UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ABILENE RODRIGUES CORREIA

Desenvolvimento de um sistema biossensor baseado em filmes *layerby-layer* de PAH e ácido fólico para detecção de células cancerosas com receptores de folato

> São Carlos 2019

ABILENE RODRIGUES CORREIA

Desenvolvimento de um sistema biossensor baseado em filmes *layerby-layer* de PAH e ácido fólico para detecção de células cancerosas com receptores de folato

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada Opção: Física Biomolecular Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Versão Original

São Carlos 2019 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Correia, Abilene Rodrigues Desenvolvimento de um sistema biossensor baseado em filmes *layer-by-layer* de PAH e ácido fólico para detecção de células cancerosas com receptores de folato / Abilene Rodrigues Correia; orientador Valtencir Zucolotto -- São Carlos, 2019. 98 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Nanomedicina. 2. Biossensor. 3. Ácido fólico. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Abilene Rodrigues Correia

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 19/06/2019

Comissão Julgadora

Dr(a). Valtencir Zucolotto

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Daniel Souza Corrêa

Instituição: (EMBRAPA/São Carlos)

Dr(a). Emanuel Carrilho Instituição: (IQSC/USP)

Ao meu Deus, meu Amigo e Salvador, que em todos os momentos esteve comigo; Aos meus pais, Francisco Lima e Francisca de Lourdes; Aos meus irmãos Alysson e Aliene, e ao meu amado noivo Oziel.

AGRADECIMENTOS

Até Aqui o Senhor Jesus me ajudou.

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus pela força e graça durante esta caminhada.

Aos meus pais Francisco Lima e Francisca de Lourdes pelo apoio, incentivo, amor, força e educação que me deram durante toda a vida.

Aos meus irmãos Alysson e Aliene.

Ao meu noivo Oziel, pelo amor, companheirismo e compreensão em cada momento difícil. Agradeço por acreditar em mim, ouvir e apoiar os meus sonhos, em você encontrei alívio e paz durante as frustações e angustias vividas, também grata por se alegrar comigo nos momentos de sucesso e realização.

À toda a minha família pelo incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, pela grande e rica oportunidade de integrar ao seu grupo de pesquisa, pela sua orientação durante o mestrado, a qual muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Dr. Nirton Cristi Silva Vieira pelas ajuda e apoio na realização deste mestrado.

À minha grande amiga Andressa, que acompanhou de perto os últimos momentos do meu mestrado, compartilhando alegrias e dificuldades.

A todos os colegas e funcionários do GNano, pela amizade e apoio profissional.

A todos os funcionários do Instituto de Física de São Carlos.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

"Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Por que quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas, glória, pois, a Ele eternamente. Amém"

Romanos 11:33-36

RESUMO

CORREIA, A. R. **Desenvolvimento de um sistema biossensor baseado em filmes** *layer-bylayer* de PAH e ácido fólico para detecção de células cancerosas com receptores de folato. 2019. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A detecção precoce de células tumorais desempenha um papel importante no tratamento eficaz do câncer. Alguns métodos convencionais, como imageamento e radiomarcadores, são eficazes, porém complexos e de alto custo. Por outro lado, biossensores eletroquímicos têm atraído a atenção considerável devido às suas vantagens em relação às técnicas convencionais, como alta sensibilidade, simplicidade, resposta rápida, miniaturização e baixo custo. Estudos recentes mostraram que as superfícies das células tumorais, em especial cânceres ginecológicos, expressam mais receptores de folato (RF) que as células normais. Os receptores de folato são proteínas que têm uma alta afinidade com o ácido fólico (K_d < 1 nmol L^{-1}). Neste estudo foi desenvolvido um biossensor para a detecção da célula tumoral HeLa (célula de câncer do colo do útero), baseado na plataforma eletroquímica modificada com ácido fólico (AF). Como controle negativo foi utilizada a HMEC (célula epitelial mamária humana) e realizado um teste de seletividade com o polímero Poli(ácido acrílico) - PAA. A superfície do biossensor foi modificada com filmes automontados camada por camada (em inglês layer-by-layer - LbL) contendo PAH (poli cloridrato de alilamina) e ácido fólico utilizados como materiais com carga positiva e negativa, respectivamente. Os filmes foram caracterizados e otimizados pela técnica de espectroscopia no ultravioleta visível, exibindo uma banda de absorção centrada em 290 e 360 nm. As interações entre PAH e ácido fólico foram investigadas usando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. Análises de microscopia de força atômica revelaram uma morfologia globular para o filme (PAH/AF) contendo 20 bicamadas com uma rugosidade média de 17 nm. Espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica foram utilizadas para detecção das células. O biossensor desenvolvido foi capaz de detectar receptores de folato na concentração de 10 nmol L⁻¹ com uma faixa linear entre 10 a 40 nmol L⁻¹, $R^2 = 0,99$. O limite de detecção para a célula HeLa foi de 50 células mL⁻¹ obtido na faixa linear entre 50 a 10^6 células mL⁻¹, R² = 0,99. O biossensor apresentou uma boa reprodutibilidade e estabilidade (%DPR = 1,95%, n=3).

Palavras-chave: Nanomedicina. Biossensor. Ácido fólico.

ABSTRACT

CORREIA, A. R. Development of a biossensor system based on layer-by-layer films of **PAH and folic acid for detection of cancer cells with folate receptors.** 2019. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Early detection of tumor cells plays an important role in the effective treatment of cancer. Some conventional methods, such as imaging and radiolabels, are effective, but complex and costly. On the other hand, electrochemical biosensors have attracted considerable attention due to its advantages over conventional techniques, such as high sensitivity, simplicity, fast response, miniaturization and low cost. Recent studies have shown that tumor cell surfaces, especially in gynecologic cancers, express more folate receptors than normal cells. Folate receptors are folate binding proteins which have a high affinity for folic acid (FA) ($K_d < 1$ nmol L⁻¹). In this study a biosensor was developed for the detection of tumor cells HeLa (cervical cancer cells), based on electrochemical platform modified with folic acid. HMEC (human mammary epithelial cells) was used as the negative control and a selectivity test was carried out with polymer Poly (acrylic acid) - PAA. The surface of the biosensor was modified with self-assembly layer-by-layer (LbL) films containing PAH (polyamine hydrochloride) and folic acid used as positively and negatively charged materials, respectively. The films had been characterized and optimized using ultraviolet and visible absorption spectroscopy, exhibiting an absorption band centered at 290 and 360 nm. Interactions between PAH and folic acid were investigated using Fourier transform infrared spectroscopy. Atomic force microscopy analyzes revealed a globular morphology for (PAH/FA) film containing 20 bilayers with a mean roughness of 17 nm. Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry have been used to detect cells. The developed biosensor was able to detect 10 nmol L^{-1} Folate receptors with a linear range of 10 to 40 nmol L⁻¹, $R^2 = 0.99$. The limit of detection to HeLa cell was 50 cells mL⁻¹ in the linear range of 50 to 10^6 cells mL⁻¹, R² = 0.99. The biosensor presented good reproducibility and stability (% DPR = 1,95%, n = 3).

Keywords: Nanomedicine. Biosensor. Folic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	a) Esquema do processo de deposição de filmes; b) Imagem molecular das duas primeiras etapas de adsorção, descrevendo a deposição do filme começando com um substrato carregado positivamente e c) a estrutura química de dois poli íons típicos.	30
Figura 2 –	Esquema de um biossensor composto pelo a) material de reconhecimento biológico fixo na superfície de um b) suporte (eletrodo), conectado em um c) transdutor, que converte a ligação especifica entre o analito e o material de reconhecimento em um sinal elétrico. Este sinal passa por um d) amplificador, e) processador e depois é apresentado de forma mensurável na f) interface da tela de um monitor	32
Figura 3 –	Representação esquemática das duas principais classes de biossensores com base nos eventos de reconhecimento a) biocatalítico (ocorre transferência de um elétron para o eletrodo devido à presença de mediadores redox (R) e da enzima) e por afinidade b) com sinal e c) sem sinal	32
Figura 4 –	Resumo dos métodos eletroanalíticos comuns, destacando várias técnicas eletroquímicas interfaciais e não interfaciais. As técnicas específicas são mostradas em vermelho, as condições experimentais são mostradas em azul e os sinais analíticos são mostrados em verde.	34
Figura 5 - I	Potencial de onda triangular aplicado na voltametria cíclica	35
Figura 6 -	·Ilustração de uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos ligados a um potenciostato	36
Figura 7 -	Voltamograma cíclico onde mostra o potencial do pico catódico (E_{pc}) , o potencial do pico anódico (E_{pa}) , a corrente de pico catódico (I_{pc}) e a corrente de pico anódico (I_{pa}) , para uma reação reversível, variando o potencial de $E_1 = 1$ V e $E_2 = -1.4$ V. As setas, em azul, indicam a direção da varredura do potencial.	37
Figura 8 -	Célula eletroquímica típica de três eletrodos: CE, RE e WE (contra-eletrodo, eletrodo de referência e eletrodo de trabalho, respectivamente) para o uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, com o diagrama esquemático de um circuito Randles superimposto à interface eletrodo-solução	39
		4.4

Figura 1	10 - Estrutura do RF ligado ao Ácido Fólico. Os átomos de carbono do AF são coloridos em cinza, os átomos de nitrogênio em azul e os átomos de oxigênio em vermelho. Abaixo da imagem, uma barra de código de cores mostra a escala eletrostática de -3 a +3 eV.	43
Figura 1	11 - Estrutura química do hidrocloreto de polialilamina (PAH)	46
Figura 1	12 - Estrutura química do ácido fólico	47
Figura 1	13 - Construção do filme PAH/ AF sobre o substrato de ITO	48
Figura 1	 14 - a) Célula eletroquímica com três eletrodos: ITO - eletrodo de trabalho (WE), Ag/AgCl – eletrodo de referência (RE) e a folha de platina – contra eletrodo (CE) e o b) equipamento potenciostato/galvanostato, Autolab usado no experimento	49
Figura 1	15 - Espectro de UV-Vis do crescimento dos filmes (PAH/AF) contendo de 2 a 20 bicamadas.	56
Figura 1	16 - Relação linear entre a absorbância a 290 nm em função do número de bicamadas de PAH/AF.	57
Figura 1	17 - Soluções de ácido fólico em pH 8,0, 10,0 e 12,0	58
Figura 1	18 - a) Espectro da absorção do filme (PAH/AF) ₁₀ variando o pH da solução de ácido fólico para valores 8,0, 10,0 e 12,0 e fixando o valor de pH 6,0 para a solução de PAH e a b) relação linear entre a absorbância a 290 nm em função do número de bicamadas de PAH/AF para diferentes valores de pH da solução de ácido fólico.	59
Figura	19 - Efeito do pH nas moléculas do a) PAH e do b) ácido fólico	60
Figura 2	20 - Absorbância dos filmes (PAH/AF) _n , com n = 1, 2 e 4 a 290 nm em função do tempo de deposição da última camada do ácido fólico (AF)	61
Figura 2	21 - Espectros de FTIR para o ácido fólico, PAH e para o filme automontado de PAH/AF com 40 Bicamadas	62
Figura	 22 - Imagem AFM da superfície do substrato de Si/SiO₂ modificado com o filme (PAH/AF)₂₀ em a) 3 dimensões e b) 2 dimensões. 	64

Figura 23 -	Voltamogramas cíclicos da estabilidade temporal dos ITO's modificados com (PAH/AF) ₃ quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução a) PBS, b) PB, c) KCl e d) NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹
Figura 24 -	Voltamogramas cíclicos da estabilidade temporal dos ITO's modificado com (PAH/AF) ₃ /BSA quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução a) PBS, b) PB, c) KCl e d) NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹
Figura 25 -	Diagrama de Nyquist da estabilidade temporal dos ITO's modificados com (PAH/AF) ₃ quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl
Figura 26 -	Diagrama de Nyquist da estabilidade temporal dos ITO's modificados com (PAH/AF) ₃ /BSA quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl
Figura 27 -	a) Voltamogramas cíclicos das medidas do eletrodo limpo e dos crescimento dos filmes $(PAH/AF)_n$, em n = 1, 3, 5, 7, 9 e 11 bicamadas e b) o gráfico da variação percentual do pico de corrente anódicade $(\Delta I_{pa} (\%))$ função do número de bicamadas do filme. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 71
Figura 28 -	a) Diagrama de Nyquist das medidas do ITO limpo e do crescimento dos filmes $(PAH/AF)_n$, em n = 1, 3, 5, 7, 9 e 11 bicamadas e b) o gráfico da variação da resistência de transferência de carga (ΔRtc (%)) em função do número de bicamadas dos filmes Erro! Indicador não definido.
Figura 29 -	Voltamograma cíclico referentes ao estudo de reprodutibilidade utilizando a técnica de voltametria cíclica através da construção paralela de 3 biossensores em todas as etapas de imobilização. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 72
Figura 30 -	Diagrama de Nyquist referente ao estudo da reprodutibilidade dos biossensores em triplicata para todas as etapas de imobilização74
Figura 31 -	Voltamograma cíclico da estabilidade do biossensor na detecção de célula HeLa $(10^6 \text{ células mL}^{-1})$ contendo de 1 a 10 ciclos. Na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 76

