UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

GLENDIA GISELA IBÁÑEZ REDÍN

Novas estratégias de fabricação de imunossensores sem marcação à base de eletrodos impressos de carbono para a detecção de biomarcadores de câncer,

São Carlos

2021

GLENDIA GISELA IBÁÑEZ REDÍN

Novas estratégias de fabricação de imunossensores sem marcação à base de eletrodos impressos de carbono para a detecção de biomarcadores de câncer,

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Débora Gonçalves.

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloca o Programa)

São Carlos

2021

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.

Ibáñez-Redín, Glenda Gisela

Novas estratégias de fabricação de imunossensores sem marcação à base de eletrodos impressos de carbono para a detecção de biomarcadores de câncer / Glenda Gisela Ibáñez-Redín; orientadora Débora Gonçalves - versão corrigida -- São Carlos, 2021.

112 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Imunossensores eletroquímicos. 2. Eletrodos impressos. 3. Biomarcadores de câncer. 4. Carbon black. 5. Nanopartículas de NiFe₂O₄. I. Gonçalves, Débora, orient. II. Título.

A mi abuela “Doña Jovita” y a mi madre Mirella,
por ser ejemplo de resiliencia, autonomía y dignidad.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Débora Gonçalves pela orientação, incentivo, autonomia e por todo o apoio na minha formação;

Ao Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. por ter me permitido participar deste projeto e pela contribuição no desenvolvimento do trabalho;

À todos os Professores que participaram das bancas do exame de qualificação e da defesa pelas suas valiosas discussões e recomendações para a aprimoração do trabalho;

Aos integrantes do Grupo de Polímeros do IFSC/USP, Roberto Furuta, Gustavo Freitas do Nascimento, Elsa Materon, Nirav Joshi, Flavio Makoto, Giovana Rosso e Beatriz Tirich por serem ótimos companheiros de trabalho e pelas suas contribuições neste projeto e nos trabalhos desenvolvidos em paralelo. Agradeço em especial ao Dr. Deivy Wilson cujo suporte nos experimentos de impressão foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto;

Aos integrantes do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Amor que participaram no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pelas suas contribuições e pelo fornecimento das amostras dos pacientes;

Aos funcionários e Professores do Grupo de Polímeros do IFSC/USP por ajudar a fornecer uma excelente infraestrutura e um ótimo ambiente para a realização das pesquisas;

À todos os funcionários do IFSC/USP, em especial a Ricardo Vital e Silvio Athayde pela sua colaboração durante estes anos;

Às agencias de fomento, principalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior, CAPES pela bolsa concedida;

Finalmente, quiero agradecer a todos los que contribuyeron de manera indirecta en este proyecto, principalmente a mi madre Mirella Redín, por todo su esfuerzo y sacrificio para ayudarme a alcanzar mis metas y a todos mis amigos por su apoyo incondicional. Muchas gracias a todos por acompañarme en este viaje!

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001”.

RESUMO

IBÁÑEZ REDÍN, G.G. **Novas estratégias de fabricação de imunossensores sem marcação à base de eletrodos impressos de carbono para a detecção de biomarcadores de câncer.** 2020. 112p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Os imunossensores eletroquímicos sem marcação baseados em eletrodos de carbono impressos por serigrafia são uma ferramenta promissora para a detecção rápida, simples e econômica de biomarcadores de câncer. Porém, apesar do potencial desses dispositivos, algumas limitações, tal como a sua baixa sensibilidade, precisam ser superadas antes de sua adoção como uma tecnologia para análises clínicas. Nesse sentido, neste trabalho foram propostas diferentes estratégias para modificar eletrodos impressos de carbono, visando melhorar o sinal analítico e a área superficial para a imobilização dos anticorpos, que são duas características essenciais para o ótimo desempenho analítico de imunossensores sem marcação. Planteou-se explorar o potencial de aplicação do *carbon black* e das nanopartículas de NiFe_2O_4 , dois nanomateriais de baixo custo e excelentes propriedades eletroquímicas que permanecem relativamente inexplorados na construção de imunossensores eletroquímicos. Em uma primeira abordagem, foi desenvolvido um imunossensor para a detecção do antígeno CA 19-9 utilizando-se eletrodos modificados com filmes compósitos de *carbon black* e dos polieletrólitos polietilenoimina e ácido poliacrílico. O imunossensor apresentou um valor de limite de detecção de $0,07 \text{ U mL}^{-1}$, além de excelente reprodutibilidade de fabricação, estabilidade e seletividade. O dispositivo proposto foi aplicado na determinação de CA 19-9 em amostras de sobrenadante de célula e soro de pacientes com câncer de pâncreas, mostrando boa correlação com imunoensaios comerciais. Na segunda parte deste trabalho, foi fabricado um imunossensor para a detecção da proteína tumoral p53 baseado em eletrodos modificados com filmes de polietilenoimina e nanopartículas de NiFe_2O_4 . O dispositivo apresentou melhores parâmetros analíticos do que a maioria de imunossensores reportados na literatura para a detecção de p53, com um baixo limite de detecção de 5 fg mL^{-1} . Adicionalmente, o imunossensor apresentou excelente seletividade na detecção de p53 em amostras de soro fetal bovino, saliva e sobrenadante de célula. As plataformas propostas neste trabalho combinaram as inúmeras vantagens dos eletrodos impressos com as excelentes propriedades dos nanomateriais estudados, permitindo o desenvolvimento de testes

descartáveis, de baixo custo (<R\$ 4 por análise) e com excelente desempenho analítico que podem ser adaptados para a detecção de diversos marcadores de doenças.

Palavras-chave: Imunossensores eletroquímicos. Eletrodos impressos. Biomarcadores de câncer. *Carbon black*. Nanopartículas de NiFe_2O_4 .

ABSTRACT

IBÁÑEZ REDÍN, G.G. **New strategies for fabrication of label-free electrochemical immunosensors based on printed carbon electrodes for detecting cancer biomarkers.** 2020. 112p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Label-free electrochemical immunosensors based on screen-printed carbon electrodes are a promising tool for performing fast, simple and economical detection of cancer biomarkers. However, despite the potential of these devices, some limitations, such as their low sensitivity, need to be overcome before their widespread use as technology for clinical analysis. Herein, we proposed different strategies to modify screen-printed carbon electrodes, aiming to improve the analytical signal and the surface area for the immobilization of antibodies, which are two essential parameters for reaching good analytical performance in label-free immunosensors. We explored the application potential of carbon black and NiFe_2O_4 nanoparticles, two low-cost nanomaterials with excellent electrochemical properties, which remain relatively unexplored in the construction of electrochemical immunosensors. In a first approach, an immunosensor was developed for detecting the carbohydrate antigen CA 19-9 using electrodes modified with composites of carbon black and the polyelectrolytes polyethyleneimine and polyacrylic acid. The immunosensor exhibited a low detection limit of 0.07 U mL^{-1} , in addition to an excellent fabrication reproducibility, stability and selectivity. The proposed device showed good correlation with commercial immunoassays in the determination of CA 19-9 in cell lysates and human serum samples from pancreatic cancer patients. An immunosensor for detecting the tumor protein p53 was also developed, using electrodes modified with films of polyethyleneimine and NiFe_2O_4 nanoparticles. The analytical parameters of the devices are among the best reported in the literature for determination of p53, with a low detection limit of 5 fg mL^{-1} . Also, the immunosensors showed an excellent selectivity toward p53 detection in fetal bovine serum, saliva and cell lysate samples. The platforms proposed herein combined the numerous advantages of screen-printed electrodes with the excellent properties of the studied nanomaterials, allowing the development of low-cost (<BRL\$ 4/ test) and disposable devices with excellent analytical performance, which can be adapted for the detection of several disease markers.

Key words: Electrochemical immunosensors. Printed electrodes. Cancer biomarkers. Carbon black. NiFe_2O_4 nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1-	Estrutura do CA 19-9	30
Figura 1.2-	Componentes gerais de um biossensor	31
Figura 1.3-	Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico sanduiche.....	33
Figura 1.4 -	Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico sem marcação baseado em processos faradaicos.....	34
Figura 1.5-	Diagramas de Nyquist (A) e voltamogramas (B) típicos de imunossensores sem marcação baseados em EIS e em técnicas voltamétricas de pulso, respectivamente. Gráficos correspondentes a experimentos realizados na ausência (preto) e na presença (laranja) do analito.	35
Figura 1.6-	Representação esquemática da estrutura dos CBs.....	36
Figura 1.7-	Estrutura química do PEI de cadeia ramificada (A) e do (PAA).....	38
Figura 1.8-	Procedimento de fabricação de SPEs utilizando moldes fabricados com tecidos de poliéster. O tecido é colocado em uma tela (1) e coberto com uma emulsão fotossensível que solidifica quando exposta à luz UV (2). A emulsão é mascarada pelas formas do eletrodo e exposta à luz (3). O resíduo não solidificado é lavado (4) e o molde está pronto para o procedimento de impressão (5). A tinta condutora é impressa através do molde no PET (6) para a produção dos eletrodos. Finalmente, os eletrodos são secados no forno (7) e cortados da folha (8).).....	41
Figura 2.1-	Esquema da fabricação dos imunossensores mostrando: os eletrodos impressos (A), a deposição dos filmes de CB e polieletrólitos (B) e a imobilização dos anticorpos (C)	46
Figura 2.2-	(A) Fotografia de um eletrodo fabricado. (B) Imagem de SEM obtida para a superfície do eletrodo de trabalho. (C) Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodos comerciais, para os SPCEs (C) e cinco SPCEs (D).....	49

Figura 2.3-	Estudo da velocidade de varredura de potenciais dos SPCEs em solução $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50\text{-}300 \text{ mVs}^{-1}$	50
Figura 2.4-	Voltamogramas cíclicos para SPCEs modificados com filmes de PAA e CB-PAA (A) e PEI e CB-PEI (B). Experimentos realizados em solução $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$	51
Figura 2.5-	Voltamogramas cíclicos para SPCEs modificados com filmes de PAA e CB-PAA (A) e PEI e CB-PEI (B). Experimentos realizados em solução $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mVs}^{-1}$	52
Figura 2.6-	(A) Medidas de ângulo de contato com água. (B) Diagramas de Nyquist e (C) voltammograms de pulso diferencial para SPCE e SPCE pré-tratado em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V...	53
Figura 2.7-	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os diferentes eletrodos: SPCE, SPCE pré-tratado e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₁ . Experimentos realizados em solução em solução $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.....	54
Figura 2.8-	(A) Voltamogramas de pulso diferencial para eletrodos preparados com: (A) diferentes números de bicamadas depositadas via LbL e (B) I_p vs. número de bicamadas para três eletrodos diferentes; (C) para eletrodos modificados com dispersões de CB-PAA depositadas via DC. (D) Comparação da resposta obtida para eletrodos modificados via LBL e DC. Experimentos realizados em solução $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação =	

	0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.....	56
Figura 2.9-	Proposição do perfil de difusão da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em filmes de CB-polieletrólito. Filmes com poucas bicamadas permitem uma melhor difusão da sonda redox.....	57
Figura 2.10-	(A) Diagramas de Nyquist obtidos para o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ . Gráfico inserido: ampliação em altas frequências. (B) Circuito eletroquímico equivalente, sendo R_s a resistência da solução, R_{tc} a resistência a transferência de carga, C o capacitor e W a impedância de Warburg. Experimentos realizados em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH.....	58
Figura 2.11-	Imagens de SEM obtidas para SPCE-pré-tratados (A-B) e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ (C-D) em diferentes ampliações.....	59
Figura 2.12-	Imagens AFM para SPCE (A) e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ (B) . Efeito da deformação mecânica na resposta eletroquímica do eletrodo modificado (C). Teste de estabilidade eletroquímica do SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ (D).....	60
Figura 2.13-	Espectros de FT-IR para filmes de CB-PEI/CB-PAA antes e depois da imobilização dos anticorpos.....	61
Figura 2.14-	Comparação da resposta eletroquímica obtida no SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ antes e depois da imobilização do anti-CA 19-9 e do bloqueio com BSA. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.....	62
Figura 2.15-	Voltamogramas (A) e curva analítica (B) para eletrodos incubados com diferentes concentrações de CA 19-9 em PBS pH 7 (n=5). (C) estudo de seletividade imunossensor realizado na presença dos interferentes	

	SFB, vimentin e p16. Medidas realizadas em uma solução $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.....	63
Figura 2.16-	Determinação de CA19-9 em amostras de lisado de célula e soro de pacientes com câncer de pâncreas utilizando o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ /Ab/BSA (n=3) e imunoenaios comerciais de ECL.....	66
Figura 3.1-	Representação esquemática da fabricação do imunossensor: (A) deposição sobre a superfície dos SPCEs de filmes LbL com baixa e alta concentração de NPs de $NiFe_2O_4$ e (B) imobilização dos anticorpos anti-p53 e subsequente bloqueio da superfície.....	72
Figura 3.2-	Imagem de SEM das NPs de $NiFe_2O_4$ (A). Histograma de distribuição do diâmetro das NPs (B). Perfil de difração de raios X de pó das NPs de $NiFe_2O_4$ (C). A indexação dos planos cristalográficos e que se refere ao arquivo JCPDS No. 10-0325 para a fase espinélio cúbica de $NiFe_2O_4$	75
Figura 3.3-	Figura 3.3 – Possíveis conformações das moléculas de citrato adsorvidas na superfície das NPs de $NiFe_2O_4$	76
Figura 3.4-	Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtido a partir dos experimentos de DLS para as NPs de $NiFe_2O_4$ e de $NiFe_2O_4$ funcionalizadas	77
Figura 3.5-	Voltamogramas cíclicos para SPCEs e eletrodos modificados com NPs de $NiFe_2O_4$ e de $NiFe_2O_4$ funcionalizadas em uma solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. $v=100 \text{ mV s}^{-1}$	78
Figura 3.6-	Imagens de SEM para SPCE pré-tratado (A), SPCE/PEI (B), SPCE/PEI/NPs A (C-D) e SPCE/PEI/NPs B (E-F).....	80

- Figura 3.7- Diagramas de Nyquist para os eletrodos SPCE/PEI, SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B (A). Curvas de DPV para SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B (B) em uma solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V..... 81
- Figura 3.8- Espectros PM-IRRAS para superfícies de Au modificadas com MUA após a deposição de PEI e NPs funcionalizadas (A) e após a imobilização de anticorpos anti-p53 usando baixa (Au/PEI/NPs-Ab A) e alta (Au/PEI/NPs-Ab-B) concentração de NPs funcionalizadas..... 82
- Figura 3.9- Voltamogramas de pulso diferencial e curvas analíticas (n=3) de detecção de p53 usando os imunossensores SPCE/PEI/NPs-Ab A (A e B) e SPCE/PEI/NPs-Ab B (C e D) em uma solução $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V..... 84
- Figura 3.10- Voltamogramas de pulso diferencial para SPCE/PEI/NPs-Ab A (A) e SPCE/PEI/NPs-Ab B (B) antes (preto) e depois (vermelho) da incubação com p53. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V..... 87
- Figura 3.11- (A) Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de p53 mostrando a faixa de potencial selecionada para as análises dos dados. (B) Projeções de IDMAP para diferentes concentrações de p53. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V..... 89
- Figura 3.12- (A) Voltamogramas de pulso diferencial com potenciais de corrente máxima deslocados. (B) Projeções de IDMAP para diferentes

concentrações de p53. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V..... 90

Figura 3.13- Estudo de seletividade do imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B para a detecção de p53 em matrizes de SFB, sobrenadante de célula e saliva. (A) Resposta do sinal de corrente e (B) gráficos de IDMAP..... 91

Figura 3.14- Determinação de p53 em amostras de saliva dopadas com concentrações conhecidas da proteína..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1-	Estimativa das taxas de incidência e mortalidade para alguns tipos de câncer. *Dados globais do ano 2018. ** Estimativas para cada ano do triênio 2020-2022.....	27
Tabela 1.2-	Biomarcadores de câncer recomendados pela FDA.....	30
Tabela 2.1-	Condições para a deposição dos filmes de CB-polieletrólitos submetidas à otimização e respectivos valores selecionados.....	54
Tabela 2.2-	Atribuição das bandas de FT-IR do espectro na Figura 2.12 para filmes CB-PEI/CB-PAA.....	61
Tabela 2.3-	Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes imunossensores empregados na detecção de CA 19-9.....	65
Tabela 3.1-	Resultados das medidas de DLS e de potencial Zeta para as NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas.....	77
Tabela 3.2-	Comparação das características dos imunossensores SPCE/PEI/NPs-Ab A e SPCE/PEI/NPs-Ab B.....	85
Tabela 3.3-	Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes imunossensores para a detecção de p53. *Valores calculados considerando-se a massa molar de p53 como 43,7 kDa 146.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab – Anticorpo (*antibody*)

AFM – Microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*)

BRCA – Gene do câncer de mama (*breast cancer gene*)

BSA –Albumina de soro (*bovine serum albumin*)

CA 125 –Antígeno carboidrato 125 (*carbohydrate antigen 125*)

CA 15-3 – Antígeno carboidrato 15-3 (*carbohydrate antigen 15-3*)

CA 19-9 – Antígeno carboidrato 19-9 (*carbohydrate antigen 19-9*)

CB – Negro de fumo (*carbon black*)

CEA – Antígeno carcinoembrionário (*carcinoembryonic antigen*)

CNO – Nanocebolos de carbono (*carbon nanonions*)

CNT – Nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*)

CPE –Elemento de fase constante (*constant phase element*)

DC – *Drop-casting*

DLS – Espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*)

DNA – Ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry*)

ECL – Eletroquimioluminescência (*electrochemiluminescence*)

EDC – 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*)

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

FDA – *Food Drug Administration*

FT-IR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

GCE – Eletrodo de carbon vítreo (*glassy carbon electrode*)

GO – Óxido de grafeno (*graphene oxide*)

GQDs: *Quantum dots* de grafeno (*graphene quantum dots*)

HER – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor*)

HRP – Peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*)

IARC – Agência internacional de pesquisa do câncer (*International agency for research on cancer*)

IDE – Eletrodos interdigitados (*interdigitated electrode*)

IDH – Índice de desenvolvimento humano

IDMAP – Mapas de documentos interativos (*interactive document map*)

INCA– Instituto nacional de câncer

I_{pa} – Corrente de pico anódica

ITO – Óxido de índio e estanho (*indium tin oxide*)

JCPDS – *Joint committee on powder diffraction standards*

LbL – *Layer-by-layer*

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (*liquid chromatography–mass spectrometry*)

LD – Limite de detecção

MUA – Ácido mercaptoundecanoico (*mercaptoundecanoic acid*)

MWCNT – Nanotubos de carbon de parede multipla (*Multiwalled carbon nanotubes*)

NCs – Nanocallandras

NHS – N-hidroxissuccinimida

NPs – Nanopartículas

p16 – Proteína supressora de tumores p16

p53 – Proteína p53

PAA – Ácido poliacrílico (*poly acrylic acid*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PEI – Polietilenoimina (*polyethyleneimine*)

PET – Tereftalato de polietileno (*polyethylene terephthalate*)

PGMA – Poli(glicidilmetacrilato)

PLA – Fibras de ácido polilático (*polylactic acid fibers*)

PM-IRRAS – Espectroscopia de infravermelho com modulação da polarização (*polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy*)

PPPD – poli (N, N-difenil-p-fenilediamina) (*poly(N,N'-diphenyl-p-phenyldiamine)*)

PSA – Antígeno prostático específico (*prostate specific antigen*)

PThi – Politionina (*polythionine*)

PVC – Policloreto de vinila (*polyvinyl chloride*)

QCM – Microbalança de cristal de quartzo (*quartz crystal microbalance*)

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

Rs – Resistência da solução

RSD – Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)

Rtc–Resistência à transferência de carga

SEM – Microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*)

SFB – Soro fetal bovino

SPCE – Eletrodos de carbono impressos por serigrafia (*screen-printed carbon electrodes*)

SPE – Eletrodos impressos por serigrafia (*screen-printed electrodes*)

SPIDE – Eletrodos interdigitados impressos por serigrafia (*screen-printed interdigitated electrodes*)

SWV – Voltametria de onda quadrada (*square wave voltammetry*)

W – Impedância de Warburg

XRD – Difração de raios X (*X ray diffraction*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 A problemática do câncer	27
1.2 Biomarcadores e câncer.....	28
1.3 Biossensores eletroquímicos e detecção de biomarcadores de câncer	31
1.4 <i>Carbon black</i>	36
1.5 Nanopartículas de NiFe_2O_4	38
1.6 Eletrodos impressos e desenvolvimento de biossensores descartáveis de baixo custo	39
2 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO COM FILMES DE CARBON BLACK E POLIELETRÓLITOS PARA A DETERMINAÇÃO DO ANTÍGENO CARBOIDRATO 19-9.....	43
2.1 Motivação e objetivos.....	43
2.2 Materiais e métodos.....	44
2.2.1 Materiais e reagentes	44
2.2.2 Fabricação dos eletrodos impressos	44
2.2.3 Modificação dos SPCEs	44
2.2.4 Imobilização do anticorpo anti-CA 19-9 e fabricação dos imunossensores.....	45
2.2.5 Medidas eletroquímicas e construção das curvas analíticas	46
2.2.6 Determinação de CA 19-9 em amostras de célula e soro sanguíneo.....	47
2.2.7 Caracterizações	48
2.3 Resultados e discussão	48
2.3.1 Caracterização dos SPCEs e do CB Vulcan XC-72	48
2.3.2 Resposta eletroquímica dos SPCEs modificados com compósitos CB-polieletrólitos ...	51
2.3.3 Deposição LbL dos filmes de CB-polieletrólitos nos SPCEs.....	52
2.3.4 Preparação do imunossensor SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ /Ab/BSA	60
2.3.5 Desempenho analítico do imunossensor SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ /Ab/BSA.....	62

2.3.6 Aplicação do SPCE/(CB-PEI/CB-PAA) ₂ /Ab/BSA na determinação de CA 19-9 em amostras de soro e sobrenadante de célula	66
2.4 Conclusões	67
2.5 Publicações relacionadas.....	67
3 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO COM FILMES DE POLIETILENOIMINA E NANOPARTÍCULAS DE NiFe ₂ O ₄ FUNCIONALIZADAS PARA A DETECÇÃO DA PROTEÍNA TUMORAL P53	69
3.1 Motivação e objetivos	69
3.2 Materiais e métodos	69
3.2.1 Materiais e reagentes.....	69
3.2.2 Fabricação dos eletrodos impressos	70
3.2.3 Sínteses e funcionalização das NPs de NiFe ₂ O ₄	70
3.2.4 Modificação dos SPCEs.....	70
3.2.5 Imobilização do anticorpo anti-p53 e fabricação dos imunossensores	71
3.2.6 Medidas eletroquímicas e construção da curva analítica	72
3.2.7 Caracterizações	73
3.2.8 Tratamento das amostras analisadas	74
3.2.9 Métodos de visualização de informação	74
3.3 Resultados e discussão	75
3.3.1 Caracterização das NPs de NiFe ₂ O ₄ e de NiFe ₂ O ₄ funcionalizadas.....	75
3.3.2 Resposta eletroquímica dos SPCEs modificados com NPs de NiFe ₂ O ₄ e de NiFe ₂ O ₄ funcionalizadas	77
3.3.3 Caracterização dos eletrodos modificados com filmes de PEI e NPs de NiFe ₂ O ₄ funcionalizadas	79
3.3.4 Imobilização dos anticorpos anti-p53	81
3.3.5 Detecção de p53 em soluções padrão	82
3.3.6 Processamento de dados utilizando métodos de visualização	87

3.3.7 Seletividade do imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B	90
3.3.8 Aplicação do SPCE/PEI/NPs-Ab B na detecção de p53 em amostras de saliva.....	92
3.4 Conclusões.....	93
3.5 Publicações relacionadas	93
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 A problemática do câncer

Câncer é o termo utilizado para definir um conjunto de quase 200 enfermidades caracterizadas pelo crescimento descontrolado e anormal de células e que pode levar à formação de tumores.¹ Embora não sejam conhecidas as causas concretas que levam ao desenvolvimento da enfermidade, existem diferentes fatores de risco, tanto internos, quanto externos, tais como radiação, microrganismos infecciosos, tabaco, mutações genéticas e problemas hormonais.¹ O conjunto dos diferentes tipos de enfermidades conhecidas como câncer é a principal causa de morte na maioria dos países com índice de desenvolvimento humano (IDH) alto ou muito alto, incluindo-se o Canadá, os Estados Unidos da América (EUA) e a maioria dos países europeus. Em países como Brasil e China, as causas de mortes por câncer são as segundas mais comuns, sendo superadas somente por aquelas ocasionadas por doenças cardiovasculares.² Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), o número de mortes por câncer no mundo foi de aproximadamente 9,5 milhões em 2018 e estima-se que em 2040 vai aumentar para 16,3 milhões.³

Na Tabela 1.1 são comparados os tipos de câncer com maior taxa de incidência e mortalidade no mundo e no Brasil, de acordo com os dados do IARC⁴ e do Instituto Nacional de Câncer (INCA).⁵ Vale ressaltar que, embora há uma grande incidência global do câncer de mama e próstata, estes apresentam relativamente baixas taxas de mortalidade se comparados a outros tipos de câncer menos frequentes, tal como de fígado (841080 novos casos por ano).⁴ Isto se deve, em parte, ao grande investimento em estratégias e campanhas de conscientização visando a prevenção e o diagnóstico precoce.

