Scorrano, S.; Mele, G. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, *12*, 5908–5945, doi:10.3390/ijms12095908.
84. Kang, M.S.; Cho, E.; Choi, H.E.; Amri, C.; Lee, J.H.; Kim, K.S. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Emerging Biomaterials for Cancer Theragnostic Applications. *Biomaterials Research* **2023**, *27*, doi:10.1186/s40824-023-00388-5.

85. Wulff, G. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates-A Way towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie International* **1995**, *34*, 1812-1832, doi:10.1002/anie.199518121.
86. Mosbach, K.; Ramström, O. The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology. *Nature Publishing Group* **1996**, *14*, 163-170, doi:10.1038/nbt0296-163.
87. Adumitrăchioaie, A.; Tertiş, M.; Cernat, A.; Săndulescu, R.; Cristea, C. Electrochemical Methods Based on Molecularly Imprinted Polymers for Drug Detection. *International Journal of Electrochemical Science* **2018**, *13*, 2556–2576, doi:10.20964/2018.03.75.
88. Spivak, D.A. Optimization, Evaluation, and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*, 1779–1794, doi:10.1016/j.addr.2005.07.012.
89. Perrier, S. 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization—A User Guide. *Macromolecules* **2017**, *50*, 7433–7447, doi:10.1021/acs.macromol.7b00767.
90. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **2012**, *45*, 4015–4039, doi:10.1021/ma3001719.
91. Edeleva, M.; Van Steenberge, P.H.M.; Sabbe, M.K.; D’hooge, D.R. Connecting Gas-phase Computational Chemistry to Condensed Phase Kinetic Modeling: The State-of-the-art. *Polymers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/polym13183027.
92. Kim, S.; Sikes, H.D. Radical Polymerization Reactions for Amplified Biodetection Signals. *Polymer Chemistry* **2020**, *11*, 1424–1444, doi:10.1039/c9py01801h.
93. El-Schich, Z.; Zhang, Y.; Feith, M.; Beyer, S.; Sternbæk, L.; Ohlsson, L.; Stollenwerk, M.; Wingren, A.G. Molecularly Imprinted Polymers in Biological Applications. *Biotechniques* **2020**, *69*, 407–420, doi:10.2144/btn-2020-0091.
94. Ertürk, G.; Mattiasson, B. Molecular Imprinting Techniques Used for the Preparation of Biosensors. *Sensors (Switzerland)* **2017**, *17*, doi: 10.3390/s17020288.
95. Kang, M.S.; Cho, E.; Choi, H.E.; Amri, C.; Lee, J.H.; Kim, K.S. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Emerging Biomaterials for Cancer Theragnostic Applications. *Biomaterials Research* **2023**, *27*, doi:10.1186/s40824-023-00388-5.
96. Mostafa, A.M.; Barton, S.J.; Wren, S.P.; Barker, J. Review on Molecularly Imprinted Polymers with a Focus on Their Application to the Analysis of Protein

