



Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para monitorização do cancro da mama

MARTA SOFIA VIEIRA DA SILVA
Novembro de 2015

Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de cancro da mama

Marta Sofia Vieira Da Silva nº 1121381

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Orientadores

Doutor João Pacheco

Doutor Hendrikus Nouws

Porto, Novembro de 2015

Construção de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a monitorização de cancro da mama

Marta Sofia Vieira Da Silva nº 1121381

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Orientadores

Doutor João Pacheco

Doutor Hendrikus Nouws

Porto, Novembro de 2015

Agradecimentos

Ao coordenador do mestrado pela defesa dos nossos interesses dentro da instituição.

À Professora Doutora Cristina Delerue-Matos por me ter acolhido no seu laboratório.

Ao Doutor Hendrikus Nouws por toda a disponibilidade, incentivo e compreensão ao longo do trabalho.

Ao Doutor João Pacheco por todo o incentivo, paciência, empenho e disponibilidade demonstrados durante a realização deste trabalho, contribuindo com sugestões preponderantes.

Aos meus amigos pela amizade constante e compreensão ao longo deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu namorado, pela paciência e compreensão ao longo destes anos, em especial nos períodos de maior cansaço, por todo o apoio incondicional e incentivo.

Resumo

O Cancro da mama é uma doença cuja incidência tem vindo a aumentar de ano para ano e além disso é responsável por um grande número de mortes em todo mundo. De modo a combater esta doença têm sido propostos e utilizados biomarcadores tumorais que permitem o diagnóstico precoce, o acompanhamento do tratamento e/ou a orientação do tipo tratamento a adotar. Atualmente, os biomarcadores circulantes no sangue periférico recomendados pela Associação Americana de Oncologia Clínica (ASCO) para monitorizar os pacientes durante o tratamento são o *cancer antigen 15-3* (CA 15-3), o *cancer antigen 27.29* (CA 27.29) e o *cancer embryonic antigen* (CEA).

Neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico (voltamétrico) para monitorizar o cancro da mama através da análise do biomarcador CA 15-3. Inicialmente realizou-se o estudo da adsorção da proteína na superfície do eléctrodo para compreender o comportamento do sensor para diferentes concentrações. De seguida, estudaram-se três polímeros (poliaminofenol, polifenol e polifenilenediamina) e seleccionou-se o poliaminofenol como o polímero a utilizar, pois possuía a melhor percentagem de alteração de sinal. Após a seleção do polímero, este foi depositado na superfície do eléctrodo por eletropolimerização, formando um filme polimérico molecularmente impresso (MIP) à volta da proteína (molde). Posteriormente, foram analisados cinco solventes (água, mistura de dodecil sulfato de sódio e ácido acético, ácido oxálico, guanidina e proteinase K) e o ácido oxálico revelou ser mais eficaz na extração da proteína. Por último, procedeu-se à caracterização do sensor e analisou-se a resposta analítica para diferentes concentrações de CA 15-3 revelando diferenças claras entre o NIP (polímero não impresso) e o MIP.

Palavras-chave: Cancro da mama, biomarcador, CA 15-3, sensor, eletroquímica, polímero molecularmente impresso

Abstract

Breast cancer is a disease with an incidence that has been increasing over the years and is responsible for a high number of deaths worldwide. In order to control this disease several tumor biomarkers have been proposed and used to enable early diagnostics, patient follow-up and/or treatment guidance. Currently, the circulating biomarkers (in peripheral blood) that are recommended by American Society of Clinical Oncology (ASCO) for monitoring patients during treatment are cancer antigen 15-3 (CA 15-3), cancer antigen 27.29 (CA 27.29) and cancer embryonic antigen (CEA).

In this project an electrochemical (voltammetric) sensor for monitoring breast cancer was developed through the analysis of CA 15-3. Firstly, a protein adsorption study on the working electrode surface was carried out to understand the behavior of the sensor toward several protein concentrations. Subsequently, 3 polymers were studied (polyaminophenol, polyphenol and poly (phenylenediamine)) and polyaminophenol was selected as the polymer with the best percentage of signal change. Then, the polymer was electropolymerized on the working electrode surface resulting in a molecularly imprinted polymer film (MIP) of the protein (template). Afterwards, five solvents to extract the protein after incubation were studied (water, mixture of sodium dodecyl sulfate and acetic acid, oxalic acid, proteinase K and guanidine) in order to understand which one would be the most effective. For this purpose oxalic acid was chosen. Finally, the developed sensor was characterized by evaluating the analytical response for different concentrations of CA 15-3, which revealed clear differences between the MIP and NIP (non-imprinted polymer).

Keywords: Breast cancer, biomarker, sensor, electrochemical, molecularly imprinted polymer, CA 15-3

Índice

Agradecimentos.....	- 5 -
Resumo	- 7 -
Abstract	- 9 -
Índice.....	i
Índice de figuras	iii
Índice de tabelas.....	v
Acrónimos Descrição	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento.....	3
1.2. Cancro da Mama e Biomarcadores	3
1.3. Sensores	5
1.3.1. Sensores Eletroquímicos	6
1.4. Voltametria	7
1.4.1. Voltametria Cíclica.....	7
1.4.2. Voltametria diferencial de impulsos	8
1.4.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	9
1.5. Tipos de Eléttodos.....	11
1.6. Eléttodos Modificados	12
1.6.1. Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)	12
1.6.2. MIPs eletroquímicos	14
1.6.3. MIPs e Proteínas	15
1.7. Organização da dissertação	17
2. Parte Experimental	19
2.1. Reagentes	20
2.2. Soluções.....	20
2.3. Equipamento	20

2.4.	Preparação do sensor	21
2.5.	Medições eletroquímicas	22
3.	Resultados e Discussão	24
3.1.	Construção e funcionamento do sensor.....	26
3.2.	Estudo da adsorção da proteína.....	28
3.3.	Seleção do polímero.....	31
3.4.	Impressão Molecular	37
3.5.	Extração da Proteína	41
3.6.	Caraterização do Sensor	43
3.7.	Resposta analítica	46
4.	Conclusão.....	50
	Referências Bibliográficas	53

Índice de figuras

Figura 1.1. Voltamograma Cíclico de um sistema reversível (adaptado) [16].	8
Figura 1.2. Sinal de excitação para a voltametria diferencial de impulso [16].	9
Figura 1.3. Voltamograma diferencial de impulsos [15].	9
Figura 1.4. Diagrama de Nyquist [19].	10
Figura 1.5. Circuito equivalente à espectroscopia de impedância eletroquímica. (adaptado) [17].	11
Figura 1.6. Esquema geral da preparação dos MIPs.	13
Figura 3.1. Esquema de construção e funcionamento do sensor.	27
Figura 3.2. Estudo da adsorção da proteína na superfície do SPAu. (A1) Voltamogramas e (B1) diagrama de Nyquist obtidos após adsorção de diferentes concentrações; representação gráfica dos resultados obtidos por DPV (A2) e impedância (B2) em função da concentração.	30
Figura 3.3. Estrutura química dos três monómeros escolhidos. A) Representa o fenol, B) representa o 2-aminofenol e C) representa o o-fenilenodiamina.	32
Figura 3.4. Preparação por electropolimerização de SPAu modificados com polímeros diferentes. A – Polifenilenodiamina; B – Polifenol; C- Poliaminofenol.	34
Figura 3.5. Estudo da seleção do polímero. A1 e A2 representam a DPV e a EIS para poliaminofenol (PAP), respetivamente. B1 e B2 representam a DPV e a EIS para o polifenol (PP), respetivamente. C1 e C2 representam a DPV e EIS para o polifenilenodiamina (POPDA), respetivamente.	35
Figura 3.6. Voltamogramas cíclicos correspondentes ao processo de preparação por electropolimerização de um MIP e um NIP.	38
Figura 3.7. Comparação dos resultados obtidos após polimerização. A) Voltamogramas de DPV para o MIP o NIP. B) EIS para o MIP e o NIP.	40
Figura 3.8. Estudo da extração da proteína usando diferentes solventes. A) Representa a medição da impedância. B) Representa a medição DPV.	42
Figura 3.9. Caracterização passo por passo da construção do sensor através do estudo da EIS (A) e CV (B).	45
Figura 3.10. Estudo da resposta analítica em função da concentração de proteína. A1 e B1 voltamogramas de DPV para o MIP e o NIP, respetivamente; A2 e B2 intensidade de	

corrente do pico em função da concentração de CA 15-3 para o MIP e o NIP
respetivamente. 46

Figura 3.11. Curvas de calibração construídas representando a variação da intensidade
de corrente do pico em função do logaritmo da concentração de CA 15-3. 47

Índice de tabelas

Tabela 1. Recomendações da ASCO para a utilização de biomarcadores tumorais no cancro da mama. [5]	4
--	---

Acrónimos

Descrição

ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
CA 15-3	<i>Cancer Antigen 15-3</i>
CA 27-29	<i>Cancer Antigen 27.29</i>
CEA	<i>Cancer Embryonic Antigen</i>
CV	<i>Cyclic voltammetry</i>
DPV	<i>Differential pulse voltammetry</i>
EIS	<i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
NIP	<i>Non-imprinted Polymer</i>
PAP	Poliaminofenol
POPDA	Polifenilenodiamina
PP	Polifenol
SPAu	<i>Screen Printed Gold Electrode</i>
SPE	<i>Screen Printed Electrode</i>

1.Introdução

1.1. Enquadramento

O cancro lidera a causa de morte nos países com maior poder económico e nos países subdesenvolvidos é a segunda causa de morte. A incidência desta doença continua a aumentar globalmente e em grande escala derivado ao envelhecimento e crescimento da população mundial, assim como da adoção de estilos de vida menos saudáveis (o tabagismo, a alimentação, o consumo de álcool e falta de atividade física) [1-2].

O cancro da mama é um tipo de cancro bastante comum atualmente, sendo registado frequentemente e apresenta um número de mortalidade elevado que tem vindo a aumentar de ano para ano. A utilização de técnicas convencionais para a deteção de células cancerígenas envolve, geralmente uma biopsia e posterior exame do tecido removido, por fixação celular e estudos sobre a morfologia das células. No entanto, estes testes não permitem uma avaliação conclusiva sobre a doença, podendo revelar alguma subjetividade nas suas análises, são extremamente invasivos e normalmente não permitem o diagnóstico precoce da doença [3]. Tendo em conta estes inconvenientes, têm surgido sensores como alternativas para a deteção da doença através da análise de biomarcadores, substâncias produzidas em resposta à ocorrência de cancro ou certas condições benignas, por exemplo em urina, sangue ou outros fluidos biológicos. A possibilidade de utilizar biopsias líquidas de uma forma mais efetiva e mais acessível poderá ter uma contribuição importante na solução dos desafios mencionados anteriormente [4-5].

Idealmente, os biomarcadores devem possibilitar a distinção entre células normais e malignas com sensibilidade e seletividade notáveis. Apesar do elevado número de biomarcadores circulantes (no sangue periférico) do cancro da mama sugerido na literatura, atualmente só o *cancer antigen* 15-3 (CA15-3) é analisada na prática corrente.

Neste âmbito, o desenvolvimento de sensores que possibilitem o diagnóstico e a monitorização do tratamento através da análise de biomarcadores em fluidos biológicos torna-se pertinente, pois permitiria realizar a análise com maior seletividade e sensibilidade, a um custo relativamente mais baixo e com mais rapidez.

1.2. Cancro da Mama e Biomarcadores

De acordo com a globocan, o cancro da mama é o segundo tipo de cancro mais comum em todo mundo e mais frequente nas mulheres. Todos os anos são diagnosticados cerca de 1,6 milhões de novos casos em todo mundo e regista-se o falecimento de

500,000 mulheres. Em Portugal, são registados cerca de 5600 novos casos e a incidência continua a aumentar.

O cancro da mama é uma doença caracterizada pelo crescimento e invasão anormal de células no tecido da mama. A sua deteção e tratamento precoce possibilita a continuidade de uma vida normal. Neste sentido a análise de biomarcadores poderá ter uma contribuição útil. Biomarcadores são substâncias produzidas em resposta à ocorrência de cancro ou certas condições benignas e inclui alterações no ADN, ARN, proteínas, metabolitos, processos celulares e tecidos. A identificação de biomarcadores no soro teria implicações enormes no diagnóstico e tratamento [4].

A pesquisa de biomarcadores para o cancro da mama demonstrou que devem possuir algumas características, tais como o desempenho analítico, a evidência da sua utilidade clínica na gestão do cancro da mama e demonstrar o seu valor preditivo. Atualmente, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) descreve algumas recomendações para utilização dos biomarcadores tumorais do cancro da mama (Tabela 1) [4-6].

Tabela 1. Recomendações da ASCO para a utilização de biomarcadores tumorais no cancro da mama [5].

Biomarcador	Recomendações
CA 15-3 e CA 27.29	São utilizados para monitorizar os pacientes durante o tratamento, combinando imagens, exame físico e história. Não é recomendado serem utilizados como uma ferramenta de controlo isolada. Um aumento de CA 15-3 ou CA 27.29 indica que haverá uma falha no tratamento. Portanto, devera ser utilizada com precaução durante as primeiras 4 a 6 semana do novo tratamento, pois haverá a possibilidade de ocorrer um falso aumento.
CEA	É utilizado para monitorizar os pacientes durante o tratamento, combinando imagens, exame físico e história. Não é recomendado serem utilizados como uma ferramenta de controlo isolada. Um aumento de CEA indica que haverá uma falha no tratamento. Portanto, devera ser utilizada com precaução durante as primeiras 4 a 6 semana do novo tratamento, pois haverá a possibilidade de ocorrer um falso aumento.
ER e PR	Quantificado em todos os cancros da mama primários invasivos. Caso os resultados influenciem o tratamento podem ser medidos em lesões metastáticas. Tanto para pacientes pré e pós-menopausa a utilização do estado do recetor da hormona esteroide

	para identificar pacientes pode beneficiar a terapia endócrina precoce e a doença metastática.
HER2	A expressão de HER2 deve ser testada em todos os câncros da mama primários invasivos, tanto no diagnóstico como na reincidência.
uPA e PAI 1	Quantificados pelo método ELISA podem ser utilizados para determinar o prognóstico de recém diagnosticados. Baixos valores de ambos os marcadores são associados a um baixo risco de reincidência e em mulheres com hormone-receptor positivo poderão fazer tratamento endócrino aliado à quimioterapia, que trará algum benefício.
Análise multiparâmetros de expressão genética no cancro da mama	A análise Oncotype DX pode ser utilizado para prever o risco de reincidência em pacientes recém diagnosticados com recetor-estrogénio positivo. A análise pode prever quais os pacientes que irão beneficiar mais do tratamento com tamoxifen sem quimioterapia. No caso de pacientes com valores elevados de reincidência obtêm maior benefício com quimioterapia.