Tabela 1.1- Estimativa das taxas de incidência e mortalidade para alguns tipos de câncer. *Dados globais do ano 2018. ** Estimativas para cada ano do triênio 2020-2022.

Posição	Estimativa global*		Estimativa de incidência no
	Incidência (Nº de novos casos)	Mortes (Nº de mortes)	Brasil** (Nº de novos casos)
1º	Pulmão 2 093 876	Pulmão 1 761 007	Mama 66 280
2º	Mama 2 088 849	Estômago 782 685	Próstata 65 840
3º	Cólon e reto 1 400 000	Fígado 781 631	Cólon e reto 40 990
4º	Próstata 1 276 106	Mama 626 679	Pulmão 30 200

Fonte: Elaborada pela autora a partir de dados do IARC⁴ e do INCA.⁵

Em muitos casos, a detecção do câncer em suas etapas iniciais pode facilitar a escolha de tratamentos adequados, aumentando assim as probabilidades de sobrevivência dos pacientes. Para o câncer de cólon e reto, por exemplo, a taxa de mortalidade em países com IDH muito alto tem diminuído significativamente nos últimos anos devido à adoção de melhores práticas para a detecção precoce. Em contrapartida, houve um aumento significativo no número de mortes associadas a esse mesmo câncer em países em desenvolvimento, nos quais a infraestrutura de saúde é limitada e a possibilidade de detecção precoce é menor.⁶ Embora alguns dos métodos mais comumente empregados no diagnóstico da doença envolvem técnicas de imagem, tais como ressonância magnética, tomografia de emissão de pósitrons e ultrassom,⁷ a detecção e a quantificação de biomarcadores representam uma estratégia importante para o diagnóstico em etapas iniciais e na estimativa de fatores de risco.⁸

1.2 Biomarcadores e câncer

Os biomarcadores são definidos como *“substâncias que sendo medidas podem indicar a presença de processos biológicos (normais ou anormais) ou a resposta farmacológica a intervenções terapêuticas”*.⁹ A presença e as mudanças nos níveis de concentração de algumas destas substâncias podem se relacionar ao aparecimento de enfermidades, dentre elas o câncer.¹⁰ Em particular, existem muitas biomoléculas utilizadas como biomarcadores de câncer, incluindo os ácidos nucleicos (DNA e RNA), proteínas (enzimas, receptores, anticorpos, etc.), hormônios e peptídeos, dentre outros.¹ Estas moléculas podem ser detectadas em diferentes tipos de fluidos, tais como sangue, urina, saliva, soro sanguíneo e plasma,⁸ sem a necessidade de procedimentos invasivos e dolorosos, tal como a biopsia.

O câncer é o resultado de diferentes alterações, tanto genéticas quanto epigenéticas, nas etapas de evolução celular e que promovem a expressão anômala de genes, contribuindo assim nas diferentes etapas do desenvolvimento da enfermidade.¹¹ Isto tem sido aplicado na identificação de mutações que podem ser utilizadas como biomarcadores na avaliação de risco de contrair a enfermidade e no diagnóstico precoce. Alguns exemplos de mutações genéticas utilizadas na avaliação de risco são as apresentadas pelos genes BRCA 1 e BRCA 2, que podem aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama e câncer de ovário. Estudos recentes revelam que ao redor de 72% de mulheres com mutações no gene BRCA 1 podem apresentar câncer de mama antes dos 80 anos.¹²

As mutações nos genes supressores de tumores, tais como o p53, estão diretamente relacionadas ao processo de carcinogênese e são também utilizadas como biomarcadores de

câncer. O gene p53, também conhecido como o “guardião do genoma”, expressa a proteína supressora de tumores p53, que está envolvida em diversos processos fundamentais para manter a integridade genética da célula. Estes incluem a regulação do crescimento celular, prevenção do acúmulo de mutações no DNA e a indução da morte celular em resposta a sinais de estresse.¹³ As mutações no gene p53 são uma das alterações genéticas específicas mais comumente encontradas no câncer, estando presentes em aproximadamente 50% dos tumores humanos.¹⁴ Muitas destas mutações estão relacionadas ao acúmulo da proteína mutada no núcleo das células tumorais e, conseqüentemente, ao aumento das concentrações nos fluidos extracelulares como sangue, urina e saliva.^{15,16} Portanto, a quantificação da proteína p53 em diferentes matrizes pode ser útil para o diagnóstico e monitoramento de vários tipos de câncer.¹⁷ Por exemplo, o aumento nas concentrações de p53 em saliva tem sido relacionado ao câncer da cavidade oral, tal como o carcinoma oral de células escamosas.¹⁸

Uma característica das células tumorais é o surgimento de alterações nos polissacarídeos e glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) presentes na membrana celular, que cumprem papéis importantes na regulação da proliferação dos tumores, metástases e angiogênese.¹⁹ Mudanças, como a glicosilação aberrante das proteínas de membrana e a superexpressão de alguns polissacarídeos e glicoconjugados, são comumente observadas em diversos tipos de câncer e podem ser utilizadas como biomarcadores da doença.²⁰ O antígeno carboidrato 19-9 (CA 19-9, *Carbohydrate Antigen 19-9*), por exemplo, é o biomarcador mais recomendado pela *Food Drug Administration* (FDA) para o monitoramento do câncer de pâncreas. O CA 19-9, também conhecido como antígeno Syalyl Lewis^A, é um tetrasacarídeo sintetizado por células do pâncreas, ducto biliar e dos epitélios gástrico, endometrial, salivar e do cólon.²¹ Em condições normais, o CA 19-9 se encontra em baixas concentrações no sangue formando complexos com diferentes proteínas, incluindo mucinas, o antígeno carcinoembrionário (CEA, *carcinoembryonic antigen*) e apolipoproteínas.²² Incrementos nas concentrações de CA 19-9 no sangue e tecidos têm sido observados em pacientes com câncer colorretal, gástrico, de pâncreas e de mama e doenças inflamatórias como pancreatite. Na Figura 1.1 é apresentada a estrutura do CA 19-9.

Figura 1.1- Estrutura do CA 19-9.
Fonte: Adaptada de GALLI *et al.*²³

Além do CA 19-9 e do p53, que foram as moléculas estudadas neste trabalho, diferentes biomarcadores têm sido descritos na literatura. A quantificação desses biomarcadores é utilizada em vários tipos de amostra na rotina clínica para triagem, diagnóstico, prognóstico, escolha do tratamento e monitoramento da resposta dos pacientes aos tratamentos. Na Tabela 1.2 são apresentados diferentes biomarcadores aprovados pela FDA e alguns dos tipos de câncer com os quais têm sido associados.²⁴

Tabela 1.2- Biomarcadores de câncer recomendados pela FDA.

Biomarcadores	Tipo de molécula	Tipos de câncer associados	Uso clínico
PSA	Proteína	Próstata	Triagem e monitoramento
HER 2	Proteína	Mama	Monitoramento
HER 2/NEU	DNA	Mama	Prognóstico e escolha do tratamento
CA 15-3	Glicoproteína	Mama	Monitoramento
CEA	Proteína	Colón	Monitoramento
EGFR	Proteína	Colón	Monitoramento
CA 125	Glicoproteína	Ovário	Monitoramento

PSA: antígeno prostático específico, HER 2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, CA 15-3: antígeno carboidrato 15-3, CEA: antígeno carcinoembrionário, EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico, CA 125: antígeno carboidrato 125.

Fonte: Adaptada de DIXIT *et al.*²⁴

Devido ao grande potencial de análise de biomarcadores, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, sensíveis e, principalmente, viáveis economicamente e que permitam a detecção e quantificação com grande seletividade. Atualmente, os métodos convencionais para a detecção e determinação de biomarcadores envolvem o uso de técnicas como imuno-histoquímica, ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*), imunoenaios baseados em

eletroquimioluminescência (ECL, *electrochemiluminescence*) e cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS, *Liquid chromatography–mass spectrometry*) para marcadores proteicos e reação em cadeia da polimerase para ácidos nucleicos (PCR, *polymerase chain reaction*). Muito embora a maioria destes métodos apresente bons resultados analíticos, eles são predominantemente demorados e exigem grandes quantidades de amostras, muitas etapas técnicas, o uso de equipamentos sofisticados e especialistas técnicos, características essas que impedem aplicações do tipo point-of-care.²⁴ Isso tem motivado o interesse em metodologias mais simples e econômicas para a detecção e quantificação de biomarcadores, incluindo o preparo de biossensores eletroquímicos, cujo princípio de funcionamento será descrito na seção seguinte.

1.3 Biossensores eletroquímicos e detecção de biomarcadores de câncer

Os biossensores são dispositivos que utilizam um material biológico como elemento de reconhecimento (enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, células, etc) em contato com um transdutor de sinais que converte um sinal biológico em um sinal quantificável.²⁵ A vantagem destes dispositivos consiste na seletividade proporcionada pela interação entre o componente biológico e a espécie a ser detectada (interações enzima-substrato, hibridação de fitas complementares de DNA, etc). Dependendo da especificidade desta interação, é possível a detecção de um analito, mesmo que em uma matriz complexa. Segundo o tipo de transdutor de sinais e do elemento de reconhecimento, os biossensores podem se classificar em diferentes tipos.²⁶ Na Figura 1.2 são apresentados os componentes gerais dos biossensores e a sua classificação.

Figura 1.2- Componentes gerais de um biossensor.
Fonte: Elaborada pela autora.

Ao longo dos anos, os biossensores eletroquímicos foram os mais utilizados devido às suas inúmeras vantagens, dentre as quais se destacam: rapidez, grande sensibilidade, menor custo e maior facilidade de operação dos equipamentos. Adicionalmente, como os processos eletroquímicos relevantes ocorrem na interface eletrodo/solução, é possível trabalhar com pequenas quantidades de amostra, o que é de grande importância para aplicações em análises clínicas e em procedimentos do tipo point-of-care.²⁷ Dependendo do tipo de técnica utilizada, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados em: condutimétricos, potenciométricos, impedimétricos, amperométricos ou voltamétricos, sendo os dois últimos os mais utilizados.¹ Diferentes biossensores eletroquímicos para a detecção de biomarcadores de câncer têm sido desenvolvidos. Eles combinam a vantagem da sensibilidade, proporcionada pelo uso de nanomateriais, e possibilidades de se trabalhar com diferentes estratégias de reconhecimento, dentre as quais se destacam as interações antígeno-anticorpo.

Os anticorpos são glicoproteínas pertencentes à família das imunoglobulinas, cuja interação específica com os antígenos é a base da operação dos imunossensores. Nestes, as mudanças ocasionadas por esta interação são medidas e transformadas em um sinal analítico quantificável²⁷ e podem ser monitoradas por meio de duas estratégias diferentes: com ou sem marcação. Desde as primeiras pesquisas envolvendo imunossensores eletroquímicos com marcação,²⁸ eles se mostraram promissores para a detecção de biomarcadores de câncer.²⁹ Na Figura 1.3 ilustra-se o princípio de funcionamento dos imunossensores eletroquímicos com marcação do tipo sanduíche, no qual o elemento de reconhecimento geralmente é um anticorpo primário imobilizado na superfície do eletrodo. Após a incubação com o antígeno, ou a amostra, um segundo anticorpo conjugado é adicionado com um marcador. Este marcador (enzimas, moléculas redox, nanopartículas, etc) é utilizado na geração de um sinal eletroquímico proporcional à concentração do antígeno, permitindo a sua quantificação indireta.

Figura 1.3- Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico sanduíche.
Fonte: Elaborada pela autora.

Ao longo dos anos, os avanços na área de nanotecnologia têm contribuído para o desenvolvimento de um grande número de imunossensores tipo sanduíche na detecção de biomarcadores de câncer. Estes dispositivos exploram a grande área superficial dos nanomateriais, tais como nanotubos de carbono,³⁰ grafeno³¹ e nanopartículas³² no desenvolvimento de estratégias de amplificação que resultam em dispositivos ultrasensíveis e de baixos limites de detecção.⁹ Nesse contexto, MANI e colaboradores³³ desenvolveram um imunossensor para a detecção de PSA utilizando anticorpos secundários conjugados com nanopartículas magnéticas marcadas com a enzima peroxidase. Este dispositivo apresentou melhoras na sensibilidade e no limite de detecção de 1700 e 2000 vezes, respectivamente, quando comparado ao dispositivo fabricado sem o uso das nanopartículas. Porém, os imunossensores com marcação apresentam algumas desvantagens: a grande quantidade de etapas no processo de medidas e a necessidade de se utilizar anticorpos secundários marcados, que aumentam os custos e dificultam as análises na área clínica.

Os imunossensores eletroquímicos sem marcação são uma alternativa mais rápida, simples e econômica para a detecção direta de biomarcadores de câncer. O funcionamento destes dispositivos pode estar baseado no monitoramento de processos faradaicos ou não faradaicos. Nos imunossensores sem marcação não faradaicos, são registradas alterações na dupla camada elétrica devido à formação do complexo antígeno-anticorpo.³⁴ Estes dispositivos são normalmente baseados em resultados de capacitância e de impedância elétrica e apresentam vantagens como a possibilidade de detecção dos analitos sem a necessidade de se utilizar reagentes adicionais, porém com baixa sensibilidade.³⁵ Por outro lado, como apresentado na Figura 1.4, a formação do complexo antígeno-anticorpo em imunossensores sem marcação baseados em medidas faradaicas deve ser monitorada a partir da medida da resposta eletroquímica de uma espécie redox, que pode estar em solução ou

imobilizada na superfície. A adsorção do antígeno na superfície do eletrodo ocasiona mudanças nas propriedades eletroquímicas do sistema que podem ser monitoradas a partir de diferentes técnicas eletroquímicas, sem a necessidade de se utilizar anticorpos secundários ou enzimas.

Figura 1.4- Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico sem marcação baseado em processos faradaicos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas no desenvolvimento de imunossensores sem marcação faradaicos, destacam-se a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, *electrochemical impedance spectroscopy*) e técnicas voltamétricas de pulso: voltametria de pulso diferencial (DPV, *differential pulse voltammetry*) e voltametria de onda quadrada (SWV, *square wave voltammetry*). Tipicamente, tanto nos sensores voltamétricos quanto nos impedimétricos, o comportamento de uma sonda redox padrão como o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ pode ser analisado antes e depois da incubação com diferentes concentrações do analito. Geralmente, a maioria de moléculas analisadas neste tipo de sensores (proteínas e glicoproteínas) é de natureza isolante e a sua adsorção na superfície do eletrodo bloqueia a transferência de elétrons entre a sonda redox e o eletrodo. Esse bloqueio é refletido no aumento da resistência à transferência de carga (R_{tc}) nos diagramas de Nyquist e na diminuição do sinal de corrente nos sensores impedimétricos e voltamétricos, respectivamente. Na Figura 1.5 são apresentadas as respostas típicas de sensores impedimétricos (A) e voltamétricos (B) na ausência e presença do analito.

Figura 1.5- Diagramas de Nyquist (A) e voltamogramas (B) típicos de imunossensores sem marcação baseados em EIS e em técnicas voltamétricas de pulso, respectivamente. Gráficos correspondentes a experimentos realizados na ausência (preto) e na presença (laranja) do analito.

Fonte: Elaborada pela autora.

Embora os imunossensores tipo sanduíche apresentem maior sensibilidade como resultado das diferentes estratégias de amplificação, o uso de nanomateriais tem permitido o desenvolvimento de grande número de dispositivos sem marcação com excelentes respostas analíticas. Nos imunossensores baseados em técnicas voltamétricas, como os estudados neste trabalho, a modificação da superfície dos eletrodos com nanomateriais condutores com grande área superficial e estáveis é uma abordagem que permite melhorar o sinal analítico (corrente) do dispositivo e/ou introduzir grupos funcionais para favorecer a imobilização das biomoléculas. Ambas as propriedades são importantes para o ótimo desempenho dos dispositivos, já que é possível melhorar parâmetros analíticos do método como a sensibilidade aumentando o sinal de corrente. Além disto, a imobilização dos anticorpos pode influenciar notavelmente a estabilidade dos sensores.³⁶ Atualmente, materiais tais como grafeno,³⁷ nanotubos de carbono,³⁸ *quantum dots*,³⁹ dentre outros, estão sendo amplamente utilizados na fabricação de imunossensores eletroquímicos sem marcação. Um exemplo deste tipo de imunossensor é o fabricado por WANG e colaboradores⁴⁰ para a detecção do CEA. O dispositivo baseado em nanocompósitos de óxido de grafeno reduzido, dissulfeto de molibdênio e nanopartículas (NPs) de Ag apresentou um limite de detecção de $1,6 \text{ fg mL}^{-1}$, que é menor do que o reportado em trabalhos anteriores utilizando-se imunossensores do tipo sanduíche.

Além de melhorar as respostas analíticas dos dispositivos, os materiais ideais para a fabricação de imunossensores eletroquímicos devem ser preferencialmente econômicos, facilmente manipuláveis e obtidos a partir de procedimentos sintéticos simples e escaláveis para a produção em massa. Embora atendam a estes requisitos, materiais como *carbon black* (CB) e NPs de NiFe_2O_4 permanecem relativamente inexplorados como modificadores de

eletrodos para a construção de imunossensores eletroquímicos. Assim, neste trabalho, foi estudado o potencial de aplicação de ambos materiais no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos sem marcação na detecção de biomarcadores de câncer. As principais características do CB e das NPs de NiFe_2O_4 , assim como as suas aplicações em eletroanálise, serão abordadas nas seções 1.4 e 1.5, respectivamente.

1.4 Carbon black

A partir do trabalho de ARDUINI e colaboradores de 2010⁴¹ houve um crescente interesse na utilização do CB para a construção de eletrodos para aplicações eletroanalíticas. Em parte esse interesse se deve ao relativamente baixo custo (1 kg/euro),⁴² grande relação área/volume e, principalmente, excelentes propriedades eletroquímicas, que são comparáveis e, em alguns casos, superiores às de materiais tais como nanotubos de carbono, óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido.⁴³ Os CBs são um conjunto de materiais de carbono produzidos a partir da combustão ou decomposição térmica de derivados de petróleo⁴⁴ e amplamente utilizados em diferentes tipos de aplicações industriais, principalmente na de borracha para fabricação de pneus de automóveis. A estrutura destes materiais é caracterizada pela presença de partículas esféricas com diâmetros entre 3 a 100 nm e que formam agregados e aglomerados de maior tamanho.⁴⁵ Na Figura 1.6 pode ser observada a estrutura do CB.

Figura 1.6- Representação esquemática da estrutura dos CBs.
Fonte: Elaborada pela autora.

Além do baixo custo e das boas propriedades eletroquímicas, o CB apresenta uma boa dispersabilidade em matrizes poliméricas e alguns solventes orgânicos, o que facilita a sua utilização no desenvolvimento de filmes nanoestruturados para a modificação de superfícies.⁴⁵

Todas estas propriedades, somadas à estrutura porosa do material, facilitam a ancoragem de nanopartículas metálicas,⁴⁶ que podem ser utilizadas na imobilização de biomoléculas⁴⁷ e permitem com que o número de pesquisas utilizando CB para sensores e biossensores seja cada vez maior.⁴⁸ Vários tipos de CBs, tais como o N220 e o Vulcan XC 72, têm sido amplamente usados em sensores para a determinação de compostos fenólicos,⁴⁹ íons cloreto,⁵⁰ fosfatos⁵¹ e fármacos⁵² e em biossensores enzimáticos destinados principalmente à detecção de pesticidas^{53,54} e fenóis.^{47,55} Por outro lado, as aplicações de CB em biossensores de afinidade são ainda consideravelmente menores. Os primeiros trabalhos reportados na literatura utilizaram moléculas de ácidos nucleicos como bioreceptores. Por exemplo, compósitos de *acetylene black* e NPs de Au têm sido combinados com nanofolhas de sulfeto de cobre⁵⁶ e disulfeto de tungstênio⁵⁷ na construção de genossensores eletroquímicos. Aptassensores baseados em CB também têm sido desenvolvidos e aplicados na detecção de metais pesados⁵⁸ e antibióticos.⁵⁹

No que se refere aos imunossensores eletroquímicos, compósitos de CB e polímeros como quitosana,⁶⁰ polipirrol⁶¹ e poli(glicidilmetacrilato)^{62,63} foram utilizados na modificação de eletrodos de óxido de índio e estanho (ITO, *indium tin oxide*) para a detecção dos biomarcadores p53,⁶⁰ Interleucina (IL) 1,⁶² IL6⁶¹ e IL8.⁶³ Em todos estes dispositivos, os filmes compósitos foram depositados sobre eletrodos de ITO e, posteriormente, os anticorpos específicos para o reconhecimento dos biomarcadores foram imobilizados por meio de ligações com os grupos funcionais presentes nos polímeros. Estes imunossensores, baseados em medidas de EIS, apresentaram bom desempenho analítico para a detecção das biomoléculas em diferentes matrizes biológicas.

No desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, a deposição dos nanomateriais na superfície dos eletrodos é um processo fundamental com implicações em propriedades dos dispositivos como estabilidade, desempenho analítico e reprodutibilidade.³⁶ Atualmente, o método por excelência utilizado na fabricação de filmes de CB sobre a superfície de eletrodos é a deposição por *drop-casting* (DC).^{48,64} Alguns trabalhos têm descrito o uso de métodos de deposição alternativos como *spin-coating*⁶⁰⁻⁶³ e *slot-die*.⁶⁵ Porém, metodologias tipicamente utilizadas na fabricação de filmes nanoestruturados, tal como a deposição *layer-by-layer* (LbL), permanecem relativamente inexploradas.

A técnica LbL é interessante por possibilitar a fabricação de filmes finos sobre qualquer tipo de substrato por meio de interação eletrostática e ligações de hidrogênio entre materiais carregados.⁶⁶ Por exemplo, JAN e colaboradores⁶⁷ depositaram filmes de compósitos de CB e polieletrólitos sobre substratos de tereftalato de polietileno (PET,

polyethylene terephthalate) utilizando LbL. Os polieletrólitos polietilenoimina (PEI, *polyethylenimine*) e ácido poliacrílico (PAA, *poly acrylic acid*) (Figura 1.7) foram utilizados como matrizes para dispersar o CB, e camadas alternadas dos filmes foram depositados sobre superfícies de PET previamente tratadas com plasma de oxigênio. Esta abordagem permitiu a fabricação de filmes nanoestruturados flexíveis, condutivos e com grande quantidade de grupos funcionais que podem ser utilizados na imobilização covalente de biomoléculas.

Figura 1.7- Estrutura química do PEI de cadeia ramificada (A) e do (PAA).
Fonte: Elaborada pela autora.

Neste trabalho, o potencial dos filmes de CB e polieletrólitos depositados por LbL para aplicações em imunossensores eletroquímicos sem marcação foi explorado pela primeira vez.

1.5 Nanopartículas de NiFe_2O_4

As pesquisas na área de biossensores eletroquímicos, assim como a biotecnologia em geral, têm se beneficiado enormemente com os avanços na área de nanotecnologia. O desenvolvimento de estratégias sintéticas com alto controle sobre a forma e o tamanho tem permitido a preparação de um grande número de nanoestruturas com propriedades elétricas, eletrônicas, magnéticas, químicas e ópticas interessantes para diferentes aplicações.⁶⁸ Particularmente, quando utilizadas na modificação de eletrodos, muitas destas nanoestruturas conseguem melhorar a transferência eletrônica e/ou influenciar o transporte de massa, o que resulta em métodos com melhores parâmetros analíticos.⁶⁹

Dentre as diferentes nanoestruturas, as NPs de metais como Au, Ag e Pt têm sido mais comumente utilizadas em dispositivos eletroquímicos devido a sua condutividade e propriedades eletrocatalíticas frente a diferentes compostos.⁷⁰⁻⁷² No entanto, o elevado custo dos metais nobres tem motivado pesquisas em materiais alternativos de maior abundância e menor custo, dentro os quais se destacam as NPs magnéticas de óxidos de ferro.⁷³ O uso de

NPs magnéticas de óxidos de ferro em aplicações biomédicas tem-se tornado cada vez mais comum devido às interessantes propriedades destes materiais, que incluem magnetismo e facilidade de sínteses e de funcionalização da superfície.⁷⁴

Dentre as diferentes NPs magnéticas de óxidos de ferro, destacam-se as ferritas com fórmula geral MFe_2O_4 , sendo M geralmente um metal divalente (Ni, Zn, Co, entre outros), que apresentam atividade catalítica frente às reações de oxidação de H_2O_2 e de evolução de oxigênio.⁷³ Particularmente, as NPs de $NiFe_2O_4$ têm sido amplamente utilizadas em sensores eletroquímicos baseados em eletrodos de carbono vítreo (GCE, *glassy carbon electrode*)⁷⁵⁻⁷⁷ e de pasta de carbono⁷⁸⁻⁸⁰ para a determinação de fármacos,^{75,77,78} neurotransmissores,⁷⁶ bases nitrogenadas,⁷⁹ nitrito⁸⁰ e corantes,⁸¹ assim como em biossensores enzimáticos para análises de glicose.⁸²

Além das vantagens citadas, a grande área superficial das NPs de $NiFe_2O_4$ e a facilidade de funcionalização da superfície fazem com que este material seja particularmente interessante para aplicação em biossensores de afinidade. No entanto, poucos são os trabalhos na literatura sobre o seu uso para a modificação de eletrodos em imunossensores eletroquímicos. Nesse contexto, SUN e colaboradores desenvolveram um imunossensor para a detecção do biomarcador alfa-fetoproteína utilizando NPs de $NiFe_2O_4$ recobertas com aminopropiltriétoxissilano. As NPs foram utilizadas para modificar eletrodos de pasta de carbono e os sensores foram aplicados na detecção da alfa-fetoproteína em amostras de soro por meio de medidas potenciométricas.⁸³ Mais recentemente, DEVI e colaboradores⁸⁴ desenvolveram um sensor para a determinação do peptídeo beta amiloide em fluido cerebrospinal utilizando GCE modificados com compósitos de NPs de $NiFe_2O_4$, AuNPs e óxido de grafeno.

1.6 Eletrodos impressos e desenvolvimento de biossensores descartáveis de baixo custo

Um aspecto importante a ser considerado no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é o eletrodo, pois é o responsável pela conversão da resposta biológica em um sinal quantificável. Assim, propriedades como tamanho, forma, dimensões, materiais e estrutura da superfície acabam influenciando notavelmente o desempenho dos dispositivos.²⁴ Nos últimos anos, foi desenvolvido um grande número de imunossensores eletroquímicos para detecção de biomarcadores de câncer baseados em eletrodos descartáveis de baixo custo.⁸⁵⁻⁸⁷ Estes dispositivos são produzidos sobre diferentes tipos de substratos utilizando-se diferentes técnicas de fabricação, dentre as quais se destacam: a impressão por jato de tinta

(*ink-jet printing*)⁸⁸ e a impressão por serigrafia (*screen-printing*).⁸⁹ Nesse contexto, CARVAJAL e colaboradores desenvolveram um dispositivo microfluídico para a determinação do biomarcador de câncer de mama HER-2 por impressão por jato de tinta.⁹⁰ O dispositivo, com um custo de fabricação de 0,25 USD por peça, permitiu a detecção do biomarcador com um limite de detecção de 12 pg mL⁻¹.

Em particular, os eletrodos impressos por serigrafia (SPE, *screen-printed electrodes*) têm impulsionado notavelmente os avanços nas pesquisas na área de biossensores. Desde os anos 90, estes dispositivos têm adquirido grande destaque devido à possibilidade de serem fabricados em diferentes configurações, materiais e tamanhos, facilitando a projeção de biossensores miniaturizados e mais econômicos.⁸⁹ Isto é de grande relevância para aplicações em análises clínicas, nas quais são necessários dispositivos descartáveis. Neste caso, eles não requerem de etapas de polimento e regeneração da superfície e permitam com que se trabalhe com baixos volumes de amostra.⁹ Os SPEs podem ser obtidos comercialmente ou fabricados em laboratórios de pesquisa a partir de procedimentos simples, o que permite uma maior liberdade na escolha dos materiais e configurações.

Na Figura 1.8 é apresentado um esquema do procedimento de fabricação dos SPEs. Em termos gerais o processo consiste na impressão de tintas condutoras na superfície de um substrato utilizando um molde geralmente fabricado com um tecido ultrafino de poliéster recoberto com uma resina fotossensível. A tinta, que toma a forma do molde vazado, é posteriormente curada a partir de um tratamento térmico. Este procedimento pode ser realizado manualmente ou com a ajuda de impressoras automáticas ou semiautomáticas.

Figura 1.8- Procedimento de fabricação de SPEs utilizando moldes fabricados com tecidos de poliéster. O tecido é colocado em uma tela (1) e coberto com uma emulsão fotossensível que solidifica quando exposta à luz UV (2). A emulsão é mascarada pelas formas do eletrodo e exposta à luz (3). O resíduo não solidificado é lavado (4) e o molde está pronto para o procedimento de impressão (5). A tinta condutora é impressa através do molde no PET (6) para a produção dos eletrodos. Finalmente, os eletrodos são secados no forno (7) e cortados da folha (8).

Fonte: Adaptada de IBAÑEZ-REDIN *et al.*⁹¹

Embora a maioria de biossensores para detecção de biomarcadores de câncer baseados em SPEs seja fabricados com eletrodos comerciais,^{92,93} o número de pesquisas envolvendo dispositivos de baixo custo aumentou nos últimos anos. Com isso, há um crescente desenvolvimento de tópicos de pesquisa envolvendo: fabricação de dispositivos⁹⁴ de tintas mais eficientes,^{95,96} estabelecimento de metodologias de preparo mais simples e econômicas⁶⁵ e busca por materiais e estratégias de modificação que permitam melhorar significativamente o desempenho dos dispositivos.⁹⁷ O ultimo tópico foi abordado neste trabalho de doutorado, que teve como objetivo geral desenvolver imunossensores eletroquímicos sem marcação para a detecção de biomarcadores de câncer baseados em eletrodos de carbono impressos por serigrafia (SPCE, *screen-printed carbon electrodes*) e modificados com CB e NPs de NiFe_2O_4 . Pretendeu-se combinar as inúmeras vantagens, em particular uso de SPCEs com as excelentes propriedades destes nanomateriais para o desenvolvimento de testes descartáveis, de baixo custo e com bom desempenho analítico.

2 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO COM FILMES DE CARBON BLACK E POLIELETRÓLITOS PARA A DETERMINAÇÃO DO ANTÍGENO CARBOIDRATO 19-9

2.1 Motivação e objetivos

Os SPCEs modificados com filmes nanoestruturados de CB são uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos de baixo custo e com excelentes características analíticas. Ao longo dos últimos anos, diferentes sensores e biossensores têm sido propostos para a determinação de espécies de interesse ambiental, farmacêutico e industrial, combinando a simplicidade e facilidade de manipulação dos SPCEs com as excelentes propriedades eletroquímicas e estruturais de diversos tipos de CB.^{98,99} Estas plataformas possuem características interessantes para aplicação em análises clínica e possibilitam o desenvolvimento de testes facilmente manipuláveis e descartáveis. Porém, o uso de SPCEs modificados com CB para a fabricação de imunossensores eletroquímicos na detecção de biomarcadores de doenças permanece relativamente inexplorado. Levando isto em consideração, o objetivo principal deste capítulo foi discutir como eletrodos impressos modificados com filmes nanoestruturados de CB podem ser utilizados no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a determinação do biomarcador de câncer CA 19-9. Para isto, foram propostas modificações com filmes de compósitos de CB e polieletrólitos aniônicos e catiônicos utilizando-se a técnica LbL. Para atingir estes objetivos, foram tratados os seguintes temas específicos:

- Fabricação de SPCEs em substratos flexíveis e caracterização por métodos eletroquímicos e por microscopia eletrônica de varredura.
- Modificação dos SPCEs com filmes de compósitos de CB-polieletrólitos e estudos sobre efeitos das modificações nas respostas eletroquímicas dos dispositivos.
- Desenvolvimento de imunossensor sem marcação para a detecção do biomarcador de câncer de pâncreas CA 19-9 em amostras de soro sanguíneo e sobrenadante de células.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Materiais e reagentes

As tintas de carbono (BQ221) e Ag/AgCl (5870) e a resina dielétrica (5036) utilizadas na fabricação dos eletrodos impressos foram obtidas da Dupont. CB Vulcan XC 72 (CB) foi obtido da Cabot Corp (EUA). Sal de sódio do ácido poliacrílico (massa molar = 2 100 g mol⁻¹) (PAA), polietilenoimina ramificada (massa molar = 25 000 g mol⁻¹) (PEI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), *Tween* 80, albumina de soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O anticorpo monoclonal anti-CA19-9 e o antígeno CA 19-9 foram adquiridos na Aviva Systems Biology (EUA). As soluções de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7) utilizadas para as medidas eletroquímicas foram preparadas utilizando NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄ e as soluções de PBS (*Phosphate-buffered saline*) utilizadas nas etapas de lavagem e diluição das proteínas foram preparadas utilizando NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ e KCl. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade ≥ 18 M Ω cm.

2.2.2 Fabricação dos eletrodos impressos

Os SPCEs foram impressos sobre filmes de PET utilizando uma máquina de impressão semiautomática (IMAH, Brasil). Para a fabricação dos moldes, os dispositivos foram projetados com o *software* AutoCAD[®] (Autodesk, EUA) e transferidos para telas de poliéster de 150 fios cobertas com resina fotossensível. Uma camada de tinta condutora de carbono, contendo os contatos elétricos e os eletrodos de trabalho e auxiliar, foi depositada sobre o substrato e secada em estufa a 90 °C durante 15 min. Posteriormente, foram impressos e secados os eletrodos de referência Ag/AgCl e, finalmente, uma camada de resina dielétrica foi depositada para delimitar a área de contato dos eletrodos.

2.2.3 Modificação dos SPCEs

Os eletrodos de trabalho foram modificados com filmes de CB e polieletrólitos utilizando a técnica LbL adaptando o procedimento descrito por JAN e colaboradores.⁶⁷ Para isto, 1 mg de CB foi misturado a 1 mL das soluções 0,5 mg mL⁻¹ de PEI ou de PAA e as

misturas foram submetidas a agitação ultrassônica por 30 min. Após agitação foram obtidas dispersões de CB-PAA e CB-PEI com valores de pH de 5,1 e 7,6 respectivamente.

Antes da modificação dos eletrodos, foi realizado um pré-tratamento anódico aplicando um potencial de 1,2 V durante 300 s em meio de uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.¹⁰⁰ Esta etapa de pré-tratamento foi utilizada para selecionar os eletrodos com resposta eletroquímica similar, a partir da comparação dos amperogramas. Eletrodos com perfil muito diferente foram descartados. Após a lavagem, um volume de 20 µL da dispersão de CB em PEI (CB-PEI) foi adicionado sobre a superfície do eletrodo de trabalho e deixado em repouso durante 10 min. Os eletrodos foram lavados com água ultrapura, secados em fluxo de gás nitrogênio e se adicionou sobre eles 10 µL da dispersão de CB em PAA (CB-PAA). Após a lavagem e secagem, foram obtidos eletrodos modificados com 1 bicamada de filmes de CB-polieletrólitos (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₁). O procedimento foi repetido para se obter eletrodos modificados com 1, 2, 3 e 4 bicamadas. Para fins de comparação, foram preparados eletrodos modificados com CB-PEI ou CB-PAA usando a técnica de DC. Para isso, volumes de 5 ou 10 µL da respectiva dispersão foram depositados nas superfícies do eletrodo de trabalho previamente pré-tratado e o solvente foi evaporado em temperatura ambiente por 2 h. Os eletrodos modificados foram nomeados como SPCE/CB-PAA e SPCE/CB-PEI.

2.2.4 Imobilização do anticorpo anti-CA 19-9 e fabricação dos imunossensores

O anticorpo anti-CA 19-9 foi imobilizado na superfície do eletrodo modificado a partir da ligação covalente com os grupos carboxilas presentes no PAA. Para a ativação dos grupos carboxila, foram depositados 20 µL de solução contendo de EDC 0,4 mol L⁻¹ e de NHS 0,1 mmol L⁻¹ sobre a superfície dos eletrodos de trabalho.⁹⁰ Após 30 min, os eletrodos foram lavados e secados. Sobre eles foram depositados 10 µL de solução de anti-CA 19-9 em tampão PBS pH 7,4 (diluição 1:10 vol./vol.) e incubados a 4 °C durante 12 h. Para diminuir a adsorção inespecífica, os eletrodos de trabalho foram incubados com 20 µL de solução de BSA 0,1% em PBS pH 7,4 com 0,05% de *Tween* 80 (PBS-T80) durante 20 min. Finalmente, os eletrodos foram lavados três vezes com PBS. O procedimento geral de fabricação e modificação dos eletrodos é apresentado na Figura 2.1. Para comparação, foram preparados imunossensores utilizando SPCE modificado com dispersão CB-PAA por DC (SPCE/CB-PAA/Ab/BSA).

A) Fabricação dos eletrodos impressos

B) Modificação dos SPCEs

C) Imobilização do anticorpo

Figura 2.1 - Esquema da fabricação dos imunossensores mostrando: os eletrodos impressos (A), a deposição dos filmes de CB e polieletrólitos (B) e a imobilização dos anticorpos (C).

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

2.2.5 Medidas eletroquímicas e construção das curvas analíticas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab (Methron, Suíça) gerenciado pelo software Nova 2.1.3. As medidas de EIS foram realizadas utilizando o *software* Nova 1.11, sob um potencial de circuito aberto com

amplitude de 10 mV e na faixa de frequências de 0,1 a 100 kHz. A ferramenta *fit and simulation* do software Nova 1.11 foi utilizada para ajustar os circuitos eletroquímicos equivalentes aos dados experimentais. Os espectros de impedância obtidos para o SPCE e o SPCE pré-tratado foram ajustados utilizando o circuito de Randles modificado [Rs(CPE [RtcW])], sendo Rs a resistência da solução, CPE o elemento de fase constante, Rtc a resistência à transferência de carga e W a impedância de Warburg.

Para a construção das curvas analíticas, os imunossensores foram incubados com 10 µL de soluções de diferentes concentrações de CA 19-9 em PBS pH 7 durante 20 min. Posteriormente, foram lavados com soluções de PBS-TW80 e PBS e secados em fluxo contínuo de nitrogênio antes de realizar as medidas eletroquímicas. A interação antígeno-anticorpo foi monitorada utilizando a técnica de DPV (parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V) em uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a Equação 2.1,¹⁰² sendo y_B o intercepto e S_B o desvio quadrático médio da curva analítica.

$$\text{LD} = y_B + 3S_B \quad 2.1$$

2.2.6 Determinação de CA 19-9 em amostras de célula e soro sanguíneo

A resposta analítica dos imunossensores foi avaliada utilizando amostras de soro de pacientes com câncer de pâncreas (Comitê de ética N° 1.447.041) e sobrenadante de célula das linhagens celulares HT-29 e SW-620. Todas as amostras foram fornecidas pelo Centro de Pesquisas de Oncologia Molecular do Hospital do Amor (Barretos, Brasil). A concentração de CA19-9 nessas amostras foi determinada usando um analisador de ECL Cobas 601 e um conjunto comercial de imunoensaio Elecsys CA19-9, ambos da Roche Diagnostics (Suíça). Antes da análise, as amostras foram diluídas em PBS para alcançar concentrações dentro do intervalo dinâmico da curva analítica. Os imunossensores foram incubados com 10 µL das amostras durante 20 min e depois lavados e secos. Os voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos nas mesmas condições utilizadas para as curvas analíticas.

2.2.7 Caracterizações

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM, *scanning electron microscopy*) foram obtidas usando um microscópio ZEISS Sigma. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM, *High-resolution transmission electron microscopy*) foram obtidas usando um microscópio Tecnai G2 F20 (FEI, EUA). Os experimentos de microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*) foram realizados com um microscópio *dimension FastScan* (Bruker, EUA). A espessura dos filmes de tinta de carbono e Ag/AgCl foi determinada utilizando um perfilômetro Dektak XT (Bruker, EUA). As medidas de ângulo de contato foram realizadas com um goniômetro CAM200 (KSV Instruments, Finland) e o *software* CAM 2008. Os experimentos de espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) foram realizados usando um espectrômetro Thermo Nicolet Nexus 470 (Thermo Fisher, EUA).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização dos SPCEs e do CB Vulcan XC-72

O uso da técnica *screen-printing* permitiu a fabricação de eletrodos descartáveis e flexíveis com uma área geométrica do eletrodo de trabalho de $0,09 \text{ cm}^2$. As espessuras dos filmes foram determinadas a partir de medidas de perfilometria como sendo $(8,7 \pm 0,3) \mu\text{m}$ e $(9,1 \pm 0,6) \mu\text{m}$ para os filmes de tinta de carbono e Ag/AgCl, respectivamente. Na Figura 2.2 A é apresentada a fotografia de um eletrodo impresso em folhas de PET. A morfologia da superfície dos eletrodos de trabalho foi estudada por SEM. A Figura 2.2 B apresenta uma imagem SEM de eletrodo de trabalho como uma superfície rugosa e a presença de flocos de grafite, que são componentes comuns na elaboração de tintas condutoras de carbono.⁹⁵

A resposta eletroquímica dos dispositivos foi comparada às obtidas para eletrodos comerciais (DropSens 150, eletrodo de trabalho circular com área geométrica de $0,12 \text{ cm}^2$) utilizando a sonda eletroquímica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Na Figura 2.2 C são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para os dois eletrodos em uma solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura (ν) de 100 mV s^{-1} . Os eletrodos fabricados exibiram baixa taxa de transferência de elétrons caracterizada por uma maior separação dos potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p). Além disto, apresentaram uma

melhor definição dos picos e uma densidade de corrente $2\times$ maior do que a obtida com eletrodos comerciais. Adicionalmente, os SPCEs apresentaram uma excelente reprodutibilidade de fabricação, com uma percentagem de desvio padrão relativo (RSD, *relative standard deviation*) de 3,3%, como observado na Figura 2.2 D. Vale ressaltar que os dispositivos fabricados, além de apresentarem excelentes propriedades em geral, têm um custo estimado de fabricação de cerca de R\$ 0,30, valor significativamente menor em comparação aos obtidos com outros dispositivos comerciais fabricados em PET (R\$ 13 por eletrodo, Orion-Hitech).

Figura 2.2 - (A) Fotografia de um eletrodo fabricado. (B) Imagem de SEM obtida para a superfície do eletrodo de trabalho. (C) Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodos comerciais, para os SPCEs (C) e 5 SPCEs (D).

