

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

JOSEFA ELAINE SILVA GERMINIO

**SENSOR BIOMIMÉTICO NANOESTRUTURADO EM ÚNICA ETAPA BASEADO
EM GRAFENO E TIONINA PARA RASTREIO DO CARCINOMA EMBRIONÁRIO**

Recife

2018

JOSEFA ELAINE SILVA GERMINIO

**SENSOR BIOMIMÉTICO NANOESTRUTURADO EM ÚNICA ETAPA BASEADO
EM GRAFENO E TIONINA PARA RASTREIO DO CARCINOMA EMBRIONÁRIO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia

Linha de Pesquisa: Processamento de biossinais e imagens médicas e biológicas.

ORIENTADORA: *Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra*

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Rosineide Mesquita Gonçalves Luz / CRB4-1361 (BCTG)

G374s Germinio, Josefa Elaine Silva.

Sensor biomimético nanoestruturado em única etapa baseado em grafeno e tionina para rastreio do carcinoma embrionário / Josefa Elaine Silva Germinio – Recife, 2018.

60 folha.: il., fig. tab.

Orientadora: Prof. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2018.

Inclui Referências.

1. Engenharia Biomédica. 2. Sensor biomimético. 3. Antígeno carcinoembrionário. 4. Tionina. 5. Grafeno. 6. Nanocompósito. I. Dutra, Rosa Amália Fireman (Orientadora). II. Título.

JOSEFA ELAINE SILVA GERMINIO

**SENSOR BIOMIMÉTICO NANOESTRUTURADO EM ÚNICA
ETAPA BASEADO EM GRAFENO E TIONINA PARA
RASTREIO DO CARCINOMA EMBRIONÁRIO**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: _____

Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra, Doutor (a) pela
Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra, UFPE
Doutor (a) pela Universidade Federal de Pernambuco – Recife, Brasil

Prof. Dr. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, UFPE
Doutor pela Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, Brasil

Prof. Dr. Ricardo Yara, UFPE
Doutor (a) pela Universidade de São Paulo – São Paulo, Brasil

Recife, fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me guiar em cada nova jornada rumo a realização dos meus sonhos.

A minha mãe **Edna Ferreira** por me educar, me criar para a vida e ensinar a sempre voar alto e ser corajosa diante dos desafios que o mundo nos impõe quando queremos nos tornar realizados.

Aos meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo pelas minhas conquistas. De forma especial aos meus irmãos **Edson Germinio** e **Erasmio Germinio** que sempre me incentivaram e sempre me enxergaram como inspiração para ir além do possível na busca por seus sonhos. Aos meus avós **Erasmio** e **Carmelita** que sentiram minha ausência durante os dias de estudo e pesquisa mas que sempre me apoiaram e torceram pelo sucesso. Ao meu pai por me dar a vida.

Gostaria de agradecer imensamente a professora **Dra. Rosa Fireman** pela oportunidade de tê-la como orientadora, pela paciência e disposição.

Aos companheiros de pesquisa LAPED (Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico), em especial **Anne Kelly, Gilvânia Silva, Antônio Márcio e Bárbara Silva** pelo grande apoio científico. Também aos companheiros de bancada que tornaram cada dia de trabalho mais produtivo **Erika Trindade, Djair Ferreira, Marcos Foguel e Priscila Mendonça**.

Agradecer a **Universidade Federal de Pernambuco** por oportunizar o programa de Pós-Graduação de Mestrado em Engenharia Biomédica, bem como a **CAPES** entidade mantenedora de bolsas de incentivo à pesquisa.

De modo geral, agradecer a todos que contribuíram no decorrer da jornada.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

Antígeno CarcinoEmbrionário (CEA) destaca-se como um dos mais importantes biomarcadores usados no diagnóstico e controle de neoplasias, sendo útil também no prognóstico de pacientes submetidos à tratamentos cirúrgicos de remoção de tumores. O desenvolvimento de teste de rastreio de baixo custo para o CEA, que conserve suas propriedades analíticas de alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, é desejável. A proposta de superfícies biomiméticas, aplicadas a sensores eletroquímicos capazes de detectar seletivamente biomoléculas, tem sido amplamente investigada por atender às demandas citadas. No polímero de impressão molecular (MIP), monômeros funcionais são associados às moléculas molde para a construção das cavidades poliméricas de reconhecimento. Neste estudo, o acetato de tionina, um derivado orgânico da fenotiazina, de natureza catiônica, que apresenta grupos funcionais tióis foi utilizado a fim de construir cavidades de reconhecimento seletivas às biomoléculas. Além disso, o grafeno, um nanomaterial de fácil síntese, foi incorporado à superfície de reconhecimento como estratégia de expandir a área eletrocatalítica e aumentar a velocidade de transferência de elétrons. O MIP foi obtido através da eletropolimerização em única etapa de uma solução de tionina, grafeno e CEA usando a técnica de voltametria cíclica (-0,5 a 1,4 V durante 20 ciclos a 50 mV/s). A molécula molde de CEA foi removida através de sucessivas lavagens com solução de ácido acético (10%). Posteriormente, o sensor biomimético foi submetido à prova contra amostras enriquecidas com CEA. As respostas analíticas foram obtidas até 30 ng/mL e o sensor apresentou um limite de detecção de 3,1 ng/mL. Os testes de especificidade foram realizados com o polímero não impresso molecularmente (NIP), controle negativo, o qual não demonstrou resposta significativa às concentrações de CEA testadas. O sensor biomimético desenvolvido mostrou-se capaz de reconhecer o CEA em níveis de referência clínica desejáveis, com perspectivas de aplicação em ensaios eletroquímicos de rastreio de neoplasias diversas, uma vez que este antígeno é responsivo em diversos cânceres.

Palavras-chave: Sensor biomimético. Antígeno carcinoembrionário. Tionina. Grafeno. Nanocompósito.

ABSTRACT

CarcinoEmbryonic Antigen (CEA) stands out as one of the most important biomarkers used in the diagnosis and control of neoplasms, being also useful in the prognosis of patients submitted to surgical treatment of tumor remotion. The development of a low cost screening test for CEA that retains its analytical properties of high sensitivity and diagnostic specificity is desirable. The proposal of biomimetic surfaces, applied to electrochemical sensors capable of selectively detecting biomolecules, has been extensively investigated for meeting the aforementioned demands. In molecular imprinting polymer (MIP), functional monomers are associated with template molecules for the construction of the polymer recognition wells. In this study, thionine acetate, a phenothiazine derivative of cationic nature, which has functional thiol groups, was used in order to construct selective recognition cavities for the biomolecules. In addition, graphene, an easily synthesized nanomaterial, was incorporated into the recognition surface as a strategy to expand the electrocatalytic area and increase the electron transfer rate. The MIP was obtained through one-step by electropolymerizing a solution of thionine, graphene and CEA using the cyclic voltammetry technique (-0.5 to 1.4 V for 20 cycles at 50 mV / s). The template molecule of CEA was removed by successive washes with acetic acid solution (10%). Subsequently, the biomimetic sensor was tested against samples enriched with CEA. The analytical responses were obtained up to 30 ng / mL and the sensor had a detection limit of approximately 3.1 ng / mL. Specificity tests were performed with the non-molecularly imprinted polymer (NIP), negative control, in which have not showed responses at equivalent concentrations. The developed biomimetic sensor was able to recognize the CEA at desirable clinical reference levels, with perspectives of application in electrochemical tests of diverse neoplasms, since this antigen is responsive in several cancers.