Abreviaturas: ASCO, American Society of Clinical Oncology; CEA, carcinoembryonic antigen; ELISA, enzyme-linked immunoabsorbent assay; ER, estrogen receptor; DCIS, ductal carcinoma in situ; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; PR, progesterone receptor; uPA, urokinase plasminogen activator.

As diretrizes da ASCO apoiam a utilização de biomarcadores presentes no soro (CA 15-3, CA 27.29 e CEA) para monitorizar pacientes com metástases durante o tratamento, em conjunto com o histórico, os exames físicos e imagiologia.

1.3. Sensores

Um sensor é um dispositivo que produz um sinal mensurável como resposta a um estímulo físico ou químico e podem ser classificados em dois tipos, físicos ou químicos. Os sensores físicos realizam a medição de propriedades físicas como a temperatura, índice de refração entre outros. Quanto aos sensores químicos, estes podem ser utilizados tanto para análise qualitativa (por exemplo, identificação de constituintes químicos de uma amostra) como para análise quantitativa (por exemplo, determinação da concentração dos constituintes de uma amostra) [7-9].

Um sensor químico é um dispositivo analítico constituído por três partes: o elemento sensor (recetor), o transdutor e o sistema eletrónico. O elemento sensor é um componente fundamental no dispositivo pois tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. Posteriormente, a interação entre o elemento sensor e o analito é transformada num sinal elétrico mensurável, que é recebido e tratado no sistema eletrónico [8].

Existem várias possibilidades para elaborar o elemento sensor, como por exemplo a utilização de um sistema biológico (enzima, anticorpo) ou de polímeros molecularmente impressos (MIPs), em que a deteção é realizada através da interação entre os analitos e o MIP.

Os transdutores também desempenham um papel preponderante num sensor, pois transformam a interação entre o analito e o recetor num sinal elétrico. Normalmente, são caracterizados de acordo com o método de transdução que é utilizado. Alguns dos métodos mais utilizados são: eletroquímico, ótico, piezoelétrico e térmico [9].

1.3.1. Sensores Eletroquímicos

Um sensor eletroquímico permite a recolha de dados e a obtenção de informação com a mínima manipulação do sistema. A maior parte dos sensores descritos na literatura baseiam-se em transdutores eletroquímicos [10-11]. Estes dispositivos são altamente sensíveis, baratos, fáceis de usar e portáteis, permitindo análises in situ o que resultou num aumento da sua aplicabilidade. Existem vários métodos eletroquímicos, tais como:

- Amperometria, que consiste na medição da intensidade da corrente após a aplicação de um potencial num eléctrodo. A corrente gerada é uma resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eléctrodo. Esta corrente é, em determinadas condições, diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas;
- Voltametria, que consiste na variação de um potencial de um eléctrodo e medição da corrente da oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eléctrodo. Através desta técnica obtém-se informação quantitativa e qualitativa sobre as espécies oxidadas e/ou reduzidas;
- Potenciometria, que consiste na medição da diferença de potencial entre dois eléctrodos mergulhados numa solução em condições de corrente (praticamente) nula;
- Condutimetria, que consiste na medição da condutividade de uma solução;

- Impedanciometria, em que se deteta a impedância do elétrodo [12].

O princípio básico dos sensores amperométricos e voltamétricos envolve um fluxo de eletrões entre uma espécie eletroativa e a superfície de um elétrodo.

1.4. Voltametria

Na voltametria são utilizados três elétrodos: o elétrodo de trabalho (onde ocorre o processo de interesse), o elétrodo de referência e o elétrodo auxiliar. Estes três elétrodos são inseridos numa solução e são conectados a um potencióstato, que permite controlar o potencial do elétrodo de trabalho e medir a corrente resultante [13-14].

Na voltametria regista-se um voltamograma (curva corrente-potencial) que é registado durante o varrimento do potencial do elétrodo de trabalho. Quando ao potencial aplicado ocorrem reações de oxidação ou redução origina-se um fluxo de eletrões na interface entre a superfície do elétrodo de trabalho e a solução. Assim, à medida que o potencial se torna mais negativo (varrimento catódico) a energia dos eletrões aumenta e o elétrodo funciona como uma fonte de eletrões que fluirão para a solução, dando origem à redução da espécie eletroativa na interface elétrodo-solução. No caso contrario (varrimento anódico), isto é, para potenciais mais positivos é favorecida a oxidação da espécie eletroativa [14-15].

Existe uma variedade de métodos voltamétricos que, essencialmente, diferem entre si no modo de aplicação do potencial e medição da corrente. Alguns exemplos destes métodos são, a voltametria cíclica, a voltametria de varrimento linear e a voltametria diferencial de impulsos. Nos subcapítulos seguintes, serão descritas apenas as técnicas utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho [14-15].

A seleção da técnica mais adequada está relacionada com o tipo e qualidade de informação quantitativa e/ou qualitativa que se pretende obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o elétrodo de trabalho. [15] Posteriormente, serão feitas algumas considerações teóricas sobre as técnicas de voltametria cíclica e de voltametria diferencial de impulsos (DPV).

1.4.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas mais utilizadas para obter informação qualitativa e quantitativa sobre processos eletroquímicos. Esta técnica fornece rapidamente informações sobre os processos redox, tais como a reversibilidade de

processos, a cinética de reações de transferência eletrônica, reações químicas acopladas ou processos de adsorção [15].

A voltametria cíclica consiste no varrimento de potencial do eletrodo de trabalho utilizando uma onda triangular. Neste tipo de varrimento, parte-se de um potencial tendo em consideração uma determinada gama de potenciais. Posteriormente, inverte-se o sentido, isto é, o varrimento é realizado no sentido inverso na mesma gama [16].

Os parâmetros eletroquímicos mais relevantes num voltamograma cíclico são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as intensidades de corrente do pico catódico e anódico (i_{pc} e i_{pa}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$), (Figura 1.1) [16-17].

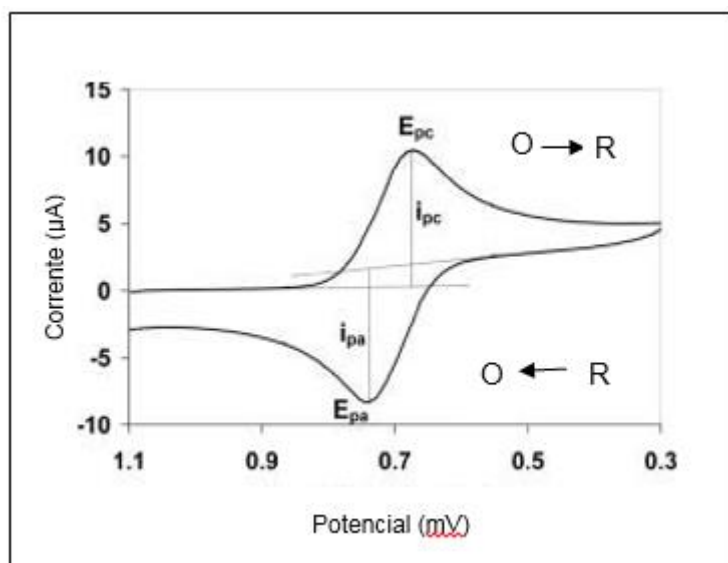


Figura 1.1. Voltamograma Cíclico de um sistema reversível (adaptado) [16].

Estes parâmetros são fundamentais para caracterizar o tipo de processo que ocorreu. Quando o varrimento de potencial catódico é seguido pelo anódico, a espécie reduzida que se formou pode ser oxidada, ou seja a reação dá-se no sentido inverso (sistema reversível), o que gera dois picos no voltamograma.

1.4.2. Voltametria diferencial de impulsos

Na voltametria diferencial de impulsos (DPV) a forma de aplicação do potencial no eletrodo de trabalho consiste em pequenos pulsos de amplitude constante sobreposta numa onda em forma de escada (Figura 1.2.). Nesta técnica, a medição da corrente é efetuada duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra no final do pulso [15-16].

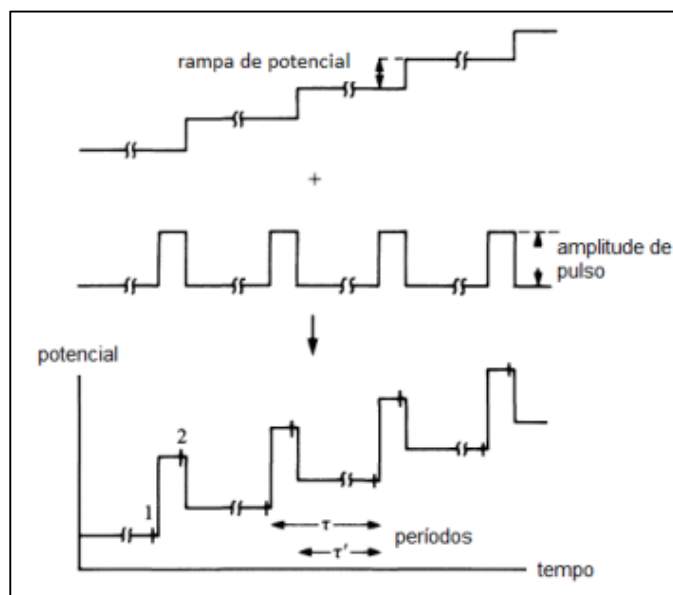


Figura 1.2. Sinal de excitação para a voltametria diferencial de impulso [16].

A primeira corrente é subtraída à segunda e a diferença de correntes é representada graficamente em função do potencial aplicado. O voltamograma da DPV (Figura 1.3) apresenta picos de corrente gaussiana, cuja área e altura do pico são diretamente proporcionais em determinadas condições, à concentração do analito [15-17].

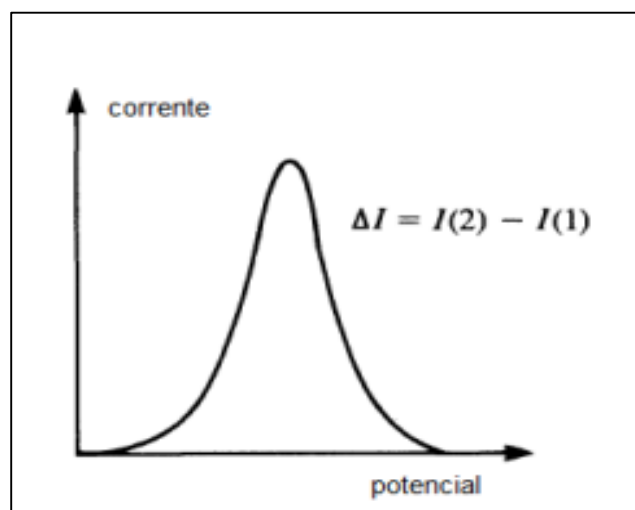


Figura 1.3. Voltamograma diferencial de impulsos [15].

1.4.3. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) consiste na resposta do sistema eletroquímico a um potencial aplicado. Assim permite detetar as propriedades dielétricas

do sistema para um determinado intervalo de frequências. Os resultados obtidos podem ser observados sob a forma do diagrama de Nyquist [16].

Idealmente, o diagrama de Nyquist apresenta um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear nas médias e baixas nas médias e baixas frequências (Figura 1.4). Na região das altas frequências, o efeito de relaxação de transferência de carga é apresentada por um semicírculo, e podem ser obtidos valores de R_s e R_p . Em que R_s é a resistência do eletrodo e eletrólito e podem ser obtidos por primeiro cruzamento do semicírculo com o eixo real. O segundo cruzamento do semicírculo da linha real, é o valor de $R_s + R_p$ em que R_p é a resistência de transferência de carga associada à interface polímero/eletrólito [17].

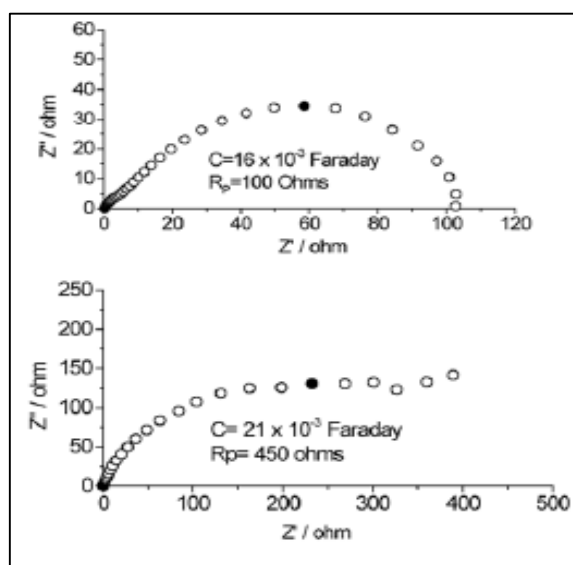


Figura 1.4. Diagrama de Nyquist [19].

Os processos eletroquímicos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho podem ser simulados por um circuito equivalente constituído por resistências e condensadores. Considera-se que o comportamento eletroquímico que ocorre no eletrodo é equivalente ao de uma resistência, conhecida como impedância de Faraday [16-19].

Na Figura 1.5. observa-se o circuito equivalente de espectroscopia de impedância eletroquímica de uma célula eletrolítica, onde C_L representa a capacitância da camada elétrica dupla no eletrodo, R_i representa a resistência interna da célula eletrolítica, R_c representa a resistência de polarização do eletrodo e R_0 representa a resistência do circuito da célula eletrolítica [19].