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*⁹⁷

O comportamento das correntes de pico em função da velocidade de varredura (v) foi investigado a partir de estudos de voltametria cíclica (CV, *cyclic voltammetry*). Na Figura 2.3 A são apresentados os voltamogramas cíclicos para o SPCE em uma solução $K_3Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ variando a velocidade de varredura de 50 a 300 mV s^{-1} . Como observado na Figura 2.3 B, uma relação linear entre as correntes de pico anódico (I_{pa}) e

$v^{1/2}$ foi obtida, evidenciando um comportamento típico de processos eletroquímicos controlados por difusão.¹⁰³ A área eletroativa do eletrodo de trabalho foi estimada empregando-se a equação de Randles-Sevcik para sistemas controlados por difusão (Equação 2.2).¹⁰³

$$I_{pa} = \pm (2,69 \times 10^5) n^{3/2} D^{1/2} C v^{1/2} A \quad 2.2$$

Sendo I_{pa} a corrente de pico anódico, n (1) o número de elétrons envolvido no processo eletroquímico, D ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)¹⁰³ o coeficiente de difusão da espécie, C ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$), a concentração do analito, v (V s^{-1})¹⁰³ a velocidade de varredura e A (cm^2) a área eletroativa do eletrodo. O eletrodo de trabalho apresentou uma área eletroativa de $0,086 \text{ cm}^2$, que é próxima à área geométrica ($0,090 \text{ cm}^2$).

Figura 2.3 - Estudo da velocidade de varredura de potenciais dos SPCEs em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50\text{-}300 \text{ mVs}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

O CB utilizado neste trabalho foi o Vulcan XC-72, um tipo de CB com propriedades condutoras amplamente utilizado na produção de baterias e catalisadores para células a combustíveis.¹⁰⁴ O Vulcan XC-72 possui propriedades interessantes para aplicações em eletroanálises tais como uma grande área superficial específica ($254 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e baixa resistividade elétrica,¹⁰⁵ mostrando melhor desempenho electroanalítico quando comparado com outros tipos de CBs incluindo-se o Black Pearls 4750, E2000 e N220.^{99,106}

A caracterização do Vulcan XC-72 foi realizada a partir de estudos de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM, do inglês *High-resolution transmission electron microscopy*). Na Figura 2.4 são apresentadas as micrografias obtidas em duas magnificações diferentes, onde pode ser observada a morfologia típica deste material

caracterizada pela formação de aglomerados de partículas manométricas que por sua vez são formadas por diferentes camadas de grafeno (Figura 2.4B).^{64,106}

Figura 2.4 - Voltamogramas cíclicos para SPCEs modificados com filmes de PAA e CB-PAA (A) e PEI e CB-PEI (B). Experimentos realizados em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

2.3.2 Resposta eletroquímica dos SPCEs modificados com compósitos CB-polieletrólitos

Inicialmente foram estudadas as respostas eletroquímicas dos compósitos CB-polieletrólitos em um meio contendo a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Na Figura 2.5 são apresentados os voltamogramas para SPCEs modificados com 5 μL das dispersões dos polieletrólitos em uma concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ na ausência e na presença de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de CB. A presença de CB em ambos os filmes melhorou notavelmente a resposta eletroquímica dos SPCEs devido às excelentes propriedades do Vulcan XC 72, incluindo boa condutividade elétrica e grande área superficial específica.⁹⁹ Nos eletrodos modificados com filmes compostos por PAA, observou-se o aumento do sinal analítico de $1,5\times$ após a introdução de CB assim como a diminuição do ΔE_p (454 mV para SPCE-PAA e 300 mV para SPCE/CB-PAA), o qual é característico de processos eletrocatalíticos.

Figura 2.5 - Voltamogramas cíclicos para SPCEs modificados com filmes de PAA e CB-PAA (A) e PEI e CB-PEI (B). Experimentos realizados em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mVs}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Vale ressaltar que contrário ao observado para os eletrodos modificados com PAA (Figura 2.5 A), os eletrodos modificados com PEI (na ausência de CB) apresentaram uma resposta eletroquímica com um aumento de aproximadamente $2\times$ no sinal em comparação com os eletrodos sem modificar (Figura 2.5 B). Isto se deve à presença de grande quantidade de grupos amino com carga positiva nas moléculas de PEI ($\text{pK}_a = 9, 8$ e 7 para as aminas terciárias, secundárias e primárias, respectivamente).⁶⁶ Estes grupos amino podem facilitar o aumento na concentração dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ carregados negativamente presentes na interface eletrodo-solução, facilitando assim a transferência de elétrons.¹⁰⁷

2.3.3 Deposição LbL dos filmes de CB-polieletrólitos nos SPCEs

Os SPCEs foram modificados com filmes de CB-PEI e CB-PAA utilizando-se a técnica LbL como alternativa à modificação por via DC, comumente utilizada no desenvolvimento de dispositivos baseados em CB.⁴⁸ Inicialmente, um pré-tratamento anódico (ver materiais e métodos, seção 2.2.3) foi realizado no eletrodo de trabalho para promover a formação de grupos funcionais oxigenados. Estes grupos funcionais têm como papel promover a adsorção da primeira camada catiônica na superfície a partir de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio com as moléculas de PEI.⁶⁶ O pré-tratamento dos eletrodos levou a um aumento na hidrofiliabilidade da superfície, que foi observado a partir de medidas de ângulo de contato (θ) com água. Na Figura 2.6 A são apresentadas as imagens obtidas para os eletrodos antes e depois do pré-tratamento. Foi observada uma diminuição no

valor de θ do eletrodo pré-tratado (SPCE pré-tratado) de $(110 \pm 7)^\circ$ para $(84 \pm 4)^\circ$ em comparação ao eletrodo sem tratamento. Esse comportamento é atribuído a um aumento na molhabilidade da superfície após a introdução de grupos polares no pré-tratamento anódico. Além disto, está associado à remoção de impurezas orgânicas, tais como óleos e aglutinantes, comumente utilizados na formulação das tintas.¹⁰⁸

As mudanças nas propriedades superficiais dos eletrodos ocasionaram mudanças significativas nas suas propriedades eletroquímicas observadas a partir de estudos de DPV e EIS com a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Na Figura 2.6A e B observa-se a diminuição da resistência à transferência de carga (R_{tc}) de 29,6 para 11,5 $\text{k}\Omega$ após o pré-tratamento, assim como o aumento no sinal de corrente em aproximadamente $3\times$ e o deslocamento do potencial de pico de 316 mV para 118 mV. Todas estas mudanças estão associadas à melhora das propriedades eletrocatalíticas dos SPCEs devido ao pré-tratamento.

Figura 2.6 - (A) Medidas de ângulo de contato com água. (B) Diagramas de Nyquist e (C) voltammograms de pulso diferencial para SPCE e SPCE pré-tratado em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

Posteriormente foi realizada a deposição dos filmes de CB-PEI e CB-PAA nas superfícies dos eletrodos de trabalho pré-tratados. Tanto a concentração de CB nos compósitos quanto o tempo de adsorção dos filmes foram otimizados considerando como

critérios a obtenção de voltamogramas de pulso diferencial com boa definição e elevado sinal analítico. Na Tabela 2.1 são apresentadas as diferentes concentrações de CB e os tempos de adsorção estudados. Os melhores resultados foram obtidos para filmes contendo 1 mg mL^{-1} de CB com tempo de adsorção de 10 min, consequentemente essas condições foram utilizadas nos experimentos posteriores.

Tabela 2.1 Condições para a deposição dos filmes de CB-polieletrólitos submetidas à otimização e respectivos valores selecionados

Condições	Valores estudados	Valores selecionados
Concentração de CB (mg mL^{-1})	0,5; 1 e 2	1
Tempo de adsorção (min)	5; 10 e 15	10

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 2.7 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial para eletrodos modificados com uma bicamada dos filmes ($\text{SPCE}/(\text{CB-PEI}/\text{CB-PAA})_1$), SPCE pré-tratado e eletrodo sem modificar (previamente apresentados na Figura 2.6 C), quando se pôde comparar o comportamento da sonda redox nas diferentes plataformas. A modificação de SPCEs com uma bicamada CB-polieletrólito resultou em um aumento significativo no sinal de corrente, que foi de $2,3\times$ e $6,1\times$ maior do que o observado para o SPCE-pré-tratado e para o SPCE sem modificar, respectivamente.

Figura 2.7 - Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os diferentes eletrodos: SPCE, SPCE pré-tratado e $\text{SPCE}/(\text{CB-PEI}/\text{CB-PAA})_1$. Experimentos realizados em solução em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Elaborada pela autora.

A resposta eletroquímica de filmes fabricados utilizando-se a técnica de LbL é influenciada pelo número de camadas depositadas. Um maior número de camadas depositadas leva à formação de filmes mais homogêneos e espessos, com maior cobertura da superfície.¹⁰⁹ A influência do número de bicamadas CB-polieletrólito na resposta eletroquímica foi investigada para eletrodos modificados com 1 (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₁), 2 (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂), 3 (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₃) e 4 (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₄) bicamadas. Nas Figuras 2.8A e B observa-se que a corrente de pico é praticamente a mesma para os eletrodos com as 2 primeiras bicamadas depositadas, mas cai significativamente após 3 e 4 deposições. Este comportamento sugere que o crescimento dos filmes de CB-polieletrólitos na superfície dos eletrodos ocorre exponencialmente e esta em concordância com resultados previamente reportados na literatura para filmes baseados em PEI e PAA.¹¹⁰

A queda no sinal de corrente com o incremento no número de bicamadas sugere que o aumento na espessura dos filmes limita a transferência eletrônica da sonda redox. Isto foi verificado a partir de experimentos com eletrodos modificados com filmes mais espessos depositados por via DC. Para isto, foram depositados 5 e 10 μL da dispersão contendo 1 mg mL^{-1} de CB em 0,5 mg mL^{-1} de PAA na superfície dos eletrodos pré-tratados. Na Figura 2.8 C podem ser observados os voltamogramas de pulso diferencial em uma solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7). Nessas curvas, pode-se observar a diminuição na intensidade de corrente para filmes com maior quantidade de material (mais espessos).

Pode-se destacar que os eletrodos preparados por LbL apresentaram um sinal de corrente maior em comparação aos via DC assim como uma melhor definição dos voltamogramas (picos menos largos). Isto foi observado ainda para modificações com dispersões de CB-PEI, onde se poderia esperar que a alta concentração de grupos amino carregados positivamente favorecesse a transferência eletrônica (Figura 2.8D). Este resultado pode ser atribuído a uma melhor difusão da sonda redox até a superfície do eletrodo através dos filmes finos^{109,111} e sugerem uma vantagem do uso da metodologia LbL. Resultados similares têm sido obtidos para eletrodos de Au modificados com multicamadas de polieletrólitos.^{107,109}

Figura 2.8 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial para eletrodos preparados com: (A) diferentes números de bicamadas depositadas via LbL e (B) I_p vs. número de bicamadas para três eletrodos diferentes; (C) para eletrodos modificados com dispersões de CB-PAA depositadas via DC. (D) Comparação da resposta obtida para eletrodos modificados via LBL e DC. Experimentos realizados em solução $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

Na Figura 2.9 é apresentada uma proposta para o perfil de difusão da sonda redox $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ através dos filmes de CB-polieletrólito baseado em BARREIRA e colaboradores.¹⁰⁹ Vale ressaltar que a resposta eletroquímica de eletrodos modificados com compósitos CB-polieletrólito depende especificamente do tipo de sonda utilizada e do seu mecanismo de transferência eletrônica. Por conseguinte, a melhor arquitetura dos filmes deve ser escolhida e otimizada para cada molécula investigada. Por exemplo, em trabalhos realizados em nosso grupo uma melhora resposta eletroquímica foi obtida para moléculas com maior tendência à adsorção na superfície do eletrodo, tais como a dopamina, quando são utilizados filmes mais espessos com grande quantidade de CB-PAA.⁶⁵

Figura 2.9 - Proposição do perfil de difusão da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ em filmes de CB-polieletrólito.

Filmes com poucas bicamadas permitem uma melhor difusão da sonda redox.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a construção dos sensores, foram utilizadas plataformas modificadas com duas bicamadas ($\text{SPCE}/(\text{CB-PEI}/\text{CB-PAA})_2$), pois essas apresentaram maior repetibilidade determinada em estudos de DPV para três eletrodos diferentes ($\text{RSD} = 3,2\%$).

Com o objetivo de se obter informações mais detalhadas sobre o comportamento eletroquímico da plataforma selecionada, foram realizados experimentos de EIS. Na Figura 2.10 A é apresentado o diagrama de Nyquist para o eletrodo $\text{SPCE}/(\text{CB-PEI}/\text{CB-PAA})_2$ em uma solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Ao contrário do observado para o SPCEs, sem modificar e pré-tratado, os eletrodos modificados exibiram dois semicírculos, um na região de alta frequência e outro em frequências intermediárias (Figure 2.6 B). Este resultado sugere a existência de regiões na superfície do eletrodo nas quais a sonda redox apresenta diferentes cinéticas de transferências de carga devido à natureza porosa e heterogênea dos filmes baseados em CB. Resultados similares têm sido observados para eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de CB e dihexadecil hidrogenofosfato.⁵²

Figura 2.10 - (A) Diagramas de Nyquist obtidos para o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂. Gráfico inserido: ampliação em altas frequências. (B) Circuito eletroquímico equivalente, sendo R_s a resistência da solução, R_{tc} a resistência a transferência de carga, C o capacitor e W a impedância de Warburg. Experimentos realizados em solução $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

Os dados da Figura 2.10 A foram ajustados a partir do circuito eletroquímico equivalente da Figura 2.10 B, sendo R_s a resistência da solução, R_{tc} a resistência a transferência de carga, C o capacitor e W a impedância de Warburg. Os valores de R_{tc} para o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ ($R_{tc1} = 0,485 \text{ k}\Omega$ e $R_{tc2} = 1,51 \text{ k}\Omega$) são inferiores aos obtidos para eletrodos sem modificar e pré-tratados, indicando uma melhora na resposta eletroquímica, consistente com o aumento no sinal de corrente em experimentos de DPV.

Na Figura 2.11 são apresentadas as imagens de SEM dos eletrodos SPCE pré-tratado e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂. O eletrodo pré-tratado (Figura 2.11 A-B) apresentou uma morfologia típica das tintas condutoras de carbono com presença de grafite, partículas de carbono e material aglutinante.⁹⁵ Deve-se ressaltar que mudanças significativas na morfologia dos eletrodos não foram observadas como consequência do pré-tratamento eletroquímico. Após a modificação com duas bicamadas de CB-polieletrólitos, a superfície foi parcialmente recoberta por um material rugoso e heterogêneo e com a presença de aglomerados (Figura 2.11 B-C). Este tipo de morfologia é comumente observada em filmes de CB devido à grande área superficial específica do material.⁶⁴

Figura 2.11 - Imagens de SEM obtidas para SPCE-pré-tratados (A-B) e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ (C-D) em diferentes ampliações.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

A morfologia dos eletrodos foi também estudada utilizando-se AFM (Figura 2.12 (A-B)). A rugosidade média calculada a partir das micrografias para uma ampliação de 1,1 μm foi de $(38,7 \pm 0,6)$ nm e $(78,7 \pm 0,9)$ nm para SPCE e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂, respectivamente. A estabilidade do SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ foi avaliada monitorando-se o efeito da deformação mecânica sobre a resposta eletroquímica dos dispositivos. Como se observa na Figura 2.12 C, não houve mudanças significativas no sinal de corrente para os eletrodos antes e depois de ser dobrados 50×. Assim, nota-se a grande estabilidade mecânica, tanto dos eletrodos, quanto dos filmes depositados. Adicionalmente, estudou-se a estabilidade eletroquímica dos eletrodos a partir de respostas por CV monitorando a corrente de pico anódica depois de 20 ciclos sucessivos. Na Figura 2.12 D são observados os voltamogramas cíclicos em uma solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). O SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ apresentou uma boa estabilidade eletroquímica sem uma diminuição significativa do sinal de corrente devido ao envenenamento da superfície ($\Delta I = 2,8\%$).

Figura 2.12 - Imagens AFM para SPCE (A) e SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ (B). Efeito da deformação mecânica na resposta eletroquímica do eletrodo modificado (C). Teste de estabilidade eletroquímica do SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ (D).

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

2.3.4 Preparação do imunossensor SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA

O SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ apresenta características interessantes para o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos, incluindo-se: (I) grande área superficial e alta rugosidade que permite a imobilização de maior quantidade de moléculas receptoras⁶⁶ e (II) sinal analítico aprimorado que possibilita o desenvolvimento de métodos mais sensíveis.³⁶ Adicionalmente, os grupos carbóxilos presentes na última camada (CB-PAA) proporcionam uma alternativa simples à imobilização de biomoléculas, sendo necessária apenas a ativação com EDC/NHS.¹¹² O imunossensor foi fabricado imobilizando anticorpos específicos para o reconhecimento do antígeno CA 19-9 na superfície do eletrodo modificado. A possibilidade de imobilizar os anticorpos nos filmes propostos foi estudada utilizando-se espectroscopia FT-IR.

Na Figura 2.13 são apresentados os espectros para os filmes de CB-polieletrólitos antes (CB-PEI/CB-PAA) e depois da imobilização dos anticorpos (CB-PEI/CB-PAA-Ab). O

espectro do CB-PEI/CB-PAA exibe bandas características de ambos polieletrólitos, sumarizadas na Tabela 2.2. Após a imobilização dos anticorpos, são observadas duas bandas em 1650 e 1530 cm^{-1} atribuídas à presença de amidas I e II, respectivamente. Estas bandas são características de proteínas e atribuídas às vibrações de estiramento e flexão dos grupos C=O e N-H da ligação peptídica.¹¹³ O espectro também exibiu duas bandas em 2917 e 2847 cm^{-1} atribuídas à vibração simétrica e antissimétrica do grupo C-H junto a uma banda larga em torno de 3600 cm^{-1} devido à sobreposição das vibrações O-H e N-H.

Figura 2.13 - Espectros de FT-IR para filmes de CB-PEI/CB-PAA antes e depois da imobilização dos anticorpos. Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

Tabela 2.2-Atribuição das bandas de FT-IR do espectro na Figura 2.12 para filmes CB-PEI/CB-PAA.

Banda	Número de onda (cm^{-1})		Referência
	PAA	PEI	
C-H estiramento		2951 e 2818	
COO- estiramento simétrico	1590		114
N-H deformação angular	-----	1590	66
COO-	1446	-----	
C-H ₂ deformação angular	1408	1398	114
C-N deformação angular	-----	1304	
C-CH ₂ estiramento	1010		

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

A imobilização dos anticorpos também foi verificada a partir de estudos eletroquímicos. Na Figura 2.14 são apresentados os voltamogramas para o eletrodo antes e

depois dos procedimentos de imobilização dos anticorpos (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab) e bloqueio com solução de BSA 0,1% (SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA). Nestas curvas voltamétricas pode-se observar a diminuição da intensidade de corrente atribuída ao bloqueio da área eletroativa da superfície pela introdução das proteínas. O processo de imobilização apresentou uma excelente reprodutibilidade com RSD de 6,7% calculado para 8 eletrodos diferentes.

Figura 2.14 - Comparação da resposta eletroquímica obtida no SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂ antes e depois da imobilização do anti-CA 19-9 e do bloqueio com BSA . Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7. Parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Elaborada pela autora.

2.3.5 Desempenho analítico do imunossensor SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA

A curva analítica para a determinação do antígeno CA 19-9 foi construída a partir de medidas de DPV em solução K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7). Na Figura 2.15 (A) são apresentados os voltamogramas para eletrodos incubados com soluções de diferentes concentrações de CA 19-9 em PBS pH 7 (0; 0,01; 0,1; 1, 10 e 40 U mL⁻¹ de CA 19-9). Como esperado, ocorre uma diminuição da intensidade de corrente com o aumento da concentração de antígeno, atribuído ao caráter isolante da proteína, que bloqueia a transferência de carga entre a espécie redox e a superfície do eletrodo.

Na Figura 2.15 B é apresentada a respectiva curva analítica representada pela equação: $\Delta I = (2,20 \pm 0,07) \mu A + (0,82 \pm 0,05) \mu A \text{ mL U}^{-1} \log [\text{CA 19-9}]$, com R² de 0,984. O LD foi de 0,07 U mL⁻¹, sendo muito menor do que o reportado para conjuntos ELISA disponíveis no

mercado (5 U mL^{-1}).¹¹⁵ Este baixo valor de LD é adequado para quantificar CA19-9 em análises clínicas, pois permite a diluição das amostras para minimizar o efeito de matriz. Por exemplo, amostras de pacientes com câncer de pâncreas, nas quais o valor limite é de 37 U mL^{-1} , podem ser diluídas várias vezes antes da análise. Vale a pena destacar, que imunossensores fabricados com SPCEs modificados com dispersão CB-PAA por via DC (SPCE/CB-PAA/Ab) apresentaram sensibilidades $\sim 10\times$ menores, como observado na Figura 2.15 B (curva analítica em vermelho). Isto atribui-se ao baixo sinal analítico observado para esta plataforma nos experimentos de caracterização, novamente confirmando a vantagem no uso da metodologia LbL.

Figura 2.15 - Voltamogramas (A) e curva analítica (B) para eletrodos incubados com diferentes concentrações de CA 19-9 em PBS pH 7 ($n=5$). (C) estudo de seletividade imunossensor realizado na presença dos interferentes SFB, vimentina e p16. Medidas realizadas em uma solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

A seletividade do imunossensor foi estudada utilizando-se três possíveis substâncias interferentes: soro fetal bovino $10\times$ diluído (SFB), vimentina (2 ng mL^{-1}) e a proteína supressora de tumores p16 (3 ng mL^{-1}). As concentrações de vimentina e p16 foram

selecionadas considerando-se os níveis reportados destas proteínas em pacientes com diferentes tipos de câncer (0,897-1,80 ng mL⁻¹ e 0,800-2,09 ng mL⁻¹ para vimentina e p16 respectivamente).^{116,117} Como se observa na Figura 2.15 C, todas as amostras apresentaram baixa interação com a plataforma, com respostas significativamente menores do que a observada para uma concentração de CA 19-9 de 1,0 U mL⁻¹. Deve-se destacar a baixa interferência observada para a amostra de SFB, que é uma matriz complexa com alta concentração de proteínas, indicando uma boa seletividade do imunossensor.