Key words: Biomimetic sensor. Carcinoembryonic antigen. Thionine. Graphene. Nanocomposite.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência de câncer no Brasil de acordo com o sexo no ano de 2014.	17
Figura 2	Esquema mostrando a fisiopatologia envolvida na formação do câncer.	18
Figura 3	Principais marcadores tumorais e respectivos órgãos aos quais estão relacionados.	20
Figura 4	Ilustração das etapas de teste de ELISA para detecção de CEA.	21
Figura 5	Esquema básico dos principais componentes de um biossensor: A) elemento de bioreconhecimento, B) elemento transdutor e C) Unidade de conversão e processamento do sinal elétrico.	23
Figura 6	Formação de polímeros molecularmente impresso.	26
Figura 7	Representação esquemática de diferentes alótropos de carbono; a) grafite, b) diamante, c) fulereno, d) nanotubos de carbono de parede simples, e) nanotubos de carbono de múltiplas paredes, f) grafeno.	28
Figura 8	Representação da estrutura do grafeno: A- Grupo Epóxi, B - Grupo hidroxila e C - Grupo carboxilo.	29
Figura 9	Representação da estrutura do monômero tionina.	30
Figura 10	Representação esquemática do processo de obtenção do MIP de CEA por polimerização eletroquímica a partir de uma matriz de Th e OG.	38
Figura 11	Voltamogramas cíclicos dos sucessivos ciclos de polimerização eletroquímica da Th sobre a superfície do EAu. Medidas realizadas em solução de 1 mM de Th.	40
Figura 12	Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) do EAu limpo e eletropolimerizado com PTh. Medidas realizadas em $(K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6)$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M).	41
Figura 13	A) Voltamograma cíclico registrados em sonda de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) do EAueletropolimerizado com diferentes concentrações de Th: I) eletrodo limpo, II) 0,1 mM, III) 0,5 mM, IV) 1 mM, V) 5 mM e VI) 10 mM; B) Área eletroativa dos voltamogramas cíclicos <i>versus</i> concentração do monômero de Th.	42
Figura 14	A- Voltamograma cíclico demonstrando perfil do eletrodo de ouro após formação de filme de PTh variando o número de ciclos: I) 10 ciclos, II) 15 ciclos, III) 20 ciclos, IV) 25 ciclos e V) 30 ciclos; B) Número de ciclos <i>versus</i> área dos voltamogramas cíclicos correspondentes. Leituras realizadas em sonda de	43

$K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M).

- Figura 15** Voltamogramas cíclicos demonstrando o perfil eletroquímico da contribuição de cada componente do filme nanocompósito de PTh-OG: (II) PTh; (I) EAu limpo; (III) OG; (IV) PTh/OG e (V) PTh-OG. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M). 44
- Figura 16** Estudo de estabilidade do filme de PTh-OG realizado a partir de VC, demonstrando as sucessivas varredura durante 20 ciclos. Medidas obtidas em sonda de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparada em solução de KCl (0.1 M). 45
- Figura 17** (A) Voltamogramas cíclicos do EAu/PTh-OG sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 $mV s^{-1}$). Medidas realizadas em ferrocianeto e ferricianeto de potássio (0,5 mol L^{-1}) preparado em KCl (0,5 mol L^{-1}); (B) Dependência das correntes de I_{pa} e I_{pc} em relação a raiz quadrada da velocidade de varredura. 46
- Figura 18** Voltamograma cíclicos (A) e de onda quadrada (B) da construção do sensor biomimético de PTh-OG-CEA: (I) EAu limpo; (II) após eletropolimerização da Th-OG-CEA; (III) remoção da biomolécula e (IV) após incubação com 10 ng/mL de CEA. Todas as medidas foram realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M). 47
- Figura 19** (A) Voltamogramas cíclicos mostrando a influência do número de lavagens com ácido acético (10%) sobre a eficiência de remoção da molécula de CEA do filme polimérico: I) EAu limpo, II) PTH-OG-CEA, III) após 1ª lavagem, IV) após 2ª lavagem e V) após 3ª lavagem. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M), (B) Δi_{vs} números de lavagens com ácido acético 10% em água. 48
- Figura 20** Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) das etapas de construção do controle negativo (NIP) do sensor biomimético: (I) EAu limpo; (II) após eletropolimerização do Th-OG; (III) após lavagem com ácido acético 10% e (IV) incubação com 10 ng/mL de CEA. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M). 49
- Figura 21** Curva de detecção de antígeno carcinoembrionário sobre a plataforma de PTh-OG com valores de concentração de 10; 20; 30; 40; 50 ng/mL^{-1} . 49
- Figura 22** Gráfico de comparação entre as curvas de MIP –PTH-OG (linha preta) e N-MIP (linha azul). 50

Figura 23 Microscopia de força atômica da superfície do disco de ouro nu (A); 51
Disco de ouro com nanocompósito TH-OG-CEA (B), Disco de ouro
após lavagem de remoção da molécula de CEA (C).

LISTA DE ABREVIATURAS

E	Potencial
I	Corrente
EAU	Eletrodo de ouro
Epa	Potencial de pico anódico
Ipa	Corrente de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
Ipc	Corrente de pico catódico
nG	Nanogramas
mL	Mililitros
GO	Óxido de grafeno
PTH-OG	Politionina-Óxido de Grafeno
VC	Voltametria cíclica
ΔI	Variações de picos de corrente
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ECLIA	<i>Electrochemiluminescence immunoassay</i>
CEA	Antigenocarcinoembrionário
OMS	Organização Mundial de Saúde
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
CV	Coeficiente de variação
SWV	<i>Square Wave Voltammetry</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Câncer como problema mundial de saúde pública	16
2.1.1	Conceito e epidemiologia da doença.....	16
2.1.2	Fisiopatologia do câncer.....	17
2.1.3	Prevenção e diagnóstico precoce do câncer	18
2.1.4	Marcadores tumorais	19
2.1.5	Ensaio para detecção de CEA.....	21
2.2	Biossensores	22
2.2.1	Transdutores empregados em biossensores.....	23
2.2.2	Imunossensores eletroquímicos.....	24
2.2.3	Sensores biomiméticos	25
2.2.4	Superfícies biomiméticas nanoestruturadas	26
2.2.5	Nanomateriais.....	27
2.2.6	Óxido de grafeno	28
2.2.7	Superfícies biomiméticas baseadas em nanocompósitos de grafeno.....	29
2.2.8	Acetato de tionina.....	30
2.3	Técnicas de caracterização de plataformas sensoras	31
2.3.1	Caracterização Eletroquímica.....	31
2.3.1.1	<i>Voltametria Cíclica</i>	31
2.3.1.2	<i>Voltametria de onda quadrada</i>	32
2.3.2	Técnicas de caracterização estrutural e topográfica	32
2.3.2.1	<i>Microscopia eletrônica de força atômica</i>	33
3	OBJETIVO	34
3.1	Geral	34
3.2	Específicos	34
4	MATERIAL E METODOS.....	35
4.1	Reagentes.....	35
4.2	Equipamentos	35
4.3	Preparo da superfície de trabalho.....	35
4.4	Polimerização eletroquímica da Tionina.....	36
4.5	Otimização experimental	36
4.5.1	Concentração do monômero.....	36
4.5.2	Influência do número de ciclos	36
4.6	Caracterização eletroquímica do nanocompósito.....	36