- Biomarkers. *Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *144*, doi:10.1016/j.trac.2021.116431.
97. Lin, J.; Yan, F.; Hu, X.; Ju, H. Chemiluminescent Immunosensor for CA19-9 Based on Antigen Immobilization on a Cross-Linked Chitosan Membrane. *Journal of Immunological Methods* **2004**, *291*, 165–174, doi:10.1016/j.jim.2004.06.001.
98. Gu, B.; Xu, C.; Yang, C.; Liu, S.; Wang, M. ZnO Quantum Dot Labeled Immunosensor for Carbohydrate Antigen 19-9. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2720–2723, doi:10.1016/j.bios.2010.09.031.
99. Alarfaj, N.A.; El-Tohamy, M.F.; Oraby, H.F. CA 19-9 Pancreatic Tumor Marker Fluorescence Immunosensing Detection via Immobilized Carbon Quantum Dots Conjugated Gold Nanocomposite. *International Journal Molecular Sciences* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19041162.
100. Mekuye, B.; Abera, B. Nanomaterials: An Overview of Synthesis, Classification, Characterization, and Applications. *Nano Select* **2023**, *4*, 486–501, doi:10.1002/nano.202300038.
101. Baig, N.; Kammakam, I.; Falath, W.; Kammakam, I. Nanomaterials: A Review of Synthesis Methods, Properties, Recent Progress, and Challenges. *Materials Advances* **2021**, *2*, 1821–1871, doi:10.1039/D0MA00807A.
102. Sanfelice, R.C.; Pavinatto, A.; Corrêa, D.S. Introdução à Nanotecnologia. *Nanotecnologia Aplicada a Polímeros* **2022**, 27-47, doi:10.5151/9786555502527
103. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12*, 908–931, doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
104. Abid, N.; Khan, A.M.; Shujait, S.; Chaudhary, K.; Ikram, M.; Imran, M.; Haider, J.; Khan, M.; Khan, Q.; Maqbool, M. Synthesis of Nanomaterials Using Various Top-down and Bottom-up Approaches, Influencing Factors, Advantages, and Disadvantages: A Review. *Advances in Colloid Interface Science* **2022**, *300*, doi:10.1016/j.cis.2021.102597.
105. Nanoscience Instruments Nanoparticle Synthesis Available online: <https://www.nanoscience.com/techniques/nanoparticle-synthesis/> (accessed on 28 August 2024).
106. Kharbanda, S.; Dhanda, N.; Aidan Sun, A.C.; Thakur, A.; Thakur, P. Multiferroic Perovskite Bismuth Ferrite Nanostructures: A Review on Synthesis and Applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2023**, *572*, doi:10.1016/j.jmmm.2023.170569.

107. Naresh, U.; Kumar, R.J.; Naidu, K.C.B. Hydrothermal Synthesis of Barium Copper Ferrite Nanoparticles: Nanofiber Formation, Optical, and Magnetic Properties. *Materials Chemistry and Physics* **2019**, *236*, doi:10.1016/j.matchemphys.2019.121807.
108. Gidwani, B.; Sahu, V.; Shukla, S.S.; Pandey, R.; Joshi, V.; Jain, V.K.; Vyas, A. Quantum Dots: Prospectives, Toxicity, Advances and Applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2021**, *61*, doi:10.1016/j.jddst.2020.102308.
109. Hamidu, A.; Pitt, W.G.; Husseini, G.A. Recent Breakthroughs in Using Quantum Dots for Cancer Imaging and Drug Delivery Purposes. *Nanomaterials* **2023**, *13*, doi:10.3390/nano13182566.
110. Fang, M.; Peng, C.W.; Pang, D.W.; Li, Y. Quantum Dots for Cancer Research: Current Status, Remaining Issues, and Future Perspectives. *Cancer Biology & Medicine* **2012**, *9*, 151–163, doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2012.03.001.
111. Alivisatos, A.P. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science (1979)* **1996**, *271*, 933–937, doi:10.1126/science.271.5251.933.
112. Bera, D.; Qian, L.; Tseng, T.K.; Holloway, P.H. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials* **2010**, *3*, 2260–2345, doi:10.3390/ma3042260.
113. Martins, M.A.; Trindade, T. Os Nanomateriais e a Descoberta de Novos Mundos na Bancada do Químico. *Química Nova* **2012**, *35*, doi:10.1590/S0100-40422012000700026.
114. Ghorbani, M.M.; Taherian, R. Methods of Measuring Electrical Properties of Material. *Electrical Conductivity in Polymer-Based Composites* **2019**, 365–394, doi: 10.1016/B978-0-12-812541-0.00012-4.
115. Kalsoom, U. e.; Yi, R.; Qu, J.; Liu, L. Nonlinear Optical Properties of CdSe and CdTe Core-Shell Quantum Dots and Their Applications. *Frontiers in Physics* **2021**, *9*, doi:10.3389/fphy.2021.612070.
116. Jagtap, S.; Chopade, P.; Tadepalli, S.; Bhalerao, A.; Gosavi, S. A Review on the Progress of ZnSe as Inorganic Scintillator. *Opto-Electronics Review* **2019**, *27*, 90–103, doi:10.1016/j.opelre.2019.01.001.
117. Rodrigues, S.S.M.; Ribeiro, D.S.M.; Soares, J.X.; Passos, M.L.C.; Saraiva, M.L.M.F.S.; Santos, J.L.M. Application of Nanocrystalline CdTe Quantum Dots in Chemical Analysis: Implementation of Chemo-Sensing Schemes Based on Analyte-Triggered Photoluminescence Modulation. *Coordination Chemistry Reviews* **2017**, *330*, 127–143, doi:10.1016/j.ccr.2016.10.001.