Figura 32 -	Gráfico da corrente em função das medidas sucessivas de voltametria cíclica para o biossensor imobilizado com a célula HeLa (10 ⁶ células mL ⁻¹)78
Figura 33 -	Voltamograma cíclico do biossensor $(PAH/AF)_3/BSA/HeLa (10^6 células mL-1) para diferentes velocidades de varredura (20, 30, 50 e 100 mV s-1). Na presença de [Fe(CN)_6]^{3-/4-} em solução aquosa de NaNO3, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos$
Figura 34 –	Resposta do biossensor em relação a diferentes concentrações de receptores de folato (RF) (10, 20, 30 e 40 nmol L-1) na forma de diagrama de Nyquist80
Figura 35 -	Resposta do biossensor em relação a diferentes concentrações de receptores de folato (10, 20, 30 e 40 nmol L ⁻¹) na forma de voltamograma cíclico. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 81
Figura 36 -	Resposta do biossensor em diferentes concentrações de células HeLa (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL ⁻¹) na forma de diagrama de Nyquist82
Figura 37 –	Resposta do biossensor em diferentes concentrações de células HeLa (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL-1) na forma de voltamograma cíclico. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO3, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 83
Figura 38 –	Resposta do biossensor em diferentes concentrações da célula HMEC (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL ⁻¹) na forma de diagrama de Nyquist84
Figura 39 -	-Resposta do biossensor em diferentes concentrações da célula HMEC (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL ⁻¹) na forma de voltamograma cíclico. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 85
Figura 40 –	Diagrama de Nyquist do estudo da seletividade quanto ao material de bio- reconhecimento do biossensor com o filme: (PAH/PAA) ₃ /BSA e com a célula HeLa: (PAH/PAA) ₃ /BSA/HeLa (10 ⁶ células mL-1)
Figura 41 -	Voltamogramas cíclicos do estudo da seletividade quanto ao material de bio-reconhecimento do biossensor com o filme: $(PAH/PAA)_3/BSA$ e com a célula HeLa: $(PAH/PAA)_3/BSA/HeLa$ (10 ₆ células mL-1). Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO ₃ , com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s ⁻¹ 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação de diferentes biossensores eletroquímicos para a detecção de câncer.	44
Tabela 2 -	Atribuição das bandas de FTIR para a soluções de PAH, ácido fólico e para o filme (PAH/AF) contendo 40 bicamadas	63
Tabela 3 -	Estudo da reprodutibilidade na montagem dos biossensores utilizando a técnica de voltametria cíclica. Apresentação dos valores relativos à corrente média do pico de oxidação, desvio padrão e desvio padrão relativo percentual	75
Tabela 4 -	Estudo da reprodutibilidade na montagem dos biossensores utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Apresentação dos valores relativos à resistência média, desvio padrão e desvio padrão relativo percentual	lo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido Fólico
AFM	Atomic force microscopy
BSA	Bovine Serum Albumin
C _{dc} –	Capacitância da dupla camada
CE –	Contra-eletrodo
CV –	Ciclic voltammetry
$E_1 -$	Potencial inicial
E_2-	Potencial final
E _{pa} –	Potencial de pico anódico
E _{pc} –	Potencial de pico catódico
EIS –	Electrochemical Impedance Spectroscopy
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HeLa	Célula de Câncer do colo do útero
HMEC	Célula epiteliais mamária humana
I _{pa}	corrente de pico anódico
I _{pc}	corrente de pico catódico
ITO	indium tin oxide
KCl	Cloreto de Potássio
K _d	Constante de dissociação
LbL	Layer-by-Layer
NaNO ₃	Nitrato de Sódio
PAA	poli(ácido acrílico)
PAH	poly allylamine hydrochloride
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffer Saline
RE	Reference electrode
RF	Receptor de folato
R _s	Resistência da solução
R _{tc}	Resistência de transferência de carga
Tris – HCl	Tris (trishidroximetil amino metano) com HCl
UV-vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível

- WE Work electrode
- Z' Componente real da impedância
- Z" Componente imaginária da impedância
- $\Delta I_{pa}(\%)$ Variação percentual do pico de corrente
- $\Delta R_{tc}(\%)$ Variação percentual da resistência de transferência de carga

1	INTRODUÇÃO	.25
2	OBJETIVOS	.27
2.1	Objetivo geral	.27
2.2	Objetivos específicos	.27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	.29
3.1	Filmes automontados LbL	.29
3.2	Biossensor eletroquímico	.31
3.2.1	Voltametria cíclica	.35
3.2.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica	.38
3.3	Biossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção de células cancerosas	.41
4	EXPERIMENTAL	.45
4.1	Materiais	.45
4.2	Processo de limpeza do eletrodo	.45
4.3	Modificação do eletrodo	.46
4.4	Medidas eletroquímicas	.48
4.5	Técnicas de caracterização e optimização do filme PAH/AF	.51
4.5.1	Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis)	.51
4.5.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	.51
4.5.3	Microscopia de força atômica (AFM)	.53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	.55
5.1	Caracterização e otimização do filme PAH/AF	.55
5.1.1	Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis)	.55
5.1.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	.61
5.1 3	Microscopia de força atômica (AFM)	.64
5.1.4	Otimização da solução de estocagem do eletrodo	.65
5.1.5	Otimização do número de bicamadas do filme	.70
5.2	Caracterização do biossensor	.73
5.2 1	Reprodutibilidade	.73
5.2.2	Estabilidade	.77
5.2.3	Repetibilidade	.78
5.2.4	Velocidade de varredura	.79
5.3	Detecção eletroquímica	.81
5.3.1	Detecção dos receptores de folato	.81
5.3.2	Detecção da célula HeLa	.83

Sumário

5.4	Estudo da seletividade	85
5.4.1	Célula HMEC	85
5.4.2	Filme PAH/PAA	87
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Segundo pesquisa divulgada pelo observatório de oncologia do Brasil, o câncer é a principal causa de morte em 516 das 5.570 cidades brasileiras.¹ De acordo com este estudo, estima-se que nas próximas décadas os tumores malignos serão responsáveis pela maioria dos óbitos no país, superando as doenças cardiovasculares e as relacionadas ao aparelho circulatório, atualmente líderes em mortalidade¹. O instituto nacional de câncer (INCA) estima até o final do ano 2019, 582.590 novos caso de câncer, sendo 282.450 em mulheres e 300.140 em homens.²

Entre os cânceres mais incidentes no Brasil estão os de próstata, pulmão, mama feminina e intestino, revelando o perfil de um país industrializado, urbanizado e com população em processo de envelhecimento, frequentes em países desenvolvidos do ocidente. Por outro lado, o mesmo estudo revela que o Brasil apresenta a incidência de cânceres frequentes em países menos desenvolvidos, os quais estão relacionados à infecções, como o câncer de colo do útero e estômago. Por definição, o câncer é o nome dado a um grupo de mais de 100 doenças que têm como fator comum o crescimento anormal e desordenado de células, geralmente tratável, se detectado em seu estágio inicial³. No entanto, em um estágio avançado, as células tumorais propagam-se para além do seu local de origem, que de forma geral, leva à óbito aproximadamente 50% dos pacientes no período de 5 anos, segundo a estimativa do INCA.⁴

O diagnóstico da doença no seu estado inicial é de extrema importância para que a escolha do tratamento se faça de forma adequada e consequentemente eficaz no combate à doença. Atualmente, métodos têm sido desenvolvidos para rastrear células cancerosas, como ensaios citológicos, imagem fluorescente, radiomarcadores, ressonância magnética, tomografia computadorizada, radiografia por raio X e ultrassonografia. Estes são eficazes, porém complexos, de alto custo, demanda tempo, requer pessoal altamente qualificado e em caso de ensaios com radiomarcadores estão sujeitos a riscos radioativos.⁵ Assim, o desenvolvimento de uma técnica com alta sensibilidade, simplicidade, baixo custo e resposta rápida, é desejável para a detecção do câncer. Os biossensores são promissores para suprir estas necessidades, pois além de possuir tais características, o diagnóstico é feito por testes *point-of-care*, ou seja, testes laboratoriais remotos.⁶

Os biossensores são altamente seletivos e específicos quanto ao seu material de reconhecimento⁶. Estudos recentes mostraram que as superfícies das células tumorais, em especial as dos cânceres ginecológicos, expressam mais receptores de folato que as células normais. Estes receptores são proteínas que têm uma alta afinidade com a molécula de ácido fólico.⁷

Visando esta vantagem, a presente dissertação de mestrado, apresenta o desenvolvimento e estudo de um sistema de biossensor eletroquímico para a detecção da célula cancerosas, especialmente célula HeLa (linhagem celular de câncer do colo do útero humano). Para isso, o biossensor foi construído através da imobilização sobre substratos de ITO (do inglês, *indium tin oxide*) do polícátion hidrocloreto de polialilamina (PAH) e da molécula de ácido fólico (AF) (que contém carga negativa devido ao grupamento carboxila) através da técnica *layer-by-layer* (LbL). Ou seja, camada por camada imobilizada pelo efeito das interações eletrostáticas. A molécula de ácido fólico foi usada como receptor para a detecção de células cancerosas superexpressadas com receptor de folato alternativamente à aos convencionais anticorpos. Esta configuração de biossensor é a inovação desenvolvida neste trabalho para detectar células cancerosas superexpressadas com receptores de folato. A molécula de ácido fólico foi usada como ligante, ao invés de anticorpos, pois além de apresentar alta afinidade com os receptores de folato, aumenta a vida útil dos biossensores e garante a reprodutibilidade dos resultados por apresentar maior estabilidade e não sofrer inatividade, como acontece frequentemente com os anticorpos.⁸

A interação entre a molécula de ácido fólico com as células cancerosas foi monitorada através das técnicas de impedância eletroquímica e voltametria cíclica. O biossensor foi inicialmente testado com solução tampão contendo receptores de folato e em seguida com células epiteliais HeLa, tendo como controle negativo a célula HMEC (não tumoral de linhagem celular epitelial de tecido mamário humano). Como teste de seletividade foi construído um novo filme utilizando o polímero poli(ácido acrílico), PAA em substituição ao ácido fólico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal dessa dissertação é o desenvolvimento e estudo de um biossensor composto por filmes LbL de PAH/AF para a detecção de células tumorais HeLa via medidas eletroquímicas. Ou seja, buscou desenvolver um novo método de detecção de células tumorais através da interação dos receptores de folato presentes na superfície de células cancerosas do colo de útero e os filmes PAH/AF.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da dissertação são os seguintes:

- Otimização do crescimento do filme PAH/AF em diferentes condições (pH, tempo de imersão, etc.)
- Avaliação eletroquímica da estabilidade do biossensor quando imerso em soluções tampão fosfato salino (PBS), fosfato (PB), cloreto de potássio (KCl) e nitrato de sódio (NaNO₃).
- Caracterização eletroquímica do filme.
- Determinação do número de bicamadas do filme.
- Detecção eletroquímica dos receptores de folato e de células HeLa.
- Avaliação das curvas de calibração para concentrações de receptores de folato e de células HeLa.
- Avaliação de testes de controle negativo com células HMEC.
- Avaliação da seletividade do biossensor quanto ao material de reconhecimento.
- Comparação entre as técnicas de detecção de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Filmes automontados LbL

A técnica de deposição camada por camada ou *Layer-by-Layer* (LbL), é uma técnica que possibilita a automontagem em sequência de filmes ultrafinos, através da adsorção de poli íons em solução aquosa carregados positivamente e negativamente⁹, gerando multicamadas que podem ser utilizadas em diversas aplicações: biossensores, dispositivos optoeletrônicos como diodos orgânicos, membranas seletivas, encapsulamento, terapia genética, filmes emissores de luz, entre muitos outros.¹⁰⁻¹⁷ A técnica que precede a adsorção física é a técnica de automontagem por adsorção química de moléculas orgânicas com grupos funcionais específicos, estabelecida por Sagiv e colaboradores no início da década de 80.¹⁸ Nesta época a técnica de Langmuir-Blodgett (LB) era a única a fornecer o controle de espessura na ordem de nanômetros e arquitetura necessária durante a construição de multicamadas orgânicas. Assim, Sagiv utilizou o princípio da técnica LB para construir filmes com moléculas anfifílicas, que têm regiões polares e apolares bem definidas e insolúveis. No entanto, para obter o crescimento do filme, ou seja, construir multicamadas, era necessário adsorver quimicamente uma camada sobre outra já depositada, o que exigiu a síntese de moléculas com afinidade adequada, o que é considerada a etapa limitante do processo.¹⁸⁻¹⁹

Para superar a limitação imposta pela síntese de moléculas funcionalizadas, Decher e colaboradores, propuseram uma nova metodologia para a construção de filmes,¹⁹ que em vez de adsorção química, a montagem era baseada na interação física de camadas alternadas de policátions (moléculas com cargas positivas) e poliânions (moléculas com cargas negativas) em superfície sólida carregada eletricamente, surgindo assim, o método de adsorção LbL. Como resultado, os primeiros filmes obtidos pela técnica apresentaram homogeneidade e ordenamento em camadas cuja espessura podia ser controlada.²⁰

Experimentalmente, a técnica LbL consiste em submergir um substrato, carregado eletricamente, em um béquer contendo a solução aquosa de policátion por um determinado período de tempo, geralmente alguns minutos,²⁰⁻²¹ como mostra a Figura 1a. Uma vez em contato com a solução de depósito, as moléculas carregadas positivamente adsorvem-se na superfície do substrato por interação eletrostática. O substrato é então, lavado em solução aquosa com pH próximo ao da solução aquosa de policátion para remover as moléculas que não foram totalmente adsorvidas, sendo em seguida seco ao ar ou com fluxo de gás nitrogênio

(N₂). Como a superfície do substrato está agora carregada positivamente, o que permite a adsorção de uma nova camada carregada com carga oposta, o substrato é imerso em solução aquosa de poliânion. Após a adsorção desta segunda camada, o substrato é novamente lavado e seco. A alternância entre soluções com cargas opostas cria o número de bicamadas desejada, como é ilustrado na Figura 1b.



Figura 1 – a) Esquema do processo de deposição de filmes; b) Imagem molecular das duas primeiras etapas de adsorção, descrevendo a deposição do filme começando com o substrato carregado positivamente e c) a estrutura química de dois poli íons típicos.

Fonte: Adaptada de DECHER.²²

Comparada com outras técnicas de fabricação de filmes, a técnica de adsorção por LbL é simples e de baixo custo, dependendo basicamente da interação entre as diversas camadas que serão adsorvidas em um substrato com carga superficial conhecida, como por exemplo: os vidros, metais, derivados de silício e o óxido de índio - estanho (do inglês, *Indium tin oxide* -ITO), que possuem carga superficial negativa. As interações presentes na formação das multicamadas são: eletrostática²³, ligação de hidrogênio²⁴, transferência de carga entre polímeros²⁵, Van der Walls²⁶ e hidrofóbicas²⁷, sendo que, entre estas interações, a eletrostática é a principal devido as ligações iônicas fortes, contribuindo significativamente na estabilidade, uniformidade e durabilidade dos filmes.

Uma das grandes vantagens da técnica LbL é a diversidade dos materiais utilizados. Além do exemplo mostrado na Figura 1c, vários outros policátions e poliânions também podem ser empregados.²⁸ Também os biomateriais, como: proteínas solúveis em água²⁹, DNA,³⁰ polissacarídeos³¹ e substâncias inorgânicas como nanoparticulas³² têm sido utilizados para montagem de filmes LbL.