4.6.1	Construção do nanocompósito de OG e PTh	36
4.6.2	Estabilidade eletroquímica do nanocompósito de PTh-OG	37
4.6.3	Influência da velocidade de varredura.....	37
4.7	Construção do sensor biomimético a partir de nanocompósito de OG e PTh.....	37
4.7.1	Construção do controle negativo N-MIP.....	38
4.8	Desempenho analítico do sensor biomimético de CEA	38
4.9	Caracterização morfológica do sensor biomimético.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Polimerização eletroquímica da Tionina.....	40
5.2	Otimização experimental	41
5.2.1	Concentração do monômero de Th.....	41
5.2.2	Influência do número de ciclos de polimerização	42
5.3	Caracterização eletroquímica do nanocompósito.....	43
5.3.1	Construção do nanocompósito de OG e PTh	43
5.3.2	Estabilidade eletroquímica do nanocompósito de PTh-OG	45
5.3.3	Estudo da velocidade de varredura sobre nanocompósito de PTh-OG	45
5.4	Construção do sensor biomimético de CEA a partir de nanocompósito de OG e PTh....	46
5.4.1	Otimização das lavagens para remoção da biomolécula	47
5.4.2	Construção do controle negativo (NIP).....	48
5.5	Desempenho analítico do sensor biomimético de CEA	49
5.6	Comparação entre a plataforma MIP e o NIP.....	50
5.7	Caracterizações morfológicas do sensor biomimético.....	50
6	CONCLUSÃO	52
7	PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O câncer está relacionado a uma classe de doenças que envolve crescimento anormal e perda de controle na divisão celular com o potencial de invadir tecidos e órgãos adjacentes (SOBIN, GOSPODAROWICZ&WITTEKIND, 2011). Segundo dados na Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer, sendo esta a segunda maior causa de morte no mundo, com expectativa de que este número aumente em 70% nas próximas duas décadas. Desta forma, o diagnóstico precoce de câncer e rastreamento da doença são as principais estratégias para evitar maiores taxas de mortalidade e morbidade, possibilitando maiores chances de tratamento e cura (WHO, acesso Dez. 2017). Neoplasias são capazes de produzir e liberar na circulação sanguínea, diversas substâncias chamadas marcadores tumorais, destacando-se o antígeno carcinoembrionário (CEA) que tem grande importância no monitoramento de recidivas, suporte ao diagnóstico e controle de neoplasias (GRUNNET & SORENSEN, 2012).

Os métodos mais utilizados por laboratórios para detectar e dosar níveis sanguíneos do CEA incluem o imunoensaioenzimático (ELISA) e Eletroquimioluminescência (ECLIA) que apesar de serem considerados sensíveis e específicos estes requerem transporte da amostra ao laboratório, demorando o tempo de análise e limitando o uso em ambulatórios ou áreas remotas (DAI et al., 2005). Deste modo, os biossensores têm cada vez mais atraído o interesse de pesquisadores por serem dispositivos simples econômicos e de resposta rápida para aplicação em imunodiagnóstico. Estes dispositivos bioanalíticos utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado proporcional à reação com o analito-alvo podendo ser classificados de acordo com o tipo de analito ou transdutor envolvido no sistema, destacando-se os transdutores eletroquímicos que apresentam baixo custo, estabilidade e envolvem eletrônica simples na obtenção de resposta analítica (MEDEIROS et al., 2012; CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

A proposta de sensores biomiméticos tem sido amplamente empregada na detecção de biomoléculas devido ao fácil preparo, baixo custo, possibilidade de síntese em situações onde nenhuma biomolécula (receptor ou enzima) se encontra disponível ou quando elas possuem um alto preço e resistência a ambientes adversos. Os sensores biomiméticos baseados em polímero molecularmente impresso (MIP) são um tipo diferenciado de biossensores de afinidade que envolve a construção de cavidades miméticas em uma matriz polimérica

utilizando uma biomolécula molde. Estas cavidades são complementares as biomoléculas moldes não apenas em formato e tamanho, mas também em relação aos pontos de interação (UZUN & TURNER, 2015).

Nos últimos anos, novas perspectivas no preparo de superfícies biomiméticas sugeriram no intuito de aprimorar a execução dos procedimentos e garantir um aumento da sensibilidade analítica do sensor. Deste modo, a eletropolimerização de monômeros funcionais juntamente com a molécula molda a superfície de suporte, permite a construção de cavidades miméticas dentro de filmes poliméricos finos, facilitando a remoção uniforme da biomolécula molde e obtenção de MIP mais seletivos e reprodutíveis (VOLKERT & HAES, 2014). A aplicação de nanomateriais tem contribuído grandiosamente para a cinética de ligação, bem como o desempenho geral dos MIPs em comparação com os materiais tradicionais, pois estes, geralmente apresentam melhor afinidade e seletividade na detecção molecular.

Nanomateriais de carbono, tais como nanotubos, fulereno e grafeno tem se destacado na última década no desenvolvimento de sensores eletroquímicos biomiméticos por dispor de uma alta área superficial e excelentes características elétricas e mecânicas especialmente o grafeno (VASHIST & LUONG, 2015). Entretanto, devido aos desafios ainda existentes na produção de MIP envolvendo estes nanomateriais, como a baixa dispersão em meio aquoso, a utilização de nanocompósitos apresenta-se como uma metodologia capaz de superar estas dificuldades de maneira simples e em única etapa (HU et al., 2014). Nanocompósitos formados a partir de óxido de grafeno apresentam um alto desempenho funcional que melhora a sensibilidade da plataforma, devido a sua facilidade de condução de elétrons, fácil dispersão em água e resistividade baixa em temperatura ambiente (VASHIST & LUONG, 2015).

A sensibilidade biomimética é atribuída aos monômeros envolvidos, e dentre os derivados de fenotiazina, a tionina mostra-se como um material bastante promissor para aplicação em sensores por ser um excelente mediador de elétrons e apresentar atividade eletrocatalítica significativa quando polimerizado em meio neutro (DAI et al., 2016). A interação entre os componentes do nanocompósito é possível devido aos grupos funcionais disponíveis em cada material utilizado. Deste modo, a escolha minuciosa de cada material é a chave para construção de uma excelente plataforma sensora. Neste trabalho, uma superfície biomimética baseada em um filme nanocompósito de óxido de grafeno e tionina será desenvolvida em uma única etapa de síntese para detecção eletroquímica de antígeno carcinoembrionário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

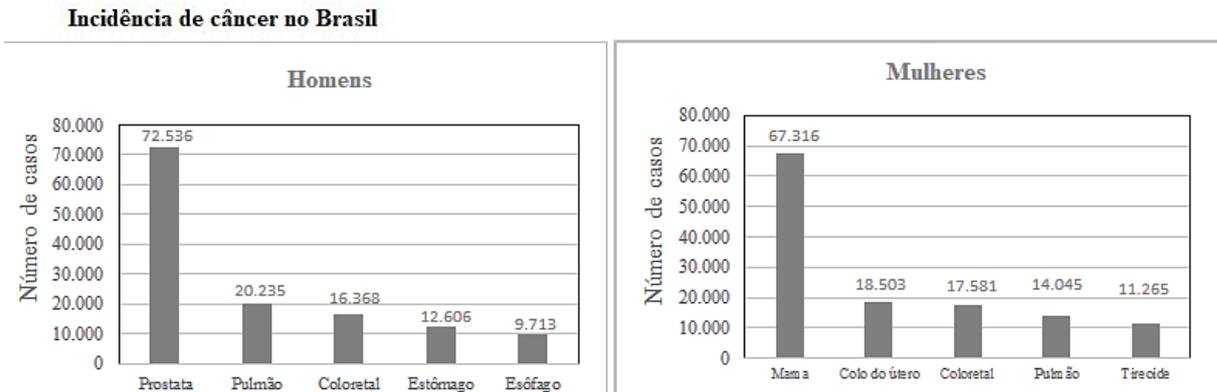
2.1 Câncer como problema mundial de saúde pública

2.1.1 Conceito e epidemiologia da doença

O termo câncer vem do grego *karkínos* que significa caranguejo, primeiramente usada pelo pai da medicina Hipócrates (cerca de 460 A.C - 370 A.C), devido a aparência da superfície de corte de um tumor sólido. Durante o século XVIII, um patologista Italiano Giovanni Morgagni foi responsável por caracterizar o câncer como uma unidade específica localizada em uma parte do corpo, e a partir da colaboração de Marie Bichat chegou-se à conclusão de que os órgãos tinham diferentes tecidos e que estes poderiam ser afetados por diferentes tipos de câncer. O primeiro caso de metástase foi descoberto ainda nesta época pelo médico Joseph Recamier, sugerindo que a corrente sanguínea e linfática contribuíam para o direcionamento do câncer para outros tecidos (HAJDU et al., 2011). Nos dias atuais, o termo câncer é comumente utilizado para referir-se a um conjunto que inclui mais de 100 doenças relacionadas à perda de controle de divisão celular. A maioria das células multiplica-se e morre de forma ordenada, entretanto as células cancerosas não sofrem morte programada e continuam crescendo incontrolável e rapidamente, dando origem a outras células anormais que tem a capacidade de invadir também tecidos e órgãos adjacentes (INCA, 2011; WHO, 2015).