118. Choi, H.S.; Liu, W.; Liu, F.; Nasr, K.; Misra, P.; Bawendi, M.G.; Frangioni, J. V. Design Considerations for Tumour-Targeted Nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **2010**, *5*, 42–47, doi:10.1038/nnano.2009.314.
119. Humajová, P.; Baliak, P.; Yumdjo Youmbissi, I.L.; Jebavá, A.; Řezáčová, L.; Lubal, P. The Analytical Application of Quenching Phenomena of CdTe Quantum Dot Nanoparticles. *Inorganics* **2023**, *11*, doi:10.3390/inorganics11090373.
120. Piloto, A.M.L.; Ribeiro, D.S.M.; Rodrigues, S.S.M.; Santos, J.L.M.; Ferreira Sales, M.G. Label-Free Quantum Dot Conjugates for Human Protein IL-2 Based on Molecularly Imprinted Polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2020**, *304*, doi:10.1016/j.snb.2019.127343.
121. Wang, Z.; Long, R.; Peng, M.; Li, T.; Shi, S. Molecularly Imprinted Polymers-Coated CdTe Quantum Dots for Highly Sensitive and Selective Fluorescent Determination of Ferulic Acid. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2019**, doi:10.1155/2019/1505878.
122. Valeur, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH **2001**; doi:10.1002/3527600248.
123. Burrows, H.D.; Azenha, M.; Monteiro, C.J.P. Catalysis from Theory to Application. An Integrated Course; Figueiredo, J.L., Pereira, M.M., Faria, J., Eds.; Coimbra **2008**; doi:10.14195/978-989-26-0410-7.
124. Jaffé, H.H.; Miller, A.L. The Fates of Electronic Excitation Energy. *Journal of Chemical Education* **1966**, *43*, 469–473, doi:10.1021/ed043p469.
125. Mátyus, L.; Szöllosi, J.; Jenei, A. Steady-State Fluorescence Quenching Applications for Studying Protein Structure and Dynamics. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology* **2006**, *83*, 223–236, doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.12.017.
126. Gehlen, M.H. The Centenary of the Stern-Volmer Equation of Fluorescence Quenching: From the Single Line Plot to the SV Quenching Map. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2020**, *42*, doi:10.1016/j.jphotochemrev.2019.100338.
127. Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Naenna, T.; Prachayasittikul, V. Quantitative Structure-Imprinting Factor Relationship of Molecularly Imprinted Polymers. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22*, 3309–3317, doi:10.1016/j.bios.2007.01.017.
128. Corp, C.-C. Recombinant Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9). Organism Species: Homo Sapiens (Human) Instruction Manual; 12, **2016**.

129. Rodrigues, S.S.M.; Ribeiro, D.S.M.; Molina-Garcia, L.; Ruiz Medina, A.; Prior, J.A.V.; Santos, J.L.M. Fluorescence Enhancement of CdTe MPA-Capped Quantum Dots by Glutathione for Hydrogen Peroxide Determination. *Talanta* **2014**, *122*, 157–165, doi:10.1016/j.talanta.2014.01.031.
130. Zhu, J.; Wang, S.N.; Li, J.J.; Zhao, J.W. The Effect of Core Size on the Fluorescence Emission Properties of CdTe@CdS Core@shell Quantum Dots. *Journal of Luminescence* **2018**, *199*, 216–224, doi:10.1016/j.jlumin.2018.03.047.
131. Mesquida, T. FILTER LAB General Catalogue Available online: [https://fanoia.com/media/catalogos/General\\_catalogue\\_FILTER-LAB\\_2017\\_WqHBI50.pdf#page=95](https://fanoia.com/media/catalogos/General_catalogue_FILTER-LAB_2017_WqHBI50.pdf#page=95) (accessed on 20 August 2024).
132. Yamada, T.; Minami, T.; Yamada, M.; Terauchi, Y. Proposed Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9) Cut-off Values for the Detection of Pancreatic Cancer in Patients with Poorly Controlled Diabetes: A Real-World Study. *Endocrine Journal* **2023**, *70*, 1069–1075, doi:10.1507/endocrj.EJ23-0186.
133. Piloto, A.M.L.; Ribeiro, D.S.M.; Santos, J.L.M.; Sales, G. Development of a Sensitive Ratiometric Imprinted Hydrogel for the Detection of Matrix Metalloproteinase 7 (MMP7) Biomarker. *ACS Applied Optical Materials* **2024**, *2*, 57–67, doi:10.1021/acsaom.3c00325.