Na Tabela 2.3 é apresentada uma comparação entre os parâmetros analíticos para o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA e diversos imunossensores eletroquímicos sem marcação empregados na determinação de CA 19-9 e encontrados na literatura. O SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA apresentou um menor limite de detecção do que o obtido para outros biossensores fabricados com nano cristais de Au e Ag,¹¹⁸ compósitos de Au e politionina,¹¹⁹ nanotubos de carbono e nanocebolas de carbono.⁹¹ Outros dispositivos baseados em compósitos de poli(N, N-difenil-p-fenilediamina) e nanopartículas Au e Pt,¹¹⁹ nanocalindras de Au e Pt¹²⁰ e nanopartículas de óxido de Ce e Fe¹²¹ apresentaram menores valores de LD. Porém, estes foram fabricados com eletrodos de carbono vítreo, Pt e Au, sendo incompatíveis com aplicações no ponto de atendimento, onde dispositivos descartáveis e de baixo custo são preferidos. Adicionalmente, a metodologia descrita aqui pode ser facilmente adaptada à fabricação em grande escala, uma vez que a produção, tanto dos SPCEs quanto do CB, está bem estabelecida na indústria.

Em comparação a outros dispositivos baseados em CB recentemente reportados na literatura,^{60,62,63} o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA também é vantajoso. Isto se deve à relativa simplicidade do processo de fabricação e uso de baixo volumes de amostra e reagentes, uma vez que apenas 10 e 100 µL de amostra e solução de trabalho são utilizados nas etapas de incubação e medição, respectivamente.

Tabela 2.3-Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes imunossensores empregados na detecção de CA 19-9.

Eletrodo	Técnica	Intervalo linear U mL ⁻¹	LD U mL ⁻¹	Referencia
AuIDE/PEI-CNT/Ab	Capacitância	0,05-60	0,35	¹²²
GCE/AuNPs/AuNPs@PThi/Ab	DPV	6,5-520	0,26	¹²³
GCE/AuAg nanocristais/Ab	DPV	1,0-30	0,23	¹¹⁸
SPIDE/ CNO-GO-Ab	Capacitância	0,3-100	0,12	⁹¹
GCE/AuPtNCs/Ab	DPV	0,05-50	$3,0 \times 10^{-2}$	¹²⁰
Pt /PPPD-Au/Pt/ Ab	SWV	$1,0 \times 10^{-3}$ -40	$2,3 \times 10^{-4}$	¹¹⁹
AE/ FeOx@mC500/ CeO ₂ /Ab	EIS	$1,0 \times 10^{-4}$ -10	$1,0 \times 10^{-5}$	¹²¹
SPCE/CB ₂ -Ab	DPV	$1,0 \times 10^{-2}$ -40	$7,0 \times 10^{-2}$	Este trabalho

GCE: eletrodo de carbono vítreo, Ab: anticorpo, AuNps: nanopartículas de Au, PThi: politionina, NCs: nanocaliandras, IDE: eletrodos interdigitados, PEI: polietilenoimina; CNT: nanotubos de carbono; SPIDE: eletrodos interdigitados impressos, CNO: nanocébolas de carbono, GO: óxido de grafeno, PPPD: poli(N, N-difenil-p-fenilediamina), AE: eletrodos de Au, FeOx@mC500/ CeO₂: nanopartículas bimetálicas de Ce e óxidos de Fe incorporadas em matrizes de carbono mesoporoso.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

2.3.6 Aplicação do SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA na determinação de CA 19-9 em amostras de soro e sobrenadante de célula

A aplicabilidade do imunossensor foi investigada pela a determinação de CA 19-9 em duas amostras de sobrenadante de célula das linhagens celulares HT-29 (positiva) e SW-620 (negativa) e duas amostras de soro sanguíneo de pacientes com câncer de pâncreas. Na Figura 2.16 são apresentadas as variações da concentração das diferentes amostras em comparação às obtidas com o immunoensaio comercial de ECL. Os níveis de CA 19-9 em todas as amostras foram similares para ambos os métodos, demonstrando o potencial de aplicação do imunossensor proposto para aplicações em análises clínicas.

Figura 2.16 - Determinação de CA19-9 em amostras de lisado de célula e soro de pacientes com câncer de pâncreas utilizando o SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA (n=3) e immunoensaios comerciais de ECL.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹⁰¹

Deve-se destacar que a amostra de sobrenadante de célula da linhagem celular SW-620 apresentou níveis de CA 19-9 muito baixos em comparação ao observado para a linhagem celular HT-29, corroborando a boa seletividade da plataforma proposta para detecções em matrizes complexas. Como esperado, as concentrações de CA 19-9 nas amostras de soro sanguíneo foram superiores ao valor de referência para câncer de pâncreas (37 U mL⁻¹). Porém, deve-se considerar que o diagnóstico preciso da doença requer de metodologias complementares, já que aumentos nas concentrações de CA 19-9 podem estar relacionados aos outros transtornos gastrointestinais, tais como pancreatites e câncer de estômago e colorretal.¹²⁴ Assim, o imunossensor proposto seria de grande utilidade em análises de rotina relacionados com triagem e monitoramento da resposta aos tratamentos.

Vale ressaltar que o imunossensor SPCE/(CB-PEI/CB-PAA)₂/Ab/BSA, além de apresentar excelente desempenho analítico, têm um custo em materiais e reagentes estimado de cerca de R\$ 3 por análises. Este valor é significativamente inferior quando comparado com alguns testes disponíveis no mercado incluindo kits ELISA (~R\$ 33 por análises).¹¹⁵

2.4 Conclusões

O potencial dos eletrodos impressos modificados com compósitos de CB e polieletrólitos no desenvolvimento de imunossensores para a detecção de biomarcadores de câncer foi estudado pela primeira vez neste trabalho. Foi desenvolvido um imunossensor simples, descartável e de baixo custo (~R\$ 3 por análises) na determinação do carboidrato antígeno CA19-9. A técnica de LbL foi utilizada na modificação dos SPCE com filmes de CB-polieletrólitos como alternativa à modificação via DC comumente utilizada no desenvolvimento de dispositivos baseados neste nanomaterial. A caracterização eletroquímica com a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ revelou uma vantagem do uso desta metodologia em comparação com a técnica de DC para a modificação dos eletrodos de trabalho. Esta vantagem se vê refletida principalmente no aumento da intensidade de corrente devido à melhor difusão da sonda redox nos filmes finos. A combinação do bom sinal analítico proporcionado pela arquitetura de filmes finos com a grande área e rugosidade da superfície devido à presença de CB permitiu o desenvolvimento de um método com bons parâmetros analíticos. O imunossensor descartável apresentou excelentes resultados na determinação de CA 19-9 em soluções padrão, com limite de detecção de $0,07 \text{ U mL}^{-1}$. Este valor é menor do que o reportado para conjuntos de ELISA disponíveis comercialmente, além de apresentar excelente reprodutibilidade e estabilidade.

O dispositivo proposto foi aplicado na determinação de CA 19-9 em amostras de sobrenadante de célula e soro de pacientes com câncer de pâncreas, mostrando boa correlação com o immunoensaio comercial de ECL. Tudo isto somado à vantagem do baixíssimo custo dos materiais utilizados e a simplicidade dos procedimentos fazem deste dispositivo uma alternativa promissora para a detecção de biomarcadores de câncer.

2.5 Publicações relacionadas

Os resultados referentes à fabricação e caracterização dos SPCEs apresentados neste capítulo foram publicados em IBÁÑEZ-REDÍN, G; WILSON, D; GONÇALVES, D AND

OLIVEIRA JR O.N. *Low-cost screen-printed electrodes based on electrochemically reduced graphene oxide-carbon black nanocomposites for dopamine, epinephrine and paracetamol detection*. Journal of Colloid and Interface Science, v. 515, p. 101–108, 2018.

Os resultados referentes ao desenvolvimento do imunossensor e reproduzidos aqui com permissão da *Springer Nature* (Número de licença 5024290812623) foram publicados em IBÁÑEZ-REDÍN, G; MATERON, E; FURUTA, R; WILSON, D; FREITAS DO NASCIMENTO, G; MELENDEZ, M, CARVALHO, A; REIS, R; OLIVEIRA JR. O.N AND GONÇALVES, D. *Screen-printed electrodes modified with carbon black and polyelectrolyte films for determination of cancer marker carbohydrate antigen 19-9*. Microchimica Acta, v. 187, n. 417, p. 1–11, 2020.

3 MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO COM FILMES DE POLIETILENOIMINA E NANOPARTÍCULAS DE NiFe_2O_4 FUNCIONALIZADAS PARA A DETECÇÃO DA PROTEÍNA TUMORAL P53

3.1 Motivação e objetivos

Considerando-se a grande amplificação do sinal de corrente da sonda eletroquímica $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ para eletrodos modificados com filmes de PEI, foi proposto, nesta etapa do trabalho, explorar a aplicação desta plataforma junto a nanopartículas (NPs) de NiFe_2O_4 na detecção da proteína p53. A combinação destes materiais teve o intuito de aumentar o sinal analítico e a área superficial para a imobilização dos anticorpos, ou seja, duas características essenciais para o ótimo desempenho de imunossensores sem marcação baseados em técnicas voltamétricas. A estratégia adotada foi a funcionalização das NPs de NiFe_2O_4 com grupos carboxilatos para posterior deposição via LbL na superfície de eletrodos modificados com uma camada de PEI. Estes grupos também foram utilizados para a imobilização covalente de anticorpos específicos para reconhecimento do p53. Objetivou-se estudar o efeito da concentração das NPs presentes nos imunossensores sobre suas diferentes propriedades a partir de técnicas de caracterização eletroquímicas, microscópicas, piezoelétricas e espectroscópicas.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais e reagentes

Soluções do anticorpo anti-p53 (clone DO-7) e da proteína p53 foram obtidos da Agilent Dako (EUA) e da Abcam (Reino unido), respectivamente. Cloreto de níquel hexahidratado, cloreto de ferro (III) hexaidratado, hexacianoferrato de potássio (III), hexacianoferrato de potássio (II), etilenoglicol, acetato de sódio, Tween-20, polietilenoimina ramificada (massa molar = $25\,000\text{ g mol}^{-1}$) (PEI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), albumina de soro bovino (BSA) e N-hidroxissuccinimida (NHS), ácido 11-mercaptoundecanóico (11-MUA) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). As amostras de célula da linhagem celular Saos-2 foram obtidas da ATTC (EUA). As tintas de Ag (PE410), Ag/AgCl (5870) e a resina dielétrica (5036), utilizadas na

fabricação dos eletrodos impressos, foram obtidas da Dupont (EUA). Filmes de policloreto de vinila (PVC, *polyvinyl chloride*) foram obtidos no mercado local.

3.2.2 Fabricação dos eletrodos impressos

Os SPCEs utilizados neste trabalho foram impressos sobre filmes de PVC utilizando a metodologia descrita na secção 2.2.2 com algumas modificações. Inicialmente, foi utilizada tinta de Ag para imprimir três trilhas como contatos elétricos. A tinta foi curada em estufa a 90 °C durante 15 min. Posteriormente, foi impressa uma camada de tinta de carbono contendo o contra eletrodo e o eletrodo de trabalho com área geométrica de $\sim 0,13 \text{ cm}^2$. A tinta foi curada em estufa a 90 °C durante 15 min, seguido da impressão e secagem de uma camada de tinta Ag/AgCl contendo o eletrodo de referência. Finalmente, foi depositada uma camada de resina dielétrica para delimitar a área de contato dos eletrodos.

3.2.3 Sínteses e funcionalização das NPs de NiFe_2O_4

As NPs de NiFe_2O_4 foram sintetizadas por meio do método hidrotermal.⁸⁴ Para isso, 1,2 g de cloreto de níquel hexahidratado, 2,7 g de cloreto de ferro (III) hexaidratado e 7,2 mg de acetato de sódio foram dissolvidos em 100 mL de etilenoglicol e a mistura foi mantida em agitação durante 1 h. A solução resultante foi transferida para uma autoclave de aço inoxidável forrada com Teflon, o qual foi mantido a 200 °C durante 8 h. Transcorrido o tempo de reação, as NPs foram esfriadas em temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas várias vezes com água e etanol utilizando-se uma centrífuga. Finalmente, as NPs de NiFe_2O_4 foram secadas sob vácuo durante 12 h e funcionalizadas com citrato de sódio. O procedimento de funcionalização das NPs foi descrito anteriormente,¹²⁵ no qual 50 mg de NPs foram dispersos em 20 mL de água e a mistura foi aquecida a 85 °C sob agitação durante 30 min. Em seguida, um excesso de citrato de sódio foi adicionado e a suspensão foi mantida sob agitação em uma temperatura constante de 85 °C por mais 30 min. As NPs funcionalizadas foram lavadas com água ultra pura até atingir um pH neutro e armazenadas a 4 °C.

3.2.4 Modificação dos SPCEs

Os SPCEs foram modificados por meio da técnica LbL adsorvendo uma bicamada de PEI e de NPs de NiFe_2O_4 funcionalizadas. Antes da modificação dos eletrodos, um pré-

tratamento anódico foi realizado aplicando um potencial de 1,2 V durante 300 s em meio de uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após a lavagem, um volume de $15 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de PEI ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adicionado sobre a superfície do eletrodo de trabalho, que foi deixado em repouso por 5 min. Os eletrodos foram lavados com água ultrapura, secados em fluxo de gás nitrogênio e se adicionou sobre eles $15 \text{ }\mu\text{L}$ da dispersão das NPs de NiFe_2O_4 funcionalizadas. Nesta etapa foram utilizadas diferentes quantidades de NPs ($0,2$ e $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) com o objetivo de se avaliar o efeito da concentração de NPs sobre o desempenho dos sensores. Uma concentração máxima de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ foi escolhida devido à baixa estabilidade das dispersões em concentrações mais altas, para as quais foi observado um alto grau de sedimentação das NPs. Após 5 min, os eletrodos foram lavados e secados com gás nitrogênio. Os eletrodos preparados com baixa e alta concentração de NPs foram denotados SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B, respectivamente.

3.2.5 Imobilização do anticorpo anti-p53 e fabricação dos imunossensores

O anticorpo anti-p53 foi imobilizado na superfície dos eletrodos modificados a partir de ligações covalentes com os grupos carboxilas presentes nas NPs funcionalizadas. Para a ativação dos grupos carboxilas, depositou-se $15 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução contendo $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS sobre a superfície dos eletrodos de trabalho. Após 20 min, os eletrodos foram lavados e secados e sobre eles foi depositado um volume de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de anti-p53 em tampão PBS pH 7,4 e incubados em temperatura ambiente durante 45 min. Para diminuir efeitos de adsorção inespecífica, os eletrodos de trabalho foram incubados com $15 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de BSA 0,1% em PBS pH 7,4 com 0,05% de Tween-20 (PBS-T20) durante 15 min. Finalmente, os eletrodos foram lavados com PBS e secados com nitrogênio. O procedimento geral de modificação dos eletrodos é ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 - Representação esquemática da fabricação do imunossensor: (A) deposição sobre a superfície dos SPCEs de filmes LbL com baixa e alta concentração de NPs de NiFe₂O₄ e (B) imobilização dos anticorpos anti-p53 e subsequente bloqueio da superfície.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

3.2.6 Medidas eletroquímicas e construção da curva analítica

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato Autolab (Methron, Suíça) gerenciado pelo *software* Nova 2.1.3. As medidas de EIS foram realizadas sob um potencial de circuito aberto com amplitude de 10 mV na faixa de frequências de 0,1 a 100 kHz. A ferramenta *fit and simulation* do *software* Nova 2.1.3 foi utilizada para ajustar os circuitos eletroquímicos equivalentes aos dados experimentais. Todos os espectros de impedância foram ajustados utilizando o circuito de Randles modificado e previamente definido na Secção 2.2.5.

Para a construção das curvas analíticas, os imunossensores foram incubados com 10 µL de soluções de diferentes concentrações de p53 em tampão fosfato pH 7,0 durante 20 min. Posteriormente, foram lavados com soluções de PBS e secados em fluxo contínuo de nitrogênio antes de realizar as medidas eletroquímicas. A interação antígeno-anticorpo foi monitorada utilizando a técnica DPV (parâmetros: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V) em uma solução contendo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato pH 7,0.

O valor de LD foi calculado considerando a concentração que promove uma mudança no sinal de $3 \times S_B$, sendo S_B o desvio padrão de 10 brancos.⁴⁰

3.2.7 Caracterizações

As imagens de SEM foram obtidas utilizando-se um microscópio ZEISS Sigma. A caracterização estrutural NPs de NiFe_2O_4 foi realizada por difração de raios X (XRD, *Xray diffraction*) utilizando um difractômetro Rigaku Rotaflex RU-200B (Rigaku, EUA) com radiação $\text{CuK}\alpha$ na faixa de 2θ de 10° a 90° e velocidade de varredura de 2° min^{-1} . Os difractogramas obtidos foram comparados com dados cristalográficos reportados na base de dados *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS). A funcionalização das NPs foi investigada com medidas de potencial Zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS, *dynamic light scattering*) usando um equipamento Zsizer Nano ZS90 (Malvern, Reino unido). O preparo dos filmes de PEI e NPs, assim como a imobilização dos anticorpos nas plataformas com diferentes concentrações de NPs, foram estudados por espectroscopia de infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS, *polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy*) e microbalança de cristal de quartzo (QCM, *quartz crystal microbalance*). Em ambos os experimentos foram utilizadas superfícies de Au funcionalizadas com 50 mmol L^{-1} de 11-MUA durante 24 h, com o objetivo de simular a superfície dos SPCEs pré-tratados. Os experimentos de PM-IRRAS foram realizados com um espectrofotômetro PMI 550 (KSV, Finlândia) gerenciado pelo *software* IRRAS 1.0.5 utilizando um ângulo de incidência de 81° . As medidas de QCM foram realizadas com um equipamento QCM 200 (*Stanford Research Systems Inc.*, EUA) com um cristal de quartzo de frequência de oscilação de 5 MHz recoberto com um filme de Au. As quantidades de NPs e anticorpos depositadas nos diferentes filmes foram estimadas utilizando a equação de Sauerbrey (Equação 3.1).

$$\frac{\Delta m}{A} = - \frac{\Delta f \sqrt{\rho_q \mu_q}}{2f_0^2} \quad 3.1$$

Sendo Δf a mudança na frequência após a deposição dos filmes, f_0 (5 MHz) a frequência de oscilação do cristal de quartzo, ρ_q ($2,65 \text{ g cm}^{-3}$) a densidade do quartzo, μ_q ($2,95 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$) o módulo de cisalhamento do cristal de quartzo e A a área de trabalho do eletrodo.

3.2.8 Tratamento das amostras analisadas

A capacidade do imunossensor para detectar p53 em matrizes complexas foi testada usando três tipos de amostras: SFB, saliva e sobrenadante da linhagem celular Saos-2 (não expressa p53). As amostras de saliva foram coletadas de voluntários saudáveis que deram autorização verbal e foram instruídos para não comer, fumar, beber ou mascar chiclete nos 30 min anteriores ao fornecimento das amostras. O procedimento para a obtenção das amostras foi realizado conforme as orientações do Hospital do amor e consistiu em enxaguar a boca rigorosamente com 10 mL de solução de NaCl 0,9% por 2 min e depositar o enxague em um tubo falcon de 50 mL. As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado novamente; o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi armazenado a -80 °C. Antes do uso, as amostras foram descongeladas e ressuspensas em 200 µL de PBS.

Para as medições, todas as amostras (SFB, saliva e sobrenadante de célula) foram diluídas 100 vezes com soluções de PBS e fortificadas com concentrações conhecidas de p53. As análises foram feitas em triplicata incubando os imunossensores com 10 µL da amostra por 20 min. Os imunossensores foram então lavados com soluções de PBS e secos em fluxo de nitrogênio. As medições de DPV foram realizadas seguindo o mesmo procedimento usado na construção das curvas analíticas.

3.2.9 Métodos de visualização de informação

Os dados foram analisados utilizando técnicas de visualização e de redução de dimensionalidade implementadas no *software Projection explorer sensors* (PEX-Sensors).¹²⁷ Os voltammogramas com linha base corrigida foram reduzidos dimensionalmente e projetados pela técnica de mapas de documentos interativos (IDMAP, *Interactive document map*). Assim, foi possível criar representações visuais para a análise das similaridades entre os dados, nas quais cada voltamograma de pulso diferencial foi transformado em um único ponto de um espaço de duas dimensões e voltamogramas com respostas similares aparecem próximos uns dos outros. O desempenho das projeções foi avaliado pelo cálculo do coeficiente de silhueta (*Silhouette coefficient*), S , definido como:

$$S = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(b_i - a_i)}{\max(a_i, b_i)} \quad 3.2$$

Sendo a_i a media das distâncias entre o i -ésimo ponto e os outros pontos pertencentes ao mesmo cluster, e b_i a distância mínima entre o i -ésimo ponto e todos os pontos pertencentes aos outros clusters. Os valores de S variaram entre -1 e 1 , com os valores mais altos indicando uma melhor qualidade da classificação.¹²⁸

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Caracterização das NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas

A caracterização das NPs de NiFe_2O_4 foi realizada usando as técnicas de SEM e XRD. Como se observa na Figura 3.2 A, as NPs apresentaram uma morfologia esférica com diâmetro médio de 180 nm (ver histograma de distribuição na Figura 3.2 B, realizado utilizando o software Image J). Na Figura 3.2 C é apresentado o perfil de difração de raios X de pó das NPs, cujos planos foram indexados de acordo com a carta cristalográfica JCPDS N°. 10-0325. A partir destes resultados, confirmou-se a formação da fase espinélio cúbica do NiFe_2O_4 .

Figura 3.2 - Imagem de SEM das NPs de NiFe_2O_4 (A). Histograma de distribuição do diâmetro das NPs (B). Perfil de difração de raios X de pó das NPs de NiFe_2O_4 (C). A indexação dos planos cristalográficos e que se refere ao arquivo JCPDS N°. 10-0325 para a fase espinélio cúbica de NiFe_2O_4 .

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

As NPs foram funcionalizadas usando citrato de sódio com o objetivo de introduzir grupos funcionais carboxilatos para posterior imobilização covalente dos anticorpos anti-p53. A funcionalização das NPs é dada pela interação entre os grupos COO^- ou CO^- presentes nas moléculas de citrato e os átomos de Fe na superfície das NPs formando camadas auto-organizadas, nas quais as moléculas de citrato podem adquirir diferentes conformações dependendo do pH. Nas condições utilizadas neste estudo ($\text{pH} > 7$), é esperada a formação de ligações envolvendo tanto os grupos COO^- quanto os CO^- , conforme o esquema apresentado na Figura 3.3.¹²⁹

Figura 3.3 – Possíveis conformações das moléculas de citrato adsorvidas na superfície das NPs de NiFe_2O_4 .
Fonte: Adaptada de ZHANG *et al.*¹²⁹

A introdução destes grupos funcionais foi verificada a partir de experimentos de potencial Zeta e DLS. Na Figura 3.4 são apresentados os resultados das medidas de DLS para as NPs de NiFe_2O_4 antes e depois da funcionalização. Os parâmetros obtidos para ambas as amostras estão resumidos na Tabela 3.1, junto aos resultados dos experimentos de potencial Zeta. Os valores do diâmetro hidrodinâmico para as NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas foram de 323,2 nm e 254,4 nm, respectivamente. O maior tamanho verificado para as NPs sem funcionalizar é atribuído à formação de aglomerados devido à forte interação magnética dipolar entre partículas.¹³⁰ A introdução dos grupos carboxilato pode reduzir esta interação e promover a formação de suspensões mais estáveis, com menos aglomerados e com uma distribuição mais estreita do tamanho de partículas, ou seja, como menores valores de índice de polidispersabilidade (Tabela 3.1). No caso, a diminuição neste índice foi de cerca de 71%. Adicionalmente, a funcionalização da superfície foi corroborada pela mudança no potencial Zeta, que passou de (28 ± 5) mV nas NPs de NiFe_2O_4 para (-27 ± 8) mV nas NPs de NiFe_2O_4 funcionalizadas.