Segundo dados na OMS, em 2015 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer, sendo esta a segunda maior causa de morte no mundo, com expectativa de que este número aumente em 70% nas próximas duas décadas. O câncer de pulmão apresenta-se como mais prevalente, seguido pelo câncer de fígado, colo retal, estômago e mama, de acordo com OMS (2015). Dados epidemiológicos de 2014 sobre o perfil de mortalidade do câncer no Brasil, indicaram um total de 119.600 mortes de pacientes do sexo masculino e 104.100 do sexo feminino, onde o câncer de próstata apresenta-se em primeiro lugar (14,9%) com incidência de 72.536 casos em homens, enquanto o câncer de mama representa (16,8%), com um total de 67.316 casos (**figura 1**). Outros diagnósticos de cânceres também apresentam um perfil de alta prevalência no país destacando-se: pulmão, colo do útero, colo retal, estômago, esôfago e tireoide (WHO, 2015).

Figura 1: Incidência de câncer no Brasil de acordo com o sexo no ano de 2014.



Fonte: OMS, 2015

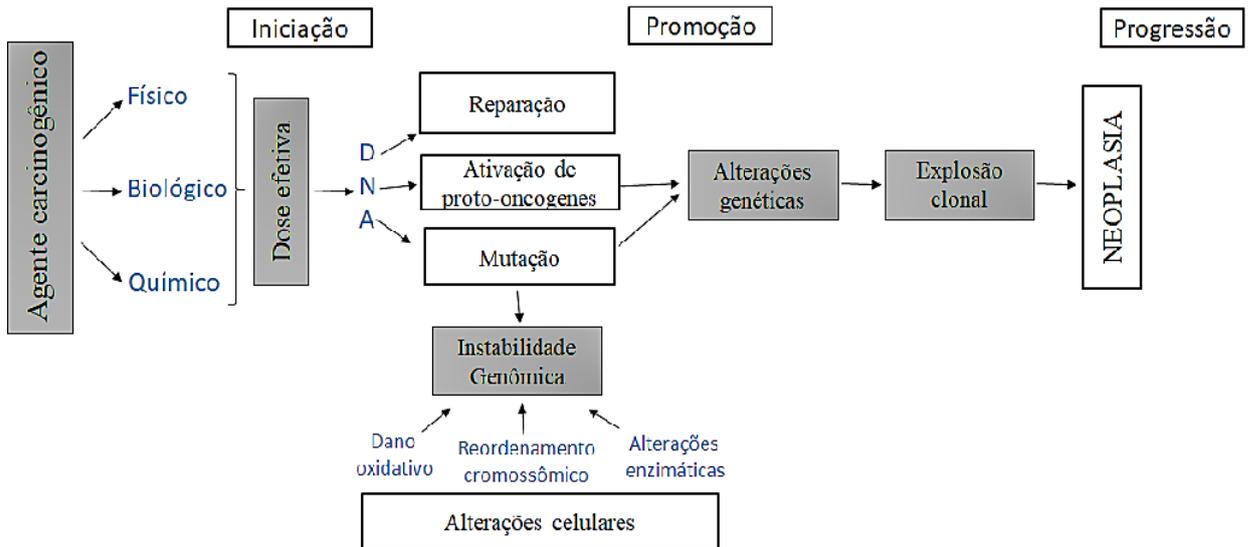
2.1.2 Fisiopatologia do câncer

O câncer é uma classe de doenças que envolve o crescimento anormal e perda de controle na divisão celular com o potencial de invadir tecidos e órgãos adjacentes. Esta divisão celular pode ocorrer de forma controlada ou não controlada, a primeira trata-se de reações reversíveis após término do estímulo de proliferação celular podendo ser classificadas como metaplasia, hiperplasia e displasia; enquanto na reação de divisão celular não controlado há crescimento de tecido anormal e de maneira exacerbada classificando-se como neoplasias que podem ser *in situ* ou invasivas (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2011). O carcinoma *in situ* é o estágio inicial do câncer quando este atinge apenas camadas superficiais do tecido afetado, porém quando as células cancerosas se disseminam e são capazes de atingir outras camadas teciduais, outros órgãos ou corrente sanguínea este quadro é considerado carcinoma invasivo (WHO, 2015).

O processo de formação do câncer chamado de oncogênese pode acontecer lentamente em três estados denominados de iniciação, quando genes sofrem ação de agentes cancerígenos, posteriormente o estado de promoção, quando oncopromotores atuam diretamente nas células lesadas e o estado de progressão que é caracterizado pela proliferação desenfreada e irreversível das células (KUMAR et al., 2015). O processo de oncogênese acontece quando células passam a receber informações erradas de funcionamento devido a mutação em genes especiais chamados proto-oncogenes transformando-se em oncogenes (**figura 2**). Esta mutação pode ser desencadeada por ação de agentes cancerígenos ou até mesmo por mutação espontânea. Este processo complexo é responsável por originar

neoplasias que podem afetar células de diversos tecidos e órgãos, capazes de liberar hormônios e células que servem como marcadores de tumor (SOBIN, GOSPODAROWICZ, WITTEKIND, 2011; INCA, 2011).

Figura 2: Esquema mostrando a fisiopatologia envolvida na formação do câncer



Fonte: Adaptado do Instituto Nacional do Câncer (INCA)

2.1.3 Prevenção e diagnóstico precoce do câncer

Os principais fatores de risco diretamente relacionados ao desenvolvimento de patologias oncológicas são: sedentarismo (27,2%), obesidade (20,1%) e fumo (17,3%). Porém existem diversos outros fatores secundários que podem contribuir para o desenvolvimento de mutações e posteriormente surgimento de neoplasias, dentre estas práticas comuns de risco destacam-se: o uso abusivo de álcool, doenças infecciosas, exposição à radiação, alimentação inadequada, poluição ambiental, exposições ocupacionais e comportamento sexual (INCA, 2011).

A OMS publicou, recentemente, um plano de fortalecimento da rede de prevenção do câncer destacando a vacinação contra viroses como a hepatite e HPV, campanhas de conscientização, diminuição de riscos ocupacionais e tóxicos e também redução da exposição a raios ultravioleta bem como, radiação ionizante (WHO, 2015). Apesar de existirem fatores inevitáveis como idade, raça, etnia, gênero e hereditariedade, a prevenção tem se mostrado como medida eficaz contra o surgimento de mais casos principalmente relacionados a atividades ocupacionais (INCA, 2011).

O diagnóstico precoce de câncer e o rastreamento da doença são as principais estratégias de detecção para evitar maiores taxas de mortalidade e morbidade, possibilitar chances maiores de tratamento adequado e maior possibilidade de cura. O diagnóstico precoce deve ser sempre levado em consideração, principalmente quando há exposição aos fatores de risco, para isto, o programa nacional de controle do câncer da OMS sugere componentes que envolvem esclarecer informações para a população e profissionais de saúde. Além disso, o rastreamento de novos casos deve ser realizado em pessoas saudáveis que não apresentam sintomas mas que apresentem chances de desenvolver a patologia ou que obtenha resultados alterados em exames, devendo ser investigado a partir de exames complementares de imagem e endoscópicos, histopatológicos e marcadores tumorais (INCA, 2011; WHO, 2015).