## Anexos

### Anexo A – Estudo da interação dos QDs com a proteína CA19-9 em função do tempo de incubação

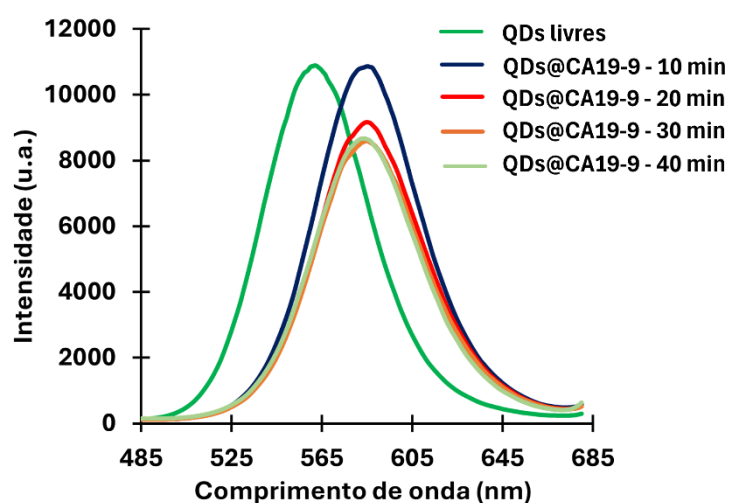


Figura A1 – Incubação de QDs com a proteína CA19-9 em diferentes tempos, 10, 20, 30 e 40 minutos.

## Anexo B – Otimização das melhores condições de polimerização

Tabela B1 – Diferentes condições de polimerização.

AAm (mM)	MBAm (mM)	Rácio	APS (mM)	TEMED (mM)	Tempo de polimerização
0,1	0,1	1:1	0,5	19,89	30 minutos
					1 hora
					2 horas
0,01	0,05	1:5			30 minutos
					1 hora
					2 horas
0,01	0,1	1:10			30 minutos
					1 hora
					2 horas
0,1	0,1	1:1	0,5	39,8	30 minutos
			1		