Figura 3.4 - Distribuição do diâmetro hidrodinâmico obtido a partir dos experimentos de DLS para as NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

Tabela 3.1 - Resultados das medidas de DLS e de potencial Zeta para as NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas.

Amostra		Potencial Zeta (mV)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersabilidade
NPs de NiFe_2O_4		28 ± 5	323,2	0,131
NPS de	NiFe_2O_4 funcionalizadas	-27 ± 8	254,4	0,038

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

3.3.2 Resposta eletroquímica dos SPCEs modificados com NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas

A resposta eletroquímica dos SPCEs modificados com filmes de NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas foi investigada utilizando a sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Na Figura 3.5 são apresentados os voltamogramas obtidos em uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Foi observada uma melhor resposta eletroquímica para o eletrodo modificado com NPs sem

funcionalizar, já que ele apresentou um aumento na corrente anódica de $\sim 2\times$. Embora as NPs de NiFe_2O_4 apresentassem condutividade elétrica e atividade catalítica frente a moléculas tais como H_2O_2 , o incremento na corrente anódica, neste caso, pode ser atribuído principalmente a alterações no comportamento difusional da sonda redox devido à própria estrutura porosa do filme (ver Figura 3.2 A).^{131,132} A porosidade do filme tem um influência em seu comportamento voltamétrico por conta da presença dos dois picos de redução em 0,3 V e -0,2 V (vs Ag/AgCl) (Figura 3.2 A). O aparecimento desses picos pode ser explicado pela presença de espécies acumuladas nos poros do filme e difundidas até a superfície do eletrodo desde o seio da solução.

Figura 3.5 - Voltamogramas cíclicos para SPCEs e eletrodos modificados com NPs de NiFe_2O_4 e de NiFe_2O_4 funcionalizadas em uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. $v=100 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

Por outro lado, a modificação do eletrodo com NPs funcionalizadas levou à diminuição nas respostas de corrente (Figura 3.5). Este efeito pode ser justificado pela presença de grupos funcionais com carga negativa na superfície das partículas e que podem repelir a sonda redox, também carregada negativamente. Para o desenvolvimento de imunossensores amperométricos, uma baixa definição nos sinais de corrente é uma limitação, já que pode afetar significativamente na sensibilidade do método de análise. Devido a isto, decidiu-se modificar os eletrodos com filmes de PEI que, como discutido previamente,

melhoram significativamente as respostas de corrente em presença da sonda redox $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$.

Os eletrodos foram modificados com filmes de PEI e com NPs funcionalizadas utilizando a metodologia LbL descrita no Capítulo 2. Foram utilizadas duas concentrações de NPs funcionalizadas: 0,2 e 1,5 mg mL^{-1} , com o objetivo de se investigar se havia alguma influência da cobertura da superfície no desempenho analítico do imunossensor. A caracterização destas duas plataformas será apresentada nas seções seguintes.

3.3.3 Caracterização dos eletrodos modificados com filmes de PEI e NPs de NiFe_2O_4 funcionalizadas

A morfologia dos filmes de PEI e NPs funcionalizadas depositados por LbL sobre os SPCEs foi analisada por SEM. Como mostrado nas Figuras 3.6 A e B, não houve mudanças significativas na morfologia do eletrodo pré-tratado após a deposição dos filmes de PEI (SPCE/PEI). As Figuras 3.6 (C-D) mostram as imagens de SEM para os eletrodos modificados com 0,2 mg mL^{-1} de NPs (SPCE/PEI/NPs A), nas quais é observada a presença de partículas distribuídas na superfície do eletrodo. A modificação com dispersões de maior concentração, por sua vez, promoveu a formação de aglomerados de NPs, Figuras 3.6 (E-F) .

Com o objetivo de se estimar diferenças entre as quantidades de NPs depositadas nos dois filmes, foram realizados experimentos de QCM utilizando superfícies de Au modificadas com 11-MUA. A massa adsorvida de NPs obtida usando a equação de Sauerbrey¹³³ foi de 0,584 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para Au/PEI/NPs A e 10,3 $\mu\text{g cm}^{-2}$ para Au/PEI/NPs B, ou seja, representando um aumento de cerca de 18 vezes na quantidade de NPs adsorvida após ser utilizada uma maior concentração de NPs durante o preparo dos filmes.

Figura 3.6 - Imagens de SEM para SPCE pré-tratado (A), SPCE/PEI (B), SPCE/ PEI/NPs A (C-D) e SPCE/PEI/NPs B (E-F).

Fonte: Adaptada de IBAÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

As respostas eletroquímicas dos diferentes eletrodos em presença da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ foi investigada utilizando-se as técnicas de EIS e DPV. Na Figura 3.7 A são observados os diagramas de Nyquist para os eletrodos SPCE/PEI, SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B. A deposição das NPs ocasionou um aumento nos valores de R_{tc} , de 0,106 k Ω para 2,19 k Ω e 3,77 k Ω para SPCE/PEI, SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B, respectivamente. Deve-se ressaltar que, como o esperado, o eletrodo preparado com uma maior concentração de NPs apresentou um valor maior de R_{tc} devido à maior repulsão da sonda redox em uma superfície mais carregada negativamente. Este efeito também se reflete na intensidade de corrente em experimentos de DPV. Como pode ser observado na Figura 3.7

B, o sinal da corrente para o eletrodo SPCE/PEI/NPs A foi de cerca de $1,5\times$ maior em comparação ao obtido com o eletrodo SPCE/PEI/NPs B.

Figura 3.7 - Diagramas de Nyquist para os eletrodos SPCE/PEI, SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B (A). Curvas de DPV para SPCE/PEI/NPs A e SPCE/PEI/NPs B (B) em uma solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em tampão fosfato $0,1$ mol L^{-1} pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

3.3.4 Imobilização dos anticorpos anti-p53

A deposição dos diferentes filmes, assim como a imobilização dos anticorpos anti-p53, foram estudadas por PM-IRRAS utilizando como substratos eletrodos de Au modificados com 11-MUA. Na Figura 3.8 A são apresentados os espectros para os filmes de PEI e NPs funcionalizadas, nos quais é possível observar as bandas características de ambos os materiais. O espectro da superfície modificada com filmes de PEI (Au/PEI) apresentou duas bandas em 1523 e 1457 cm^{-1} , atribuídas à deformação angular dos grupos N-H e à vibração de estiramento de grupos C-N, respectivamente.¹²² Estas bandas são típicas dos grupos amino, confirmando, assim, que ocorreu a adsorção de PEI na superfície do Au. Por outro lado, o espectro obtido após a deposição das NPs apresentou uma banda larga em 1621 cm^{-1} , atribuída ao alongamento assimétrico dos grupos COO^- , e uma banda em 1392 cm^{-1} , atribuída aos modos de vibração de alongamento dos grupos C-O-. Ambos grupos funcionais estão presentes nas moléculas de citrato utilizadas na funcionalização das NPs (ver Figura 3.3).¹²⁵

Figura 3.8 - Espectros PM-IRRAS para superfícies de Au modificadas com MUA após a deposição de PEI e NPs funcionalizadas (A) e após a imobilização de anticorpos anti-p53 usando baixa (Au/PEI/NPs-Ab A) e alta (Au/PEI/NPs-Ab-B) concentração de NPs funcionalizadas.

Fonte: Adaptada de IBAÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

Os efeitos da imobilização dos anticorpos monoclonais anti-p53 nas superfícies modificadas usando baixas (Au/PEI/NPs-Ab A) e altas (Au/PEI/NPs-Ab B) concentrações de NPs funcionalizadas foram estudados por meio de espectros de PM-IRRAS. Em ambos casos, foram subtraídos os espectros dos filmes contendo PEI e NPs, com o objetivo de observar mais claramente a contribuição das bandas relacionadas com os anticorpos. Na Figura 3.8 B são apresentados os espectros, onde são observadas as bandas I e II de amidas em 1660 cm^{-1} e 1545 cm^{-1} , respectivamente. Estas bandas estão relacionadas aos modos de vibração de estiramento e flexão dos grupos C=O e N-H presentes em peptídeos, corroborando assim a imobilização dos anticorpos em ambas plataformas.¹³⁴ É importante ressaltar que a intensidade dos sinais nos espectros de PM-IRRAS não está relacionada somente à concentração dos grupos adsorvidos, mas também depende da orientação dos grupos funcionais presentes na superfície e da refletividade da superfície. Assim, uma maior intensidade das bandas no espectro da plataforma Au/PEI/NPs-Ab A não deve ser relacionada a uma maior concentração de anticorpos. De fato, de acordo com os experimentos de QCM, a concentração de anticorpos em Au/NPs-Ab B foi cerca de $5\times$ maior do que o valor encontrado para Au/PEI/NPs-Ab A ($4,35\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ e $0,831\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}$ para Au/NPs-Ab B e Au/NPs-Ab A, respectivamente).

3.3.5 Detecção de p53 em soluções padrão

A detecção de p53 em soluções padrão foi verificada por meio da técnica de DPV com os imunossensores fabricados utilizando uma baixa (SPCE/PEI/NPs-Ab A) e uma alta

(SPCE/PEI/NPs-Ab B) concentração de NPs funcionalizadas. As medidas foram realizadas em uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7). Nas Figuras 3.9 A e C são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial para os eletrodos incubados com soluções de diferentes concentrações de p53. Como pode ser observado nas Figuras 3.9 A e C (primer voltammograma, correspondente ao branco), o imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab A apresentou maior sinal de corrente ainda depois da imobilização dos anticorpos e o bloqueio da superfície, o qual foi $\sim 0,9\times$ maior em comparação ao obtido com o eletrodo SPCE/PEI/NPs-Ab B. Esta diferença é menor à observada para as plataformas na ausência de proteínas (ver Figura 3.7 B), onde o sinal para o eletrodo SPCE/PEI/NPs A foi de cerca de $1,5\times$ maior. Este comportamento é atribuído à etapa de bloqueio com BSA, já que esta proteína com carga negativa (ponto isoeletrico: 4,8)¹³⁵ é adsorvida também no filme de PEI contribuindo à diminuição do sinal. Como esperado, a formação do complexo antígeno-anticorpo na superfície do eletrodo levou a uma diminuição da corrente de pico devido à natureza isolante da proteína p53, que bloqueia a transferência de elétrons entre a sonda redox e a superfície do eletrodo.

Nas Figuras 3.9 B e D são apresentadas as curvas analíticas para SPCE/PEI/NPs-Ab A e SPCE/PEI/NPs-Ab B, respectivamente. O imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B apresentou um intervalo dinâmico mais amplo, que é atribuído a uma maior concentração de NPs na superfície do eletrodo. Como observado nos experimentos de QCM, a presença de uma maior concentração de NPs disponibiliza uma maior área superficial para a imobilização de anticorpos e, conseqüentemente, promove a presença de maior número de sítios de ligação para interação com a proteína.¹³⁶ Este aumento do intervalo linear é importante, pois permite a detecção de concentrações de p53 com uma relevância clínica para o diagnóstico de várias doenças, incluindo-se câncer gástrico (420 pg mL^{-1}),¹³⁷ carcinoma pancreático (50 pg mL^{-1}) e câncer de ovário (200 pg mL^{-1}).¹³⁸ Além disto, o uso de uma maior concentração de NPs também influenciou de maneira positiva na repetibilidade de fabricação dos imunossensores, que foi avaliada a partir de voltammograms de pulso diferencial obtidos para 5 eletrodos diferentes. O imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B apresentou uma melhor repetibilidade com RSD de 4,7%, um valor significativamente menor do que o obtido para SPCE/PEI/NPs-Ab A (15,2%). Deve-se destacar, que como esperado, o imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab A apresentou maior sensibilidade ($2,9 \mu\text{A log [p53]}^{-1}$) a qual foi $\sim 1,7\times$ maior em comparação com a plataforma SPCE/PEI/NPs-Ab B ($1,7 \mu\text{A log [p53]}^{-1}$).

Figura 3.9 - Voltamogramas de pulso diferencial e curvas analíticas ($n=3$) de detecção de p53 usando os imunossensores SPCE/PEI/NPs-Ab A (A e B) e SPCE/PEI/NPs-Ab B (C e D) em uma solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = $0,05 \text{ s}$, amplitude de modulação = $0,09 \text{ V}$ e incremento de potencial = $0,05 \text{ V}$.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

As principais características de ambas as plataformas, inferidas a partir dos experimentos de caracterização e das curvas de calibração na Figura 3.9, são comparadas na Tabela 3.2. A plataforma SPCE/PEI/NPs-Ab A apresentou maior sensibilidade devido principalmente ao maior sinal de corrente. Porém, deve-se ressaltar que embora com menor sinal analítico, o imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B apresentou melhor desempenho geral. Portanto, ênfase especial deve ser dada às etapas de otimização dos sensores, considerando outras propriedades, além do sinal analítico. Como observado neste caso, imobilizar grandes quantidades de anticorpos pode ser fundamental para melhorar o desempenho dos imunossensores. SHARAFELDIN e colaboradores¹³⁶ chegaram a conclusões semelhantes, quando compararam diferentes estratégias para a imobilização de anticorpos em superfícies de SPCEs. Devido ao desempenho superior do SPCE/PEI/NPs-Ab B, este imunossensor foi escolhido para dar continuidade aos experimentos. A equação de regressão para a curva

analítica do SPCE/PEI/NPs-Ab B (Figura 3.8 D) foi calculada como $\Delta I = (7,7 \pm 0,4) \mu\text{A} + (1,7 \pm 0,1) \mu\text{A pg}^{-1} \text{ mL log [p53]}$, com R^2 de 0,98 e LD de $5,0 \text{ fg mL}^{-1}$.

Tabela 3.2 - Comparação das características dos imunossensores SPCE/PEI/NPs-Ab A e SPCE/PEI/NPs-Ab B.

Característica	SPCE/PEI/NPs-Ab A	SPCE/PEI/NPs-Ab B
Sinal analítico	maior	menor
Capacidade para imobilização de anticorpos	baixa	alta
Repetibilidade de fabricação (RSD)	15,2%	4,7%
Intervalo linear (pg mL^{-1})	$1,0-1,0 \times 10^2$	$1,0-1,0 \times 10^4$
Sensibilidade ($\mu\text{A log [p53]}^{-1}$)	2,9	1,7

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 3.3 são comparados os parâmetros analíticos para o SPCE/PEI/NPs-Ab B e outros imunossensores eletroquímicos empregados na detecção de p53. O imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B apresentou um menor valor de LD se comparado a imunossensores baseados em SPCEs modificados com nanotubos de carbono e NPs de Au,¹⁵ SPCEs modificados com NPs de Au eletrodepositadas,¹³⁹ SPCEs combinados com NPs magnéticas,¹⁴⁰ eletrodos interdigitados de Au modificados com nanofibras de ácido polilático¹⁴¹ e monocamadas de 11-MUA,¹⁴² GCE modificado com óxido de grafeno e NPs de Au¹⁴³ e eletrodos de ITO modificado com poli(glicidilmetacrilato).¹⁴⁴

Outros imunossensores fabricados com eletrodos de ITO modificados com compósitos de CB e quitosana⁶⁰ e eletrodos de Au modificados com *quantum dots* de grafeno e NPs de Au¹⁴⁵ apresentaram menores valores de LD; porém, os experimentos foram realizados utilizando células convencionais de três eletrodos, que exigem maiores volumes de solução. Adicionalmente, os imunossensores baseados em eletrodos não descartáveis requerem etapas adicionais de polimento ou de regeneração, que não são compatíveis com aplicações do tipo point-of-care.

Tabela 3.3 - Comparação dos parâmetros analíticos para diferentes imunossensores para a detecção de p53. *Valores calculados considerando-se a massa molar de p53 como 43,7 kDa.¹⁴⁶

Eletrodo	Técnica	Sistema	Estratégia	Intervalo linear pg mL⁻¹	LD fg mL⁻¹	Referencia
SPCE-AuNp	LSW	SPCE	Competitivo	$8,7 \times 10^4 - 2,2 \times 10^6^*$	$2,2 \times 10^6^*$	139
SPCE/Magnetic micro-carriers	Amperometria	SPCE	Sanduiche	$5,0 \times 10^3 - 1,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^6$	140
SPCE-CNT/GNP	DPV	SPCE	Competitivo	$8,7 \times 10^2 - 4,4 \times 10^{5*}$	$6.1 \times 10^{5*}$	15
Au/PLA-Ab	Capacitância	Eletrodo interdigitado de Au	Sem marcação	50- $1,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	141
Au/MUA-Ab	EIS	Célula eletroquímica	Sem marcação	-----	$1,4 \times 10^3$	142
GCE/AuNPs/GO-Ab	DPV	Célula eletroquímica	Sem marcação	8,7-87 e $87 - 8,7 \times 10^{3*}$	$1,3 \times 10^{3*}$	143
ITO/StarPGMA-Ab	EIS	Célula eletroquímica	Sem marcação	$1,0 \times 10^{-2} - 4,0$	7,0	144
ITO/chitosan-CB-Ab	EIS	Célula eletroquímica	Sem marcação	$1,0 \times 10^{-2} - 2,0$	3,0	60
Au/P-Cys/GQDs/GNPs	SWV	Célula eletroquímica	Sem marcação	$8,6 \times 10^{-3} - 7,0 \times 10^{-1*}$	$2,8^*$	145
SPCE/PEI/NPs-Ab B	DPV	SPCE	Sem marcação	$1,0 - 1,0 \times 10^4$	5,0	Este trabalho

AuNp: NPs de Au, CNT: nanotubos de carbono, GNP: NPs de Au, PLA: fibras de ácido polilático, MUA: ácido 11-mercaptopundecanóico, GO: óxido de grafeno, StarPGMA: poli (glicidilmetacrilato), CB: carbon black, Cys: *cisteína*, GQDs: *quantum dots de grafeno*, HRP: peroxidase de raiz forte, BSA: Albumina de soro bovino.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

3.3.6 Processamento de dados utilizando métodos de visualização

A deposição de materiais isolantes na superfície dos eletrodos, além de originar baixos valores de intensidade de corrente, pode promover outras mudanças relevantes nos voltamogramas de pulso diferencial. Respostas tais como um deslocamento do potencial de pico e um aumento da largura dos picos são relacionadas a mudanças na cinética de transferência eletrônica¹⁴⁷ comumente observados em imunossensores sem marcação preparados com diferentes materiais e eletrodos.^{118,120,148,149} Embora estas alterações possam ser vinculadas ao aumento da concentração do analito (proteína) na superfície do eletrodo, elas são desconsideradas nas etapas de análise de dados e na construção da curva analítica, quando normalmente são só utilizados os valores das correntes de pico. Para os dois imunossensores estudados neste trabalho, observou-se, junto à diminuição no sinal de corrente, um deslocamento do potencial de pico para valores maiores e um aumento da largura dos picos nos voltamogramas de pulso diferencial (Figura 3.10). No caso do imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab A, foi também observado um segundo pico, com baixa intensidade e em potenciais maiores, e que pode ser relacionado a presença de regiões no eletrodo nas quais a sonda redox experimenta diferentes cinéticas de transferência de elétrons.¹⁵⁰ Estas alterações no comportamento eletroquímico dos imunossensores SPCE/PEI/NPs-Ab A e SPCE/PEI/NPs-Ab B podem ser observadas com melhor detalhamento na Figura 3.10.

(Continúa)

(Continuação)

Figura 3.10 - Voltamogramas de pulso diferencial para SPCE/PEI/NPs-Ab A (A) e SPCE/PEI/NPs-Ab B (B) antes (preto) e depois (vermelho) da incubação com p53. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados obtidos com o imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B foram analisados pela técnica de projeção multidimensional IDMAP,¹⁵¹ que tem sido amplamente utilizada em trabalhos com sensores e biossensores.^{91,152,153} Com esta abordagem, as dissimilaridades entre as amostras são representadas como distâncias euclidianas por meio da transformação do voltamograma de pulso diferencial para cada amostra em um único ponto de um espaço de duas dimensões.¹²⁸ Assim, várias informações contidas nos voltamogramas, e não só os valores das correntes de pico, foram aproveitadas para distinguir amostras com diferentes concentrações de p53. Na Figura 3.11 são apresentadas as projeções obtidas para quatro concentrações diferentes. Foram analisados três voltamogramas para cada amostra considerando a faixa de potencial entre -100 mV e 400 mV, com um total de 100 valores por amostra (Figura 3.11 A). Cada ponto no mapa representa um voltamograma e amostras com um perfil voltamétrico semelhante são colocadas próximas umas das outras. Como pode ser observado na Figura 3.11 B, há uma clara distinção entre amostras com diferentes concentrações de p53 e que se reflete no alto valor do coeficiente de silhueta ($S=0,8585$).

Figura 3.11 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de p53 mostrando a faixa de potencial selecionada para as análises dos dados. (B) Projeções de IDMAP para diferentes concentrações de p53. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com o objetivo de se obter uma estimativa da contribuição do deslocamento do potencial de pico, os dados dos voltamogramas de pulso diferencial foram deslocados fazendo os potenciais de pico coincidirem (ver Figura 3.12 A) e, posteriormente, foram projetados com IDMAP. Na Figura 3 12 B observa-se claramente uma menor separação dos pontos no sistema, para o qual o valor de S foi de 0,7316, sugerindo uma importante contribuição do deslocamento do potencial na classificação dos dados. Estes resultados mostram como características dos voltamogramas de pulso diferencial, que normalmente são desconsideradas nas etapas de análises, contêm informações de grande relevância analítica e que podem ser aproveitadas mediante o uso de métodos de visualização.