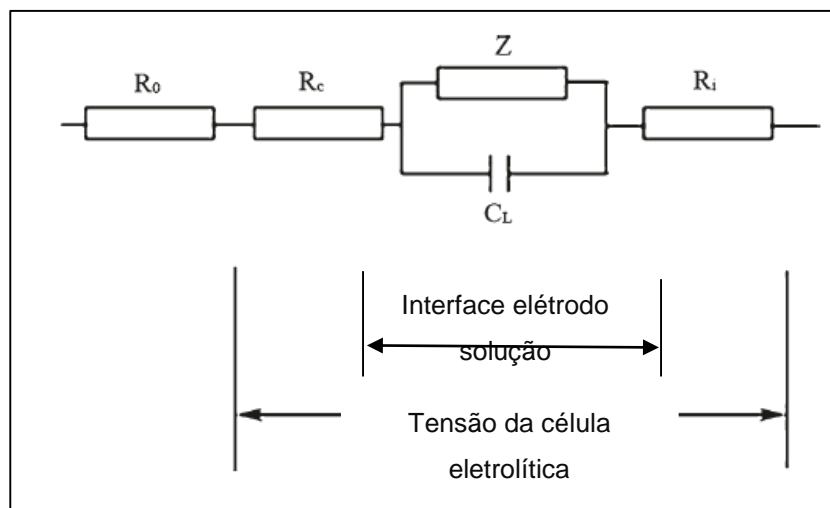


Figura 1.5. Circuito equivalente à espectroscopia de impedância eletroquímica. (adaptado) [17].

A espectroscopia de impedância eletroquímica permite avaliar as características das superfícies de eletrodos quimicamente modificados e obter informação sobre o mecanismo de reação de um processo eletroquímico [18-19].

1.5. Tipos de Eletrodos

Na base da análise voltamétrica estão as reações que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho. Para o sucesso desta análise, é necessário escolher um eletrodo de trabalho com propriedades físicas ou químicas adequadas.

Existe uma variedade de materiais de eletrodos de trabalho tais como metais nobres, carbono e mercúrio [20]. O carbono tem sido bastante utilizado na construção de vários eletrodos porque possui uma ampla janela de potencial, baixa corrente de fundo, superfície química rica e baixo custo. A par do carbono, o ouro também tem sido muito utilizado na construção de eletrodos, pois favorece a transferência de elétrons, possui uma ampla gama de potencial anódico e é quimicamente inerte [20].

1.6. Eléttodos Modificados

A modificação da superfície dos eléttodos de trabalho, consoante a área de estudo, permite melhorar as suas propriedades. O método mais utilizado para a incorporação de um modificador de superfície do eléttodo é revesti-la com um filme polimérico adequado. Este revestimento da superfície pode ser feito através da deposição da solução do polímero selecionado (deixando o solvente evaporar) ou por eletropolimerização (promove a formação do filme polimérico) [21].

Deste modo, a resposta eletroquímica do eléttodo melhora significativamente. Por exemplo, no caso das proteínas, que são imobilizadas à superfície do eléttodo, permite estudar os seus mecanismos de reações redox para posterior análise de atividade biológica.

1.6.1. Polímeros Molecularmente Impressos (MIPs)

Os polímeros de impressão molecular, também designados como materiais biomiméticos, são materiais rígidos que apresentam propriedades de reconhecimento para determinadas moléculas alvo [22].

O conceito de impressão molecular surgiu a partir da teoria de Pauling para anticorpos, onde um antigénio era utilizado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica dos anticorpos, obtendo-se uma configuração complementar do antigénio na respetiva cadeia polipeptídica de anticorpos. Assim, surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional á volta da molécula molde, podendo atuar de forma semelhante ao anticorpo, isto é, que fosse capaz de fazer a mesma seleção e reconhecimento molecular [23-24].

Os MIPs são materiais sintéticos com locais de reconhecimento capazes de se ligarem à molécula alvo, como referido no parágrafo anterior. Estes materiais são obtidos por polimerização de uma solução contendo monómeros funcionais, um agente de “*Cross-linking*”, um iniciador e um solvente na presença da molécula molde a ser impressa, para que se obtenha um “esqueleto polimérico”. Após este processo, a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação, revelando posteriormente os locais de ligação, que são complementares em tamanho e forma, como ilustra a Figura 1.6 [23-24].

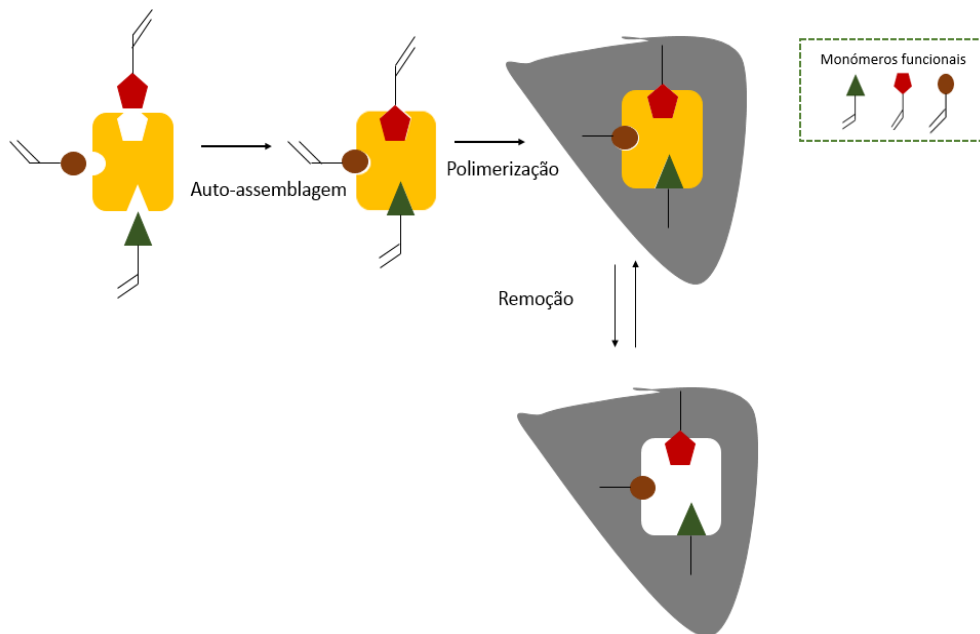


Figura 1.6. Esquema geral da preparação dos MIPs.

O MIP resultante é estável, robusto e resistente a um largo intervalo de valores de pH, solventes e temperaturas. Este comportamento a par do baixo custo faz com que os MIPs sejam uma alternativa relativamente aos recetores naturais. As vantagens dos MIPs face aos materiais naturais (biológicos) incluem ainda, a facilidade de preparação, resistência a ambientes adversos (as biomoléculas não resistiriam), podem ser armazenados a seco e a temperaturas ambiente por longos períodos de tempo sem perda do seu desempenho inicial [25].

As abordagens mais usadas na preparação para a interação entre o polímero e a molécula alvo são a covalente e a não covalente. O primeiro caso há uma reação previa de formação de uma ligação covalente entre o monómero funcional e a molécula a imprimir. Este tipo de preparação permite uma boa qualidade de impressão, com poucos locais não específicos e boa homogeneidade de pontos de ligação. No entanto, nem sempre há reações irreversíveis para formação de ligações covalentes. Por outro lado, devido à força da ligação formada muitas vezes há dificuldade em remover a molécula e o processo de ligação e remoção são lentos. Assim, a abordagem mais comum é a não covalente, que consiste na formação de interações do tipo ponte de hidrogénico, iónicas, forças de Van der Waals ou hidrofóbicas. Este tipo de preparação permite uma maior facilidade de remoção e processos de ligação simples e rápidos. A desvantagem é a possibilidade de se formarem mais pontos não específicos [26].

Podem ser usados diferentes métodos e técnicas de preparação, dependendo do tipo de polímeros e finalidade que se pretende. O método mais usado consiste na polimerização por radical livre (*free radical polymerization*), sendo uma reação rápida usando um iniciador azo por iniciação térmica ou fotoquímica. A técnica mais comum consiste na preparação de um polímero em bloco (*bulk*). Posteriormente à polimerização o bloco é partido e as partículas trituradas. No entanto este é o método menos eficaz e outras técnicas têm sido desenvolvidas, tais como: solução, precipitação, emulsão, *in situ* [26].

Teoricamente é possível preparar um MIP para qualquer molécula. Dadas as suas características, têm sido aplicados em diversas áreas, como alternativa aos recetores naturais, com especial destaque para desenvolvimento de sistemas de separação seletivos normalmente associados a técnicas cromatográficas. Nos últimos anos, devido ao grande desenvolvimento dos sensores químicos, esta tem sido uma área de grande aplicação lógica dos MIPs.

1.6.2. MIPs eletroquímicos

Devido às características e grande desenvolvimento dos sensores eletroquímicos, a utilização de MIPs como elemento seletivo para o funcionamento deste tipo de sensores tem sido de grande interesse. A principal dificuldade na preparação deste tipo de sistema consiste na integração do MIP com o transdutor (neste caso um elétrodo de trabalho) [27]. Isto é, conseguir incorporar num elétrodo o polímero obtido, normalmente sob a forma de partículas de diferentes tamanhos e formas, garantindo estabilidade e reprodutibilidade do processo.

A forma mais simples consiste em preparar o polímero em bloco, triturar e misturar com grafite, e usando a pasta com elétrodo de pasta de carbono seletivo. No entanto este técnico não é muito eficaz, com limitações na transferência de massa e na cinética de ligação em aplicações deste tipo. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas, tais como: deposição de gota; *spin-coating*, deposição camada por camada (*layer by layer*), *grafting*, eletropolimerização, preparação de polímeros em nanopartículas [27-28].

Destas técnicas a eletropolimerização, tem sido alvo de grande destaque e interesse pois permite preparar filmes poliméricos molecularmente impressos à superfície do transdutor com simplicidade e rapidez de preparação. Ou seja permite num só processo a preparação e incorporação com MIP na superfície do sensor, de forma estável e reprodutível. Para além disso, permite controlar com facilidade a espessura do filme e a

sua morfologia, controlando as condições eletroquímicas. Esta técnica dispensa na maior parte dos casos o uso de iniciador (assim como necessidade de calor ou radiação UV) e de *cross-linking*. Podem preparar-se polímeros condutores ou não condutores a partir de monómeros eletroativos, sendo frequente a incorporação de nano materiais para aumentar a condutividade e/ou a área de superfície. Como exemplos de monómeros regularmente usados temos: pirrol, o-etilenodiamina, fenol e derivados, tiofeno e derivados [27].

Este tipo de polimerização tem tido algum sucesso na preparação de sensores MIP eletroquímicos para a detecção de diversos analitos como proteínas e fármacos [28].

1.6.3. MIPs e Proteínas

As proteínas são conjuntos de macromoléculas complexas que desempenham o papel de mediador em processos específicos de reconhecimento molecular. Ultimamente têm sido desenvolvidos estudos de detecção e quantificação de proteínas, recorrendo à técnica de imunologia que depende da interação específica entre anticorpo e antígeno. Porém, a utilização destas biomoléculas apresenta algumas limitações, tais como mudanças químicas e físicas que ocorrem durante o seu manuseamento em laboratório, o elevado custo e o tempo necessário para a produção do anticorpo [29-30].

Face a estas limitações, os polímeros molecularmente impressos surgem como alternativa aos recetores naturais possuindo, o mesmo nível de seletividade e especificidade. No entanto, existe uma maior dificuldade no desenvolvimento de MIPs para o reconhecimento de macromoléculas biológicas, em comparação com a impressão molecular de moléculas pequenas. Quando se pretende “imprimir” proteínas existem alguns problemas chave, normalmente ausentes nas moléculas pequenas, que estão relacionados com o tamanho molecular, a complexidade, a flexibilidade conformacional e a solubilidade [29-30].

Tamanho Molecular

Normalmente, os blocos de polímeros tradicionais são densos e podem provocar algumas dificuldades às macromoléculas em atingir ou deixar um local de ligação formado. O fraco transporte de massa e o aprisionamento permanente originam propriedades de reconhecimento inadequadas. Para tentar eliminar estes problemas, por vezes, é necessário quebrar o bloco, sendo possível expor os locais de ligação [30].

Complexidade

As proteínas possuem um elevado número de potenciais locais de reconhecimento sobre uma área de superfície considerável. Locais diferentes da proteína apresentam propriedades físicas e químicas distintas e conseqüentemente podem surgir problemas de reconhecimento e de reatividade cruzada. Relativamente aos MIPs, estes exibem boa seletividade quando o número de locais de interação é baixo, mas as suas próprias interações são fortes. Portanto, quando existem múltiplas interações fracas não é possível produzir um MIP com elevada seletividade, o que favorece o aparecimento de ligações in específicas [30].

Flexibilidade Conformacional

As condições de polimerização podem gerar alguns problemas quando se recorre aos procedimentos de impressão tradicionais para proteínas. Assim as condições em que decorre o processo de polimerização podem provocar a desnaturação das proteínas ou força-las a conformações ou agregados que não são adequados para a impressão molecular, o que poderá afetar a seletividade [30].

Solubilidade

A maioria das impressões moleculares é efetuada em solventes orgânicos apolares na tentativa de maximizar as interações electrostáticas, como as ligações de hidrogénio, das quais muitos MIPs dependem para poderem realizar o reconhecimento. Contudo, a fraca estabilidade e solubilidade da maior parte das proteínas em solventes apolares limita a sua utilização. Assim a disponibilidade do monómero é reduzida, pois a maioria é insolúvel ou parcialmente solúvel em água [30].

Apesar das dificuldades têm sido desenvolvidas várias técnicas e estratégias de preparação de MIPs para proteínas, dividindo-se nas seguintes categorias: técnicas tradicionais, impressão de Epítipo e impressão na superfície [29-30]. A impressão tradicional é a abordagem mais simples para realizar a impressão macromolecular, pois permite a formação de locais de ligação para toda a proteína. No entanto é uma técnica que apresenta muitas limitações, devidas as dificuldades apontadas anteriormente. Ainda assim, diferentes técnicas de preparação originado partículas de diferentes morfologias e características têm sido testados.

A impressão por Epítipo utiliza um pequeno elemento estrutural da proteína como modelo que substitui a proteína alvo (maior dimensão). A principal vantagem desta técnica é a utilização de uma sequência peptídica conhecida, correspondente a uma parte estrutural da proteína e que servirá de molde para a preparação do MIP. O uso de péptidos terminais permite a obtenção de polímeros mais seletivos. Prevê-se que sejam necessária uma sequência com um mínimo de nove aminoácidos [29-30].

Quanto à impressão na superfície, pode ser obtida quer por fixação prévia da proteína numa superfície de suporte, seguida de polimerização á sua volta. Os locais de ligação podem ser impressos na superfície do polímero ou perto da superfície da camada do polímero, conseguindo resolver o problema de transferência de massa restrita e facilitando, posteriormente, a remoção da proteína. Tem sido estudadas várias técnicas de fixação das proteínas em superfícies. A polimerização pode ser realizada pelas técnicas tradicionais, ou então pela preparação de um filme fino por eletropolimerização. Esta técnica tem a desvantagem de produzir um número reduzido de locais impressos. [29-30]

1.7. Organização da dissertação

O presente trabalho está organizado em quatro capítulos. No primeiro capítulo, introdução, foram feitas algumas considerações teóricas sobre o cancro da mama e os seus biomarcadores, os sensores e os MIPs no sentido de contextualizar o trabalho desenvolvido.