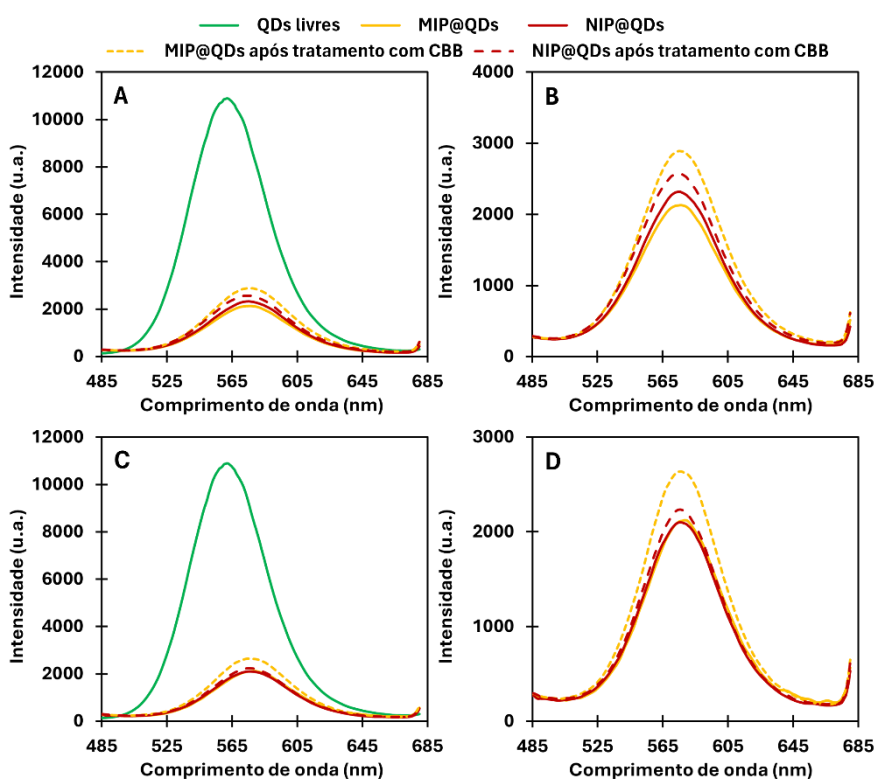


Figura B1 – Gráficos representativos da variação da concentração APS para iniciar a reação de polimerização. (A e B) Representam a polimerização com 0,5 mM de APS (C e D) Correspondem à polimerização realizada com 1 mM APS.