Neste estudo foi utilizado o substrato ITO para a montagem dos filmes LbL, pois além de ser um material condutor, transparente, ³³ é um material muito atrativo por não ser tóxico para as células.³⁴ Já os poli íons utilizados na montagem dos filmes foram o hidrocloreto de polialilamina (do inglês, poly allylamine hydrochloride - PAH), como policátion e a molécula de ácido fólico (AF) como poliânion, formando assim bicamadas através da ligação eletrostática entre os grupos carboxílico do ácido fólico e os grupos amina do PAH.

3.2 Biossensor eletroquímico

A IUPAC (International Union of Pureand Applied Chemistry) define biossensor eletroquímico da seguinte forma: "Um biossensor eletroquímico é um dispositivo integrado, capaz de fornecer informações analíticas, quantitativas ou semi-quantitativas através do uso de um elemento de reconhecimento biológico que está em contato direto com o transdutor eletroquímico."³⁵ A conversão direta de um evento biológico em um sinal mensurável, por exemplo, em um sinal elétrico, tornar os biossensores eletroquímicos um meio atrativo nas análises de amostras biológicas. A Figura 2 mostra o esquema de um biossensor eletroquímico com seus principais elementos.



Figura 2- Esquema de um biossensor composto pelo a) material de reconhecimento biológico fixo na superfície de um b) suporte (eletrodo), conectado em um c) transdutor, que converte a ligação especifica entre o analito e o material de reconhecimento em um sinal elétrico. Este sinal passa por um d) amplificador, e) processador e depois é apresentado de forma mensurável na f) interface da tela de um monitor.

Fonte: Adaptada de RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN.³⁶

De acordo com o tipo de eventos biológicos que pode ocorrer entre o material de reconhecimento e o analito, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em duas categorias, que são: os dispositivos biocatalíticos e por afinidade,³⁷ como mostra a Figura 3.



Figura 3 - Representação esquemática das duas principais classes de biossensores com base nos eventos de reconhecimento a) biocatalítico (ocorre transferência de um elétrons para o eletrodo devido à presença de mediadores redox (R) e da enzima) e por afinidade b) com sinal e c) sem sinal.

Fonte: Adaptada de KREJCOVA, L. et all³⁸ ;AZOSENSORS.³⁹

Um exemplo bem conhecido de detecção biocatalítica é o biossensor de glicose, que utiliza a enzima glicose oxidase para reagir com a glicose presente na amostra, gerando um

sinal quantitativo. Por outro lado, os biossensores por afinidade têm como princípio o uso da interação seletiva entre o analito e um componente biológico específico, tais como, anticorpos, receptores de membrana ou ácidos nucleicos (fragmento de DNA), para produzir um sinal mensurável. O reconhecimento por afinidade é determinado principalmente pelo tamanho e formato estrutural do local de ligação ao analito de interesse. A alta afinidade e especificidade das biomoléculas por seu ligante torna essa categoria de biossensores muito sensíveis e seletivos.³⁶

Além da classificação quanto ao componente biológico, os biossensores eletroquímicos também são classificados quanto ao sistema de transdução de sinal. Este sistema faz uso dos métodos eletroanalíticos, nos quais relacionam grandezas elétricas como, corrente, potencial e carga, com parâmetros químicos de uma solução eletrolítica.³⁶ Estes métodos podem ser sub-divididos em vários tipos, dependendo de quais aspectos são controlados e quais são medidos. Os principais são: amperometria, voltametria, potenciometria, espectroscopia de impedância e condutimetria.⁴⁰⁻⁴¹

Os quatro primeiros métodos, citados anteriormente, são interfaciais, ou seja, os fenômenos ocorrem na superfície do sensor; por outro lado, a técnica condutométrica é definida como não-interfacial, pois é baseada em fenômenos que ocorrem no interior da solução eletrolítica, sendo indesejado quaisquer efeitos na superfície do sensor. Os métodos interfaciais também podem ser divididos em duas categorias: estáticos e dinâmicos, baseados na ausência ou presença de corrente elétrica, respectivamente. O Resumo dos principais métodos eletroanalíticos com suas condições experimentais, sinal medido e as técnicas eletroquímicas correspondentes, é apresentado na Figura 4.



Figura 4 - Resumo dos métodos eletroanalíticos comuns, destacando várias técnicas eletroquímicas interfaciais e não-interfaciais. As técnicas específicas são mostradas em vermelho, as condições experimentais são mostradas em azul e os sinais analíticos são mostrados em verde.

Fonte: Adaptada de SKOOG; HOLLER; NIEMAN.⁴²

Dentre os métodos eletroanalíticos, a espectroscopia de impedância e a voltametria cíclica são os mais abrangentes e utilizados por diversos grupos de pesquisa. Por exemplo, no artigo de revisão de Katz e Willner foram citadas quase 200 referências descrevendo que a técnica de espectroscopia de impedância tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento de biossensores na última década e continuará a desempenhar um papel significativo no futuro.⁴³ Karolina Dziabowska e colaboradores também menciona que a voltametria cíclica e a impedância eletroquímica, são promissoras no desenvolvimento de sistemas completos de detecção automática, sem necessidade de pré-tratamento de amostra, análise rápida e interfaces com dispositivos de telecomunicação (smartphones e tablets).⁴⁴ Recentemente, grupos de pesquisas na área de biossensores têm desenvolvido diferentes plataformas de sensores, com o uso dessas técnicas para detectar reações de antígeno-anticorpo,⁴⁵ de hibridação de DNA,⁴⁶ reações enzimáticas⁴⁷ e interação receptor-ligante.⁴⁸

Baseado nas vantagens supramencionadas, optou-se utilizar no presente projeto de dissertação as técnicas de voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica.
3.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (do inglês, cyclic voltammetry - CV) é uma técnica em que um potencial de onda triangular é aplicado sobre o eletrodo de trabalho e em resposta, uma corrente elétrica é gerada. A Figura 5 mostra o potencial de onda triangular, variando de forma cíclica entre um valor inicial (E_1) e final (E_2), ou seja, quando o potencial atinge o valor E_2 a varredura é invertida e o potencial é varrido de volta para E_1 . Estes potenciais, nos quais ocorre a reversão, são chamados de potenciais de inversão.



Figura 5 - Potencial de onda triangular aplicado na voltametria cíclica. Fonte: Adaptada de BHARDWAJ.⁴⁹

As medidas voltamétricas são feitas através de um potenciostato, conectado com três eletrodos: eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência, do inglês, *work electrode* (WE), *counter electrode* (CE) e *reference electrode* (RE), respectivamente. Vários esquemas de configuração são usados nos experimentos eletroquímicos, um deles apresenta os três eletrodos submersos em um suporte de vidro contendo a solução analítica. Este conjunto, formado pelo recipiente de vidro, os três eletrodos e a solução analítica é geralmente chamado de célula eletroquímica. A Figura 6 mostra uma representação

esquemática de um potenciostato ligado a uma célula eletroquímica convencional com os três eletrodos mencionados anteriormente.



Figura 6 - Ilustração de uma célula eletroquímica convencional, com três eletrodos ligados a um potenciostato. Fonte: Adaptada de BRANDT et al.⁵⁰

Para a realização das medidas eletroquímicas, a solução analítica deve possuir a característica eletroativa, ou seja, deve conter uma substância capaz de sofrer oxidação e redução (prova redox) quando aplicado um potencial no eletrodo de trabalho. Este potencial deve estar no intervalo de potenciais de inversão no qual a prova redox sofre oxidação e redução, favorecendo a transferência de elétrons na interface solução-eletrodo.⁵¹ A direção da varredura inicial pode ser tanto negativa ou positiva. Quando o potencial se torna mais negativo, o eletrodo de trabalho passa a ser uma fonte de elétrons favorecendo a redução do analito. Nesse caso, a varredura é chamada de direta e uma corrente catódica é desenvolvida. Por outro lado, quando a direção dos potenciais é no sentido mais positivo a varredura é denominada de reversa e o eletrodo de trabalho se torna um receptor de elétrons, favorecendo assim, a oxidação do analito próximo a superfície do eletrodo com o aparecimento de uma corrente anódica.⁵¹

O registro da resposta da corrente em função do potencial aplicado é feito através de um gráfico chamado voltamograma cíclico e seus principais parâmetros são: potencial de pico catódico (E_{pc}), potencial de pico anódico (E_{pa}), a corrente de pico catódico (i_{pc}) e a corrente de pico anódico (i_{pa})., como mostra a Figura 7.



Figura 7 - Voltamograma cíclico onde mostra o potencial de pico catódico (E_{pc}), o potencial de pico anódico (E_{pa}), a corrente de pico catódico (I_{pc}) e a corrente de pico anódico (I_{pa}), para uma reação reversível, variando o potencial de $E_1 = 1$ V e $E_2 = -1.4$ V. As setas, em azul, indicam a direção da varredura do potencial.

Fonte: Elaborada pela autora.

Do ponto de vista da análise quantitativa, as informações importantes a serem obtidas a partir do voltamograma cíclico são os valores dos picos das correntes anódicas e catódicas, como mostrados na Figura 7. Para um eletrodo plano, a corrente de pico na voltametria cíclica é dada pela equação de *Randles-Sevcik*⁵²:

$$i_n = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C = KC$$
⁽¹⁾

onde i_p é a corrente de pico em Ampère, n é o número de mols de elétrons por mol da espécie eletroativa, A é a área do eletrodo de trabalho em cm², D é o coeficiente de difusão para a solução do analito em cm² s⁻¹, v é a velocidade de varredura em mV s⁻¹ e C é a concentração do analito próximo à superfície do eletrodo em mol cm⁻³. Em uma reação reversível, as correntes i_{pc} e i_{pa} são aproximadamente iguais em valor absoluto com sinais opostos, apresentando uma diferença entre os picos de potenciais igual a 0,0592/n , onde n é o número de elétrons envolvidos na semi-reação.⁴²

Geralmente, o eletrodo de trabalho é feito de carbono, ITO ou ouro, pois são materiais condutores e quimicamente estáveis. O contra-eletrodo, por sua vez, é utilizado para fechar o circuito de corrente da solução analítica, entre este e o eletrodo de trabalho e como forma de garantir que a meia-reação, que ocorre no contra-eletrodo possa ocorrer com rapidez suficiente, não limitando o processo no lado oposto, o contra-eletrodo deve apresentar uma área superficial maior do que o eletrodo de trabalho. Geralmente, a platina é utilizada para a fabricação do contra-eletrodo por ser um material inerte e também porque reações eletrônicas ocorrem muito rapidamente em sua superfície. Já o eletrodo de referência tem a função de manter um potencial de referência conhecido e constante, usualmente é composto de Ag/AgCl ou calomelano saturado.⁵³

3.2.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy* - EIS) é uma técnica de caracterização não destrutiva de superfícies, camadas finas, filmes e membranas. Geralmente, esta técnica é baseada na aplicação de um sinal de tensão alternada, de forma senoidal, com pequena amplitude, e em resposta, registra-se as partes real e imaginária da impedância complexa em função da frequência. No entanto, a interpretação das informações a partir dos dados da impedância eletroquímica pode ser difícil, sendo necessário estabelecer modelos para auxiliar a análise dos resultados. Um exemplo de modelo, comumente utilizado, é o de circuito equivalente proposto por Randles, que relaciona a similaridade entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico composto pela resistência de transferência de carga (R_{tc}), resistência da solução eletrolítica (R_s), capacitância da dupla camada (C_{dc}) e impedância de Warburg (W), como apresentados na Figura 8.



Figura 8 - Célula eletroquímica de três eletrodos: CE, RE e WE (contra-eletrodo, eletrodo de referência e eletrodo de trabalho, respectivamente) para o uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, com o diagrama esquemático de um circuito de Randles superimposto à interface eletrodo-solução.

Fonte: Adaptada de DAMOS; MENDES; KUBOTA.54

Para o circuito equivalente, mostrado na Figura 8, as componentes real (Z') e imaginária (Z") da impedância, na frequência angular (ω), são⁵⁵:

$$Z' = R_{\rm s} + \frac{R_{tc}}{1 + \omega^2 C_{dc}^2 R_{tc}^2}$$
(2)

$$Z'' = \frac{\omega C_{dc} R_{tc}^2}{1 + \omega^2 C_{dc}^2 R_{tc}^2}$$
(3)

De acordo com as expressões 2 e 3, observa-se que para limite de baixas frequências, os valores das componentes da impedância, passam a ser:

$$Z'_{\omega \to 0} = R_{\rm s} + R_{tc} \tag{4}$$

$$Z''_{\omega \to 0} = 0 \tag{5}$$

No entanto, para regiões de altas frequências, as componentes Z' e Z" tendem aos valores:

$$Z'_{\omega \to \infty} = R_{\rm s} \tag{6}$$

$$Z''_{\omega \to \infty} = 0 \tag{7}$$

A partir destas análises, é possível obter informações sobre a resistência da solução e dos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo-solução (resistência à transferência de carga), nas regiões de altas e baixas frequências. Por outro lado, ao eliminar a frequência angular nas expressões 2 e 3, obtém-se a seguinte relação entre as componentes real e imaginária:

$$\left(Z' - R_{\rm s} - \frac{R_{tc}}{2}\right)^2 + Z''^2 = \left(\frac{R_{tc}}{2}\right)^2 \tag{8}$$

A partir da expressão 8, pode-se verificar que a relação Z' em função de Z'' resulta em um gráfico semi-circular com raio igual a $R_{tc}/2$, centrado em $Z' = R_s + R_{tc}/2$ e Z'' = 0, como mostrado na Figura 9. A representação gráfica das componentes imaginária e real é chamada de diagrama de Nyquist. Nota-se no gráfico que o eixo y é negativo e que em cada ponto do diagrama há uma impedância em uma determinada frequência.