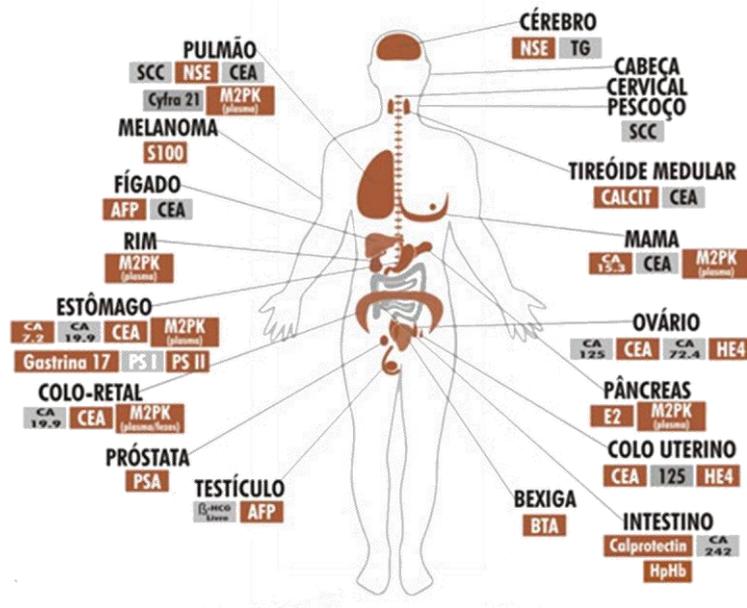
2.1.4 Marcadores tumorais

Neoplasias não capazes de produzir e liberar na circulação sanguínea, diversas substâncias chamadas marcadores tumorais úteis no manejo clínico de pacientes com câncer, contribuindo no diagnóstico, monitoramento, rastreamento de resposta terapêutica e eficácia de tratamento. Os testes comumente empregados na detecção destes marcadores são de natureza bioquímica, histoquímica e genética no qual os resultados obtidos são comparados aos valores de referência de cada marcador (ALMEIDA et al., 2007).

Dentre os principais marcadores tumorais na clínica laboratorial destacam-se: Alfa-fetoproteína (AFP), Antígeno mucóide associado ao carcinoma (MCA), Cromogranina A, Antígeno tumoral da bexiga (BTA), Telomerase, Proteína da matriz nuclear (NMP22), Cyfra 21.1, Fosfatase Ácida Prostática (PAP), CA 72.4, Gonadotrofina coriônica humana (β -HCG), CA 125, CA 15.3, CA 19.9, CA 27.29, CA 50, Calcitonina, Catepsina D, *C-erbB-2* (oncogene), Desidrogenase láctica (LDH), K-ras, Enolase Neurônio-Específica (NSE), Antígeno prostático específico (PSA), P53, 2-Microglobulina e Antígeno carcinoembrionário (CEA) (ALMEIDA et al., 2007).

Nos últimos anos, a pesquisa científica elucidou alguns marcadores órgão-específicos que contribuem sugestivamente no diagnóstico do tumor do órgão afetado. Porém, para um teste de rastreamento e monitoramento de processos metastáticos, marcadores celulares inespecíficos mostram-se mais interessantes, pois podem indicar sinais de alerta na diferenciação celular, e ainda estágios precoces de neoplasias, como o caso do Antígeno Carcinoembrionário (CEA) (figura 3).

Figura 3: Principais marcadores tumorais e respectivos órgãos aos quais estão relacionados



Fonte:ALMEIDA et al., 2007

O CEA é um marcador tumoral inespecífico capaz de contribuir no monitoramento, diagnóstico e controle de neoplasias devido sua importância clínica, útil para avaliar prognóstico de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para remoção de tumores (GRUNNET & SORENSEN, 2012). Além disso, também é recomendada a determinação dos níveis desta biomolécula durante tratamentos quimioterápicos (HASANZADEH et al., 2017) comparando os níveis obtidos do paciente com o valor de referência, que segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 3.5 ng/mL em não-fumantes e de 7 ng/mL em fumantes.

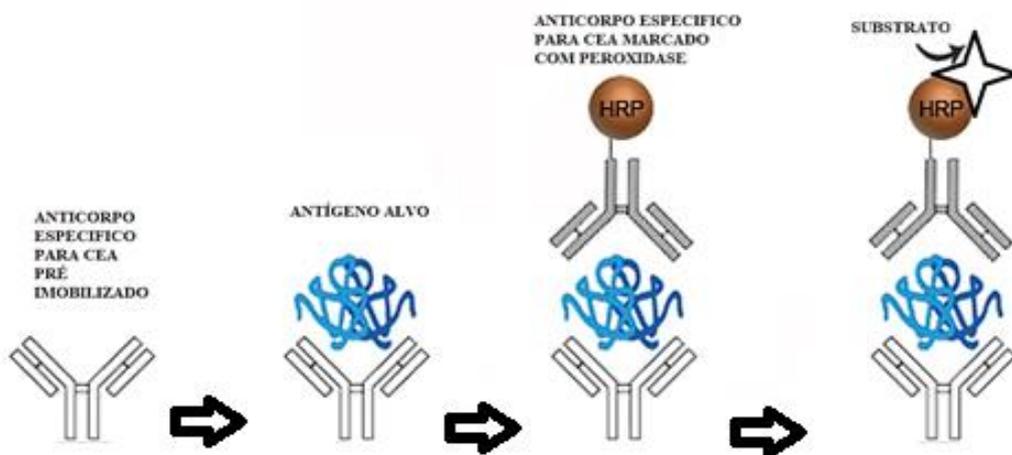
CEA é uma glicoproteína de aproximadamente 200 kDa normalmente produzida durante o período fetal sofrendo uma pausa após o nascimento. Encontra-se em níveis elevados nos adultos portadores de alguns tipos de carcinomas, principalmente do trato gastrointestinal, pâncreas, ovários, pulmão e mama, e pode apresentar-se levemente elevado também em pacientes fumantes, bem como, em algumas reações inflamatórias como: pancreatite, doença de Crohn, infecções pulmonares, doenças hepáticas e úlceras. Deste modo, apesar de não ser um marcador específico, altos níveis de CEA são fortemente sugestivos de malignidade (GRUNNET & SORENSEN, 2012; DAI et al., 2005; GOLDENBERG et al., 1981).

2.1.5 Ensaios para detecção de CEA

Ensaios imunológicos mostram-se bastante sensíveis por dependerem especificamente da capacidade de reconhecimento do anticorpo pelo antígeno correspondente evitando que antígenos, anticorpos inespecíficos ou interferentes apresentem resultados falso positivo (DAI et al., 2005). Os métodos atualmente utilizados por laboratórios para determinação do CEA baseiam-se em imunoenaios por método enzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ou eletroquimioluminescência (ECLIA, do inglês *Electrochemiluminescence immunoassay*) (CHEN et al., 2012).

O princípio desses métodos baseia-se na detecção indireta da reação antígeno-anticorpo através de anticorpos secundários conjugados à enzimas ou compostos quimioluminescentes, que promoverá a reação com seu substrato produzindo cor, ou luz, respectivamente (Figura 4). A intensidade da coloração ou luz está diretamente relacionada à quantidade de imunocomplexos formados (DAI et al., 2005; CHEN et al., 2012). Entre os métodos citados, recentemente a técnica de ECLIA tem se destacado na prática laboratorial para detecção de marcadores tumorais, por ser esta mais rápida e sensível. Apesar de serem testes considerados sensíveis e específicos, os ensaios de ELISA e ECLIA requerem transporte da amostra ao laboratório, demorando o tempo de análise e limitando o uso em ambulatórios ou áreas remotas, podendo ser uma desvantagem para o diagnóstico em larga escala (rastreamento) ou controle terapêutico.