No segundo capítulo, descreve-se toda a parte experimental relativa à construção do sensor, especificando os materiais e métodos utilizados.

No terceiro capítulo, são apresentados todos os resultados relativos às etapas de desenvolvimento do sensor.

O quarto capítulo encerra a dissertação com às considerações finais sobre o trabalho desenvolvido e perspetivas futuras.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes

Os seguintes reagentes/produtos foram utilizados ao longo do trabalho experimental, tal como foram recebidos, sem qualquer purificação adicional: hexacianoferrato (II) de potássio (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), hexacianoferrato (III) de potássio (Sigma-Aldrich, Puriss.p.a.), fosfato de potássio monobásico (Riedel-de Haën, puriss) hidrogenofosfato de di-potássio (Riedel-deHaën, puriss), ácido sulfúrico (Panreac 96% PA-ISOL), ácido oxálico (Sigma-Aldrich, puriss.p.a., anidro) hidrocloreto de guanidina (Sigma-Aldrich, ≥ 99%), ácido acético glacial (VWR), dodecil sulfato de sódio (SDS, Panreac), proteínase K, fenol (MERCK,PA), 2-aminofenol (ARCOS, 99%), ortofenilenodiamina (Sigma Aldrich, 99,5%), CA 15-3 (6,3 kU/ml, MyBioSource 5000 U).

2.2. Soluções

Foram preparadas soluções de tampão fosfato com concentração de 0,1 M, pH 7,4, misturando as quantidades apropriadas de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 e acertando o pH com HCl até ao valor desejado. Foram preparadas soluções de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 10 mM em tampão fosfato para a realização dos ensaios eletroquímicos. As polimerizações foram realizadas utilizando soluções dos respetivos polímeros de concentração 10mM em 0,1M de tampão fosfato pH 7,4.

A solução mãe de CA 15-3 (6,3 kU/mL) foi mantida no congelador a $-20^{\circ}C$ em alíquotas de 10 μ L. A partir destas alíquotas foram preparadas diariamente soluções de trabalho de diferentes concentrações em tampão fosfato e mantidas no frigorífico a $4^{\circ}C$ durante o máximo de três dias.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada (resistividade = 18.2 M Ω .cm) obtida a partir de um sistema de ultra purificação de água Millipore (Simplicity 185).

2.3. Equipamento

Todo o trabalho experimental foi efetuado à temperatura ambiente. Utilizaram-se elétrodos comerciais serigrafados (*screen-printed*) (DropSens, DRP-C223BT) com elétrodos de trabalho ($d = 1.6$ mm) e auxiliar de ouro e um elétrodo de referência de prata (SPAu). Estes elétrodos foram modificados para a construção dos sensores seletivos. As medições eletroquímicas foram efetuadas usando potenciostatos/galvanostatos da marca Metrohm Autolab, modelos PGSTAT 204 e

PGSTAT128N controlados pelo sistema de aquisição e tratamento de dados NOVA (versão 1.11). Os elétrodos serigrafados foram ligados aos potenciostatos através de um conector da DropSens(DRP-CAC).

Para a medição de líquidos utilizou-se material de vidro comum de laboratório bem como micropipetas (VWR) de 20 μL , 200 μL e 1000 μL .

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo, MS205DU), com precisão de 0,00001 g e numa balança analítica (Kern, EW220-3nm), com precisão de 0,001g.

Para uma melhor dissolução de sólidos na preparação de soluções foi usado um sistema de Ultrassons Sonorex Digital 10P (Bandelin).

2.4. Preparação do sensor

Previamente à sua utilização, os SPAus formam lavados exaustivamente com água ultrapura e secos com auxílio de um fluxo de azoto. Posteriormente procedeu-se à ativação da superfície do eletrodo de trabalho, colocando uma gota de 40 μL de H_2SO_4 0,5M, e procedendo a um varrimento por voltametria cíclica (CV) durante 5 ciclos com uma velocidade de varrimento de 100mV/s num intervalo de potencial entre -0,2 e 1,3 V.

Na construção e utilização do sensor otimizado, de seguida colocaram-se 2 μL de uma solução de 50 U/mL de CA 15-3 no eletrodo de trabalho do SPAu durante vinte minutos para adsorção da proteína. Após este período o eletrodo foi lavado com tampão fosfato e seco com azoto. Colocaram-se então no SPAu 40 μL de uma solução 2-aminofenol 10 mM em tampão fosfato e procedeu-se à polimerização por CV durante 10 ciclos com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s numa gama de potencial entre -0,1 e 0,9 V. Após polimerização, a solução de polimerização foi removida e substituída por tampão fosfato, realizando-se mais 5 ciclos nas mesmas condições, de modo a remover restos de monómero não polimerizado e estabilizar o polímero formado. Por último, removeu-se a proteína colocando no SPAu 100 μL de ácido oxálico 0,5 M durante doze horas, seguido de uma hora em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). Foi preparado ainda um sensor de controlo não impresso (NIP), com todas as condições iguais à preparação do MIP, mas sem adsorção da proteína.

2.5. Medições eletroquímicas

Foram realizadas medições eletroquímicas recorrendo às técnicas de CV, DPV e EIS. Todos os ensaios foram efetuados usando uma solução de 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4).

As medições por CV foram realizadas com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s, numa gama de potencial entre -0,2 e 0,6 V durante 6 ciclos. Na DPV a gama de potencial foi de -0,2 a 0,5 V, com um incremento de potencial de 2,5 mV e uma amplitude de impulso de 50 mV. Os diagramas de Nyquist na EIS foram obtidos fixando o potencial em 0,2 V com uma perturbação sinusoidal do potencial de amplitude 10 mV e 50 frequências distribuídas logaritmicamente na gama de 0,1 a 10 kHz.

3. Resultados e Discussão

3.1. Construção e funcionamento do sensor

Os dispositivos de testes rápidos devem possuir algumas características tais como portabilidade, simplicidade, facilidade de utilização, rentabilidade e serem descartáveis. Deste modo optou-se por usar como transdutores, elétrodos comerciais denominados “*screen printed electrodes (SPE)*” com o elétrodo de trabalho em ouro (SPAu). Este tipo de elétrodos são de tamanho reduzido, permitindo que o volume da amostra seja baixo, cerca de 30 a 40 μL , o que os torna indicados para amostras biológicas. O facto de se poder utilizar um volume reduzido é uma vantagem quando se pretende analisar amostras biológicas. Além disso a sua integração em dispositivos eletrónicos portáteis é fácil, sendo indicados para o desenvolvimento de aplicações de testes rápidos. Além do transdutor, um elemento fundamental de um sensor é o elemento seletivo. Neste trabalho recorreu-se á utilização da tecnologia de impressão molecular (MIP) para obter seletividade, devido às suas características identificadas nos capítulos anteriores. A técnica de preparação foi “*surface imprinting*” por eletropolimerização, pois permite imprimir diretamente na superfície do SPAu, sendo um método simples que permite controlar facilmente a espessura do polímero e a sua morfologia, ajustando as condições eletroquímicas. A sua principal vantagem consiste em permitir simultaneamente a impressão e comunicação direta entre o polímero obtido e a superfície do transdutor (SPAu), garantindo maior facilidade e repetibilidade do processo.

Uma das dificuldades de imprimir proteínas por eletropolimerização é o fato de poderem ficar impressas irreversivelmente, com apenas uma parte a ficar nas zonas exteriores do filme polimérico. Uma forma de contornar este problema pode ser recorrendo à impressão de superfície, ou seja, inicialmente a proteína é fixada no elétrodo e posteriormente faz-se uma polimerização em torno da proteína.

Tendo em contas estes aspetos a construção e utilização do sensor foi realizada de acordo com o esquema da Figura 3.1.

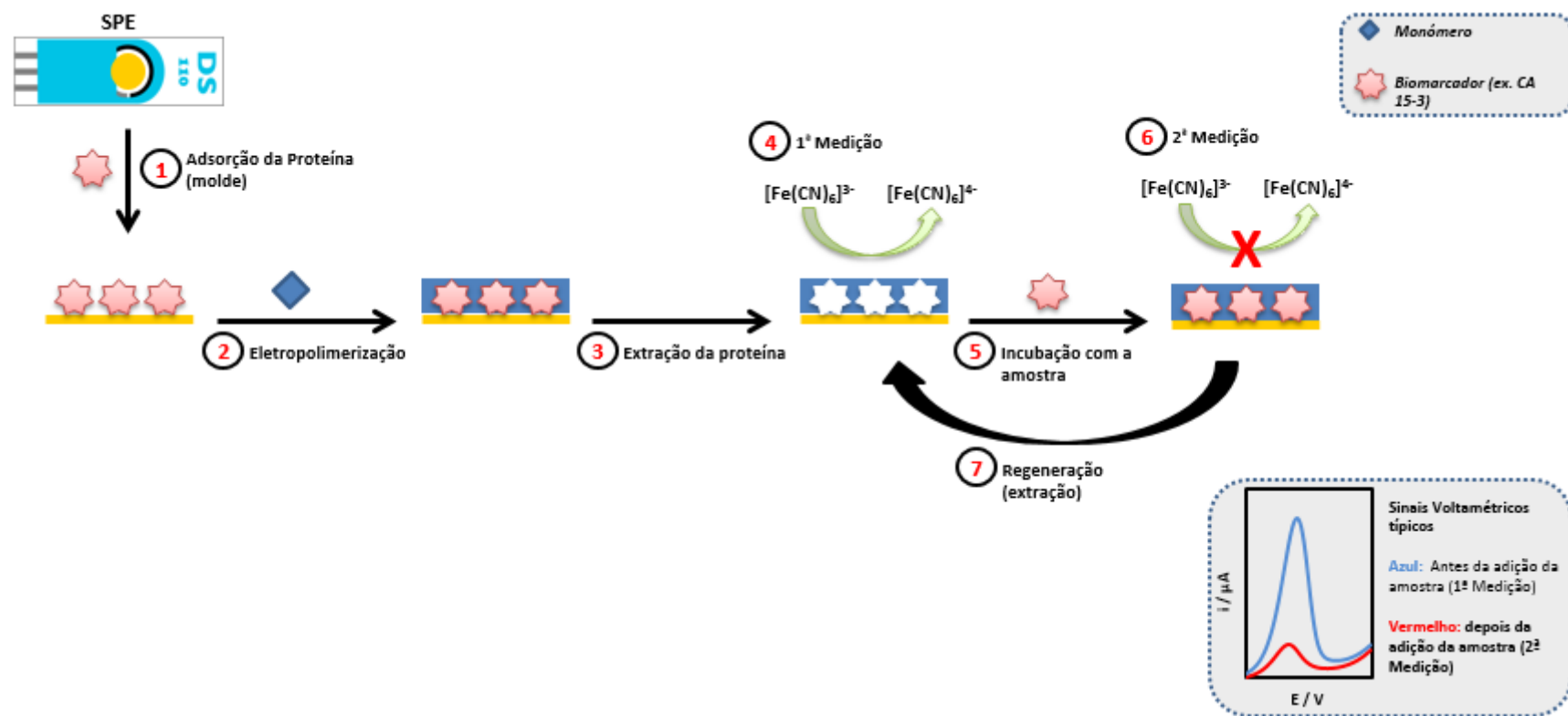


Figura 3.1. Esquema de construção e funcionamento do sensor.

Como se pode observar no esquema a construção do sensor envolve três etapas:

- (1) Adsorção da CA 15-3 na superfície do SPAu;
- (2) Eletropolimerização de um polímero à volta da proteína previamente adsorvida;
- (3) Extração da proteína, criando um filme polimérico com “cavidades” específicas.

Normalmente as proteínas são eletricamente inativas ou demonstram fraca eletroatividade. Estudos iniciais não revelaram eletroatividade da CA 15-3 em elétrodos SPAu. Assim, a análise voltamétrica foi realizada utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como reação solução para estudar a oxidação redução à superfície dos elétrodos. Desta forma, será possível medir as diferenças entre os sinais antes e depois da ligação da proteína de uma forma indireta. Assim sendo, após a preparação do sensor, o funcionamento para a deteção da CA 15-3 envolve quatro etapas:

- (4) Medição do sinal eletroquímico com “as cavidades livres” usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$;
- (5) Incubação por tempo definido de CA 15-3;
- (6) Medição do sinal eletroquímico com “as cavidades parcialmente ocupadas” usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$;
- (7) Regeneração do sensor, realizando nova extração da proteína incubada.

3.2. Estudo da adsorção da proteína

Inicialmente realizou-se um estudo para verificar se a CA 15-3 adsorvia em superfícies de Ouro usando um elétrodo de ouro convencional e medindo o sinal do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Verificou-se que a proteína ficou adsorvida na superfície do elétrodo de ouro. A adsorção de proteínas a superfícies de ouro é um fenómeno complexo que geralmente envolve o transporte da solução até á superfície, a adsorção e conseqüente relaxação conformacional [31]. Este fenómeno, além de descrito na literatura foi inclusivamente utilizado também na preparação de um sensor MIP eletroquímico para deteção de uma proteína [31]. Tendo por base o que está descrito na literatura o resultado preliminar, foi efetuado um estudo de adsorção da CA 15-3 nos SPAu. 3 μ L de várias soluções de CA 15-3, de 5 a 50 U/mL, preparadas em tampão fosfato (0,1 M ,pH 7,4), foram colocadas por 20 minutos á temperatura ambiente em elétrodos SPAu. Foram registadas os sinais

de DPV e EIS de SPAu sem CA-15-3 e após adsorção das diferentes concentrações. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.2.

Como se pode observar na Figura 3.2 (A1) há um decréscimo do pico obtido na DPV à medida que se aumenta a concentração de proteína. Tal como seria de esperar, quando a quantidade de proteína adsorvida na superfície do eletrodo de trabalho é maior, há uma superfície disponível menor para medição de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, pelo que o pico será cada vez menor. Na Figura 3.2 (A2) está representada a intensidade do pico obtido em função da concentração de proteína. Este gráfico permite observar que inicialmente há um decréscimo rápido da intensidade do pico até se obter uma estabilização a partir de uma concentração de 25 U/mL. Este comportamento indica que a partir desta concentração atingiu-se a capacidade máxima de adsorção de proteína, obtendo-se o máximo de bloqueio do sinal do ferro.