Baixa Frequência: $Z'' \rightarrow 0, Z' \rightarrow R_s + R_{tc}$

3.3 Biossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção de células cancerosas

A detecção precoce do câncer desempenha um papel importante no tratamento eficaz da doença. Alguns métodos convencionais, como imageamento e radiomarcadores, são eficazes, porém complexos e de alto custo. O uso da tecnologia emergente de biossensores pode ser fundamental na detecção precoce e em tratamentos mais efetivos. Em especial, os biossensores eletroquímicos têm atraído atenção considerável para o desenvolvimento de biossensores destinados à detecção de vários tipos de câncer. As vantagens dos biossensores em relação às técnicas convencionais não se limitam à sensibilidade e seletividade, mas ao fato de, geralmente, dispensarem um elaborado pré-tratamento da amostra (praticidade), rapidez nas análises, utilização como dispositivo de teste *point-of-care* e gastos mínimos de reagentes, proporcionando assim, agilidade na obtenção dos resultados, e redução de custos.⁵⁷

<sup>Figura 9 - Ilustração do diagrama de Nyquist.
Fonte: Adaptada de CARVALHO.; ANDRADES.⁵⁶</sup>

possuem uma maior quantidade de receptores de folato em relação às células normais.⁵⁸ Posteriormente, Chen e colaboradores demostraram que os receptores de folato apresentam uma alta afinidade com a molécula de ácido fólico ($K_d < 1 \text{ nmol } L^{-1}$).⁷ Um estudo mais específico foi feito pelo grupo de pesquisa de Siwowska, o qual revelou que receptores de folato do tipo alfa (RF α) é superexpressado em uma variedade de tipos de câncer ginecológico, incluindo linhagem celulares de câncer do colo do útero e do ovário.⁵⁹

A partir de então, pesquisas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos são feitas para detecção de câncer com elevado nível de receptores de folato,^{5, 60-64} pois de acordo com estudo de Asphahani e Zhang as células vivas podem ser usadas como elemento de detecção biológicas em biossensores eletroquímicos para monitorar as mudanças induzidas por vários estímulos.⁶⁵ O uso de células do adenocarcinoma do colo do útero é muito comum nas pesquisa para desenvolvimento de biossensores, devido ao alto nível de expressão de RFα nas células HeLa⁵⁹ (a primeira linhagem celular de câncer epitelial do colo do útero humana estabelecida em cultura).⁶⁶

O receptor de folato é uma proteína de membrana glicosilfosfatidilinositol (GPI) com alta afinidade para ligação e coordenação do transporte da forma ativa de folato, 5-metiltetrahidrofolato (5- MTF), para o interior da célula, com efeito de proporcionar a proliferação celular. O folato, encontrado em vegetais, é apresentado na forma sintética como ácido fólico, usado muito em suplemento vitamínico.⁶⁷

A ligação entre a molécula de ácido fólico e o receptores de folato é feita através da conformação dos anéis pteridina, em uma das extremidades do ácido fólico, ao interior da cavidade do Receptor de Folato (parte carregada negativamente), e dos grupos carboxila, na outra extremidade do ácido fólico, são voltados para a parte externa do receptor folato (parte carregada positivamente).⁷ A Figura 10 ilustra a estrutura do receptor de folato ligada ao ácido fólico.



Figura 10 - Estrutura do receptor de folato ligado ao ácido fólico. Os átomos de carbono do ácido fólico são coloridos em cinza, os átomos de nitrogênio em azul e os átomos de oxigênio em vermelho. Abaixo da imagem, uma barra de código de cores mostra a escala eletrostática de -3 a +3 eV.

Fonte: CHEN et al.7

Um resumo dos biossensores eletroquímicos (utilizando os métodos de voltametria cíclica e impedância eletroquímica) desenvolvidos atualmente para a detecção de células cancerosas superexpressas com receptores de folato é mostrado na Tabela 1.

Célula	Eletrodo	Faixa linear	Limite de detecção
		(células mL ⁻¹)	(células mL ⁻¹)
HeLa	Au/ssDNA/AF ⁶⁸	$100 - 10^{6}$	100
HeLa	GCPE/AuNp/Cy/Glu/PAMAM/AF ⁵	$10^2 - 10^6$	100
Jurkat E6-1	GC/pDATT-Rtx+PC ⁶⁹	$10^3 - 10^5$	68
HeLa	GCE/Poly(DTP-aryl-NH ₂)AF ⁷⁰	$10^1 - 10^5$	100
HeLa	ITO/Fc/ssDNA/AF ⁴⁸	$10^2 - 10^4$	50
HeLa	ITO/CdTe/GSH/AF ⁷¹	$10^3 - 10^5$	10^{3}
K-562	PWE/Au/AF ⁷²	$10^2 - 10^7$	31
HeLa	ITO/Au/TA/RGDS ⁷³	$10^2 - 10^7$	300
HL-60	GCE/c-MWNT/KH1C12 ⁷⁴	$10^2 - 10^7$	35

Tabela 1 - Comparação de diferentes biossensores eletroquímicos para a detecção de câncer.

Fonte: Elaborada pela autora

Os biossensores, na Tabela 1, apresentam uma alta especificidade para a detecção de câncer, no entanto, todos estes biossensores utilizam a funcionalização covalente no processo de imobilização do material de bio-reconhecimento sobre a superfície do eletrodo, o que é trabalhoso e demanda tempo, sendo necessário a utilização de vários compostos químicos para realizar a funcionalização. Além da vantagem anteriormente mencionada, o ácido fólico apresenta uma estabilidade em condições severas de preparação e, portanto, é uma molécula mais fácil de manusear em comparação com os anticorpos.⁷⁵

Portanto, é desejável o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de receptores de folato baseados em imobilização do ácido fólico, nos quais ocorram em poucas etapas, reduzindo o tempo e o custo com materiais.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

O substrato usado como eletrodo de trabalho e suporte para a construção dos filmes LbL foi o óxido de índio-estanho (ITO, do inglês *Indium tin oxide*) com R = 8 – 12 Ω , adquirido da *Delta Technologies* (USA). O poli cloridrato de alilamina (PAH) e o ácido fólico, foram adquiridos da empresa *Sigma Aldrich*.

Três diferentes soluções tampão foram preparadas com água Milli-Q (resistividade = $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), a saber:

- Tampão fosfato salino (PBS, do inglês, *Phosphate Buffer Saline*) pH = 8 com os seguintes reagentes adquiridos da *Sigma-Aldrich*: Fosfato de potássio monobásico 0,014 mol L^{-1} , fosfato de sódio dibásico 0,087 mol L^{-1} , NaCl 136,7 mol L^{-1} , KCl 2,7 mmol L^{-1} .

- Tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 8 também contendo fosfato de potássio monobásico 0,061 mol L^{-1} e fosfato de sódio dibásico 0,038 mol L^{-1} .

- Tampão Tri-HCl, pH8, contendo o composto Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) com HCl 0,1 mol L⁻¹.

Soluções salinas de KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 8 e NaNO₃ 0,1 mol L⁻¹ pH 8 foram preparadas com água Milli-Q e ambos os sais obtidos da *Sigma-Aldrich*. Nas medidas eletroquímicas, os compostos hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado e o hexacianoferrato(III) de potássio trihidratado, ambos obtidos da *Sigma-Aldrich* foram utilizados como prova redox na concentração de 1 mmol L⁻¹ obtidos.

Os receptores de folato foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*. As células HeLa e HMEC foram incubadas em meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's médium*), suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF).

4.2 Processo de limpeza do eletrodo

A limpeza dos eletrodos de ITO foi realizada com acetona, álcool isopropílico, álcool etílico absoluto (todos da *Synth*) e água Milli-Q. A lavagem foi feita em ultrassom com os seguintes tempos:

- Acetona: 5 minutos

- Álcool isopropílico: 5 minutos
- Álcool etílico Absoluto: 5 minutos
- Milli-Q: 15 minutos

Este processo foi repetido três vezes, na sequência descrita. Por fim, os eletrodos foram hidrofilizados em solução alcoólica de KOH (*Sigma-Aldrich*) a 1mol L^{-1} , durante 5 minutos.

4.3 Modificação do eletrodo

Após o processo de limpeza e hidrofilização, os eletrodos de ITO foram lavados com água Milli-Q e secos com um fluxo de N₂, estando assim, pronto para a próxima etapa, a imobilização do filme na sua superfície. Esta etapa ocorre quando o ITO é imerso em uma solução aquosa de PAH (1mg mL⁻¹, pH 6) e depois imerso em uma solução aquosa de ácido fólico (1mg mL⁻¹, pH 8).

O PAH é um polímero catiônico, solúvel em água que apresenta uma estrutura linear composta por um maior número de grupos amina primário (-NH₂),⁷⁶ amplamente usado na fabricação de filmes automontados LbL.⁷⁷ A representação da estrutura química do PAH é mostrada na Figura 11.



Figura 11 - Estrutura química do hidrocloreto de polialilamina (PAH). Fonte: MOUSLMANI et al.⁷⁸

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel, pertencente ao complexo B9, na forma sintética do folato, muito usada em medicamentos, atuando na formação e manutenção de

novas células.⁷⁹ A estrutura química do ácido fólico apresenta uma conjugação do ácido pteroico e do ácido L-glutâmico, como mostra a Figura 12.



Figura 12 - Estrutura química do ácido fólico. Fonte: VANNUCCHI; MONTEIRO.⁸⁰

O tempo de adsorção para cada camada foi de 3 minutos. Após cada imersão, o ITO foi cuidadosamente lavado em água Milli-Q com pH 6 e pH 8 e secos sob um fluxo de N_2 . Este processo foi repetido várias vezes até atingir o número de bicamadas desejadas ((PAH/AF)_n, onde o índice n representa o número de bicamadas).

Após o eletrodo ser modificado com o filme PAH/AF, este foi imerso em solução de albumina de soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin* – BSA) (1%) com tampão Tris-HCl por 30 minutos para bloqueio de sítios inespecíficos e por fim adicionada soluções de tampão Tris-HCl contendo células suspendidas nas concentrações 50, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ e 10⁶ células mL⁻¹, por 1 hora. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C) e protegido da luz com um papel alumínio. A Figura 13 mostra o esquema da deposição do filme PAH/AF.



Figura 13 - Construção do filme PAH/ AF sobre o substrato de ITO.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato (*Autolab, Metrohm*), modelo PGSTAT30, com módulo de análise de resposta em frequência (FRA) para aquisição e tratamento de dados, conectado em uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos: um eletrodo de Ag/AgCl (com solução interna KCl 3,0 mol L⁻¹), uma placa de platina (100 mm²) e substratos de ITO modificados (área de trabalho = 50 mm²) como eletrodo de referência, contra eletrodo e eletrodo de trabalho, respectivamente. O equipamento potenciostato/galvanostato e a célula eletroquímica são mostrados na Figura 14.



Figura 14 - a) Célula eletroquímica com três eletrodos: ITO - eletrodo de trabalho (WE), Ag/AgCl – eletrodo de referência (RE) e a folha de platina – contra-eletrodo (CE) e o b) equipamento potenciostato/galvanostato, Autolab usado no experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram avaliadas quatro tipos de soluções tampão como solução de estocagem do eletrodo (PBS, PB, KCl e Tris-HCl) com base na estabilidade temporal das medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica dos eletrodos modificados com os filmes (PAH/AF)₃ e (PAH/AF)₃/BSA. Para este estudo, as medidas foram realizadas após os eletrodos ficarem imersos e armazenados em cada solução tampão, no tempo de 0, 15, 45, 120, 240 360, 720 e 1440 minutos. A partir deste estudo foi escolhido o tampão que apresentou pouca variação nas medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica no decorrer do tempo.

A cada medida eletroquímica foi feita em uma nova solução eletrolítica e agitada com um agitador magnético por 10 segundos, garantindo a homogeneidade do eletrólito suporte. Os estudos da reprodutibilidade foram feitos utilizando três eletrodos distintos para cada etapa de modificação do biossensor. No teste de estabilidade, 10 ciclos sequenciais de voltametria cíclica foram realizados, já para a repetibilidade, 10 medidas de voltametria cíclica foram feitas sucessivamente. Para todas as medidas de voltametria cíclica, foi aplicado uma janela de potencial de -0,6 a 1,1 V, já para as medidas de impedância eletroquímica, a frequência variou de 10^4 a 0.1 Hz, com uma amplitude de 10 mV. A análise da reprodutibilidade foi baseada em cálculos de porcentagem simples, como valor médio, desvio padrão e desvio padrão relativo percentual (%DPR) da variação percentual do pico de corrente de oxidação dos íons ferricianeto e ferrocianeto, I_{pa}, (no caso da voltametria cíclica) e da resistência do transporte de carga, R_{tc}, (no caso da impedância eletroquímica). Para os cálculos dos valores relacionados à estabilidade e à repetibilidade foram utilizados somente os valores da corrente de oxidação dos íons ferricianeto e ferrocianeto.

Outro parâmetro importante estudado foi a velocidade de varredura do potencial aplicado. Para este estudo, analisou-se os efeitos da corrente de oxidação do composto ferricianeto/ferrocianeto de potássio em função da velocidade de varredura de 20 a 100 mV s⁻¹, numa janela de potencial de -0,6 a 1,1 V com 5 ciclos. As curvas de calibração foram construídas em função das variações percentuais de I_{pa} e R_{tc} ,⁸¹⁻⁸² contra a concentração da célula em análise (entre 50 e 10^6 células mL⁻¹):

$$\Delta I_p(\%) = \frac{I_{p(1)} - I_{p(0)}}{I_{p(0)}} \times 100$$
(9)

$$\Delta R_{tc}(\%) = \frac{R_{tc(1)} - R_{tc(0)}}{R_{tc(0)}} \times 100$$
(10)

onde, os índices (0) e (1) representam as etapas antes e depois da imobilização do analito na superfície do biossensor, respectivamente.

A partir das curvas de calibração, o limite de detecção foi estimado, informando o primeiro sinal detectável. Por último, dois estudos de seletividade foram realizados: o

primeiro foi avaliado a seletividade do biossensor quanto à detecção da célula. Para isto, foi utilizado a célula HMEC, como receptores negativos de folato,⁸³ já no segundo estudo, foi avaliada a seletividade do filme (PAH/AF)₃ na detecção de célula HeLa, neste caso, um novo filme foi construído, com a substituição do ácido fólico pelo polímero PAA (poli (ácido acrílico), em pH 8, formando o filme (PAH/PAA)₃. As mesmas condições de medidas eletroquímicas usadas com o filme (PAH/AF)₃, foram utilizadas para o novo filme (PAH/PAA)₃.

4.5 Técnicas de caracterização e optimização do filme PAH/AF

4.5.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis)

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta (UV) e visível (Vis) é uma técnica analítica muito valiosa para identificar grupos funcionais nas moléculas e determinar quantitativamente compostos contendo grupos que absorvem na faixa entre 200-800 nm. Assim, nestas faixas de energia, as moléculas de um composto em análise sofrem transições eletrônicas para um estado de maior energia ou estado excitado e a partir da radiação proveniente dessa transição é determinado, de modo quantitativo, o quanto de luz é absorvida pela amostra. A equação que descreve a relação entre a intensidade da luz incidente e transmitida na amostra é dada pela lei de *Beer-Lambert*:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot L \tag{11}$$

onde A é a absorbância medida, I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz que sai da amostra, L é o caminho óptico pela amostra (espessura da amostra), ε é a constante de absorvidade molecular (especifica de uma substância) e c é a concentração da substância absorvedora.