Figura 4: Ilustração das etapas de teste de ELISA para detecção de CEA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

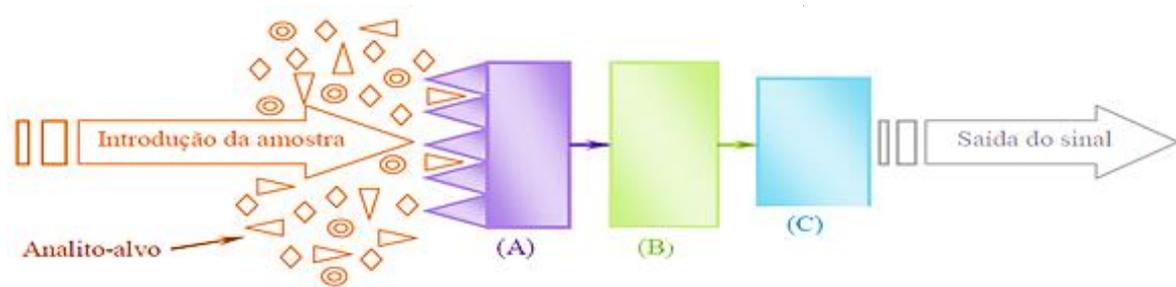
Devido ao CEA ser encontrado em níveis séricos humanos também em estados não neoplásicos, porém em um nível mais baixo que na doença, um teste qualitativo imunocromatográfico que apresenta um Sim/Não como resposta, de acordo com uma banda colorida, não se mostra apropriado. Neste sentido, novas tecnologias que possam se utilizar de dispositivos analíticos que forneçam resultados quantitativos são mais atrativas. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos biossensores tem sido largamente pesquisado, e já se tem frequentemente citados exemplos destes para medidas *point-of-care*. Rotineira e comercialmente encontram-se biossensores portáteis para determinação de glicemia. Porém, no caso de testes para imunoenaios, como por exemplo, para determinação do CEA, os biossensores ainda não apresentam sensibilidade e especificidade diagnóstica acuradas, sendo ainda considerados como uma tecnologia incipiente e de vanguarda.

2.2 Biossensores

O desenvolvimento de dispositivos bioanalíticos tem despertado grande interesse de pesquisadores na detecção de componentes biológicos de importância clínica e ambiental (BERTÓK et al., 2013). Esta perspectiva de criação de biossensores iniciou-se a partir de estudos realizados por CLARK & LYONS (1962) para determinação de glicose, e desde então esta tem sido uma ferramenta amplamente estudada para aplicações em diversas áreas e de modo especial nas análises clínicas, principalmente para facilitar a detecção de biomoléculas e o diagnóstico de patologias de importância clínica.

Biossensores são dispositivos bioanalíticos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado proporcional à reação com o analito-alvo (**Figura 5**). Em vista dos elementos que compõem os biossensores, o receptor é capaz de ligar-se ao analito e as interações bioquímicas que ocorrem na superfície sensora resultam em um sinal quantificável que é convertido e amplificado em sinal elétrico pelo transdutor, possibilitando que estes dados sejam convertidos e processados para um parâmetro significativo de referências a partir um software (LUZ, IOST & CRESPIHO, 2013). Dependendo da natureza da reação envolvida no evento de biorechecimento, os biossensores podem ser classificados como: *i*) catalíticos, que utilizam reações enzimáticas para quantificação do analito de interesse e *ii*) de bioafinidade, que dependem da ligação seletiva do analito-alvo ao elemento de biorechecimento, por exemplo, anticorpo, sonda oligonucleotídica, lectina, moléculas biomiméticas (CALIL, 2011).

Figura 5: Esquema básico dos principais componentes de umbiossensor: A) elemento de bioreconhecimento, B) elemento transdutor e C) Unidade de conversão e processamento do sinal elétrico.



Fonte: Adaptado de Calil, 2011.

Quanto ao tipo de transdutores os biossensores podem ser classificados como eletroquímicos (movimento de íons, difusão de espécies eletroativas), ópticos (alteração nos índices de absorção ou emissão de ondas eletromagnéticas), piezoelétricos (alteração de massa e/ou microviscosidade) e termométrico (alteração na transferência de calor). Os eletroquímicos têm se destacado entre os tipos de transdutores dos biossensores, sendo alguns bastante populares como o biossensor utilizado por diabéticos para acompanhar os níveis de glicemia no sangue (WANG, 2008).

2.2.1 Transdutores empregados em biossensores

A escolha do transdutor dependerá do material biológico imobilizado na superfície sensora e das propriedades da amostra de interesse. O transdutor age como uma interface, medindo a mudança física ou química que ocorre na reação com o biorreceptor, transformando essa energia em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz (MEHRVAR et al., 2000).

Transdutores acústicos ou piezoelétricos: são baseados em variações das frequências de ondas acústicas a partir de cristais piezoelétricos como resultado da interação entre o analito-alvo e o elemento de reconhecimento biológico (PERUMAL & HASHIM, 2014), enquanto os

Transdutores ópticos: apresentam resultados da interação com analito partir de estímulos de luz através de medidas de índice de refração, quantidade de luz absorvida e propriedades fluorescentes e fosforescentes (ABDULHALIM, ZOUROB & LAKHTAKIA, 2007).

Transdutores eletroquímicos: este tipo de transdução explora propriedades elétricas resultante da reação entre analito e bioreceptor dependendo da propriedade considerada pode ser subclassificados como: i) *amperométrico*, baseada na medição de corrente elétrica enquanto mantém um potencial controlado; ii) *potenciométrico*, medindo a diferença de potencial através de uma corrente constante ou zero; iii) *condutimétrico*, medindo a mudança da condutância resultante de reações catalíticas e iv) *impedimétrico*, medindo variações de impedância do meio seja através da corrente ou de potencial na superfície sensora (STRADIOTTO, YAMANAKA, & ZANONI, 2003; CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Os transdutores eletroquímicos apresentam diversas vantagens quando comparado aos transdutores ópticos e piezelétricos, tais como baixo custo, estabilidade, envolvem eletrônica mais simples e são capazes de produzir sensores livre de marcadores bem como sensores marcados (MEDEIROS et al., 2012; CHAUBEY & MALHOTRA, 2002). Sensores *label-free* ou livre de marcadores a partir de transdutores eletroquímicos tem sido amplamente investigados e empregados na detecção de biomoléculas. Este formato de testes é realizado sem compostos marcados e podem ser de detecção direta e indireta, nos de detecção direta a resposta é obtida no momento que os analitos se ligam à superfície sensora sem uso de sonda, por detecção direta e de menor custo (RAPP, GRUH, LÄNGE & 2010).

2.2.2 Imunossensores eletroquímicos

Os biossensores baseados na interação antígeno-anticorpo como elementos de reconhecimento são chamados de imunossensores. Estes essencialmente combinam a sensibilidade e especificidade dos imunossaios com baixos limites de detecção e custo reduzido do sistema de medição eletroquímica. Na interação antígeno-anticorpo envolvida neste tipo de plataforma sensora há formação de um complexo que envolve ligações não covalentes como forças Van der Waals, ligação eletrostática, pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. Estas ligações relativamente fracas ocorrem a curta distância, de modo que só as moléculas que contém o determinante antigênico interagem de forma complementar com o sítio ligante específico do respectivo anticorpo, esta complementaridade concede a aproximação máxima entre os sítios de ligação das moléculas de epítopos dos antígenos (VESELOVSKY et al., 2002).

Diversos tipos de imunossensores têm sido estudados no intuito de produzir ferramentas de detecção cada vez mais simples, com curto tempo de análise e com alta sensibilidade (KONGSUPHOL et al., 2014). Entretanto, apesar de exibirem características ideais para a construção de biossensores, nos últimos anos, quando há dificuldade de obtenção de anticorpos, resistência a ambientes diversos ou até mesmo pelo alto custo de produção, tem-se investigado a utilização de sensores biomiméticos como alternativa aos imunossensores no intuito de aprimorar ensaios e superar problemas associados às moléculas biológicas, sejam proteínas ativas, enzimas ou anticorpos (DING & HEINDEN, 2014).