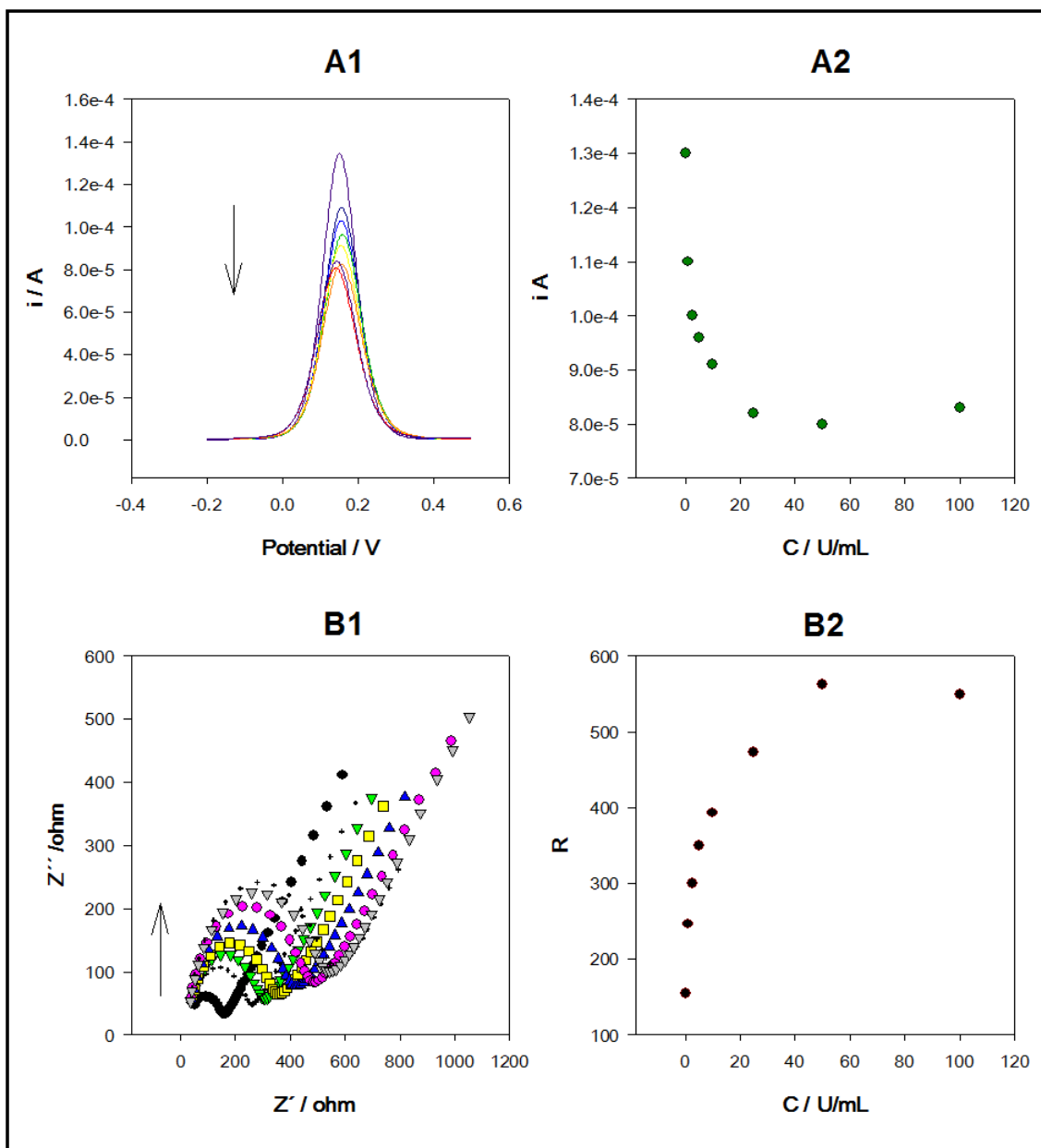


Figura 3.2. Estudo da adsorção da proteína na superfície do SPAu. (A1) Voltamogramas e (B1) diagrama de Nyquist obtidos após adsorção de diferentes concentrações; representação gráfica dos resultados obtidos por DPV (A2) e impedância (B2) em função da concentração.

Os resultados obtidos por EIS, representados na Figura 3.2 (B1 e B2) confirmam o mesmo comportamento. Na Figura 3.2, B1 verifica-se que há um aumento do semicírculo correspondente ao sinal de impedância, mostrando uma superfície cada vez mais resistente, isto é devido á maior quantidade de proteína adsorvida. Determinado o diâmetro de cada semicírculo é possível obter um valor que pode corresponder à resistência. O gráfico da Figura 3.2 B2 foi construído usando esses valores em função

da concentração da proteína. Observando o gráfico é possível verificar um comportamento similar aos resultados obtidos por DPV, ou seja há um aumento rápido da resistência da superfície até às 25 U/mL. A partir dessa concentração há uma estabilização do sinal. Assim, selecionou-se uma concentração de CA 15-3 de 50 U/mL para proceder aos estudos seguintes.

3.3. Seleção do polímero

Um dos pontos-chave para a preparação de um MIP com boa capacidade seletiva é a escolha do monómero funcional. A forma normalmente usada para seleção do monómero consiste na realização de um largo número de ensaios experimentais, usando um grande número de monómeros e condições de polimerização. Posteriormente estudaram-se e compararam-se isotérmicas de adsorção e valores de seletividade entre eles para verificar quais as condições mais eficazes. No entanto isto leva a um trabalho laborioso e muitas vezes dispendioso, sendo uma grande desvantagem da preparação de MIPs. No caso da preparação de um sensor para uma proteína (o caso deste trabalho) é ainda mais difícil utilizar este método, dada a pouca quantidade de proteína disponível e o custo elevado da mesma. Tal como referido na introdução, o primeiro passo na preparação de um MIP é a formação de um complexo entre a molécula alvo e o monómero funcional por auto assemblagem. Normalmente assume-se que o polímero com melhores cavidades seletivas é obtido a partir de uma interação forte entre o monómero e molécula-alvo na solução de pré-polimerização. Tendo por base este conceito, nos últimos anos tem-se recorrido ao estudo desta interação antes da polimerização, como uma forma fiável, barata e rápida de selecionar os melhores monómeros. Isto tem sido feito recorrendo essencialmente a estudos computacionais de interação monómero-molécula alvo. Tal estudo poderia ser muito difícil neste trabalho. Este tipo de estudo tem sido feito para moléculas pequenas. Estudar a interação de um monómero com uma proteína seria muito mais complexo e demorado, devido á estrutura complexa das proteínas desde o tamanho até ao grande número pontos de interação disponíveis.

Deste modo, a escolha de um monómero para a preparação de um polímero seletivo para a CA 15-3 passou por um processo de seleção prévia, seguido da realização de um ensaio simples. Inicialmente procuraram-se monómeros normalmente usados na preparação de sensores MIP por eletropolimerização. Dentro deste grupo procuraram-se na literatura os monómeros que já foram usados na impressão de outras proteínas. Deste modo foram selecionados três monómeros que cumpriam estes critérios, acrescentando-se a particularidade de terem grupos funcionais distintos: fenol, 2-aminofenol, o-fenilenediamina. A estrutura química dos três monómeros está ilustrada na Figura 3.3.

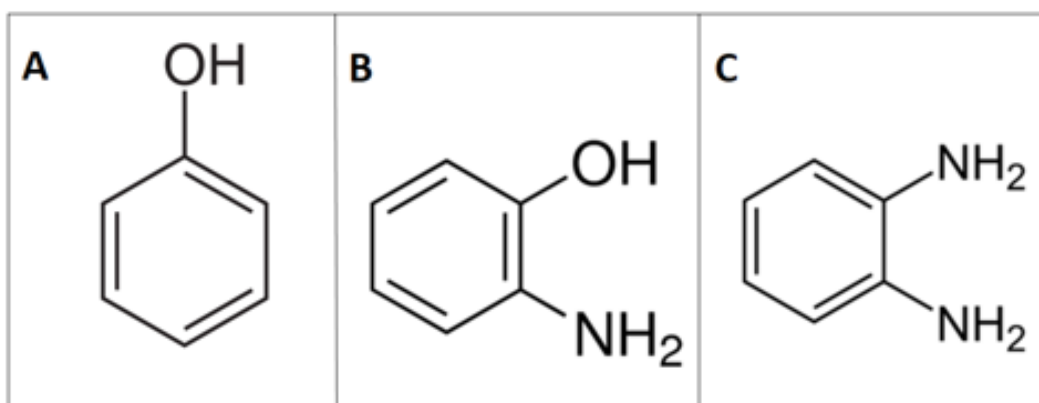


Figura 3.3. Estrutura química dos três monómeros escolhidos. A) Representa o fenol, B) representa o 2-aminofenol e C) representa o o-fenilenediamina.

É muitas vezes assumido que quanto melhor for a resposta de um polímero não impresso (NIP) melhor será a eficiência do MIP correspondente, isto porque quanto melhor for a interação não específica (NIP) maior probabilidade haverá de formação de cavidades com interações específicas. Deste modo, e usando os três monómeros selecionados foram preparados três polímeros (polifenol, poliaminofenol e polifenilenedianima) e colocados nos três NIPs na superfície dos três SPAus. Todos os polímeros foram preparados por CV, durante 10 ciclos a partir de soluções de concentração de 5mM do respetivo monómero em tampão fosfato (0,1M pH 7.4). As polimerizações obtidas estão representadas na Figura 3.4.

Foi possível obter três elétrodos com a superfície modificada, cada um com um polímero diferente. Em todos os casos, há um bloqueio da superfície após o primeiro varrimento, que pode ser verificado através da diminuição acentuada da corrente no segundo varrimento, facto que indica a formação de um filme polimérico pouco condutor, tal como esperado.

Posteriormente, para escolha do melhor polímero realizou-se um ensaio simples. Fez-se um análise por DPV e EIS da superfície polimérica usando uma solução 10mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato (0,1 M pH 7,4) até se obter a estabilização do sinal. De seguida realizou-se uma incubação de CA 15-3 em cada um dos elétrodos durante 20 min e repetiram-se as análises por DPV e EIS. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 3.5

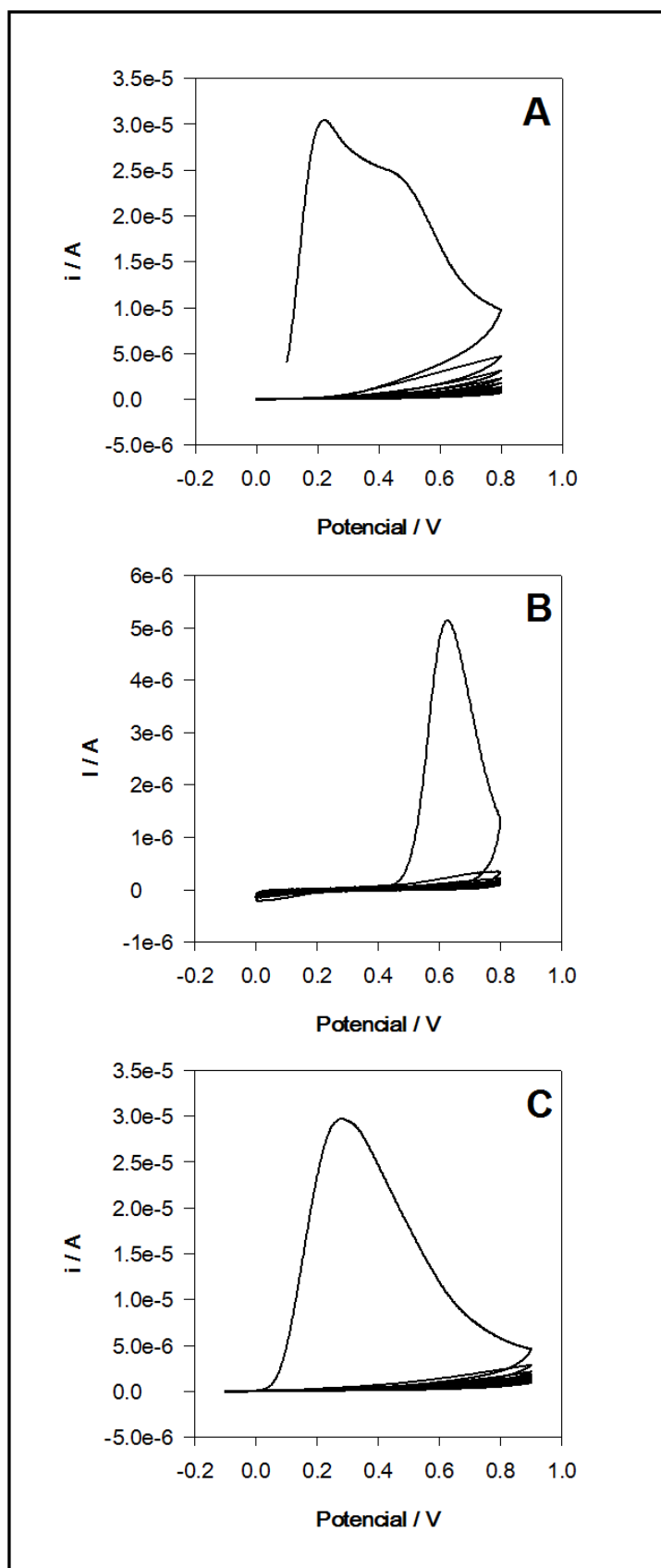


Figura 3.4. Preparação por electropolimerização de SPAu modificados com polímeros diferentes. A – Polifenilenodiamina; B – Polifenol; C- Poliaminofenol.