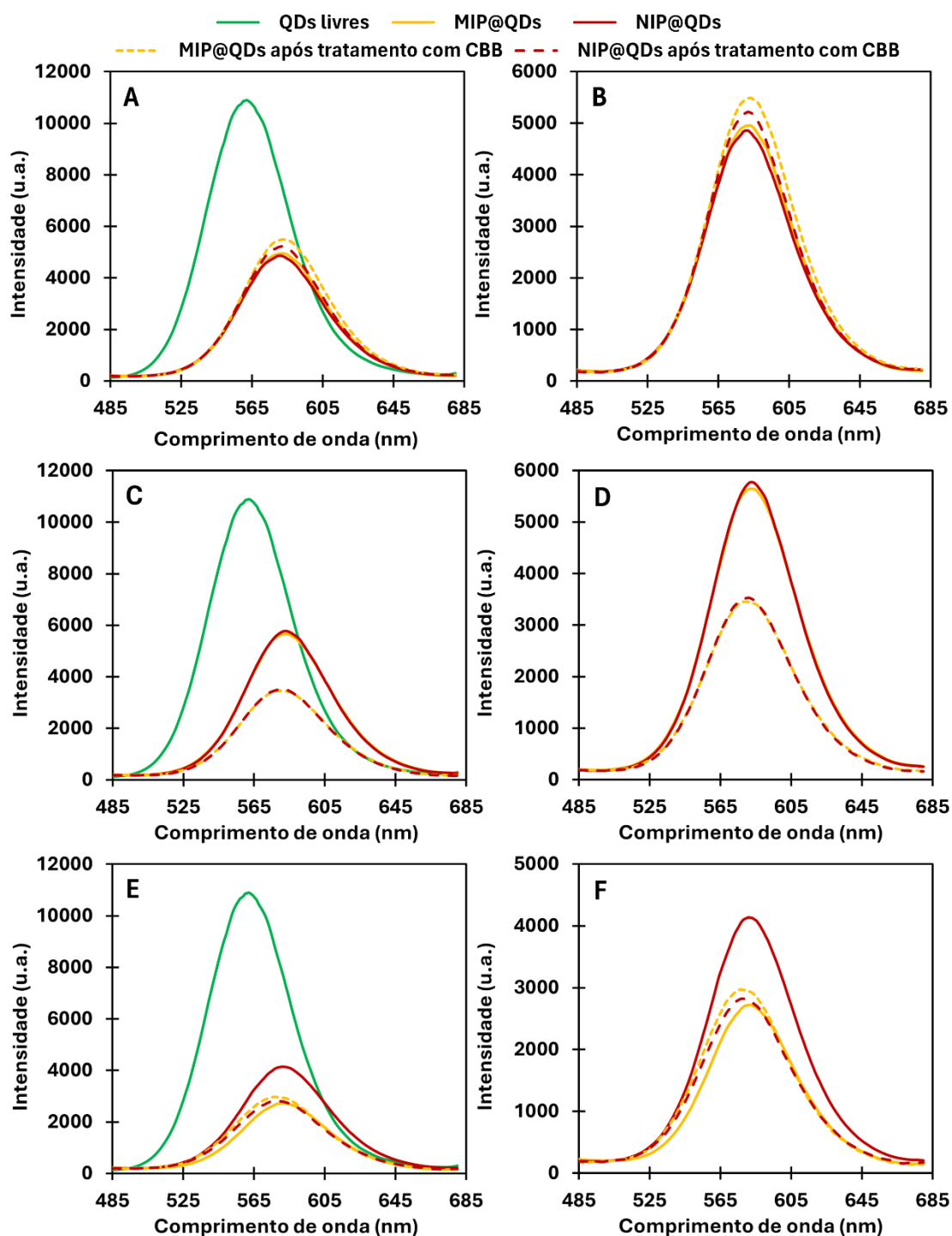


Figura B2 – Gráficos obtidos com a variação de rácio monómero: agente reticulante e diferentes tempos de polimerização. A e B correspondem a um rácio de 1:1 e um tempo de polimerização de 30 minutos. C e D representam o rácio de 1:5 e um tempo de polimerização de 1 hora. E e F representa o rácio de 1:10 e um tempo de polimerização de 2 horas.