2.2.3 Sensores biomiméticos

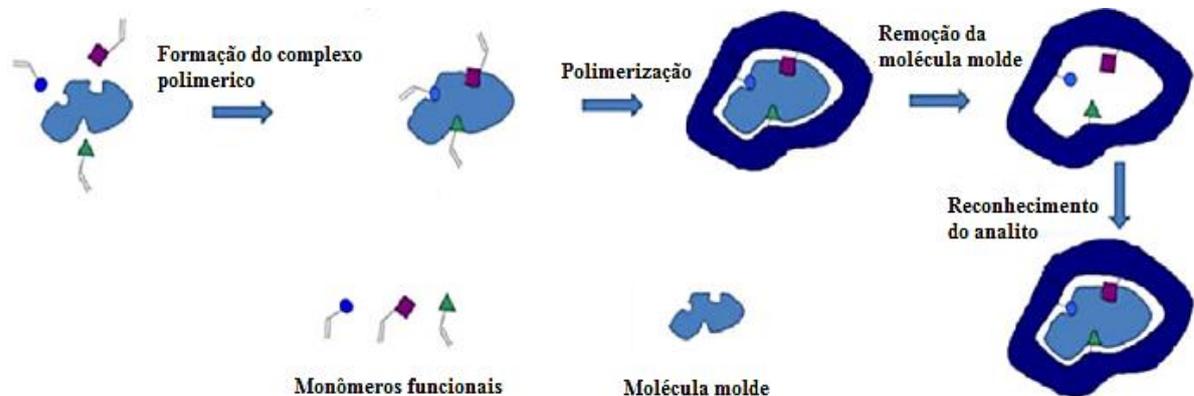
Sensores biomiméticos baseiam-se no princípio de teorias bioquímicas, que defendem que moléculas alvos exibem padrão de modelagem para novas biomoléculas com configurações complementares altamente seletivas, a exemplo do modelo encaixo induzido entre enzima e substrato (IRSHAD et al., 2013; VOLKERT & HAES, 2014). A proposta de sensores biomiméticos surgiu nas últimas décadas e sua aplicação tem sido amplamente empregada na detecção de biomoléculas, devido ao baixo custo na produção e a fácil execução da plataforma. Além disso, as superfícies biomiméticas em sensores exibem características de durabilidade, excelente propriedade mecânica e térmica e possibilitam interações com o analito dentro de condições adversas (pH ácido ou básico) (HUANG et al., 2011).

Os sensores biomiméticos podem ser construídos através de diversas metodologias, destacando-se as plataformas formadas a partir de polímero molecularmente impresso (MIP, do inglês, "*Molecularly Imprinted Polymer*") que de modo geral, trata-se de um tipo diferenciado de biossensores que envolve a construção de cavidades miméticas em uma matriz polimérica utilizando uma biomolécula molde. Estas cavidades são complementares as biomoléculas moldes não apenas em formato e tamanho, mas também em relação aos pontos de interação (UZUN & TURNER, 2015). A interação biomolécula-monômero pode ser mediada por ligações covalentes ou não covalentes, esta última através de pontes de hidrogênio, interação dipolo-dipolo, interação iônica ou interação hidrofóbica (IRSHAD et al., 2013).

Alguns elementos são indispensáveis para construção das cavidades reagentes que facilitam a detecção da molécula alvo através do formato de encaixe: a molécula alvo, que

servirá como molde na impressão; monômeros funcionais complementares; um reagente de ligação cruzada, para formação e reticulação da cadeia polimérica; e um solvente, capaz de solubilizar a biomolécula molde da matriz polimérica complementar a sua estrutura (IRSHAD et al., 2013). Na preparação da camada sensora a base de MIP, a biomolécula interage com os monômeros e a polimerização é feita através do reagente de reação cruzada, que permite que os monômeros formem um complexo polimérico em torno da molécula molde (**figura 6**). Esta é posteriormente removida da matriz, resultando em cavidades bioativas, estáveis e resistentes (MUJAHIND, IQBAL & AFZAL, 2013).

Figura 6: Formação de polímeros molecularmente impresso



Fonte: Adaptado de HUYNH & KUTNER, 2015.

2.2.4 Superfícies biomiméticas nanoestruturadas

A escolha da biomolécula molde é fundamental para que seja possível criar cavidades reativas, por isso elas precisam ser compatíveis com os processos de polimerização eletroquímica, além de serem quimicamente inertes, estáveis e resistentes à mudanças de temperatura ou radiação e apresentarem grupos funcionais que contribuam nas ligações com a cavidade polimérica (CHIMELLO, 2017).

Sensores biomiméticos de proteínas podem ser produzidos a partir do alvos impressos, seja a proteína total ou apenas uma região. Existem diferentes técnicas que podem ser aplicadas na construção de MIPs a partir da impressão em superfície, tais como “in bulk”, “stamp-coating”, “polymerbrushimprinting”, “surfacegrafting” (SCHIRHAGL, REN & ZARE, 2012). Nos últimos anos, novas perspectivas no preparo de MIPs surgiram no intuito de aprimorar a execução dos procedimentos e garantir um alto desempenho de resposta da

plataforma sensora. Deste modo, a eletropolimerização de monômeros funcionais juntamente com a molécula molde diretamente na superfície de eletrodos, permite a remoção uniforme da biomolécula e construção de cavidades complementares seletivas e reproduzíveis dentro de filmes finos poliméricos (VOLKERT & HAES, 2014).

A técnica de polimerização eletroquímica envolve reações de oxidação e redução dos monômeros funcionais sobre potenciais específicos, possibilitando estudo de parâmetros convenientes para desenvolvimento de uma plataforma estável e homogênea podendo-se controlar o número de ciclos, velocidade de polimerização e potencial aplicado (SHARMA et al., 2012). Buscando melhorar ainda mais as características sensoras dos MIPs, a introdução de nanomateriais pode contribuir para o aumento da área reativa para formação das cavidades biomiméticas, melhoramento da transferência de elétrons e aumento da sensibilidade do reconhecimento (LI et al., 2012; MISTRY et al., 2014).

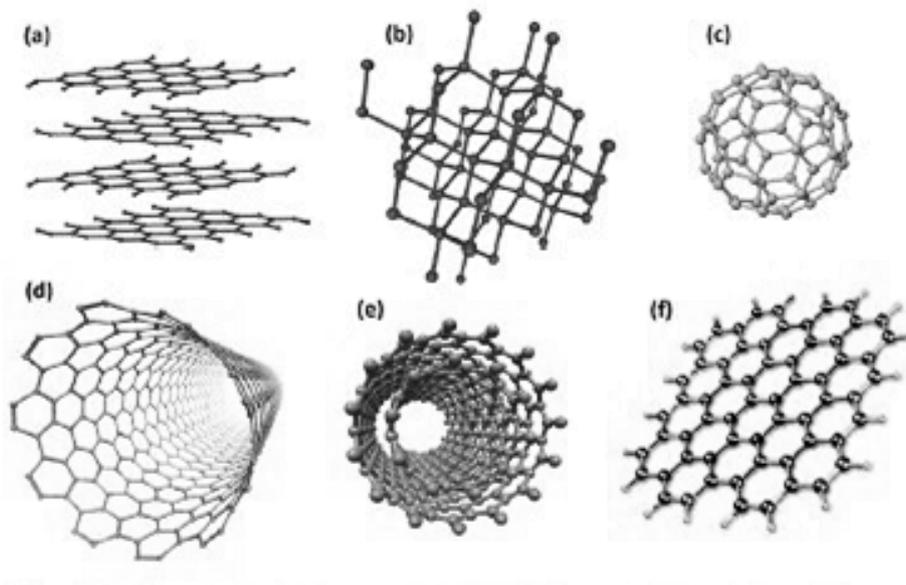
2.2.5 Nanomateriais

Nanomateriais possuem pelo menos uma de suas dimensões inferior a 100 nm e devido ao seu tamanho reduzido, estes apresentam características atrativas para aplicações em diversas áreas relacionadas à tecnologia, em especial o diagnóstico a partir da utilização de biossensores (SANTOS et al., 2014). Os principais nanomateriais envolvidos na construção de sensores destacam-se os nanocristais semicondutores (pontos quânticos), nanopartículas metálicas, nanopartículas de sílica, nanotubos de carbono, pontos quânticos de grafeno, nanopartículas magnéticas, nanopartículas poliméricas e dendrímeros que tem a capacidade de expandir a área eletrocatalítica destes dispositivos, o que resulta no aumento da disponibilidade de transferência de elétrons (SHI et al., 2007; SANTOS, et al., 2014).