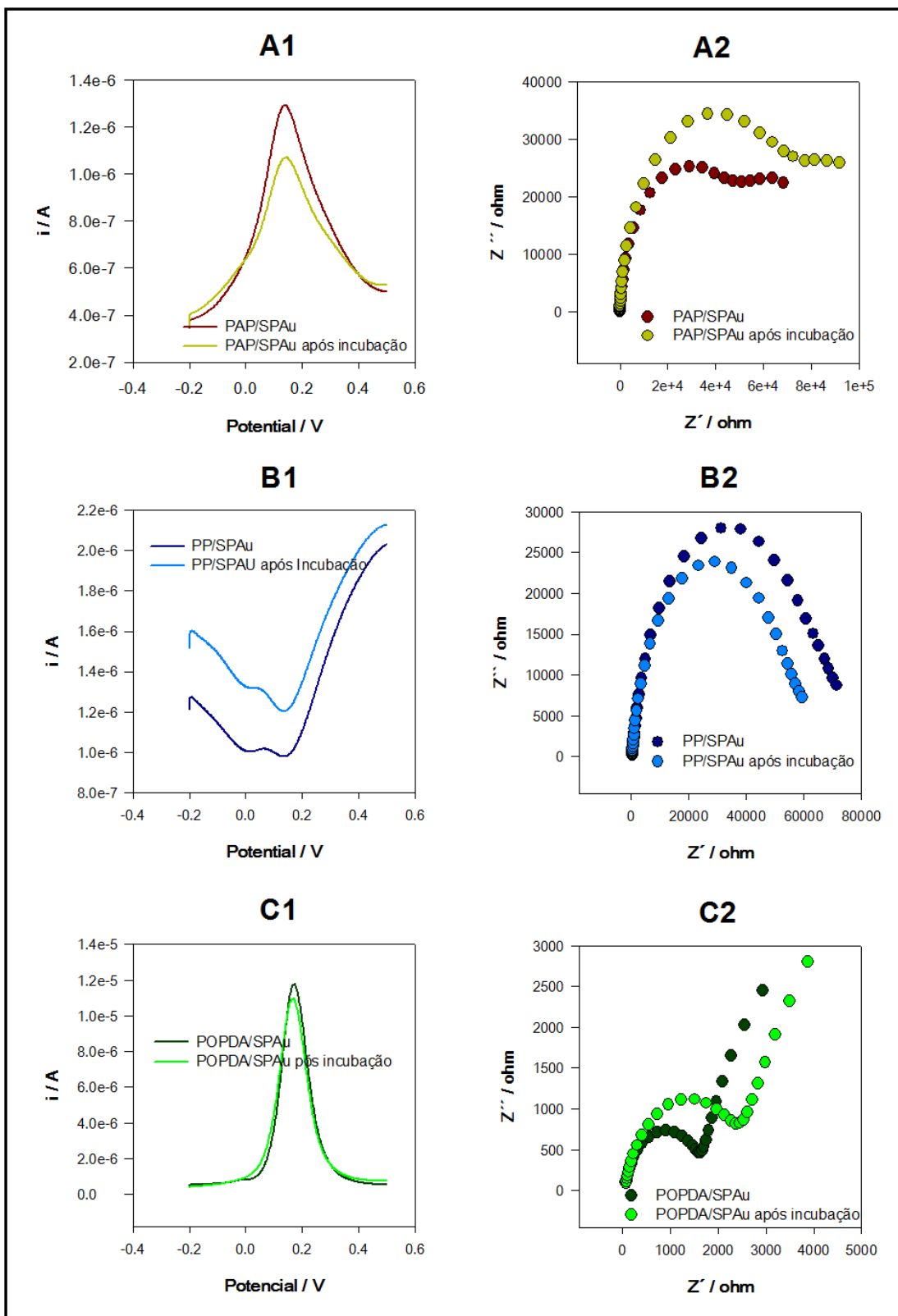


Figura 3.5. Estudo da seleção do polímero. A1 e A2 representam a DPV e a EIS para poliaminofenol (PAP), respetivamente. B1 e B2 representam a DPV e a EIS para o polifenol (PP), respetivamente. C1 e C2 representam a DPV e EIS para o polifenilenodiamina (POPDA), respetivamente.

O objetivo foi verificar qual dos polímeros conseguia uma interação com a CA 15-3, analisando as variações dos sinais obtidos antes e após incubação. A forma encontrada para comparar os três polímeros foi calcular a variação do sinal em percentagem. A análise dos resultados permitiu registar os valores referentes à intensidade de corrente do pico e à impedância, para se poder efetuar os cálculos da percentagem de alteração do sinal para cada polímero. Assim para o poliaminofenol a percentagem de alteração foi de 29 % na DPV e 30 % na impedância. No caso do polifenol os valores obtidos foram negativos, -44 % para alteração da intensidade de corrente do pico e -19 % para a impedância. Quanto ao polifenilenediamina, o valor da percentagem da intensidade de corrente do pico foi de 7% e para a impedância foi 36%. Verifica-se portanto que em todos os casos houve uma alteração do sinal, pelo que se conclui que todos interagem com a CA 15-3. Para o polifenol obteve-se um resultado não esperado. As percentagens negativas resultam do facto de a resposta após incubação ter sido melhor (superfície mais condutora). Como se pretende um sensor em que a resposta quando a proteína está presente se baseia no bloqueio, este monómero/polímero foi descartado.

Considerando as percentagens obtidas para os três polímeros, verifica-se que o polímero com melhor percentagem de bloqueio ou de alteração de sinal é o poliaminofenol, pois a sua percentagem é maior relativamente aos outros polímeros, embora o polifenilenediamina também tenha registado valores próximos na impedância. Contudo optou-se pelo poliaminofenol pois além destes indicadores é descrito na literatura como um polímero muito utilizado para a imobilização de macromoléculas.

3.4. Impressão Molecular

Após os estudos da adsorção da proteína e da seleção do polímero, foi realizada a impressão molecular. Esta etapa foi obtida realizando uma eletropolimerização na superfície da CA 15-3/SPAu, depositando 50uL de uma solução de AP 10mM em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), e usando a CV durante 10 ciclos consecutivos. Um eletrodo controle não impresso (NIP) foi também preparado usando as mesmas condições mas sem adsorção da proteína. Os voltamogramas obtidos nas polimerizações estão representados na Figura 3.6. Nesta figura é possível observar que foram obtidas diferenças durante a polimerização do MIP e do NIP. Para o NIP, após o primeiro pico de oxidação, não se regista mais nenhum pico nem de oxidação nem de redução, formando-se um filme isolador, tal como foi observado na escolha do polímero. No entanto para a polimerização do MIP, após o primeiro pico de oxidação, apesar de não se registar nenhum pico de redução, há um decréscimo mais lento do pico de oxidação. Este fato está relacionado com a presença da proteína, a qual torna, provavelmente a polimerização mais lenta. Por outro lado verifica-se que apesar desta diminuição mais lenta do pico, no final dos 10 ciclos já não se observa nenhum pico de oxidação, o que mostra que foi possível polimerizar sobre toda a proteína. Estes resultados são um primeiro indicador da capacidade para a CA 15-3 conseguir ser impressa usando estas condições.

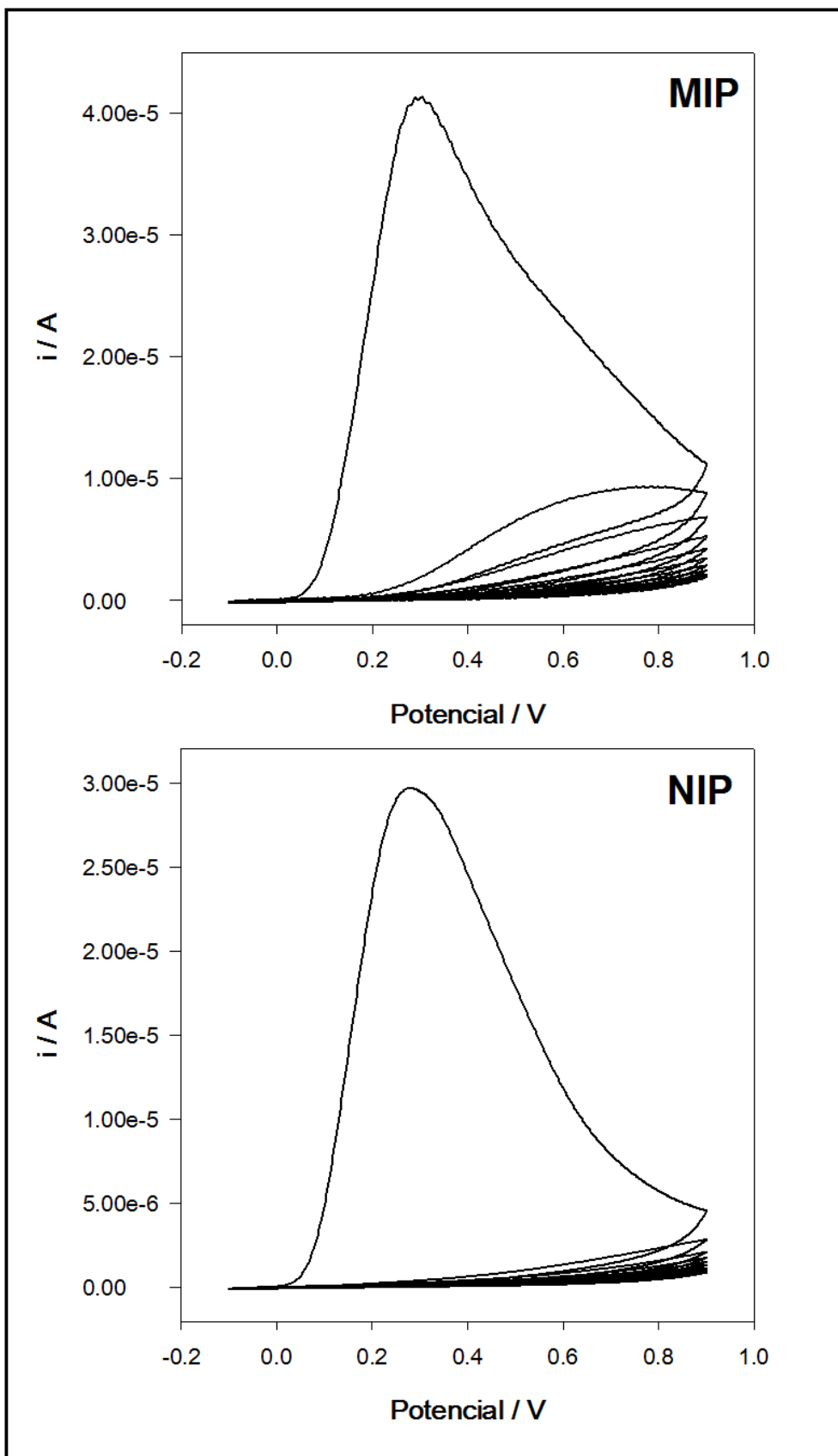


Figura 3.6. Voltamogramas cíclicos correspondentes ao processo de preparação por eletropolimerização de um MIP e um NIP.

Posteriormente procedeu-se à análise por DPV e EIS dos filmes obtidos, usando 10mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4). Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 3.7. Analisando esta figura é possível observar uma clara diferença entre o MIP e o NIP. Na Figura 3.7 (A) correspondente aos voltamogramas obtidos por DPV observa-se um pico relativo à oxidação do ferro enquanto para MIP não se regista qualquer pico. Na Figura 3.7 (B) também se evidencia uma grande diferença entre o NIP e o MIP, sendo a resistência do MIP muito mais elevada.

Estas diferenças claras indicam que a proteína ficou impressa no polímero tornando-o ainda mais isolador que o controlo, comprovando o sucesso da impressão molecular.

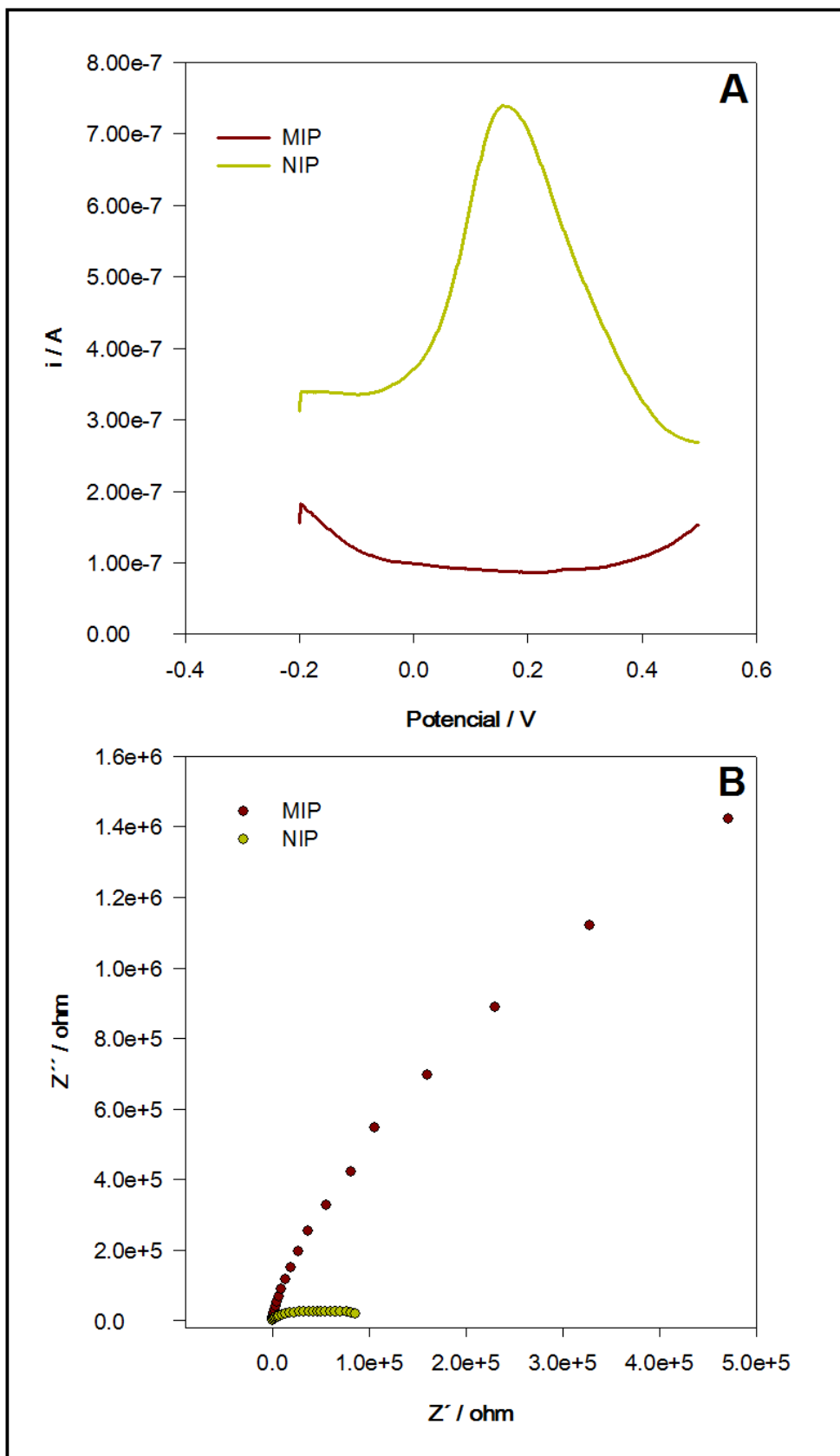


Figura 3.7. Comparação dos resultados obtidos após polimerização. A) Voltamogramas de DPV para o MIP o NIP. B) EIS para o MIP e o NIP.