## Anexo C – Síntese e estabilidade do sensor biomimético em PBS, pH 5,8

Tabela C1 – Condições de polimerização do sensor biomimético em PBS, pH 5,8

AAm (mM)	MBAm (mM)	Rácio	Tempo de polimerização	pH
0,1	0,1	1:1	30 minutos	5,8

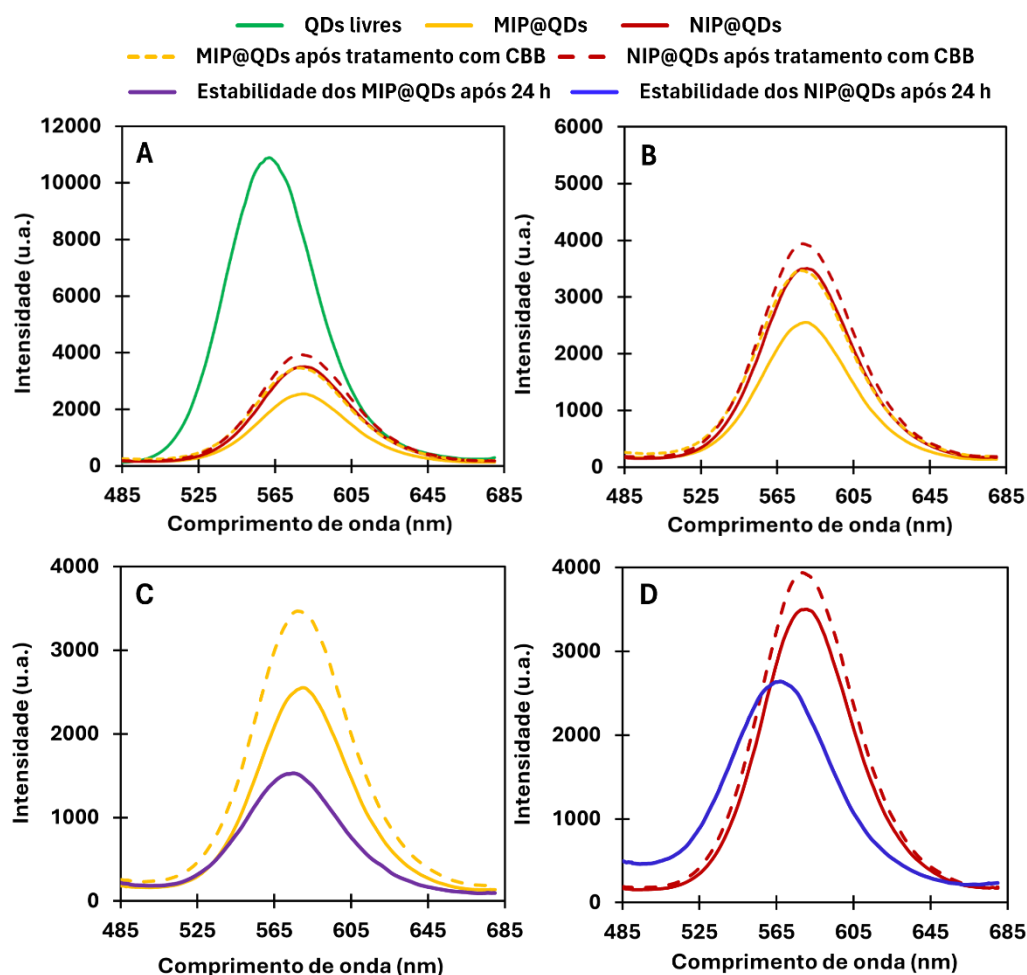


Figura C1 – Medições dos espectros de emissão de fluorescência obtidos após a polimerização dos MIP@QDs e NIP@QDs. As imagens A e B apresentam os espectros de fluorescência dos QDs livres, os MIP@QDs e NIP@QDs após polimerização e tratamento com CBB. As imagens C e D correspondem à estabilidade dos MIP@QDs e NIP@QDs em meio ácido (pH 5,8), respectivamente.

## Anexo D – Síntese e avaliação do desempenho analítico do MIP@QDs com uma concentração de impressão mais elevada de proteína (10 kU mL<sup>-1</sup>).

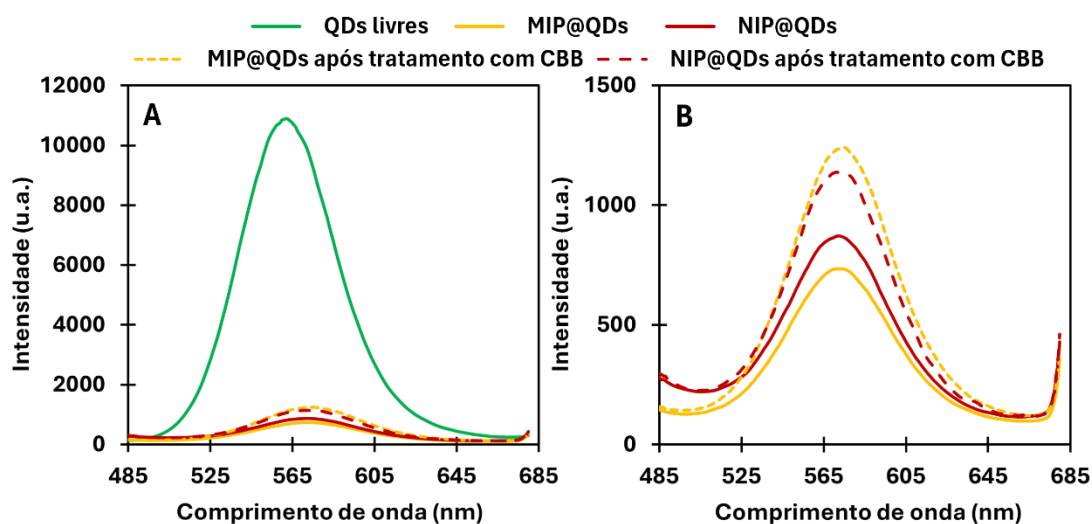


Figura D1 – Representação das medições dos espectros de emissão de fluorescência realizados nas etapas principais da produção de MIP@QDs e NIP@QDs. A imagem A apresenta os espectros de fluorescência dos QDs livres, após a polimerização dos MIP@QDs e NIP@QDs, enquanto a imagem B mostra os resultados após a lavagem com CBB.