Figura 3.12 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial com potenciais de corrente máxima deslocados. (B) Projeções de IDMAP para diferentes concentrações de p53. Parâmetros dos voltamogramas de pulso diferencial: tempo de modulação = 0,05 s, amplitude de modulação = 0,09 V e incremento de potencial = 0,05 V.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.7 Seletividade do imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B

A seletividade do imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B para a detecção de p53 em matrizes complexas foi avaliada usando três tipos de amostras: SFB, saliva e sobrenadante de célula da linhagem celular Saos-2. Essas matrizes contêm proteínas e outras moléculas que podem atuar como interferentes na detecção. Todas as amostras foram diluídas 100×, considerando o baixo limite de detecção apresentado pelo imunossensor. Na Figura 3.13 A é apresentada a resposta do imunossensor após a incubação com as diferentes matrizes, na

ausência e na presença de $1,0 \text{ pg mL}^{-1}$ de p53. Os sinais para todas as amostras não fortificadas se mostraram consideravelmente menores do que aqueles em presença de p53, o que indica a boa seletividade do imunossensor. A capacidade do SPCE/PEI/NPs-Ab B para distinguir amostras com e sem p53 também foi corroborada a partir de projeções de IDMAP. Como se observa na Figura 3.13 B, as amostras sem p53 foram facilmente diferenciadas das amostras fortificadas e estão próximas do controle PBS.

Figura 3.13 - Estudo de seletividade do imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B para a detecção de p53 em matrizes de SFB, sobrenadante de célula e saliva. (A) Resposta do sinal de corrente e (B) gráficos de IDMAP.

Fonte: Adaptada de IBÁÑEZ-REDÍN *et al.*¹²⁶

3.3.8 Aplicação do SPCE/PEI/NPs-Ab B na detecção de p53 em amostras de saliva

A aplicabilidade do imunossensor foi investigada pela determinação de p53 em amostras de saliva fortificadas com três diferentes concentrações da proteína (0,02; 0,5 e 10 ng mL⁻¹). Na Figura 3.14 são apresentadas as concentrações determinadas para as diferentes amostras comparadas com as concentrações reais. Os valores obtidos, conforme Figura 3.14, foram similares às concentrações adicionadas, o que demonstra o potencial do imunossensor proposto para aplicações na determinação de diferentes níveis de p53 em amostras de saliva. O SPCE/PEI/NPs-Ab B poderia ser utilizado em análises de triagem de pacientes com suspeita de doenças relacionadas com a cavidade oral, tais como carcinoma oral de células escamosas, para o qual têm sido repostadas concentrações de p53 em saliva de 0,709 ng mL⁻¹.¹⁵⁴

Figura 3.14 - Determinação de p53 em amostras de saliva dopadas com concentrações conhecidas da proteína.
Fonte: Elaborada pela autora.

Além de apresentar bom desempenho analítico, o imunossensor SPCE/PEI/NPs-Ab B também é vantajoso quando comparado com algumas tecnologias para detecção de p53 disponíveis comercialmente. Isto é devido à simplicidade de uso e principalmente ao baixo custo o qual é ~R\$ 4,0 por análise (custo de materiais e reagentes). Este valor é significativamente inferior em comparação com vários kits de ELISA utilizados para detecção de p53 em amostras de sobrenadante de célula, soro e plasma (~R\$ 28-35 por análise).^{155,156}

3.4 Conclusões

A grande área superficial das NPs de NiFe_2O_4 foi combinada com a capacidade de amplificação do sinal analítico dos filmes de PEI para desenvolver imunossensores capazes de detectar baixas concentrações da proteína tumoral p53. Os filmes foram utilizados na modificação de SPCEs e o efeito da concentração de NPs foi investigado usando diferentes técnicas de caracterização. Verificou-se que, embora apresentassem um sinal analítico inferior, os imunossensores com maior concentração de nanopartículas exibiram melhor desempenho, atribuído a uma maior área superficial para a imobilização de anticorpos. O melhor imunossensor apresentou melhores parâmetros analíticos do que a maioria de imunossensores reportados na literatura para a detecção de p53, incluindo sistemas sanduíche, que implicam em melhores desempenhos. Outra contribuição deste estudo foi no uso de métodos de visualização para o tratamento de dados de imunossensores sem marcação baseados em medidas de DPV. A partir da projeção dos dados pelo método de IDMAP, foi possível utilizar diferentes informações contidas nos voltamogramas de pulso diferencial (e não só as correntes de pico) para a classificação de amostras com diferentes concentrações de p53. Adicionalmente, o imunossensor apresentou uma boa seletividade para a detecção de p53 em ensaios usando matrizes complexas (SFB, sobrenadante de célula e saliva).

3.5 Publicações relacionadas

Os resultados apresentados neste capítulo reproduzidos com permissão da *Springer Nature* (Número de licença: 5024300291847) foram publicados em IBÁÑEZ-REDÍN, G; JOSHI, N; FREITAS DO NASCIMENTO, G; WILSON, D; MELENDEZ, M, CARVALHO, A; REIS, R; GONÇALVES, D; OLIVEIRA JR. O.N *Determination of p53 biomarker using an electrochemical immunoassay based on layer-by-layer films with NiFe_2O_4 nanoparticles*. *Microchimica Acta*, v. 187, n. 619, p. 1–10, 2020.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese foram exploradas novas estratégias para a modificação de eletrodos de carbono impressos por serigrafia aplicados em imunossensores para detectar biomarcadores de câncer. Focou-se em otimizar o desempenho de imunossensores sem marcação baseados em medidas de voltametria de pulso diferencial, melhorando tanto o sinal analítico quanto a área superficial para a imobilização dos anticorpos. Os eletrodos foram modificados com filmes nanoestruturados baseados em *carbon black*, polieletrólitos e nanopartículas de NiFe_2O_4 . O uso destes nanomateriais de baixo custo e relativamente inexplorados em imunossensores eletroquímicos, permitiu desenvolver testes descartáveis, económicos (custo por análise <R\$ 4,0), rápidos, e com excelentes parâmetros analíticos na detecção do CA 19-9 e da proteína supressora de tumores p53.

As arquiteturas utilizadas nos sensores foram caracterizadas a partir de diferentes técnicas eletroquímicas, microscópicas, piezoelétricas e espectroscópicas, com o qual foi possível otimizar o desempenho dos dispositivos e obter informações detalhadas sobre a interação dos componentes nos filmes. Destaca-se, a grande influência tanto da composição dos filmes, quanto da técnica utilizada na sua deposição sobre o desempenho geral dos imunossensores. No caso dos dispositivos baseados em filmes de compósitos de *carbon black* e polieletrólitos, por exemplo, a metodologia *layer-by-layer* se mostrou vantajosa em comparação com a técnica de *drop-casting*, a qual é a metodologia por excelência utilizado na fabricação de filmes de *carbon black* para aplicações em eletroanálise. Por outro lado, nos sensores baseados em nanopartículas de NiFe_2O_4 observou-se que, embora apresentassem um sinal analítico inferior, o uso de filmes com maior concentração de nanopartículas resultou em melhores desempenhos devido à maior área superficial para a imobilização de anticorpos.

Ambos os dispositivos desenvolvidos neste trabalho se mostraram eficientes na detecção dos biomarcadores em matrizes complexas. Utilizando o dispositivo baseado em filmes de *carbon black* e polieletrólitos foi possível determinar CA 19-9 em amostras de soro de pacientes com câncer de pâncreas, mostrando boa correlação com o imunoensaio comercial de eletroquimioluminescência. Por outro lado, utilizando o sensor fabricado com nanopartículas de NiFe_2O_4 em combinação com a técnica IDMAP, foi possível distinguir entre amostras de soro fetal bovino, saliva e sobrenadante de célula com e sem p53.

Pode-se antever a exploração dos temas tratados nesta tese para aplicações em pesquisas futuras. Ambas as arquiteturas propostas poderiam ser aplicadas na fabricação de outros imunossensores (incluindo-se do tipo sanduiche) e na detecção de diferentes

biomarcadores de doenças. Por outro lado, o uso de métodos de redução de dimensionalidade e visualização mostrou ser uma ferramenta promissória para o tratamento de dados de imunossensores baseados em medidas de voltametria, com a qual é possível subtrair informações de relevância analítica que normalmente são desconsideradas. Esta abordagem poderia ser de grande utilidade no desenvolvimento de imunossensores para outros tipos de analitos, principalmente na análises de bactérias e vírus. Particularmente, a modificação de eletrodos impressos de carbono com *carbon black* poderiam ser explorados mais detalhadamente visando a fabricação de testes descartáveis e econômicos com potencial aplicação em análises clínica. Assim, são esperadas pesquisas explorando a funcionalização do material, a combinação com diversos nanomateriais e polímeros e a implementação de novas estratégias para a deposição dos filmes e para a imobilização das biomoléculas.

REFERÊNCIAS

- 1 BOHUNICKY, B.; MOUSA, S. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, p. 1–10, 2011. DOI: 10.2147/NSA.S13465.
- 2 WILD CP, WEIDERPASS E, S. B. (ed.). **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2020.
- 3 AMERICAN CANCER SOCIETY. **Global cancer facts & figures**. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/global.html>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- 4 BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- 5 INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, 2019.
- 6 ARNOLD, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319511.
- 7 SARKAR, S.; DAS, S. A review of imaging methods for prostate cancer detection. **Biomedical Engineering and Computational Biology**, v. 7, n. S1, p. 1–15, 2016. DOI: 10.4137/BECB.S34255.
- 8 HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 2, p. 140–146, 2012. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.01.010.
- 9 RUSLING, J. F. *et al.* Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. **Analyst**, v. 135, n. 10, p. 2496–511, 2010. DOI: 10.1039/c0an00204f.
- 10 WU, L.; QU, X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 10, p. 2963–2997, 2015. DOI: 10.1039/C4CS00370E.
- 11 MORDENTE, A. *et al.* Cancer biomarkers discovery and validation: state of the art, problems and future perspectives. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 867, p. 9–26, 2015. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0_2.
- 12 KUCHENBAECKER, K. B. *et al.* Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Journal of the American Medical Association**, v. 317, n. 23, p. 2402–2416, 2017. DOI: 10.1001/jama.2017.7112.
- 13 MOULDER, D. E. *et al.* The roles of p53 in mitochondrial dynamics and cancer metabolism: the pendulum between survival and death in breast cancer? **Cancers**, v. 10, n. 6, p. 189, 2018. DOI: 10.3390/cancers10060189.

- 14 HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; DE LA GUARDIA, M. Current advancement in immunosensing of p53 tumor suppressor protein based on nanomaterials: analytical approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 89, p. 13–20, 2017. DOI: 10.1016/J.TRAC.2017.01.007.
- 15 GIANNETTO, M. *et al.* Competitive amperometric immunosensor for determination of p53 protein in urine with carbon nanotubes/gold nanoparticles screen-printed electrodes: a potential rapid and noninvasive screening tool for early diagnosis of urinary tract carcinoma. **Analytica Chimica Acta**, v. 991, p. 133–141, 2017. DOI: 10.1016/J.ACA.2017.09.005.
- 16 WARNAKULASURIYA, S. *et al.* Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. **Journal of Pathology**, v. 192, n. 1, p. 52–57, 2000. DOI: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH669>3.0.CO;2-C.
- 17 YIN, X. *et al.* Simultaneous determination of two phosphorylated p53 proteins in SCC-7 cells by an ICP-MS immunoassay using apoferritin-templated europium(III) and lutetium(III) phosphate nanoparticles as labels. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 7, p. 424, 2019. DOI: 10.1007/s00604-019-3540-4.
- 18 AGHA-HOSSEINI, F.; MIRZAI-DIZGAH, I.; MIRI-ZARANDI, N. S. Unstimulated salivary p53 in patients with oral lichen planus and squamous cell carcinoma. **Acta Medica Iranica**, v. 53, n. 7, p. 439–443, 2015.
- 19 MUNKLEY, J. The glycosylation landscape of pancreatic cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 17, n. 3, p. 2569–2575, 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.9885.
- 20 PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015. DOI: 10.1038/nrc3982.
- 21 SCARA, S.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. CA 19-9: biochemical and clinical aspects. *In*: SCATENA, R. (ed.). **Advances in cancer biomarkers**. Dordrech: Springer, 2015. p. 247–260. (Advances in experimental medicine and biology, v. 867).
- 22 PARTYKA, K. *et al.* Diverse monoclonal antibodies against the CA 19-9 antigen show variation in binding specificity with consequences for clinical interpretation. **Proteomics**, v. 12, n. 13, p. 2212–2220, 2012. DOI: 10.1002/pmic.201100676.
- 23 GALLI, C.; BASSO, D.; PLEBANI, M. CA 19-9: handle with care. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 51, n. 7, p. 1369–1383. DOI: 10.1515/cclm-2012-0744.
- 24 DIXIT, C. K. *et al.* Electrochemistry-based approaches to low cost, high sensitivity, automated, multiplexed protein immunoassays for cancer diagnostics. **Analyst**, v. 141, n. 2, p. 536–547, 2015. DOI: 10.1039/C5AN01829C.
- 25 TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184, 2013. DOI: doi.org/10.1039/C3CS35528D.
- 26 KOUGIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **IEEE Potentials**, v. 25, n. 2, p. 35–40, 2006. DOI: 10.1109/MP.2006.1649009.

- 27 ZHANG, X.; JU, H. J.; WANG, J. **Electrochemical sensors, biosensors, and their biomedical applications**. Boston: Academic Press, 2008.
- 28 AIZAWA, M. *et al.* An enzyme immunosensor for IgG. **Journal of Solid-Phase Biochemistry**, v. 1, n. 4, p. 319–328, 1976. DOI: 10.1007/BF02990970.
- 29 AIZAWA, M.; MORIOKA, A.; SUZUKI, S. An enzyme immunosensor for the electrochemical determination of the tumor antigen α -fetoprotein. **Analytica Chimica Acta**, v. 115, n. C, p. 61–67, 1980. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)93143-5.
- 30 MALHOTRA, R. *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensor for oral cancer biomarker IL-6 using carbon nanotube forest electrodes and multilabel amplification. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 8, p. 3118–3123, 2010. DOI: 10.1021/ac902802b.
- 31 SHARAFELDIN, M. *et al.* Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 359–366, 2017. DOI: 10.1016/J.BIOS.2016.12.052.
- 32 KAVOSI, B. *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 915–923, 2015. DOI: 10.1016/J.BIOS.2015.07.064.
- 33 MANI, V. *et al.* Ultrasensitive immunosensor for cancer biomarker proteins using gold nanoparticle film electrodes and multienzyme-particle amplification. **ACS Nano**, v. 3, n. 3, p. 585–594, 2009. DOI: 10.1021/nn800863w.
- 34 QURESHI, A. *et al.* Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2318–2323, 2010. DOI: 10.1016/j.bios.2010.03.018.
- 35 ARYA, S. K. *et al.* Capacitive aptasensor based on interdigitated electrode for breast cancer detection in undiluted human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, n. 2017, p. 106–112, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.013.
- 36 AHMAD, R. *et al.* Deposition of nanomaterials: a crucial step in biosensor fabrication. **Materials Today Communications**, v. 17, p. 289–321, 2018. DOI: 10.1016/j.MTCOMM.2018.09.024.
- 37 ZENG, Y. *et al.* A sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of cytokeratin 19 fragment antigen 21-1 based on 3D graphene with gold nanoparticle modified electrode. **Talanta**, v. 178, p. 122–128, 2018. DOI: 10.1016/j.TALANTA.2017.09.020.
- 38 OKUNO, J. *et al.* Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9–10, p. 2377–2381, 2007. DOI: 10.1016/j.bios.2006.09.038.
- 39 TUTEJA, S. K. *et al.* A label-free electrochemical immunosensor for the detection of cardiac marker using graphene quantum dots (GQDs). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 548–556, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.052.

- 40 WANG, Y. *et al.* Label-free electrochemical immunosensor based on flower-like Ag/MoS₂/rGO nanocomposites for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 255, p. 125–132, 2018. DOI: 10.1016/J.SNB.2017.07.129.
- 41 ARDUINI, F. *et al.* Electroanalytical characterization of carbon black nanomaterial paste electrode: development of highly sensitive tyrosinase biosensor for catechol detection. **Analytical Letters**, v. 43, n. 10–11, p. 1688–1702, 2010. DOI: 10.1080/00032711003653932.
- 42 ARDUINI, F. *et al.* High performance electrochemical sensor based on modified screenprinted electrodes with cost-effective dispersion of nanostructured carbon black. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 3, p. 346–350, 2010. DOI: 10.1016/j.elecom.2009.12.028.
- 43 CINTI, S. *et al.* Screen-printed electrodes modified with carbon nanomaterials: a comparison among carbon black, carbon nanotubes and graphene. **Electroanalysis**, v. 27, n. 9, p. 2230–2238, 2015. DOI: 10.1002/elan.201500168.
- 44 BESENHARD, J. O.; FRITZ, H. P. The electrochemistry of black carbons. **Angewandte Chemie**, v. 22, n. 12, p. 950–975, 1983. DOI: 10.1002/anie.198309501.
- 45 SILVA, T. A. *et al.* Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: a review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1–14, 2017. DOI: 10.1155/2017/4571614.
- 46 KUBENDHIRAN, S. *et al.* Functionalized-carbon black as a conductive matrix for nickel sulfide nanospheres and its application to non-enzymatic glucose sensor. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 165, n. 3, p. B96–B102, 2018.
- 47 IBÁÑEZ-REDÍN, G. *et al.* Effect of carbon black functionalization on the analytical performance of a tyrosinase biosensor based on glassy carbon electrode modified with dihexadecylphosphate film. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 116, p. 41–47, 2018. DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2018.05.007.
- 48 ARDUINI, F. *et al.* Carbon black as an outstanding and affordable nanomaterial for electrochemical (bio)sensor design. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 156, p. 112033, 2020. DOI: 10.1016/J.BIOS.2020.112033.
- 49 LOUNASVUORI, M. M.; KELLY, D.; FOORD, J. S. Carbon black as low-cost alternative for electrochemical sensing of phenolic compounds. **Carbon**, v. 129, p. 252–257, 2018. DOI: 10.1016/J.CARBON.2017.12.020.
- 50 TOMEI, M. R. *et al.* Carbon black-based disposable sensor for an on-site detection of free chlorine in swimming pool water. **Talanta**, v. 189, p. 262–267, 2018. DOI: 10.1016/J.TALANTA.2018.07.005.
- 51 EISELE, A. P. P. *et al.* Layering of a film of carboxymethyl-botryosphaeran onto carbon black as a novel sensitive electrochemical platform on glassy carbon electrodes for the improvement in the simultaneous determination of phenolic compounds. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 287, p. 18–26, 2019. DOI: 10.1016/J.SNB.2019.02.004.

52 DEROCO, P. B.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. A new and simple method for the simultaneous determination of amoxicillin and nimesulide using carbon black within a dihexadecylphosphate film as electrochemical sensor. **Talanta**, v. 179, p. 115–123, 2018. DOI: 10.1016/J.TALANTA.2017.10.048.

53 ARDUINI, F. *et al.* Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 346–354, 2019. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.10.014.

54 ARDUINI, F. *et al.* Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 3–4, p. 643–651, 2014. DOI: doi.org/10.1007/s00604-014-1370-y.

55 PORTACCIO, M. *et al.* Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine–carbon black nanocomposite, for bisphenol a detection. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 340–347, 2013. DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2013.07.129.

56 HUANG, K. *et al.* A sequence-specific DNA electrochemical sensor based on acetyleneblack incorporated two-dimensional CuS nanosheets and gold nanoparticles. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 209, p. 570–578, 2014. DOI: 10.1016/J.SBN.2014.12.023.

57 SHUAI, H.; HUANG, K.; CHEN, Y. A layered tungsten disulfide / acetylene black composite based DNA biosensing platform coupled with hybridization chain reaction for signal amplification. **Journal of Materials Chemistry B**, 2016. DOI: 10.1039/C5TB02214B.

58 FAKUDE, C. T.; AROTIBA, O. A.; MABUBA, N. Electrochemical aptasensing of cadmium (II) on a carbon black-gold nano- platform. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 858, p. 113796, 2020. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2019.113796.

59 KULIKOVA, T. *et al.* Impedimetric determination of kanamycin in milk with aptasensor based on carbon black-oligolactide composite. **Sensors**, v. 20, n. 4738, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3390/s20174738.

60 AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. Electrochemical immunosensor based on chitosan/conductive carbon black composite modified disposable ITO electrode: an analytical platform for p53 detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 121, p. 80–89, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.09.008.

61 BURCU, E.; AYDIN, M.; KEMAL, M. A novel electrochemical immunosensor based on acetylene black / epoxy-substituted-polypyrrole polymer composite for the highly sensitive and selective detection of interleukin 6. **Talanta**, v. 222, p. 121596, 2021. DOI: 10.1016/J.TALANTA.2020.121596.

62 BURCU, E.; KEMAL, M. A comparison between LP (GMA) and CLP (GMA) polymer composites as an immobilization matrix for biosensing applications: a model immunosensor for IL 1 a. **Analytica Chimica Acta**, v. 1077, p. 129–139, 2019. DOI: 10.1016/J.ACA.2019.05.049.

- 63 AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A highly selective electrochemical immunosensor based on conductive carbon black and star PGMA polymer composite material for IL-8 biomarker detection in human serum and saliva. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 720–728, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.07.010.
- 64 MAZZARACCHIO, V. *et al.* Inside the different types of carbon black as nanomodifiers for screen-printed electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 317, p. 673–683, 2019. DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2019.05.117.
- 65 CAGNANI, G. R. *et al.* Fully-printed electrochemical sensors made with flexible screen-printed electrodes modified by roll-to-roll slot-die coating. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112428, 2020. DOI: 10.1016/J.BIOS.2020.112428.
- 66 MIYAZAKI, C. M. *et al.* Polyethylene imine/graphene oxide layer-by-layer surface functionalization for significantly improved limit of detection and binding kinetics of immunoassays on acrylate surfaces. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 158, p. 167–174, 2017. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2017.06.042.
- 67 JAN, J. *et al.* Carbon black thin films with tunable resistance and optical transparency. **Carbon**, v. 44, n. 10, p. 1974–1981, 2006. DOI: 10.1016/j.carbon.2006.01.021.
- 68 SALATA, O. V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 6, p. 1–6, 2004. DOI: 10.1186/1477-3155-2-3.
- 69 CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis : an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 241–259, 2010. DOI: 10.1007/s00216-009-3063-7.
- 70 VICENTINI, F. C. *et al.* A biosensor based on gold nanoparticles , dihexadecylphosphate , and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 17–23, 2016. DOI: 10.1016/J.ENZIMICTEC.2015.12.004.
- 71 SUHERMAN, A. L. *et al.* Electrochemical detection of ultratrace (picomolar) levels of Hg²⁺ using a silver nanoparticle-modified glassy carbon electrode. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 13, p. 7166–7173, 2017. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01304.
- 72 SHIM, K. *et al.* Efficient wide range electrochemical bisphenol-A sensor by self-supported dendritic platinum nanoparticles on screen-printed carbon electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 255, p. 2800–2808, 2018. DOI: 10.1016/J.SNB.2017.09.096.
- 73 MA, Y. *et al.* Strongly coupled FeNi alloys / NiFe₂O₄ @ carbonitride layers- assembled microboxes for enhanced oxygen evolution reaction. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 50, p. 34396–34404, 2016. DOI: 10.1021/acsami.6b11821.
- 74 GUL, S. *et al.* A comprehensive review of magnetic nanomaterials modern day theranostics. **Frontiers in Materials**, v. 6, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3389/FMATS.2019.00179.
- 75 ENSAFI, A. A. *et al.* Electrochemical sensing of flutamide contained in plasma and urine matrices using NiFe₂O₄/rGO nanocomposite, as an efficient and selective electrocatalyst. **Electroanalysis**, v. 32, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1002/ELAN.202000048.