As medidas de espectroscopia no UV-vis foram realizadas através do espectrofotômetro da marca *Hitachi U-2900*.

4.5.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) é uma técnica que utiliza a interação da radiação infravermelha com os átomos de uma molécula, provocando modos vibracionais moleculares, sendo estes, convertidos, com o uso da transformada de Fourier, em um espectro IR da absorção ou transmissão no domínio de frequências; processo este, realizado de uma forma mais rápida em comparação com a outras técnicas. Os espectros IR foram obtidos por meio do aparelho Nicolet iS50 FT-IR da *Thermo scientific* com uma resolução de 4 cm⁻¹.

A representação gráfica do espectro FTIR aparece com uma série de bandas, no lugar de linhas pois, mesmo a absorção sendo um processo quantizado, as mudanças de nível de energia vibracional correspondem uma série de mudanças de níveis rotacionais, as quais se sobrepõem dando lugar às bandas observadas, ou seja, bandas de vibração-rotação. No gráfico do espectro infravermelho, as posições da banda, no eixo das abscissas "x", podem ser apresentadas em comprimento de onda (λ) ou número de onda $(\bar{\nu})$, e as intensidades das bandas, eixo das coordenadas "y", em porcentagem de transmitância (%T) ou absorbância (A).

A unidade do número de onda é dada em centímetros recíprocos (cm^{-1}) e pode ser convertido em frequência (ν) e em comprimento de onda (λ) . Para converter o número de onda (cm^{-1}) em frequência (1/s) basta multiplica-lo pela velocidade da luz (c):

$$\bar{\nu}(cm^{-1}) = \frac{1}{\lambda(cm)} \tag{12}$$

$$v(1/s) = \bar{v}c = \frac{c(cm/s)}{\lambda(cm)} = \frac{1}{s}$$
(13)

A transmitância é a razão entre a intensidade do feixe de radiação transmitida (I_t) por uma amostra e a intensidade do feixe de radiação que nela incide (I_i). Assim, a porcentagem de transmitância é dada por:

$$(\%T) = \frac{I_t}{I_i} \times 100 \tag{14}$$

Um dos principais motivos de usar a unidade de número de onda em vez de comprimento de onda é que ela é diretamente proporcional à energia. Assim, em termos de número de onda, o infravermelho vibracional vai de 4000 a 400 cm⁻¹, que corresponde a faixa de comprimentos de onda de 2,5 a 25 mm.

4.5.3 Microscopia de força atômica (AFM)

O Microscópico de força atômica é um instrumento de microscopia de varredura de alta resolução, na ordem de nanômetros, que usa uma ponta (sonda) para mapear a superfície de uma amostra, detectando possíveis mudanças em seu relevo. As imagens foram obtidas em um microscópico FlexAFM da *Nanosurf*, operando no modo contato intermitente com cantilever de silício, frequência de ressonância de 300 kHz, constante de força 40 N/m.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e otimização do filme PAH/AF

A caracterização dos filmes PAH/AF foi feita através das técnicas de espectroscopia: UV-vis e infravermelho, como também pela microscopia de força atômica (AFM). Na primeira etapa de otimização, foram avaliados o crescimento do filme, o efeito do pH e o tempo de adsorção do Ácido Fólico. No segundo momento, uma otimização eletroquímica foi realizada com as técnicas CV e EIS para a escolha da solução tampão e do número de bicamadas do filme.

5.1.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis)

Para a caracterização e otimização do filme PAH/AF com a técnica de espectroscopia no UV-vis, foi utilizado lâminas de quartzo (área = 450 mm^2) e soluções aquosa de PAH e AF nas concentrações de 1 mg mL⁻¹.

Crescimento dos Filmes

O espectro da solução de ácido fólico, apresentado na Figura 15b, mostra uma banda larga em torno de 350 nm e outra em torno de 280 nm, ambas atribuídas à transição $\pi - \pi^*$ localizada no anel pterina do ácido fólico. Também se observa um leve ombro em torno de 290 nm, que corresponde a transição $\pi - \pi^*$ localizada no anel 4–aminobenzoico.⁸⁴



Figura 15 - Espectro de UV-Vis do crescimento dos filmes (PAH/AF) contendo de 2 a 20 bicamadas. Fonte: Elaborada pela autora.

Já o espectro resultante do crescimento do filme, apresenta um leve deslocamento das bandas de absorção para o vermelho. Este deslocamento para um maior comprimento de onda, evidencia a ligação de hidrogênio e interação eletrostática entre os sítios de ligação positivas (NH₃⁺) do PAH com os grupos carboxila (COO⁻) do ácido fólico nos filmes LbL. Como resultado, as moléculas são dispostas em uma dimensão a alcançar uma orientação paralelas formando agregados do tipo J, ou cabeça – cauda.⁸⁵ Os espectros de absorção, registrados depois da deposição de cada bicamada de PAH/AF, são mostrados na Figura 15b. Observa-se, neste caso, que a absorbância aumenta em função do número de bicamadas. A relação linear entre a absorbância máxima em 290 nm e o número de bicamadas, é mostrada na Figura 16,

indicando que o crescimento do filme apresenta uma boa uniformidade, ou seja, uma mesma



quantidade de material é adsorvida no substrato a cada bicamada depositada.

Figura 16 - Relação linear entre a absorbância a 290 nm em função do número de bicamadas de PAH/AF. Fonte: Elaborada pela autora.

Otimização do pH

Para o estudo do efeito do pH sobre o crescimento dos filmes (PAH/AF), foi fixado o valor 6 para o pH da solução do PAH. Este valor foi estabelecido porque o PAH é uma polibase fraca com valor de *pKa* entre 8,0-9,0.⁸⁶Assim, para valores de pH inferiores aos *pKa*, o PAH fica parcialmente protonado, carregado na forma NH_3^+ , apresentando cadeias poliméricas mais lineares devido à repulsão entre as cargas eletrostáticas, e as estruturas das camadas mais finas. No entanto, com pH do meio superior ao valor de *pKa*, parte dos grupos amina do PAH encontram-se desprotonados (NH_2), resultando em cadeias mais enoveladas, devido à diminuição da repulsão entre as cargas eletrostáticas e consequentemente, gerando camadas mais espessas.⁸⁷ Por sua vez, o ácido fólico possui três valores de *pKa*⁶, dois para os

grupos ácidos (COOH) e um para o grupo amina (NH₂), 4,65, 6,75 e 9,00, respectivamente. Assim, o ácido fólico tem uma carga líquida negativa a partir do pH 8.

Através dos valores de pKa do PAH e ácido fólico, um estudo do efeito do pH no filme foi realizado. Para isto, três filmes foram construídos com 10 bicamadas, sendo fixado o valor de pH 6 para a solução de PAH e variado o valor do pH do ácido fólico de 8,0, 10,0 e 12,0. Os resultados do efeito do pH na solução do ácido fólico e na absorção da luz no filme são mostrados na Figura 17 e Figura 18, respectivamente.



Figura 17 - Soluções de ácido fólico em pH 8,0, 10,0 e 12,0.



Figura 18 - a) Espectro da absorção do filme (PAH/AF)₁₀ variando o pH da solução de ácido fólico para valores 8,0, 10,0 e 12,0 e fixando o valor de pH 6,0 para a solução de PAH e a b) relação linear entre a absorbância a 290 nm em função do número de bicamadas de PAH/AF para diferentes valores de pH da solução de ácido fólico.

De acordo com o gráfico da Figura 18, observou-se que a absorbância do filme atingiu um valor máximo para pH da solução de ácido fólico igual a 8,0. Por outro lado, a absorbância foi reduzida quando o pH da solução atingiu valores acima deste valor. Além disso, com o aumento no pH, a solução tornou-se quase incolor.

A variação da intensidade da cor da solução e da absorbância do filme deve-se ao sistema de ligações duplas e simples presentes na molécula de ácido fólico. Em pH mais alto, a reação ocorre entre os íons OH^- e molécula de ácido fólico resultando no rompimento das suas ligações. Assim, os valores de pH otimizada para a construção dos filmes foi 6,0 e 8,0 para PAH e ácido fólico, respectivamente. como ilustra a Figura 19.



Figura 19 - Efeito do pH nas moléculas do a) PAH e do b) ácido fólico (AF).

O tempo de adsorção do ácido fólico no filme LbL também foi estudado. Filmes automontados (PAH/AF)_n (onde n se refere ao número de bicamadas) foram construídos variando o tempo de deposição do ácido fólico na última camada do filme, sendo o tempo de adsorção do PAH fixo em 3 minutos, de acordo com trabalho anterior.⁸⁸ Três filmes diferentes foram construídos com 1, 2 e 4 bicamadas, como mostra a Figura 20.



Figura 20 - Absorbância dos filmes (PAH/AF)_n, com n = 1, 2 e 4 a 290 nm em função do tempo de deposição da última camada do ácido fólico (AF).

Fonte: Elaborada pela autora.

A estabilidade do ácido fólico nos filmes $(PAH/AF)_n$ com n = 1, 2 e 4, ocorreu em aproximadamente 3 minutos. Este tempo foi estabelecido para a adsorção do ácido fólico nos filmes LbL.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise FTIR, foi construído filmes PAH/AF com 40 bicamadas sobre substratos de Si/SiO₂. Os espectros FTIR são mostrados na Figura 21. Para os materiais

individuais (PAH e ácido fólico), uma alíquota de 5 mL nas concentrações de 1 mg mL⁻¹ foi depositada diretamente sobre os substratos de Si/SiO_2 .



Figura 21 - Espectros de FTIR para o ácido fólico, PAH e para o filme automontado de PAH/AF com 40 bicamadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com o gráfico da Figura 21, as bandas principais do ácido fólico são observadas em 3327 cm⁻¹, 1696 cm⁻¹ e 1607 cm⁻¹ que correspondem ao estiramento NH do anel pterina,^{89,90} estiramento do COO^{-91} e deformação angular de N-H⁹¹, respectivamente. Para o PAH, são observadas bandas em 3420 cm⁻¹ e 2923 cm⁻¹, atribuída ao estiramento de NH⁹², em 1605 cm⁻¹ e 1519 cm⁻¹, correspondente a deformação angular N-H⁹² e em 1004 cm⁻¹, a deformação angular no plano da ligação R – CH = CH₂.⁹¹No filme automontado PAH/AF com 40 bicamadas observa-se bandas correspondentes as soluções de PAH e ácidos fólicos, confirmando a imobilização dessas soluções. A Tabela 2 resume as principais bandas dos espectros mostrados na Figura 21.

Atribuição	PAH	Ácido fólico	(PAH/AF) ₄₀
Deformação angular no plano da ligação R – CH = CH ₂	1004		
C – N do grupo alifático		1191	1190
OH do fenil		1408	1398
Anel fenil		1450	1454
Anel pterina		1510	1510
Deformação angular N – H	1519		
Estiramento COO ⁻		1607	1607
Deformação angular N – H	1605		
Estiramento C = O		1696	1696
Amina primaria NH	2923		2923
Estiramento NH do anel pterina		3327	3327
Estiramento assimétrico H – H do grupo – N ⁺ H ₃	3420		

Tabela 2 - Atribuição das bandas de FTIR para as soluções de PAH, ácido fólico e para o filme (PAH/AF) contendo 40 bicamadas.

5.1 3 Microscopia de força atômica (AFM)

A técnica AFM foi utilizada para analisar a superfície do substrato de Si/SiO_2 modificado com o filme PAH/AF com 20 bicamadas, sendo as soluções de PAH e ácido fólico na concentração de 1 mg mL⁻¹. A Figura 22 mostra a imagem do filme (PAH/AF)₂₀ em a) 3 dimensões e b) 2 dimensões.



Figura 22 - Imagem AFM da superfície do substrato de Si/SiO_2 modificado com o filme (PAH/AF)₂₀ em a) 3 dimensões e b) 2 dimensões.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise do filme (PAH/AF)₂₀ com a técnica AFM revela uma morfologia globular, com uma rugosidade média de 17 nm. Observa-se também que, na 22b, a superfície do substrato está bem preenchida com os materiais constituintes do filme. Apesar de filmes rugosos serem indesejáveis em muitas aplicações, este tipo de filme pode ser uma vantagem para aplicação em sensores ou biossensores. Sensores eletroquímicos que apresentam uma alta razão área/volume, em geral são mais reativos, por exemplo como mostra Grieshaber et. al.⁹³

5.1.4 Otimização da solução de estocagem do eletrodo

A escolha da solução tampão baseou-se na avaliação da estabilidade das medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica dos eletrodos modificados. Para tanto, os eletrodos modificados com os filmes LbL de PAH/AF foram estocados nas soluções tampão em intervalos de 0, 15, 45, 120, 240, 360, 720 e 1.440 minutos. Foram avaliadas como soluções de estoque as soluções PBS, PB, KCl e Tris-HCl, onde os eletrólitos suportes utilizados nas medidas eletroquímica foram PBS, PB, KCl e NaNO₃, respectivamente. Para a otimização da solução tampão, a análise foi realizada em dois momentos. No primeiro, as medidas foram realizadas somente com o ITO modificado com o filme (PAH/AF)₃. Já no segundo momento, o eletrodo foi modificado com o filme (PAH/AF)₃ e depois imersos em solução de BSA (1%) por 30 minutos. Vale ressaltar que a BSA é uma proteína amplamente usada na literatura para eliminar ligações não específicas no biossensor.⁹⁴⁻⁹⁸

Em cada etapa, foram utilizados quatro eletrodos para cada solução tampão. Os primeiros voltamogramas cíclicos, mostrados na Figura 23, referem-se as medidas de voltametria cíclica para a primeira etapa de imobilização, contendo somente o filme (PAH/AF)₃. No caso da segunda etapa, as medidas de voltametria cíclica contendo os filmes e a proteína BSA, são mostradas através dos voltamogramas na Figura 24. A partir da análise dos gráficos, nas Figuras 23 e 24, observa-se que os picos de oxidação do eletrodo modificado somente com os filmes são mais expressivos em relação aos filmes com BSA. Este comportamento pode ser explicado pela presença da proteína BSA no filme, que bloqueia a passagem da corrente na interface eletrodo-solução. Também é notável, que as medidas de voltametria cíclica dos eletrodos, quando estes estocados em tampão Tris-HCl, apresentam uma maior estabilidade temporal, comparada com as outras soluções tampão, como mostra os gráficos da corrente de pico em função do tempo nos encartes das Figuras 23 e 24.