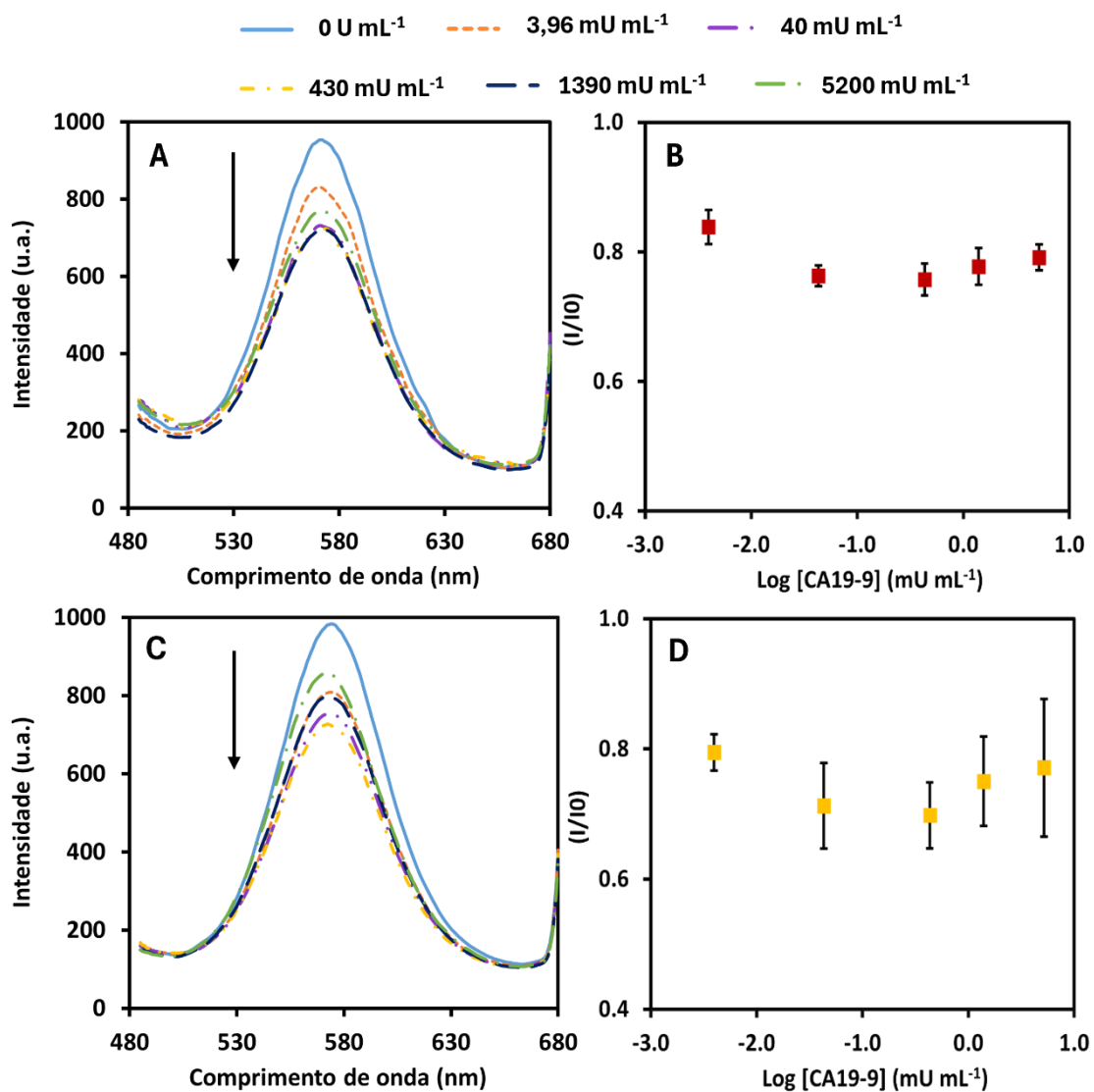


Figura D2 – Medições dos espectros de emissão de fluorescência após a última estabilização em PBS a pH 7,4, com concentrações crescentes de CA19-9, para NIP@QDs (A) e MIP@QDs (C). As imagens (B) e (D) apresentam as curvas de calibração da intensidade relativa da fluorescência em função da concentração logarítmica de CA19-9 para os NIP@QDs e MIP@QDs, respetivamente.