- 76 ENSAFI, A. A. *et al.* NiFe₂O₄ nanoparticles decorated with MWCNTs as a selective and sensitive electrochemical sensor for the determination of epinephrine using differential pulse voltammetry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6885–6892, 2014. DOI: 10.1039/C4AY01232A.
- 77 EL-WEKIL, M. M. *et al.* A facile synthesis of 3D NiFe₂O₄ nanospheres anchored on a novel ionic liquid modified reduced graphene oxide for electrochemical sensing of ledipasvir: Application to human pharmacokinetic study. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 109, p. 164–170, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.03.015.
- 78 AFKHAMI, A. *et al.* Preparation of NiFe₂O₄/graphene nanocomposite and its application as a modifier for the fabrication of an electrochemical sensor for the simultaneous determination of tramadol and acetaminophen. **Analytica Chimica Acta**, v. 831, p. 50–59, 2014. DOI: 10.1016/j.ACA.2014.04.061.
- 79 ENSAFI, A. A. *et al.* Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA based on NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles decorated MWCNTs as a novel electrochemical sensor using adsorptive stripping voltammetry. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 177, p. 634–642, 2013. DOI: 10.1016/J.SNB.2012.11.028.
- 80 NITHYAYINI, K. N.; HARISH, M. N. K.; NAGASHREE, K. L. Electrochemical detection of nitrite at NiFe₂O₄ nanoparticles synthesised by solvent deficient method. **Electrochimica Acta**, v. 317, p. 701–710, 2019. DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2019.06.026.
- 81 DARABI, R.; SHABANI-NOOSHABADI, M. NiFe₂O₄ -rGO/ionic liquid modified carbon paste electrode: an amplified electrochemical sensitive sensor for determination of sunset yellow in the presence of tartrazine and allura red. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127841, 2021. DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.127841.
- 82 LUO, L. *et al.* Amperometric glucose biosensor based on NiFe₂O₄ nanoparticles and chitosan. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 145, n. 1, p. 293–298, 2010. DOI: 10.1016/j.snb.2009.12.018.
- 83 SUN, A.-L.; QI, Q.-A.; DONG, Z.-L. Label-free electrochemical immunosensor for the determination of feto-protein based on core-shell nanocomposite particles. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, n. 8, p. 782–788, 2008. DOI: 10.2174/092986608785203818.
- 84 DEVI, R.; GOGOI, S.; DUTTA, S. Au/NiFe₂O₄ nanoparticle-decorated graphene oxide nanosheets for electrochemical immunosensing of amyloid beta peptide. **Nanoscale Advances**, v. 2, p. 239–248, 2020. DOI: 10.1039/C9NA00578A.
- 85 JENSEN, G. C. *et al.* Inkjet-printed gold nanoparticle electrochemical arrays on plastic. Application to immunodetection of a cancer biomarker protein. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 11, p. 4888, 2011. DOI: 10.1039/C0CP01755H.
- 86 TANG, C. K.; VAZE, A.; RUSLING, J. F. Fabrication of immunosensor microwell arrays from gold compact discs for detection of cancer biomarker proteins. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 2, p. 281, 2012. DOI: 10.1039/C1LC20833K.

- 87 PROENÇA, C. A. *et al.* Novel enzyme-free immunomagnetic microfluidic device based on Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄ for cancer biomarker detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 1071, p. 59–69, 2019. DOI: 10.1016/J.ACA.2019.04.047.
- 88 MOYA, A. *et al.* Inkjet-printed electrochemical sensors. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 29–39, 2017. DOI: 10.1016/j.coelec.2017.05.003.
- 89 ARDUINI, F. *et al.* Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: recent applications in clinical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 114–126, 2016. DOI: 10.1016/J.TRAC.2016.01.032.
- 90 CARVAJAL, S. *et al.* Disposable inkjet-printed electrochemical platform for detection of clinically relevant HER-2 breast cancer biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 104, p. 158–162, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.01.003.
- 91 IBÁÑEZ-REDÍN, G. *et al.* Screen-printed interdigitated electrodes modified with nanostructured carbon nano-onion films for detecting the cancer biomarker CA19-9. **Materials Science and Engineering C**, v. 99, p. 1502–1508, 2019. DOI: 10.1016/J.MSEC.2019.02.065.
- 92 VALVERDE, A. *et al.* Determination of cadherin-17 in tumor tissues of different metastatic grade using a single incubation-step amperometric immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 18, p. 11161–11167, 2018. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03506.
- 93 MARTÍN, C. M. *et al.* Magnetic beads-based electrochemical immunosensing of HIF-1 α , a biomarker of tumoral hypoxia. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 307, p. 127623, 2020. DOI: 10.1016/J.SNB.2019.127623.
- 94 AFONSO, A. S. *et al.* Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. **Talanta**, v. 146, p. 381–387, 2016. DOI: 10.1016/J.TALANTA.2015.09.002.
- 95 RAO, V. *et al.* Comparison of different carbon ink based screen-printed electrodes towards amperometric immunosensing. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1135–1143, 2006. DOI: 10.1007/S11274-006-9154-0.
- 96 PRADELA-FILHO, L. A. *et al.* Glass varnish-based carbon conductive ink: a new way to produce disposable electrochemical sensors. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 305, p. 127433, 2020. DOI: 10.1016/J.SBN.2019.127433.
- 97 IBÁÑEZ-REDÍN, G. *et al.* Low-cost screen-printed electrodes based on electrochemically reduced graphene oxide-carbon black nanocomposites for dopamine, epinephrine and paracetamol detection. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 515, p. 101–108, 2018. DOI: 10.1016/J.JCIS.2017.12.085.
- 98 CASTROVILLI, M. C. *et al.* Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 112299, 2020. DOI: 10.1016/J.BIOS.2020.112299.

99 DEROOCO, P. B. *et al.* Effect of different carbon blacks on the simultaneous electroanalysis of drugs as water contaminants based on screen-printed sensors. **Electroanalysis**, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1002/ELAN.201900042.

100 ZHANG, Y. *et al.* A novel layer-by-layer assembled multi-enzyme/CNT biosensor for discriminative detection between organophosphorus and non-organophosphorus pesticides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 287–295, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.036.

101 IBÁÑEZ-REDÍN, G. *et al.* Screen-printed electrodes modified with carbon black and polyelectrolyte films for determination of cancer marker carbohydrate antigen 19-9. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 7, p. 417, 2020. DOI: 10.1007/s00604-020-04404-6.

102 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6th ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2010.

103 BARD A J AND FAULKNER L R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001.

104 LÁZARO, M.J. *et al.* Study and application of carbon black Vulcan XC-72R in polymeric electrolyte fuel cells. In: SANDERS, I. J.; PEETEN, T.L. (ed.) **Carbon black: production, properties and uses**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2011. p. 41.

105 STONEHART, P.; WHEELER, D. Phosphoric acid fuel-cells (PAPCs) for utilities: electrocatalyst crystallite design, carbon support and matrix material challenge. In: CONWAY, B. E. (ed.). **Modern aspects of electrochemistry**. New York: Springer, 2005. p. 407. (Modern aspects of electrochemistry, n. 38).

106 VICENTINI, F. C. *et al.* Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms. **Electrochimica Acta**, v. 157, p. 125–133, 2015. DOI: 10.1016/j.electacta.2014.11.204.

107 PARDO-YISSAR, V. *et al.* Layered polyelectrolyte films on Au electrodes: characterization of electron-transfer features at the charged polymer interfaces and application for selective redox reactions. **Langmuir**, v. 17, n. 4, p. 1110–1118, 2001. DOI: 10.1021/la000729l.

108 SILVA, R. R. *et al.* Microbial nanocellulose adherent to human skin used in electrochemical sensors to detect metal ions and biomarkers in sweat. **Talanta**, v. 218, p. 121153, 2020. DOI: 10.1016/J.TALANTA.2020.121153.

109 BARREIRA, S. V. P. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy of polyelectrolyte multilayer modified electrodes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 46, p. 17973–17982, 2004. DOI: 10.1021/jp0466845.

110 WANG, B. *et al.* Direct loading and tunable release of antibiotics from polyelectrolyte multilayers to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1305–1313, 2016. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00118.

- 111 LEE, S. W. *et al.* Layer-by-layer assembly of all carbon nanotube ultrathin films for electrochemical applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 671–679, 2008. DOI: 10.1021/ja807059k.
- 112 ZHAO, Y. *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on horseradish peroxidase (HRP)-loaded silica-poly(acrylic acid) brushes for protein biomarker detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 383–388, 2016. DOI: 10.1016/J.BIOS.2015.08.065.
- 113 GALLAGHER, W. **FTIR analysis of protein structure**. Disponível em: https://www.chem.uwec.edu/chem455_s05/pages/manuals/FTIR_of_proteins.pdf. Acesso em: 16 nov. 2020.
- 114 LIEW, C.-W. *et al.* Poly(acrylic acid)-based hybrid inorganic–organic electrolytes membrane for electrical double layer capacitors application. **Polymers**, v. 8, n. 5, p. 179, 2016. DOI: 10.3390/polym8050179.
- 115 ABCAM. Human cancer antigen CA 19-9 elisa kit. Disponível em: <http://www.abcam.com/human-cancer-antigen-ca19-9-elisa-kit-ab108642.html>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- 116 JIA, W. L. *et al.* Effects of both folic acid, p16 protein expression and their interaction on progression of cervical cancerization. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 37, n. 12, p. 1647–1652, 2016. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.12.018.
- 117 ARKO-BOHAM, B. *et al.* Higher serum concentrations of vimentin and DAKP1 are associated with aggressive breast tumour phenotypes in Ghanaian women. **Biomarker Research**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1186/s40364-017-0100-0.
- 118 WANG, R. *et al.* A novel label-free electrochemical immunosensor based on the enhanced catalytic currents of oxygen reduction by AuAg hollow nanocrystals for detecting carbohydrate antigen 199. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 96, p. 152–158, 2017. DOI: 10.1016/J.BIOS.2017.05.007.
- 119 WANG, L. *et al.* Novel redox species polyaniline derivative-Au/Pt as sensing platform for label-free electrochemical immunoassay of carbohydrate antigen 199. **Analytica Chimica Acta**, v. 911, p. 108–113, 2016. DOI: 10.1016/J.ACA.2016.01.016.
- 120 WENG, X. *et al.* L-Proline bio-inspired synthesis of AuPt nanocallandras as sensing platform for label-free electrochemical immunoassay of carbohydrate antigen 19-9. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 250, p. 61–68, 2017. DOI: 10.1016/J.SBN.2017.04.156.
- 121 WANG, M. *et al.* Bimetallic cerium and ferric oxides nanoparticles embedded within mesoporous carbon matrix: electrochemical immunosensor for sensitive detection of carbohydrate antigen 19-9. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 135, p. 22–29, 2019. DOI: 10.1016/J.BIOS.2019.04.018.
- 122 THAPA, A. *et al.* Carbon nanotube matrix for highly sensitive biosensors to detect pancreatic cancer biomarker CA19-9. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 31, p. 25878–25886, 2017. DOI: 10.1021/acsami.7b07384.

- 123 ZHAO, C. *et al.* Simple and effective label-free electrochemical immunoassay for carbohydrate antigen 19-9 based on polythionine-Au composites as enhanced sensing signals for detecting different clinical samples. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3049–3058, 2017. DOI: 10.2147/IJN.S131805.
- 124 BHATTARAI, A.; JHA, B.; TIMILSINA, S. Serum CA 19-9 levels in benign and malignant diseases associated with the gastrointestinal tract. **Annals of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 35–41, 2015. DOI: 10.3126/acclm.v1i2.13546.
- 125 PROENÇA, C. A. *et al.* Use of data processing for rapid detection of the prostate-specific antigen biomarker using immunomagnetic sandwich-type sensors. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 10, p. 2171–2181, 2019. DOI: 10.3762/BJNANO.10.210.
- 126 IBÁÑEZ-REDÍN, G. *et al.* Determination of p53 biomarker using an electrochemical immunoassay based on layer-by-layer films with NiFe₂O₄ nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 619, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1007/s00604-020-04594-z.
- 127 PAULOVICH, F. V.; OLIVEIRA, M. C. F.; MINGHIM, R. The projection explorer: a flexible tool for projection-based multidimensional visualization. *In*: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON COMPUTER GRAPHICS AND IMAGE PROCESSING, 20., 2007, Minas Gerais. **Proceedings** [...]. Minas Gerais: IEEE, 2007. p. 27–34.
- 128 PAULOVICH, F.; MORAES, M.; MAKI, R.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JUNIOR, O.N.; OLIVEIRA, M. C. F. Information visualization techniques for sensing and biosensing. **Analyst**, v. 136, n. 7, p. 1344–1350, 2011. DOI: 10.1039/C0AN00822B.
- 129 ZHANG, X. *et al.* The Role of the OH group in citric acid in the coordination with Fe₃O₄ nanoparticles. **Langmuir**, v. 35, n.25, p. 8325–8332, 2019. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b00208.
- 130 SALUNKHE, A. B. *et al.* Polyvinyl alcohol functionalized cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications. **Applied Surface Science**, v. 264, n. 3, p. 598–604, 2013. DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.10.073.
- 131 WARD, K. R.; COMPTON, R. G. Quantifying the apparent “catalytic” effect of porous electrode surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 724, p. 43–47, 2014. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2014.04.009.
- 132 WARD, K. R. *et al.* Nanoparticle modified electrodes can show an apparent increase in electrode kinetics due solely to altered surface geometry: the effective electrochemical rate constant for non-flat and non-uniform electrode surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 695, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1016/J.JELECHEM.2013.02.012.
- 133 SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206–222, 1959. DOI: 10.1007/BF01337937.
- 134 MARQUES DE OLIVEIRA, R. *et al.* Probing the functionalization of gold surfaces and protein adsorption by PM-IRRAS. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 9, p. 1736–1740, 2011. DOI: 10.1002/cphc.201100080.

- 135 VE, J. *et al.* Blocking the nanopores in a layer of nonconductive nanoparticles : dominant effects therein and challenges for electrochemical impedimetric biosensing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, p. 14620–14628, 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c02650.
- 136 SHARAFELDIN, M.; MCCAFFREY, K.; RUSLING, J. F. Influence of antibody immobilization strategy on carbon electrode immunoarrays. **Analyst**, v. 144, n. 17, p. 5108–5116, 2019. DOI: 10.1039/C9AN01093A.
- 137 NASIF, W. A. *et al.* Evaluation of circulating TP53 antigen in the sera of gastric cancer patients: as a tumor marker. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 5, n. 4, p. 175–180, 2013. DOI: 10.1016/j.bgm.2013.10.001.
- 138 SEN, E.; GÖNÜLLÜ, U.; AKAR, N. The detection of quantitative serum p53 protein in lung cancer. **Tüberküloz ve Toraks**, v. 53, n. 3, p. 231–237, 2005.
- 139 AMOR-GUTIÉRREZ, O. *et al.* Competitive electrochemical immunosensor for the detection of unfolded p53 protein in blood as biomarker for Alzheimer's disease. **Analytica Chimica Acta**, v. 1093, p. 28–34, 2020. DOI: 10.1016/J.ACA.2019.09.042.
- 140 PEDRERO, M. *et al.* Disposable amperometric immunosensor for the determination of human P53 protein in cell lysates using magnetic micro-carriers. **Biosensors**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2016. DOI: 10.3390/bios6040056.
- 141 COATRINI, A. *et al.* Immunosensors containing solution blow spun fibers of poly (lactic acid) to detect p53 biomarker. **Materials Science & Engineering C**, v. 115, p. 111120, 2020. DOI: 10.1016/J.MSEC.2020.111120.
- 142 SOARES, J. C. *et al.* Adsorption according to the Langmuir-Freundlich model is the detection mechanism of the antigen p53 for early diagnosis of cancer. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 12, p. 8412–8418, 2016. DOI: 10.1039/c5cp07121f.
- 143 AFSHARAN, H. *et al.* A sandwich type immunosensor for ultrasensitive electrochemical quantification of p53 protein based on gold nanoparticles/graphene oxide. **Electrochimica Acta**, v. 188, p. 153–164, 2016. DOI: 10.1016/J.ELECTACTA.2015.11.133.
- 144 AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A disposable immunosensor using ITO based electrode modified by a star-shaped polymer for analysis of tumor suppressor protein p53 in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 107, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.02.017.
- 145 HASANZADEH, M. *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensing of tumor suppressor protein p53 in unprocessed human plasma and cell lysates using a novel nanocomposite based on poly-cysteine/graphene quantum dots/gold nanoparticle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1348–1363, 2018. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.006.
- 146 LEVINE, A.; OREN, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749–758, 2009. DOI: 10.1038/nrc2723.

- 147 BRETT, C AND BRETT, A. **Electrochemistry**: principles, methods and applications. New York: Oxford University Press Inc., 1993.
- 148 RIZWAN, M. *et al.* AuNPs/CNOs/SWCNTs/chitosan-nanocomposite modified electrochemical sensor for the label-free detection of carcinoembryonic antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 107, p. 211–217, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOS.2018.02.037.
- 149 FAN, H. *et al.* Construction of label-free electrochemical immunosensor on mesoporous carbon nanospheres for breast cancer susceptibility gene. **Analytica Chimica Acta**, v. 770, p. 62–67, 2013. DOI: 10.1016/J.ACA.2013.01.066.
- 150 WARD, K. R. *et al.* The theory of cyclic voltammetry of electrochemically heterogeneous surfaces: comparison of different models for surface geometry and applications to highly ordered pyrolytic graphite. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 20, p. 7264–7275, 2012. DOI: 10.1039/C2CP40412E.
- 151 MINGHIM, R.; PAULOVICH, F. V.; DE ANDRADE LOPES, A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. **Proceedings of SPIE**, v. 6060, p. 60600S, 2006. DOI: 10.1117/12.650880.
- 152 SOARES, J. C. *et al.* Supramolecular control in nanostructured film architectures for detecting breast cancer. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 22, p. 11833–11841, 2015. DOI: 10.1021/acsami.5b03761.
- 153 SOARES, A. C. *et al.* Microfluidic-based genosensor to detect human papillomavirus (HPV16) for head and neck cancer. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 43, p. 36757–36763, 2018. DOI: 10.1021/acsami.8b14632.
- 154 NAFARZADEH, S. *et al.* Is salivary evaluation of P53 and MMP-3 a good tool for early detection of oral squamous cell carcinoma ? *Journal of Contemporary Medical Sciences*, v. 4, n. 3, p. 176–178, 2018.
- 155 RAYBIO. Human p53 elisa kit. Disponível em: <https://www.raybiotech.com/human-p53-elisa/>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- 156 ABCAM. Human p53 elisa kit. Disponível em: <https://www.abcam.com/human-p53-elisa-kit-ab171571.html>. Acesso em: 3 mar. 2021.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- 1) **IBÁÑEZ-REDÍN, G**; WILSON, D; GONÇALVES, D; OLIVEIRA JR O.N. Low-cost screen-printed electrodes based on electrochemically reduced graphene oxide-carbon black nanocomposites for dopamine, epinephrine and paracetamol detection. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 515, p. 101–108, 2018.

- 2) OLIVEIRA, N. O; WILSON, D; PAVINATTO, F; **IBÁÑEZ-REDÍN, G**. Processo de fabricação de eletrodos montáveis e arranjo de eletrodos impressos. 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180099825. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/05/2018.

- 3) **IBÁÑEZ-REDÍN, G**; FURUTA, R; WILSON, D; SHIMIZU, F.M; MATERON, E.M, REBOLHO BATISTA ARANTES, L.M; MELENDEZ, M, CARVALHO, A; REIS, R; CHAUR, M; GONÇALVES, D; OLIVEIRA JR. O.N. Screen-printed interdigitated electrodes modified with nanostructured carbon nano-onion films for detecting the cancer biomarker CA19-9. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 1502–1508, 2019.

- 4) WILSON, D; MATERÓN, E; **IBÁÑEZ-REDÍN, G**; FARIA, R; CORREA, D. S AND OLIVEIRA JR O.N. Electrical detection of pathogenic bacteria in food samples using information visualization methods with a sensor based on magnetic nanoparticles functionalized with antimicrobial peptides. **Talanta**, v. 194, p. 611-618, 2019.

- 5) MATERON, E. M; **IBÁÑEZ-REDÍN, G**; JOSHI, N; GONÇALVES, D; OLIVEIRA JR. O.N AND FARIA, R. Analytical detection of pesticides, pollutants, and pharmaceutical waste in the environment. In: KUMAR TUTEJA, S; ARORA, D; DILBAGHI, N; LICHTFOUSE, E. **Nanosensors for Enviromental Applications**. Enviromental chemistry for a sustainable world., Springer, Cham, 2020, p. 87–129.

- 6) **IBÁÑEZ-REDÍN, G**; MATERON, E.M; FURUTA, R; WILSON, D; FREITAS DO NASCIMENTO, G; MELENDEZ, M, CARVALHO, A; REIS, R; OLIVEIRA JR. O.N; GONÇALVES, D. Screen-printed electrodes modified with carbon black and

polyelectrolyte films for determination of cancer marker carbohydrate antigen 19-9. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 417, p. 1–11, 2020.

- 7) IBÁÑEZ-REDÍN, G; JOSHI, N; FREITAS DO NASCIMENTO, G; WILSON, D; MELENDEZ, M, CARVALHO, A; REIS, R; GONÇALVES, D; OLIVEIRA JR. O.N Determination of p53 biomarker using an electrochemical immunoassay based on layer-by-layer films with NiFe₂O₄ nanoparticles. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 619, p. 1–10, 2020.
- 8) CAGNANI, G. R; IBÁÑEZ-REDÍN, G; TIRICH, B; GONÇALVES, D; BALOGH, D AND; OLIVEIRA JR. O.N. Fully-printed electrochemical sensors made with flexible screen-printed electrodes modified by roll-to-roll slot-die coating. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112428, out. 2020.