Figura 23 - Voltamogramas cíclicos da estabilidade dos ITO's modificados com $(PAH/AF)_3$ quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4}$ em solução a) PBS, b) PB, c) KCl e d) NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.



Figura 24 - Voltamogramas cíclicos da estabilidade dos ITO's modificados com $(PAH/AF)_3/BSA$ quando estocado nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução a) PBS, b) PB, c) KCl e d) NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

No caso das medidas de impedância eletroquímica, a Figura 25 mostra os diagramas de Nyquist para os eletrodos modificados com os filmes estocados nas respectivas soluções tampão. Do mesmo modo, os diagramas para os filmes com BSA são apresentados na Figura 26. A concordância entre as técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica é observada pela imobilização da proteína BSA na superfície do eletrodo, que aumenta o valor de R_{tc}, ou diminui a corrente de pico nas análises de voltametria cíclica.



Figura 25 - Diagrama de Nyquist da estabilidade dos ITO's modificados com (PAH/AF)₃ quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl.



Figura 26 - Diagrama de Nyquist da estabilidade dos ITO's modificados com (PAH/AF)₃/BSA quando estocados nas soluções tampão PBS, PB, KCl e Tris-HCl.

As medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica dos eletrodos estocados e medidos em soluções tampão PBS e PB, apresentam uma instabilidade, diminuindo o pico de corrente com o tempo (no caso da voltametria cíclica), e aumentando a resistência na superfície dos eletrodos (no caso da impedância eletroquímica). Este comportamento pode ser explicado pela presença do fosfato no tampão, que pode afetar a estabilidade da molécula do ácido fólico, conforme sugere o estudo de Arcot e Shrestha .⁹⁹ Comportamento semelhante é observado quando o eletrodo é estocado e medido em solução de KCI. Neste caso, o motivo para este comportamento é a presença dos íons CI⁻ na solução, pois estes, além de ter uma forte tendência em formar complexos¹⁰⁰ com íons metálicos de transição, no caso $Fe^{3+} + Cl^- \Rightarrow$ $FeCl^{2+}$, podem ser adsorvidos na superfície do eletrodo,¹⁰¹ contribuindo ainda mais para a instabilidade do filme. No entanto, os eletrodos estocado em solução tampão Tris-HCl e medidos em solução NaNO₃, apresentou um comportamento satisfatório, nas duas técnicas eletroquímicas, mostrando uma estabilidade favorável nas medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica.

5.1.5 Otimização do número de bicamadas do filme

O estudo da otimização das bicamadas para os filmes PAH/AF, também foi realizado utilizando as técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Para isso, foram construídos filmes com 1, 3, 5, 7, 9 e 11 bicamadas, sendo que, para cada número de bicamadas foram utilizados eletrodos diferentes. A dinâmica do crescimento dos filmes, através da voltametria cíclica, é demonstrada pelos voltamogramas, na Figura 27a, onde a corrente no pico aumenta 31,25% quando o eletrodo é modificado com um número de 3 bicamadas, isto é, de 176 μ A para 231 μ A, para o substrato de ITO limpo e modificado, respectivamente. Este comportamento é explicado pelo fato da molécula de ácido fólico, em pH 8,0, apresentar, em uma das suas extremidades, o grupo amina protonado (NH₃⁺). Desta forma, o par redox, [Fe (CN)₆]^{3-/4-}, presente na solução eletrolítica, por ter carga negativa, é atraído eletrostaticamente para a superfície do filme, gerando um maior fluxo de corrente na interface eletrodo-solução. A relação da corrente de oxidação em função do crescimento das bicamadas é mais perceptível, quando observado o gráfico da Figura 27b.


Figura 27 - a) Voltamogramas cíclicos das medidas do eletrodo limpo e do crescimento dos filmes $(PAH/AF)_n$, em n = 1, 3, 5, 7, 9 e 11 bicamadas e b) o gráfico da variação percentual do pico de corrente anódica $(\Delta I_{pa} (\%))$ em função do número de bicamadas do filme. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

Um leve aumento na corrente de oxidação é observado para o filme com 5 bicamadas, que pode estar relacionado com uma ligeira melhora da conformação do grupo amina NH_3^+ na extremidade do filme, favorecendo uma maior interação eletrostática entre os íons $[Fe(CN)_6]^{3-}$ ^{/4-} e NH_3^+ . No entanto, a partir da 7ª bicamada, nota-se, um decréscimo dos picos de oxidação tendendo a atingir valores de picos próximos ao do eletrodo limpo. Filmes LbL com muitas bicamadas apresentam maior espessura podendo tornar lenta a passagem de elétrons do eletrodo para a solução.¹⁰²⁻¹⁰⁴

O crescimento das bicamadas dos filmes pode também ser avaliado pela técnica de impedância eletroquímica, na medida que a espessura do filme aumenta, maior será os valores para R_{tc} no diagrama de Nyquist. Esta relação do número de bicamadas com a resistência de transferência de carga é mostrada na Figura 28.



Figura 288 - a) Diagrama de Nyquist das medidas do ITO limpo e do crescimento dos filmes $(PAH/AF)_n$, em n = 1, 3, 5, 7, 9 e 11 bicamadas e b) o gráfico da variação percentual da resistência de transferência de carga (ΔR_{tc} (%)) em função do número de bicamadas dos filmes.

De acordo com o estudo da otimização do filme PAH/AF em relação ao número de bicamadas, o eletrodo mobilizado com 3 bicamadas apresentou um sinal de pico de oxidação expressivo em relação aos demais eletrodos, exceto para o de 5 bicamadas, que sofreu um leve acréscimo de 0,4 % na corrente do pico de oxidação, porém este acréscimo, comparado com a vantagem de desenvolver biossensores com 3 bicamadas, torna-o em desvantagem em relação ao consumo de um tempo na fabricação do biossensor. Neste sentido, filmes com 3 bicamadas foram escolhidos para a atuação como biossensor para a detecção de célula HeLa.

5.2 Caracterização do biossensor

Depois de definidos os melhores parâmetros para a fabricação dos filmes automontados e otimizadas as condições das medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica, foi realizada a caracterização eletroquímica do biossensor quanto à sua reprodutibilidade, estabilidade, repetibilidade e velocidade de varredura.

5.2 1 Reprodutibilidade

Para garantir uma análise confiável, o biossensor em estudo foi avaliado quanto à sua reprodutibilidade na construção e detecção dos receptores de folato (40 nmol L^{-1}) e de células HeLa (10⁶ células mL⁻¹). As medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica foram feitas em triplicata. Para a detecção, com o uso da técnica de voltametria cíclica, um voltamograma de cada uma das etapas de fabricação é mostrado na Figura 29. O valor da corrente média do pico de oxidação, como também o desvio padrão são apresentados na Tabela 3.



Figura 29 - Voltamogramas cíclicos referente ao estudo de reprodutibilidade utilizando a técnica de voltametria cíclica através da construção paralela de 3 biossensores em todas as etapas de imobilização. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3/4}$ em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de - 0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

Tabela 3 - Estudo da reprodutibilidade na montagem dos biossensores utilizando a técnica de voltametria cíclica. Apresentação dos valores relativos à corrente média do pico de oxidação, desvio padrão e desvio padrão relativo percentual.

I _p (μA)				
Etapas de imobilização	Valor médio	Desvio padrão (DP)	Desvio padrão relativo percentual (%DPR)	
(PAH/AF) ₃	211	8	3,79	
(PAH/AF) ₃ /BSA	194	6	3,09	
(PAH/AF) ₃ /BSA/RF	157	4	2.55	
(PAH/AF) ₃ /BSA/HeLa	154	6	3,89	

Fonte: Elaborado pela autora.

No caso da técnica de impedância eletroquímica, a reprodutibilidade dos biossensores em todas as etapas de imobilização, por meio do diagrama de Nyquist, é mostrada na Figura 30 e os parâmetros relacionados ao estudo da reprodutibilidade são mostrados na Tabela 4.



Figura 300 - Diagrama de Nyquist referente ao estudo da reprodutibilidade dos biossensores em triplicata para todas as etapas de imobilização.

Tabela 4 - Estudo da reprodutibilidade na montagem dos biossensores utilizando as técnicas de impedância eletroquímica. Apresentação dos valores relativos à resistência média, desvio padrão e desvio padrão relativo percentual.

$\mathbf{R}_{\mathbf{tc}}\left(\mathbf{\Omega} ight)$				
Etapas de imobilização	Valor médio	Desvio padrão (DP)	Desvio padrão relativo percentual (%DPR)	
(PAH/AF) ₃	45	2	4,44	
(PAH/AF) ₃ /BSA	59	1	1,69	
(PAH/AF) ₃ /BSA/RF	178	2	1,12	
(PAH/AF) ₃ /BSA/HeLa	533	10	1,87	

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto menor for o %DPR, menor será a diferença entre os valores das repetições, e consequentemente melhor o desempenho do biossensor. Já o valor do Desvio padrão mostra quão próximo os valores das repetições estão do valor médio.

De acordo com as informações nas Tabelas 3 e 4, os valores de %DPR foram inferiores a 5%, o que indica que os eletrodos modificados possuem boa reprodutibilidade¹⁰⁵. Estudos como de Liu et. al, demonstraram um biossensor para detecção de célula HeLa¹⁰⁶, baseado em filmes (Fc-PEI/SWNT)₅/FA com %DPR de 2,8% (n = 5). Já Jiancong et. al, encontraram resultados semelhantes para a detecção de receptores de folato¹⁰⁷. A vantagem do presente projeto de pesquisa é a simplicidade na fabricação do biossensor baseado na plataforma LbL de (PAH/AF)₃.

5.2.2 Estabilidade

Para o estudo da estabilidade do biossensor foram realizados 10 ciclos sucessivos em medidas de voltametria cíclica com a célula HeLa imobilizada na concentração de 10^6 células mL⁻¹. O voltamograma contendo 10 ciclos sucessivos é mostrado na Figura 31. Foi observado que a variação do pico de oxidação durante os ciclos sucessivos teve uma máxima variação de 3,9%, alcançando uma estabilidade com 5 ciclos. Esses resultados provam que o sistema é estável e estão de acordo com a estabilidade encontrada em outros biossensores eletroquímicos.¹⁰⁸



Figura 311 - Voltamograma cíclico da estabilidade do biossensor na detecção de célula HeLa (10^6 células mL⁻¹) contendo de 1 a 10 ciclos. Na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V e v = 100 mV s⁻¹.

5.2.3 Repetibilidade

Para o estudo da repetibilidade foram utilizados 3 eletrodos diferentes modificados com (PAH/AF)₃/BSA/HeLa (10⁶ células mL⁻¹) e realizado 10 medidas de voltametria cíclica em sequência em cada eletrodo. O número de ciclo para cada medida foi de 5 ciclos em uma janela de potencial de -0,6 a 1,1 V. Os resultados estão indicados na Figura 32. O desvio padrão relativo calculado foi de 1,72%, estando abaixo dos 4%, indicando uma boa repetibilidade do biossensor.¹⁰⁹



Figura 322 - Gráfico da corrente em função das medidas sucessivas de voltametria cíclica para o biossensor imobilizado com a célula HeLa (10⁶ células mL⁻¹).

5.2.4 Velocidade de varredura

A velocidade de varredura é um fator importante a ser definido, uma vez que a duração de uma varredura fornece tempo suficiente para permitir que a reação química ocorra, assim favorecendo a transferência de carga na superfície do eletrodo. Para este estudo, diferentes velocidades de varredura foram realizadas, com a técnica de voltametria cíclica para o biossensor após este ser imobilizado com as células HeLa (10⁶ células mL⁻¹). Os resultados dos voltamogramas para diferentes velocidades de varredura podem ser observados na Figura 33. A corrente de pico cresce linearmente com a velocidade de varredura. Esta relação é um indicativo de que o mecanismo principal de transporte de massa dos íons no interior da solução até a superfície do eletrodo é realizado por difusão.¹¹⁰



Figura 33 – Voltamograma cíclico do biossensor (PAH/AF)₃/BSA/HeLa (10⁶ células mL⁻¹) para diferentes velocidades de varredura (20, 30, 50 e 100 mVs⁻¹). Na presença de [Fe(CN)₆]³⁻⁴⁻ em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos.

Observa-se no gráfico da Figura 33 que a reação é reversível, pois o crescimento dos picos varia linearmente com a raiz quadrada das velocidades de varredura, estando de acordo com a equação 1, a razão da corrente de pico anódica e catódica é aproximadamente 1, independente da velocidade de varredura e a separação entre os potencial de pico $(E_{pa} - E_{pc})$ é igual para todas as velocidades. A velocidade que apresentou um melhor perfil voltamétrico foi a de 100 mV s⁻¹.

5.3 Detecção Eletroquímica

5.3.1 Detecção dos receptores de folato

A detecção dos receptores de folato ocorreu na superfície dos eletrodos modificados com o filme $(PAH/AF)_3$ em concentrações variando entre 10 e 40 nmol mL⁻¹. Para os biossensores baseados na técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica obteve-se os diagramas de Nyquist, como apresentados na Figura 34, onde observa-se um aumento da resistência na superfície do biossensor para maiores concentrações de receptores de folato.

A curva de calibração mostrada no encarte da Figura 34 foi obtida por meio da regressão linear do gráfico ΔR_{tc} (%) *vs* receptores de folato (nmol mL⁻¹) com o coeficiente de determinação (R²) de 0,99. O limite de detecção (LD) calculado foi de 10 nmol L⁻¹, sendo três vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da reta. Este comportamento linear, já esperado, pode ser explicado pelo fato dos receptores de folato se ligar com o ácido fólico formando uma camada isolante na superfície do eletrodo⁴⁸, assim, quanto maior o número de receptores de folato imobilizado ao filme, maior o bloqueio destes aos íons Ferricianeto/Ferrocianeto de potássio.⁶⁴



Figura 34 - Resposta do biossensor em relação a diferentes concentrações de receptores de folato (RF) (10, 20, 30 e 40 nmol L⁻¹) na forma de diagrama de Nyquist.
 Fonte: Elaborada pela autora.