3.5. Extração da Proteína

Uma etapa fundamental na preparação de um MIP é a extração da molécula alvo. Apesar de incorporar as moléculas alvo no polímero obtido, é frequente a dificuldade em remove-la de forma a criar as “cavidades” específicas. A incapacidade de remover eficazmente a molécula da matriz polimérica é ainda mais evidente na impressão de proteínas, devido à estrutura complexa destas moléculas. Desta forma é necessário estudar as condições que garantam uma remoção eficiente. A forma mais comum de realizar este processo é recorrendo a uma extração por solvente.

Assim, após o sucesso da incorporação da CA-15-3 no PAP, foi efetuado um estudo de modo a avaliar a eficiência de extração da proteína por solventes com características diferentes. Inicialmente testou-se uma extração com água, por ser o solvente mais simples e um bom solvente para dissolução de proteínas. Testaram-se duas soluções ácidas diferentes, (i) 1% de ácido acético com 1% de SDS e (ii) 0,5M ácido oxálico. Ambas as soluções são normalmente usadas para extrair ou desnaturar proteínas. Foi testada uma solução alcalina de guanidina 0,5 M que também permite a desnaturação da proteína. E por fim testou-se uma solução de proteinase K, uma enzima usada na digestão de proteínas. Para a realização do estudo foram preparados cinco sensores MIP. Após polimerização, cada sensor foi exposto a um solvente diferente durante doze horas. Após esse período foram colocados em tampão fosfato (0,1 M, pH 7.4) durante uma hora. Posteriormente procedeu-se à análise por CV e EIS. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.8. Para a extração com água não se verificam, com ambas as técnicas, diferenças significativas após a polimerização, pelo que se conclui que a água não extrai a CA 15-3. As extrações com guanidina e proteinase K apenas permitem extrações parciais. Apesar de esta alteração não ser claramente visível nos dados da CV, pois praticamente não há oxidação ou redução do ferro, na EIS verifica-se um abaixamento significativo da impedância. No entanto as maiores diferenças são verificadas para as extrações com ácidos, sendo a maior diferença registada para o uso de ácido oxálico. Em ambos os casos verifica-se na CV o aparecimento de picos de oxidação e redução do ferro, que podem ser associados à criação de cavidades que permitem a chegada do ferro à superfície do eletrodo. No mesmo sentido verifica-se

uma grande diferença nos valores de impedância. Deste modo o ácido oxálico foi escolhido para a extração de CA 15-3 do MIP.

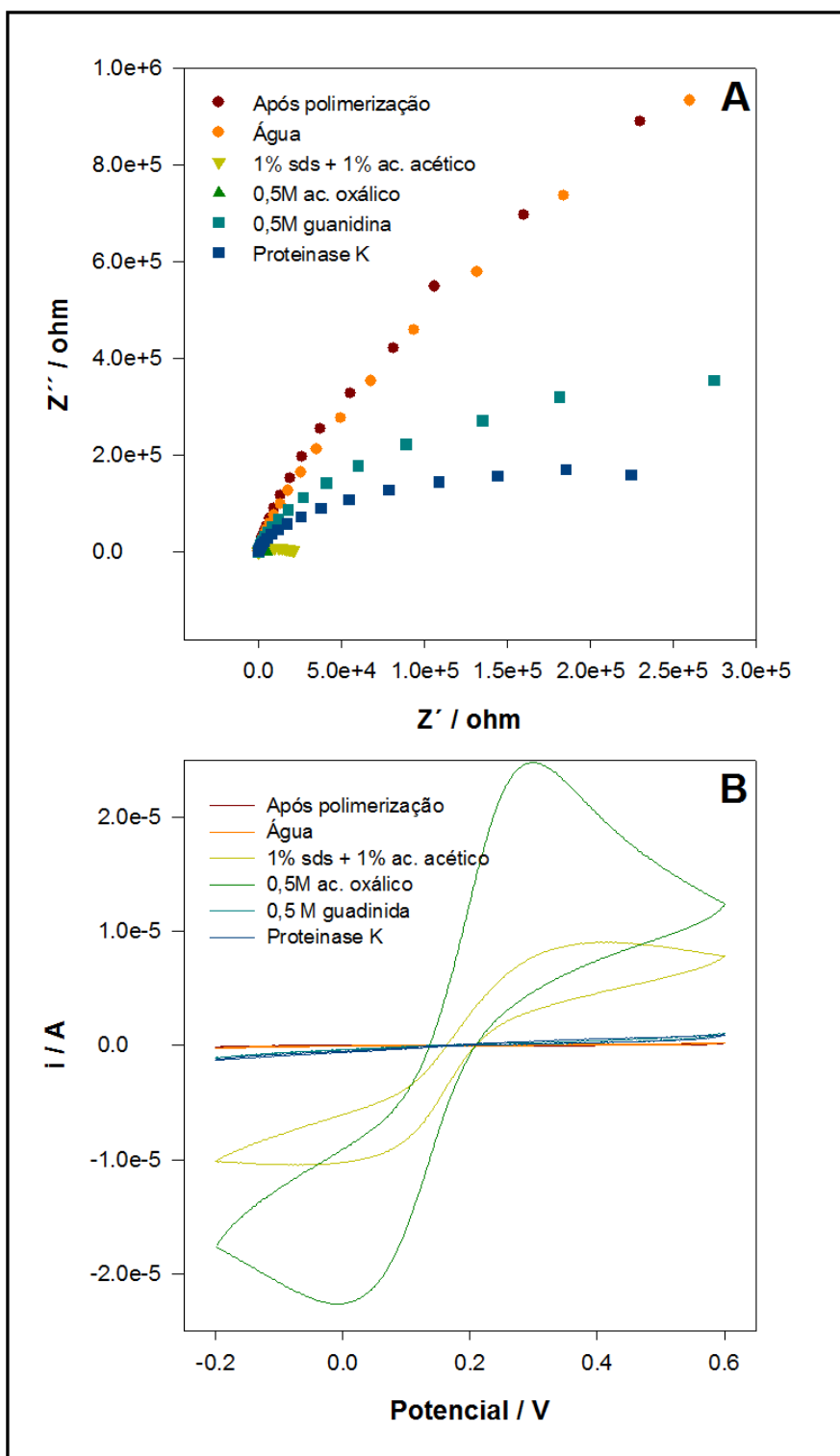


Figura 3.8. Estudo da extração da proteína usando diferentes solventes. A) Representa a medição da impedância. B) Representa a medição DPV.

3.6. Caraterização do Sensor

Foi realizada uma caraterização passo a passo da construção e utilização do sensor desenvolvido. Para isso realizou-se a medição de impedância e CV após cada modificação na superfície do elétrodo. Na Figura 3.9 são apresentados os resultados obtidos nestes estudos.

Nos dados de impedância, o semicírculo do diagrama de Nyquist para frequências mais altas corresponde ao processo de transferência eletrónica enquanto a parte linear para frequências mais baixas corresponde à difusão. Na Figura 3.9 (A) observa-se uma linha praticamente reta para o SPAu que corresponde a um processo limitado apenas pela difusão, com uma rápida cinética de transferência de eletrões. Após a adsorção da CA 15-3 há um aumento do semicírculo, indicando que o elétrodo sofre um efeito de obstrução pela presença da proteína que resulta na redução da transferência de eletrões ou no aumento da resistência ao fluxo de eletrões. Após polimerização há um aumento muito acentuado da impedância, sendo que a superfície apresenta elevada resistência à transferência eletrónica, devido à formação do filme com incorporação da proteína. Posteriormente, após a remoção da proteína observa-se uma diminuição da impedância que é explicada pelo aumento de cavidades vazias após remoção, melhorando a difusão do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ através do polímero o que por sua vez facilita a transferência de eletrões. Finalmente, após incubação há de novo um ligeiro aumento do semicírculo.

Relativamente à CV, para o SPAu observam-se picos redox característicos do processo de transferência reversível de eletrões do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$. Após a adsorção da proteína observa-se que a intensidade da corrente dos picos diminui ligeiramente. Após polimerização a intensidade da corrente de pico diminui consideravelmente, não sendo possível observar os picos redox como resultado do bloqueio da transferência de eletrões pela formação do polímero com proteína incorporada. Depois da polimerização removeu-se a proteína e na CV resultante voltou-se a observar um par de picos redox, indicando a eficiência da etapa de extração. Deste modo as cavidades ficam vazias e aumenta a porosidade do MIP, o que facilita a difusão do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ e a ocorrência da reação redox na superfície do elétrodo. Por último, incubou-se o sensor com a proteína e observou-se a diminuição dos picos redox, que é explicada pelo facto das moléculas de CA 15-3 preencherem as cavidades, bloqueando a difusão e a reação redox do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$. Assim, verifica-se que o MIP tem a capacidade de voltar a estabelecer ligação com as moléculas de CA 15-3.

É importante referir que há uma grande diferença entre os valores de impedância e CV entre o SPAu limpo e o MIP/SPAu após extração. Este facto ajuda a demonstrar que a extração não destrói o polímero na superfície do eléctrodo, apenas extrai a proteína. Caso houvesse destruição do polímero o sinal após extração teria de ser muito similar aos do SPAu.

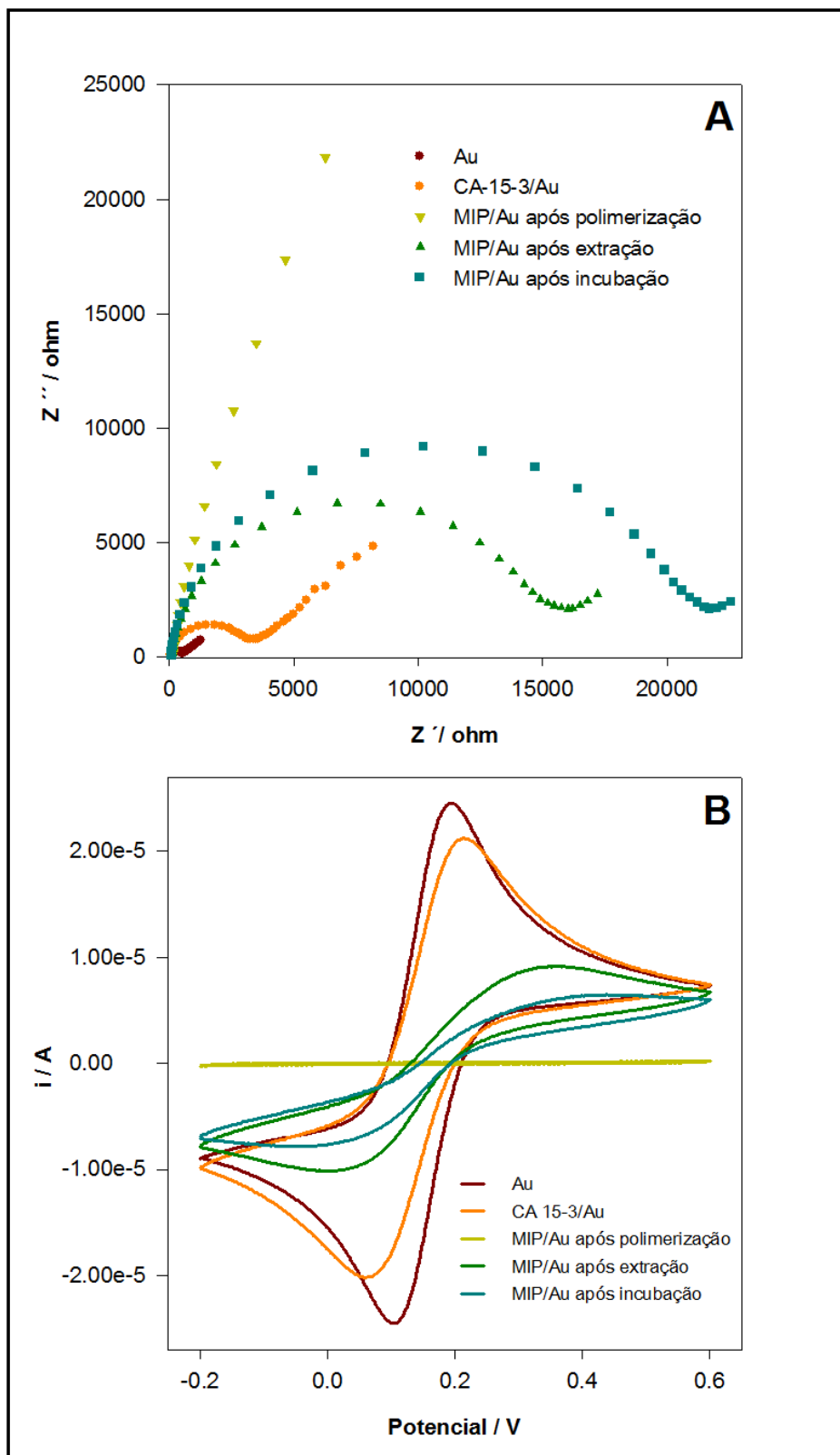


Figura 3.9. Caraterização passo por passo da construção do sensor através do estudo da EIS (A) e CV (B).

3.7. Resposta analítica

Após a construção do sensor pretendeu-se avaliar a qualidade da resposta analítica para diferentes concentrações de CA 15-3. Com essa finalidade testou-se a resposta de um MIP e de um NIP para diferentes concentrações da proteína. Soluções com concentrações diferentes foram incubadas durante 10 min, e posteriormente, registou-se o voltamograma (DPV) para cada um dos sensores., como se observa na Figura 3.10.