A curva de calibração também foi realizada através da técnica de voltametria cíclica, apresentada na Figura 35. Neste caso, monitorou-se a relação entre a corrente do pico de oxidação de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ e a concentração do receptor de folato. Assim, com o aumento da resistência da superfície do biossensor, há uma diminuição deste pico de 204,2 µA à 173,8 µA. Os biossensores, através da técnica de voltametria cíclica, apresentaram uma resposta linear, no intervalo de concentração 10 a 40 nmol L⁻¹ de receptores de folato, com R² igual a 0,96. O limite de detecção calculado foi de 10 nmol L⁻¹.



Figura 345 - Resposta do biossensor em relação a diferentes concentrações de receptores de folato (10, 20, 30 e 40 nmol L-1) na forma de voltamograma cíclico. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

Os diagramas de Nyquist e os voltamogramas cíclicos para a detecção de diferentes concentrações de células HeLa são mostrados na Figura 36 e 37 respectivamente. E as curvas de calibração podem ser vistas no encarte destas Figuras.

A curva de calibração da espectroscopia de impedância eletroquímica apresentou um comportamento semelhante aos receptores de folato, com uma linearidade do ΔR_{tc} (%) em função da concentração da célula HeLa (entre 50 a 10⁶ células mL⁻¹), com R² de 0,99 e um limite de detecção de 50 células mL⁻¹. Devido à grande quantidade de receptores de folato na superfície da célula HeLa, elas aderem, em grande número, na superfície do eletrodo.



Figura 356 – Resposta do biossensor em diferentes concentrações de célula HeLa (50, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ e 10⁶ células mL⁻¹) na forma de diagrama de Nyquist.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da técnica de voltametria cíclica, também se obteve a curva de calibração para a detecção de células HeLa nas concentrações entre 50 e 10^6 células por mL⁻¹, como mostra a Figura 37. É notado no voltamograma cíclico uma diminuição do pico de oxidação de 193,0 μ A a 122,4 μ A para as células HeLa.



Figura 37 - Resposta do biossensor em diferentes concentrações de célula HeLa (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL⁻¹) na forma de voltamograma cíclico. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

A curva de calibração do gráfico ΔI_{pa} (%) em função da concentração da célula HeLa, apresentou o R² igual a 0,96 e limite de detecção de 50 células mL⁻¹. As técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica são técnicas complementares das informações sobre o efeito na transferência de elétrons entre os íons [Fe(CN)₆] ^{3-/4-} e a superfície do eletrodo. No entanto a curva de calibração de ΔI_{pa} (%) em função das concentrações dos receptores de folato e da célula HeLa mostrou valores de R² (0,96) inferior ao valor de R² (0,99) da curva de calibração de ΔR_{tc} (%) em função das mesmas concentrações de receptores de folato e de célula HeLa. Resultado semelhante é observado nos estudos de Peteli et. al. os quais desenvolveram um biossensor para a detecção de célula HeLa baseado na plataforma GCPE/AuNp/Cys/Glu/PAMAM/FA com valores de R² = 0,96 (n = 3) para a curva de calibração de ΔI_{pa} (%) em função se letroquímico, também para detecção de célula HeLa, baseado na plataforma ITO/CNTs@PDA/AF/BSA com os valores de ΔR_{tc} (%) proporcional a concentração de 5·10² a 5·10⁶ células mL⁻¹ com R² = 0.99 (n = 3). Estes resultados podem mostrar que a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica é mais

sensível (apresentando uma melhor linearidade na curva de calibração) comparada com a voltametria cíclica para estudar as propriedades de interface dos biossensores.¹¹¹

Biossensores eletroquímicos baseados na espectroscopia de impedância eletroquímica têm atraído muita atenção, apresentando alta sensibilidade para monitorar a variação da impedância do biossensor durante os procedimentos de modificação da sua superfície.

5.4 Estudo da seletividade

5.4.1 Célula HMEC

Para avaliar a seletividade do biossensor para células cancerígenas que superexpressam receptores de folato, o biossensor foi testado com a HMEC (células epiteliais normais de mama) a qual apresenta um baixo nível de receptores de folato em comparação com a célula HeLa.¹¹² Os resultados da espectroscopia de impedância eletroquímica, para as células HMEC, nas concentrações 50, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ e 10⁶ células mL⁻¹, são demonstrados na Figura 38.



Figura 36 - Resposta do biossensor em diferentes concentrações da célula HMEC (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL⁻¹) na forma de diagrama de Nyquist.

Observa-se na Figura 38 que o diâmetro do semi-círculo aumenta de 60 Ω a 80 Ω , biossensor sem e com HMEC (10⁶ células mL⁻¹), respectivamente. Este comportamento pode ser explicado por um pequeno número de células fixas ligadas não especificamente na superfície do eletrodo.⁵

A curva de calibração do gráfico ΔR_{tc} (%) em função da concentração da célula HMEC (entre 50 a 10⁶ células mL⁻¹), com R² igual 0,6, demostra que o biossensor não apresentou uma alteração significativa, comparado quando imobilizado com as células cancerosa, provando que o biossensor desenvolvido é seletivo para a detecção da célula HeLa.

A célula HMEC também foi testada com a técnica de voltametria cíclica, obtendo um voltamograma cíclico, na Figura 39, para as concentrações 50 a 10^6 células mL⁻¹. De acordo com a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, a voltametria cíclica também apresentou uma leve alteração pico de oxidação de190 µA a 179 µA, para o eletrodo sem e com a célula HMEC (10^6 células mL⁻¹). O intervalo linear para detecção da célula HMEC foi obtido entre 50 e 10^6 células mL⁻¹, com R² igual a 0,23.



Figura 37 - Resposta do biossensor em diferentes concentrações de célula HMEC (50, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células mL⁻¹) na forma de voltamograma cíclico. Na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

5.4.2 Filme PAH/PAA

Além do estudo da seletividade do biossensor quanto à célula, foi avaliado a sua especificidade quanto à molécula de reconhecimento. Este estudo é importante para mostrar que, a interação do presente biossensor com a célula HeLa ocorre somente com a interação entre receptor de folato e a molécula de ácido fólico. Para este estudo, utilizou-se o polímero poli(ácido acrílico) - PAA, para a construção do novo biossensor com o filme (PAH/PAA)₃. A partir da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, foi obtido o diagrama de Nyquist na Figura 40 e pela técnica de voltametria cíclica, foi obtido o voltamograma cíclico, como é mostrado na Figura 41. Para o biossensor, quando modificado com uma outra molécula, no caso polímero PAA, observa-se que o pico de oxidação na voltametria e R_{tc} na impedância não sofrem alterações significativa, comparadas com as medidas realizadas nos biossensores com o filme (PAH/AF)₃.



Figura 380 - Diagrama de Nyquist do estudo da seletividade quanto ao material de bio-reconhecimento do biossensor com o filme: (PAH/PAA)₃/BSA e com a célula HeLa: (PAH/PAA)₃/BSA/HeLa (10⁶ células mL⁻¹).



Figura 391 - Voltamogramas cíclicos do estudo da seletividade quanto ao material de bio-reconhecimento do biossensor com o filme: (PAH/PAA)₃/BSA e com a célula HeLa: (PAH/PAA)₃/BSA/HeLa (10⁶ células mL⁻¹). Na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em solução aquosa de NaNO₃, com uma janela de potencial aplicado de -0,6 a 1,1 V em 5 ciclos e v = 100 mV s⁻¹.

6 CONCLUSÃO

O presente projeto de pesquisa demonstrou que os filmes automontados, constituídos de PAH e ácido fólico pela técnica *layer-by-layer*, podem ser utilizados em biossensores para detectar células cancerosa que apresentam um alto nível de receptores de folato na sua superfície. Também, como resultado, o biossensor demonstrou que a detecção é específica quando a molécula de reconhecimento é o ácido fólico, comparado com um biossensor imobilizado com o filme PAH/PAA.

Os resultados das detecções dos biossensores para receptores de folato e célula HeLa, através das duas técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, foram bastante satisfatórios e concordantes, demonstrado pelo aumento do R_{tc} e diminuição do pico de oxidação da prova redox. O biossensor em estudo mostrou-se seletivo a célula HeLa e ao filme contendo ácido fólico.

No entanto, a melhor resposta aos parâmetros de detecção foi obtida através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, onde apresentou uma boa linearidade para os receptores de folato ($R^2 = 0,99$) e para a célula HeLa ($R^2 = 0,99$) nas faixas de 10 a 40 nmol mL⁻¹ e 50 a 10⁶ células mL⁻¹, respectivamente, com o limite de detecção de 10 nmol mL⁻¹ para receptores de folato e 50 células mL⁻¹ para HeLa.

O Desvio padrão relativo percentual dos resultados de detecção foi de 1,95 % (para n=3), indicando que o ITO modificado com (PAH/AF)₃/BSA/HeLa apresenta uma boa reprodutibilidade e estabilidade. Assim, em comparação com outras técnicas de imobilização, a técnica de *layer-by-layer*, usada na presente pesquisa, mostrou ser de fácil e rápida montagem, além de baixo custo.

Do ponto de vista de portabilidade de aplicação, no futuro, a miniaturização dos eletrodos é certamente interessante por trata de um método analítico simples, que permite a análise remota, além de fazer uso de poucas quantidades de amostra.

REFERÊNCIAS

1 OBSERVATORIO DE ONCOLOGIA. **Câncer como a primeira causa de morte nos municípios brasileiros**. Disponível em: https://observatoriodeoncologia.com.br. Acesso em: 18 de abr. de 2018.

2 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA estima que haverá** cerca de 600 mil casos novos de câncer em 2018. Disponível em: https://www.inca.gov.br> Acesso em: 4 de set. 2018

3 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **O que é câncer?**. Disponível em: https://www.inca.gov.br> Acesso em: 3 de abr. de 2019

4 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Ocorrencia, sobrevida e estadiamento**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_sobrevida.pdf>. Acesso em: 02 dez.2016.

5 TEPELI, Y. et al. An electrochemical cytosensor based on a PAMAM modified glassy carbon paste electrode. **RSC Advances**, v. 5, p. 53973–53978, 2015. doi: 10.1039/c5ra07893h

6 ALI, et al. Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review. **Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 8, p. 1, 2017. doi: 10.4172/2155-6210.1000235

7 CHEN, C. et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. **Nature**, v. 500, p. 486-489, 2013. doi:10.1038/nature12327

8 DOVER, J. E. et al. Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents. **Journal of Microbiological Methods**, v.78, p. 10-19, 2009. doi:10.1016/j.mimet.2009.04.008

9 VILLIERS, M. M. et al. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 701-715, 2011. doi:10.1016/j.addr.2011.05.011

10 CHENG, J. H.; FOU, A. F.; RUBNER, M. F. Molecular self-assembly of conducting polymers. **Thin Solid Films**, v. 244, p. 985-989, 1994. doi.org/10.1016/0040-6090(94)90616-5.

11 STROEVE, P. et al. Gas transfer in supported films made by molecular self-assembly of ionic polymers. **Thin Solid Films**, v. 284, p. 708-712, 1996. doi.org/10.1016/S0040-6090(95)08428-2.

12 LEVASALMI, et al. Poly(4-methyl-1-pentene)-Supported Polyelectrolyte Multilayer Films: Preparation and Gas Permeability. Macromolecules, v-30, p. 1752, 1997. doi.org/10.1016/S0040-6090(95)08428-2

13 ONDA, M. et al. Sequential actions of glucose oxidase and peroxidase in molecular films assembled by layer-by-layer alternate adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p.163, 1996. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960720)51:2.

14 SUN, Y. et al. Fabrication of ultrathin film containing bienzyme of glucose oxidase and glucoamylase based on electrostatic interaction and its potential application as a maltose sensor. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 197, p. 147, 1996. doi:org.ez67.

15 FOU, A. C. et al. Fabrication and properties of light-emitting diodes based on self-assembled multilayers of poly(phenylene vinylene). **Journal of Applied Physics**, v. 79, p. 7501, 1996. doi.org/10.1063/1.362421.

16 HAMMOND, P. T.; WHITESIDES, G. M. Formation of polymer microstructures by selective deposition of polyion multilayers using patterned self-assembled monolayers as a template. **Macromolecules**, v. 28, p. 7569, 1995. doi: 10.1021/ma00126a040.

17 STEPP; J.; SCHLENOFF, J. B. Electrochromism and electrocatalysis in viologen polyelectrolyte multilayers. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 144, p. L155, 1997. doi: 10.1149/1.1837709.

18 NETZER. L, SAGIV. J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. Journal of the American Chemical Society, v. 105, p. 674-676, 1983. doi:10.1021/ja00341a087.

19 DECHER, G. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: 3. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films, v.** 210, p. 831-835, 1992. doi.org/10.1016/0040-6090(92)90417-A.

20 RAPOSO, M.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Adsorption mechanisms in layer-by-layer films. **Brazil Journal Physics,** v. 28, 1998. doi:org/10.1590/S0103-97331998000400014.

21 SANTOS, V. et al. The role of a layer-by-layer film containing Pt nanoparticle on the performance of a glucose enzymatic biosensor. **International Journal Electrochemical Science,** v. 8, N. 8, p. 10601, 2013.

22 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1231-1237, 1997. doi: 10.1126/science.277.5330.1232.

23 RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Emerging strategies and applications of layer-by-layer self-assembly. **Nanobiomedicine**, v.1, 2014. doi: 10.5772/60009

24 BAI, S. et al. Hydrogen-bonding-directed layer-by-layer films: effect of electrostatic interaction on the microporous morphology variation. **Langmuir**, v. 20, p. 11828-11832, 2004. doi: 10.1021/la047968j.

25 SHIMAZAKI, Y. et al. Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charge-transfer interaction. **Langmuir**, v. 13, p. 1385-1387, 1997. doi: 10.1021/la9609579.

26 SATO, M.; SANO, M. van der Waals layer-by-layer construction of a carbon nanotube 2D network. **Langmuir**, v. 21, p. 11490–11494, 2005. doi: 10.1021/la051539j.

27 LI, C. et al. Controlling the growth behaviour of multilayered films vialayer-by-layer assembly with multiple interactions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 8835, 2009. doi: 10.1039/b906306d.

28 NALWA, H. S. Handbook of surfaces and interfaces of materials. New York: Academic Press, 2001. v. 1

29 CHO, Y.; HONG, J. Sustained release of therapeutic proteins from multilayers adsorbed on the sidewalls of porous membranes. **Colloids and Surfaces A:** physicochemical and engineering aspects, v. 562, p. 296-303, 2019.

30 IVANOV, A. N. et al. SPR sensor based on polyelectrolyte complexes with DNA inclusion. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 281, p. 574-581, 2019. doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.156.

31 CRIADO, M. et al. Quantitative nanomechanical properties of multilayer films made of polysaccharides through spray assisted layer-by-layer assembly. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 1, p. 169-177, 2017.

32 XING, R. et al. Rapid and sensitive electrochemical detection of myricetin based on polyoxometalates/SnO2/gold nanoparticles ternary nanocomposite film electrode. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 283, p. 35-41, 2019.

33 LIU, H. et al. Transparent conducting oxides for electrode applications in light emitting and absorbing devices. **Superlattices and Microstructures**, v. 48, n. 5, p. 458-484, 2010.

34 ZHAO, H. et al. Exocytosis of SH-SY5Y single cell with different shapes cultured on ITO micro-pore electrode. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 363, n. 1-2, p. 309-313, 2012.

35 THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121–131, 2001.

36 RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W.R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 2008.

37 MURUGAIYAN, S. B. Biosensors in clinical chemistry: an overview. Advanced Biomedical Research, v. 3, p. 67, 2014. doi: 10.4103/2277-9175.125848.

38 KREJCOVA, L. et al. Nanoscale virus biosensors: state of the art. Nanobiosensors in Disease Diagnosis, v. 2015, n. 4, p. 47-66, 2015. doi.org/10.2147/NDD.S56771.

39 SENSORS AZO. Enzyme-based electrochemical biosensors. Disponível em: https://www.azosensors.com/. Acesso em: 8 Ago. 2012

40 MONGRA, A. C.; KAUR, A.; BANSAL, R. K. Review study on electrochemical-based biosensors. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 2, n. 2, p. 743-749, 2012.

41 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods**: fundamentals and applications. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2001.

42 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. **Principios de análise instrumental**. 5a ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

43 KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzymebiosensors. **Electroanalysis**, v. 15, p. 913-947, 2003. doi.org/10.1002/elan.200390114.

44 DZIĄBOWSKA, K.; CZACZYK, E.; NIDZWORSKI, D. Application of electrochemical methods in biosensing technologies. In: RINKEN, T.; KIVIRAND, K. (Ed.) **Biosensing technologies for the detection of pathogens**. London: Intechopen, 2017. cap. 10. p. 497.

45 CHEN, C-S.Development of a label-free impedance biosensor for detection of antibody– antigen interactions based on a novel conductive linker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 3072–3076, 2011.

46 KUMARI, P.; ADELOJU, S. B. Fabrication of a novel DNA affinity biosensor based on hybridisation induced current by electrostatic repulsion of silicotungstic acid as a redox indicator. **Talanta**, v. 194, p. 127–133, 2019. doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.074.

47 ROCCHITTA, G. et al. Enzyme biosensors for biomedical applications: strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. **Sensors**, v. 16, n. 6, p. 780, 2016.

48 NI, J. et al. Immobilization free electrochemical biosensor for folate receptor in cancer cells based on terminal protection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 496–501, 2016. doi: 10.1016/j.bios.2016.07.012.

49 BHARDWAJ, T. Review on biosensor technologies. International Association of Engineering and Management Education (IAEME), v. 6, n. 2, p. 36-62, 2015.

50 BRANDT, I. C. et al. Electrical characterization of Cu/Cu2O electrodeposited contacts. 2008, **Electrochemical Society Transactions**, v. 14,n. 1, p. 413-419, 2008. doi: 10.1149/1.2956056.

51 ELGRISHI, N. et al. A practical Beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018.

52 HARVEY, D. Electrochemical methods. In: _____. Analytical chemistry 2.0. California: Open Textbook Library, 2016. cap. 10.

53 LI, G.; MIAO, P. Theoretical background of electrochemical analysis. In: _____. **Electrochemical analysis of proteins and cells**. Berlin: Springer, 2012. p. 5-18.

54 DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química** Nova, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.

55 ITAGAKI, M. et al. Electrochemical impedance and complex capacitance to interpret electrochemical capacitor. **Electrochemistry**, v. 75, n. 8, p. 649-655, 2007.

56 CARVALHO, L. A.; ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

57 SILVA, E. T. S. G. Electrochemical biosensors in point-of-care devices: recent advances and future trends. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 4, p. 778–794, 2017.

58 ELNAKAT, H.; RATNAM, M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1067-1084, 2004.

59 SIWOWSKA, K. et al. Folate receptor-positive gynecological cancer cells:in vitro and in vivo characterization. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 72, p. 1-17, 2017.

60 DAMIATI, S. et al. Bioinspired detection sensor based on functional nanostructures of S-proteins to target the folate receptors in breast cancer cells. **Sensors and Actuators B**, v. 267, p. 224–230, 2018. doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.037.

61 ZHENG, T-T. et al. A label-free cytosensor for the enhanced electrochemical detection of cancer cells using polydopamine-coated carbon nanotubes. **Analyst**, v. 137, n. 6, p. 1316-1318, 2012.

62 GU, W. et al. A novel and simple cell-based electrochemical impedance biosensor for evaluating the combined toxicity of DON and ZEN. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 447–454, 2015. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.074.

63 LIU, L. et al. An electrochemical method to detect folate receptor positive tumor cells. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 10, p. 2547–2550, 2007.

64 CASTILLO, J. J. et al. Detection of cancer cells using a peptide nanotube–folic acid modified graphene electrode. **Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1026–1031, 2013.

65 ASPHAHANI, F.; ZHANG, M. Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection. **Analyst**, v. 132, n. 9, p. 835-841, 2007.

66 LUCEY, B. P.; NELSON-REES, W. A.; HUTCHINS, G. M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, v. 133, n. 9, p. 1463-1467, 2009.

67 CHEUNG, A. et al. Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52553–52574, 2016.

68 LI, R. et al. Electrochemiluminescence biosensor for folate receptor based on terminal protection of small-molecule-linked DNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 226–231, 2014. doi: 10.1016/j.bios.2014.02.066.

69 GURUDATT, N. G. et al. Enhanced electrochemical sensing of leukemia cells using drug/lipid co-immobilized on the conducting polymer layer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 33–40, 2016. doi: 10.1016/j.bios.2016.06.029.

70 AZAK, H. et al. Folic-acid-modifi ed conducting polymer: electrochemical detection of the cell attachment. **Macromolecular Bioscience,** v. 16, n. 4, p. 545–552, 2016.

71 JIANG, H.; WANG, X. Label-free detection of folate receptor (+) cells by molecular recognition mediated electrochemiluminescence of CdTe nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 14, p. 6872–6878, 2014.

72 GE, S. et al. Ultrasensitive electrochemical cancer cells sensor based on trimetallic dendritic Au@PtPd nanoparticles for signal amplification on lab-on-paper device. **Sensors and Actuators B**: chemical, v. 220, p. 665-672, 2015. doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.009.

73 WANG, X. et al. Preparation of electrochemical cytosensor for sensitive detection of HeLa cells based on self-assembled monolayer. **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 511–517, 2014. doi.org/10.1016/j.electacta.2014.01.027

74 SUN, P. et al. An ultrasensitive electrochemical cytosensor for highly specific detection of HL-60 cancer cells based on metal ion functionalized titanium phosphate nanospheres. 2018, **Analyst**, v. 143, p. 5170-5175, 2018. doi: 10.1039/C8AN01327F.

75 ZHOU, J. et al. Folic acid modified Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles, layer-bylayer surface engineered for targeted delivery. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, p. 404-411, 2010. 76 YOSHIDA, K. et al. Preparation of Nafion/polycation layer-by-layer films for adsorption and release of insulin. **Polymers**, v. 10, n. 8, p. 1-10, 2018.

77 JAKLENEC, A. et al. High throughput layer-by-layer films for extracting film forming parameters and modulating film interactions with cells. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 3, p. 2255–2261, 2016.

78 MOUSLMANI, M. et al. Curcumin associated poly(allylamine hydrochloride)-phosphate self-assembled hierarchically ordered nanocapsules: size dependent investigation on release and DPPH scavenging activity of curcumin. **RSC Advances**, v. 5, p. 18740-18750, 2015. doi: 10.1039/C4RA12831A.

79 HWANG, S. Y. et al. Folic acid is necessary for proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 2 p. 736-747, 2018.

80 VANNUCCHI, H.; MONTEIRO T. H. **Funções plenamente reconhecidas de nutrientes ácido fólico**. 2010. Disponível em: https://ilsi.org/brasil/wpcontent/uploads/sites/9/2016/05/10-A%CC%81cido-Fo%CC%81lico.pdf>. Acesso em 23 jan. 2018.

81 OLIVEIRA, M. D. L. A novel approach to classify serum glycoproteins from patients infected by dengue using electrochemical impedance spectroscopy analysis. **Synthetic Metals**, v. 159, n. 21-22, p. 2162–2164, 2009.

82 VIEIRA, N. C. S. Label-free electrical recognition of a dengue virus protein using the SEGFET simplified measurement system. **Analytical Methods**, v. 6, n. 22, p. 8882–8885, 2014.

83 SAEED, M.; SHEFF, D.; KOHEN, A. Novel positron emission tomography tracer distinguishes normal from cancerous cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 33872–33878, 2011.

84 LI, G.; MAGANA, D.; DYER, R. B. Photoinduced electron transfer in folic acid investigated by ultrafast infrared spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 10, p. 3467–3475, 2012.

85 HANSDA, C. et al. Photophysical behavior of layer-by-layer electrostatic self-assembled film of azo dye Chromotrope-2R and a polycation. **Journal of Luminescence**, v. 178, p. 347–355, 2016. doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.06.017.

86 CRANFORD, S. W.; BUEHLER, M. J. Critical cross-linking to mechanically couple polyelectrolytes and flexible molecules. **Soft Matter**, v. 9, n. 4, p. 1076–1090, 2013.

87 MA, Y. Increased protein sorption in Poly(acrylic acid)-containing films through incorporation of comb-like polymers and film adsorption at low ph and high ionic strength.. **Langmuir**, v. 29, n. 9, p. 2946–2954, 2013.

88 ZUCOLOTTO, V. Compósitos poliméricos nanoestruturados de azocorantes, fitalocianina e polímeros luminescente. 2003. 137p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

89 RAOUF, A. L. M. et al. Qualitative and quantitative determination of folic acid in tablets by FTIR spectroscopy. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 773, 2014.

90 PENG, C. et al. Influence of folate conjugation on the cellular uptake degree of Poly(allylamine hydrochloride) microcapsules. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 6, p. 3710–3716, 2011.

91 HE, Y. Y. et al. Complexation of anthracene with folic acid studied by FTIR and UV spectroscopies. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 72, n. 4, p. 876–879, 2009.

92 ZHAO, H. C. et al. Synthesis and thermal property of Poly(Allylamine Hydrochloride). Advanced Materials Research, v. 150, p. 1480-1483, 2010. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.150-151.1480.

93 GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel)**, v.8, n 3, p. 1400-1458. doi: 10.3390/s80314000.

94 BALAJI, A.; ZHANG, J. Electrochemical and optical biosensors for early-stage cancer diagnosis by using graphene and graphene oxide. ditya. **Cancer Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.

95 ZHENG, Z. A facile and effective electrochemical DNA biosensor for the detection of gardnerellavaginalis based on one-step BSA blocked electrode. International Journal of Electrochemical Science, v. 11, n. 10, p. 8354 – 8362, 2016.

96 PIMENTA-MARTINS, M. G. R. et al. Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 1, p. 138–143, 2012.

97 KAUSHIK, A. et al. A sensitive electrochemical immunosensor for label-free detection of Zika-virus protein. **Scientific Reports**, v. 8, n. 9700, 2018. doi.org/10.1038/s41598-018-28035-3.

98 KAILASHIYA J. et al. Graphene oxide-based biosensor for detection of plateletderivedmicroparticles: a potential tool for thrombus risk identification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 274-280, 2015. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.056.

99 ARCOT, J.; SHRESTHAB, A. Folate: methods of analysis. Trends in Food Science & Technology, v. 16, n. 6-7, p. 253–266, 2005.

100 SUTIN, N.; ROWLEY, J. K.; DODSON, R. W. Chloride complexes of iron(iii) ions and the kinetics of the chloride-catalyzed exchange reaction between iron(ii) and iron(iii) in light and heavy water. **Journal of Physical Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 1248–1252, 1961.

101 SHI, Z.; LIPKOWSKI, J. Chloride adsorption at the Au(111) electrode surface. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 403, n. 1-2, p. 225-239, 1996.

102 WU, W. et al. Controlled Layer-By-Layer Depositon of Carbon Nanotubes on Electrodes for Microbial Fuel Cells. **Energies**, v.12, n 3, p. 363, 2019. doi: 10.3390/en12030363.

103 ANISHCHENKO, D. V.; LEVIN, O. V.; MALEV, V. V. Double layer structural effects in cyclic voltammetry curves complicated with non-equilibrium injection of charge carriers into redox polymer films. **Electrochimica Acta**, v. 241, p. 375-385, 2017. doi.org/10.1016/j.electacta.2017.04.095.

104 CRESPILHO, F. N. et al. Using Electrochemical Data to Obtain Energy Diagrams for Layer-By-Layer Films from Metallic Phthalocyanines. **International Journal of Electrochemical Science,** v. 1, p. 151, 2006.

105 GU, W. et al. A novel and simple cell-based electrochemical impedance biosensor for evaluating the combined toxicity of DON and ZEN. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 447–454, 2015. http://dx.doi.orh/10.1016/j.bios.2015.03.074.

106 LIU, J. et al. Highly sensitive and selective detection of cancer cell with a label-free electrochemical cytosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 436–441, 2013. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.002

107 Ni, J. et al. Immobilization free electrochemical biosensor for folate receptor in cancer cells based on terminal protection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 496–501, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.012.

108 AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNF α in human saliva and serum samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 169–176, 2017. doi: 10.1016/j.bios.2017.05.056.

109 ARTIGUES M.; ABELLÀ, J.; COLOMINAS, S. Analytical parameters of an amperometric glucose biosensor for fast analysis in food samples. **Sensors**, v. 17, n. 11, p. 2620, 2017.

110 SCHROCK, D. S.; WIPF, D. O.; BAUR, J. E. Feedback effects in combined fast-scan cyclic voltammetry-scanning electrochemical microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 79, n.13, p. 4931-4941, 2007.

111 GUO, Y. et al. Efficient electrochemical detection of cancer cells on in situ surfacefunctionalized MoS_2 nanosheets. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 5532, 2017.

112 SAEED, M.; SHEFF, D.; KOHEN A. A novel positron emission tomography tracer distinguishes normal from cancerous cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 39, p. 33872-33878, 2011.