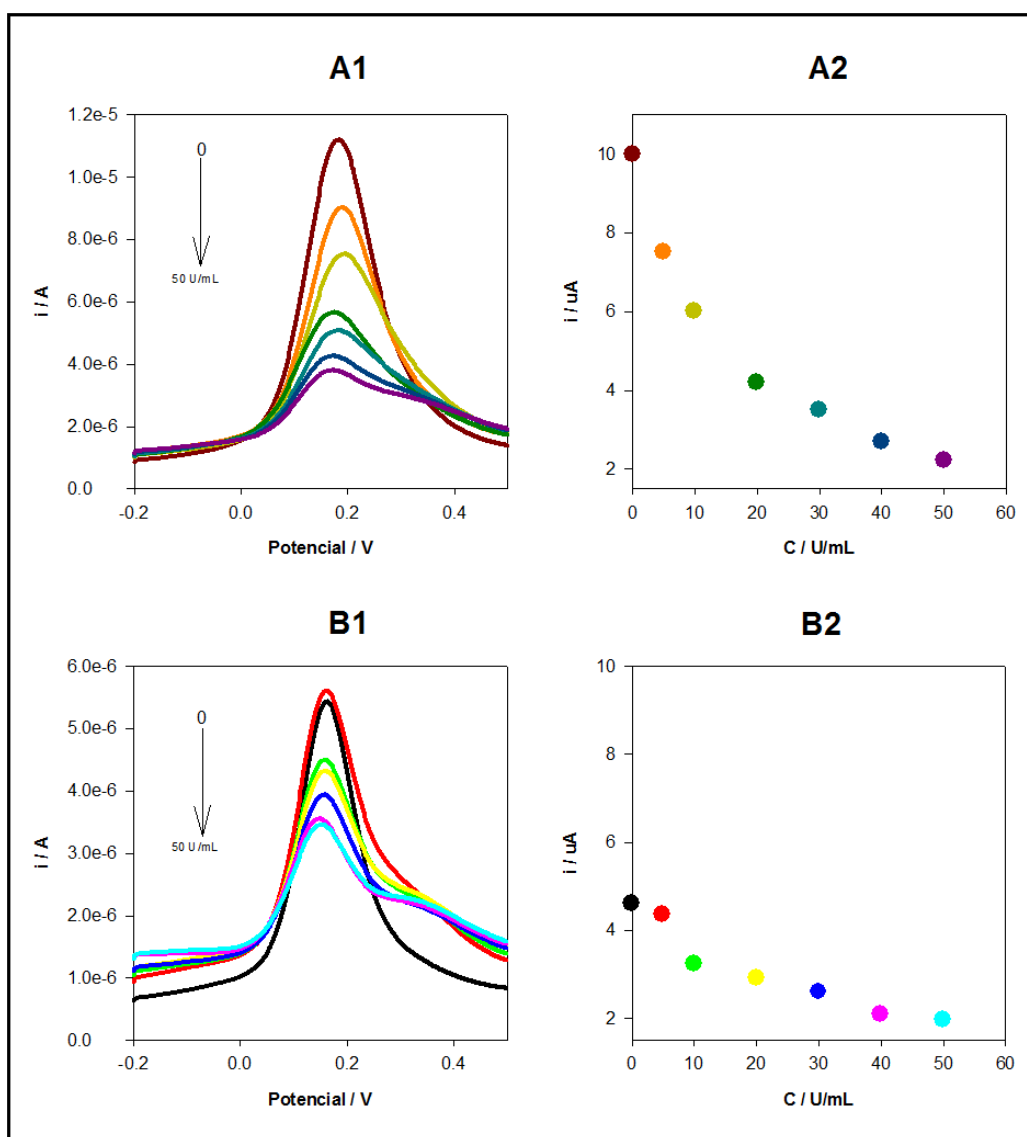


Figura 3.10. Estudo da resposta analítica em função da concentração de proteína. A1 e B1 voltamogramas de DPV para o MIP e o NIP, respetivamente; A2 e B2 intensidade de corrente do pico em função da concentração de CA 15-3 para o MIP e o NIP respetivamente.

Analisando os resultados, verifica-se que tanto para o MIP como para o NIP há uma diminuição da intensidade de corrente do pico com o aumento da concentração da proteína, comprovando-se que os sensores são eficazes para a detecção. É possível verificar ainda que as variações da intensidade de corrente do pico são mais acentuadas para o sensor MIP do que para o sensor NIP, como se pode verificar pelos gráficos da intensidade de corrente do pico em função da concentração na Figura 3.10 (A2 e B2).

Com base nestes dados foram construídas curvas de calibração. Para isso as variações das intensidades de corrente dos picos entre a resposta sem proteína e após incubação com várias concentrações foram representadas em função do logaritmo da concentração (Figura 3.11).

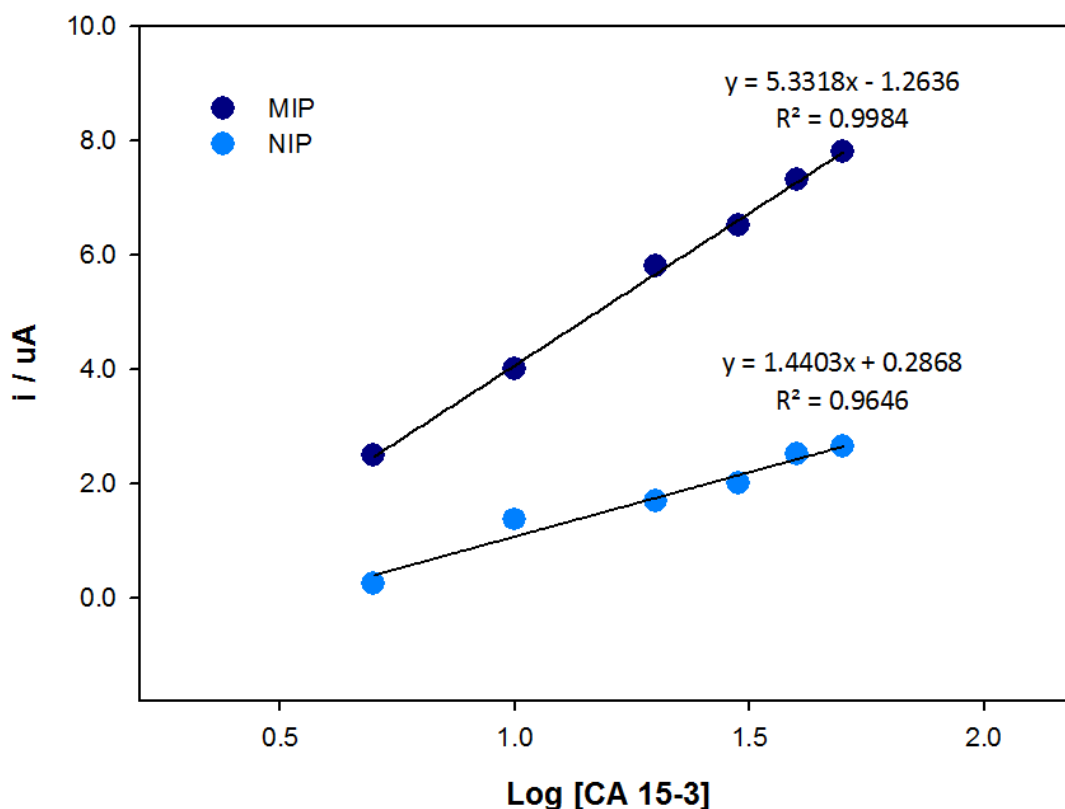


Figura 3.11. Curvas de calibração construídas representando a variação da intensidade de corrente do pico em função do logaritmo da concentração de CA 15-3.

Os resultados obtidos mostram que apesar de ambos os sensores apresentarem resposta analítica para a CA 15-3, há uma melhor sensibilidade usando o MIP. Na Figura 3.11 é possível observar que para cada concentração a variação obtida com o MIP é

sempre maior do que com o NIP. Além disso as retas apresentam declives muito diferentes, com um declive mais acentuado para o MIP. Assim, pode-se afirmar que existe uma clara diferença entre MIP e o NIP, facto que permite afirmar que foi possível construir um sensor com “cavidades” específicas para a CA 15-3.

4. Conclusão

A monitorização do cancro da mama durante o tratamento é fundamental, pois permitirá avaliar a evolução da doença no paciente e o sucesso do tratamento adotado. Consequentemente, o desenvolvimento de sensores mais sensíveis, simples e económicos é uma necessidade, pois possibilitará monitorizar a doença de forma contínua.

As técnicas eletroquímicas são alternativas cada vez mais recorrentes para o desenvolvimento de sensores. Neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico usando um SPAu modificado com um polímero molecularmente impresso. Iniciou-se a construção do sensor pelo estudo da adsorção da CA 15-3 na superfície do eletrodo, e que demonstrou a estabilização do sinal para uma concentração de 25 U/ml. Posteriormente, selecionou-se o poliaminofenol como polímero para a construção, por eletropolimerização, do MIP pois com este polímero obteve-se a melhor resposta de alteração de sinal. Após a adsorção da proteína e a seleção do polímero, realizou-se a impressão molecular que demonstrou diferenças entre a eletropolimerização do NIP e do MIP, revelando que a proteína foi impressa. De seguida, foi necessário remover a proteína para que, posteriormente, o MIP pudesse voltar a estabelecer ligação com proteína através das “cavidades” específicas formadas. Para tal avaliou-se a capacidade de extração de alguns solventes, sendo o ácido oxálico o mais eficaz. Por último, caracterizou-se o sensor e analisou-se a resposta analítica para diferentes concentrações de CA 15-3. Foi possível construir um sensor que apresentou uma resposta melhor do que o polímero não impresso.

No entanto, no decorrer deste trabalho surgiram algumas dificuldades relacionadas com a realização de sucessivas análises utilizando o mesmo sensor. Verificou-se que foi muito difícil obter um sinal constante, ou seja após cada nova extração o sinal obtido era diferente. Deste modo torna-se difícil obter uma resposta repetível sempre que se efetuava uma nova análise e não foi possível avançar com a realização dos estudos de precisão, exatidão e seletividade.

Futuramente, deverão realizar-se esses ensaios, assim como a aplicação em amostras biológicas fortificadas e posteriormente amostras de pacientes em tratamento.

Referências Bibliográficas

- [1] Pultz AB, Luz CA, Faria RP, Oliveira PA, Araújo AR, Silva JM. *Far Beyond the Usual Biomarkers in Breast Cancer: A Review*. Journal of Cancer. 2014; 5(7): 559-571.
- [2] Flavigna M, Lima MK, Giacomazzi J, et al. *Effects of lifestyle modification after breast cancer treatment: a systematic review protocol*. Systematic Reviews. 2014, 3:72.
- [3] Becker S, *A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge*. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2015, 131: 36-39.
- [4] Paoletti C, Hayes DF. *Molecular testing in breast cancer*. Annu Rev Med. 2014;65:95-110.
- [5] Lang JE, Wechsler JS, Press MF, Tripathy D. *Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy*. J Surg Oncol. 2015; 111(1):81-90.
- [6] Mirabelli P, Incoronato M, *Usefulness of Traditional Serum Biomarkers for Management of Breast Cancer Patients*. Biomed Research International. 2013.
- [7] Zadeh K, Fry B, *Nanotechnology-Enabled Sensors*. Nova Iorque: Springer science. 2008. Disponível em:
<https://books.google.pt/books?isbn=0387680233>
- [8] Wilson J. *Sensor Technology Handbook*. Oxford: Elsevier, 2005.
- [9] Trevisan MG, Poppi RJ, “*Química Analítica de processos*.” Química Nova. 2006; 29: 1065-1071.
- [10] Bret MC, “*Electrochemical sensors for environmental monitoring*.” IUPAC, 2001; 73: 1969-1977.
- [11] Lowinsohn D, Bertotti M, “*Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos*.” Química Nova. 2006;29:1318-1325.
- [12] Soares, Juliana. *Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol*. Universidade São de Paulo. 2011.
- [13] Site oficial: <http://www.princetonappliedresearch.com/Literature/index.aspx#-B>

- [14]Farghaly AO, Hameed RS, Abu-Nawwas AH. *Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques*. International Journal of Electrochemical Science. 2014; 9:3287 – 3318.
- [15]Pacheco WF, Seeman FS, Almeida GK et al. *Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos*. Revista Virtual de Química. 2013; 5 (4): 516-537.
- [16]Li G, Miao P. *Electrochemical Analysis of Proteins and Cells*. Nova Iorque: Springer.2013. Disponível em:
<https://books.google.pt/books?isbn=3642342523>
- [17] Hall EA, Skinner NG. *Synth Met*. pp.1994.
- [18] Pyun SI, Shin HC, Lee JW, Go JY. *Electrochemistry of Insertion Materials for Hydrogen and Lithium*. Nova Iorque: Springer. 2012. Disponível em:
<https://books.google.pt/books?isbn=3642294642>
- [19]Suni II. *Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials*. Trends in Analytical Chemistry. 2008; 27: 604-611.
- [20]Moretto LM, Kaltcher K. *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors*.Nova Iorque: Springer.2014. Disponível em:
<https://books.google.pt/books?isbn=1493906763>
- [21] Ciucu AA. *Chemically Modified Electrodes in Biosensing*. Biosensors & Bioelectronics.2014; 5 (3).
- [22]Tarley CR, Sotomayor MP, Kubota TL. *Aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos*. Química Nova. 2005; 28 (6): 1087-1101.
- [23] Li L, Yang L, Xing Z, Lu X, Kan Xa. *Surface molecularly imprinted polymers-based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition*. Analyst. 2013; 138 (22):6962-6968.
- [24] Viswanathan S, Rani C, Ribeiro S, Delerue-Matos C. *Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of ovarian cancer marker*. Biosensors and Bioelectronics. 2012; 33 (1):179–183.
- [25]Esteban MA. *Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2013; 45:169-181.

[26] Mirsky V, Yatsmirsky A. *Artificial receptors for chemical sensors*. Wiley-VCH.2010.
Disponível em:

<https://books.google.pt/books?isbn=3527632506>

[27] Malitesta C, Mazzotta E, Picca R, Poma A, Chianella I, Piletsky A. *MIP sensors - the electrochemical approach*. *Anal Bioanal Chem.*; 402 (5):1827–1846.

[28] Sharma P, Pietrzyk-Le A, D'Souza F, Kutner W. *Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing*. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402 (10):3177–3204.

[29] Turner WN, Jeans WC, Brain RK, Allender JC, Hlady V, Britt WD. *From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins*. *Biochemol Prog.* 2009; 22 (6): 1474-1489.

[30] Lv Y, Tan T, Svec F. *Molecular imprinting of proteins in polymers attached to the surface of nanomaterials for selective recognition of biomacromolecules*. *Biotechnology Advances.* 2013;

[31] Voros J. *The density and refractive index of adsorbing protein layers*. *Biophysical Journal*, 2004;87 (1):553-56.