Nanomateriais de carbono (**figura 7**) destacam-se por apresentarem características interessantes como: baixa densidade, excelentes propriedades mecânicas térmicas, condutividade elétrica, facilidade de síntese sobre inúmeras superfícies e inércia química estável (HU et al., 2014; ATEs, 2013). Porém, a utilização de nanoestruturas de carbono em plataformas sensoras ainda é um grande desafio devido à baixa dispersibilidade em solventes hidrofílicos, formação de agregados de material em superfície de trabalho, custo elevado e dificuldade de interação com alguns tipos de polímeros, por isso a utilização de nanocompositos tem se mostrado cada vez mais viáveis na intenção de cessar estas dificuldades (HU et al., 2014). O óxido de grafeno tem sido um dos mais influentes

nanomateriais inseridos na proposta de nanocompósito para MIP, principalmente devido aos seus grupos funcionais disponíveis e sua facilidade de dispersão em meio neutro comparado aos outros alótropos de carbono evitando aglomerados (HU et al., 2014; KONG, et al., 2012).

Figura 7: Representação esquemática de diferentes alótropos de carbono; a) grafite, b) diamante, c) fulereno, d) nanotubos de carbono de parede simples, e) nanotubos de carbono de múltiplas paredes, f) grafeno.



Fonte: Adaptada de ZARBIN & OLIVEIRA, 2013.

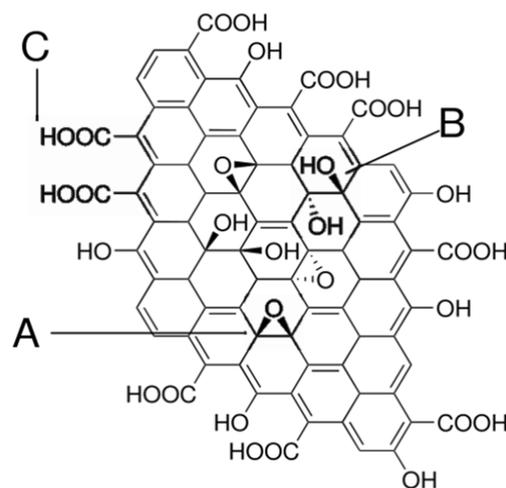
2.2.6 Óxido de grafeno

O óxido de grafeno (OG) é um dos mais importantes alótropos de carbono geralmente obtidos a partir da esfoliação do grafite e tem causado uma grande revolução na ciência de materiais devido às suas propriedades elétricas, mecânicas e ópticas (EDA & CHHOWALLA, 2010). Este material tem sido amplamente estudado para aplicações em plataformas sensoras por exibir algumas características além de grupos disponíveis capazes de ligar-se a monômeros funcionais (KONG et al., 2012). Apesar do óxido de grafeno não apresentar tanta condutividade quanto sua forma reduzida, uma vantagem do OG são os grupos de oxigênio presentes que facilitam sua dispersão em água e em outros solventes formando uma solução mais homogênea (HU et al., 2014; KONG et al., 2012).

O grafeno (**figura 8**) possui propriedades elétricas que o situam entre os metais e os semicondutores, por ter sua banda de condução (do inglês- “bandgap”) próxima a zero, ou

seja, a movimentação dos elétrons ocorre simultaneamente entre a banda de valência e a banda de condução sem passar por nenhum “gap” de energia, no entanto possui características semicondutoras. O grafeno apresenta uma resistividade baixa em temperatura ambiente ($10^{-8} \Omega/m$) e alta condutividade elétrica ($>6.000 \text{ S/cm}$). Estas propriedades quando aplicadas ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos facilitam a condução de elétrons entre as biomoléculas e a superfície do grafeno, consequentemente contribuindo para a sensibilidade da plataforma sensora. Além disso, apresenta uma elevada área superficial, com limite teórico de $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ para uma única folha, característica esta, que possibilita um aumento da área reativa para imobilização de biomoléculas (GAO & DUAN, 2015; VASHIST & LUONG, 2015).

Figura 8: Representação da estrutura do grafeno: A - Grupos epóxidos, B - Grupos hidroxila e C - Grupos carboxila.



Adaptado: HE, FORSTER & LERF, 1998.

2.2.7 Superfícies biomiméticas baseadas em nanocompósitos de grafeno

Polímeros são utilizados em nanocompósitos para atribuir versatilidade, elasticidade, estabilidade e força física entre os componentes usados para produção do filme. Outros componentes podem ser adicionados também para reforçar a matriz, destacando-se os materiais pertencentes a nano escala capazes de atribuir mais interação interfacial (HU et al., 2014). Os materiais de grafeno e derivados têm mostrado um excelente potencial no suporte a plataformas sensoras, porém é fundamental um estudo prévio para que haja afinidade entre os componentes e organização espacial para atribuir rigidez e estabilidade (DIKIN et al., 2007).

A escolha dos monômeros do MIP deve ser avaliada de acordo com o tipo de plataforma a ser construída. No caso da construção de superfícies para um sensor biomimético eletroquímico, deve-se idealmente buscar monômeros que formem polímeros com alta condutividade elétrica e estabilidade térmica, de fácil síntese, e baixo custo.

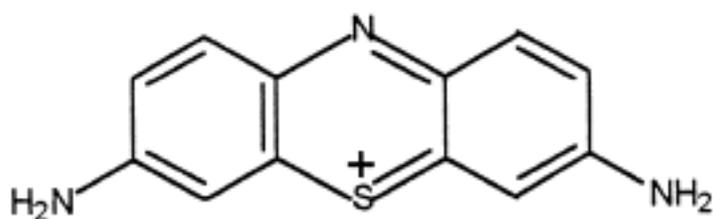
Polímeros conjugados são cada vez mais utilizados devido à sua disponibilidade, diversidade e também pelas características elétricas, eletroquímicas e ópticas através da interação com o ambiente e da mudança de propriedades podendo ser convertido em informações químicas mensuráveis analiticamente (MEDEIROS et al., 2012).

2.2.8 Acetato de tionina

Monômeros do grupo das fenotiazinas têm recebido uma considerável atenção em relação à possibilidade de estudos no âmbito da eletropolimerização, em decorrência de sua enorme variedade de aplicações, incluindo a construção de sensores químicos e bioquímicos, eletrocatalise e dispositivos de conversão de energia (WEI et al., 2010). Dentre estes, a tionina mostra-se como um grupo bastante promissor sendo um excelente mediador de elétrons e que apresenta atividade eletrocatalítica significativa quando polimerizado em meio neutro (YANG et al., 1999; DAI et al., 2016). A tionina destaca-se pela simetria e apresenta grandes vantagens na eletropolimerização por voltametria cíclica devido à sua capacidade de formar filmes estáveis, através da relação entre seus grupos aminos e o crescimento de sua cadeia polimérica (GRANQVIST; HULTAKER, 2002; TOPÇU & ALANYALIOĞLU, 2014).

Tionina (**figura 9**) contém dois grupos aminos ($-NH_2$) na posição alfa, podendo ser facilmente eletropolimerizado mesmo utilizando meios ácidos, neutros e alcalinos através da utilização de diferentes substratos seja ouro, platina ou carbono. A obtenção de politionina (PTh), em concordância com suas características eletroativas, é determinada pela manutenção de seu sistema eletrônico π deslocado e favorecimento de acúmulo de carga pela extensão polimérica (GRANQVIST; HULTAKER, 2002). Apesar da estrutura da politionina ainda não ser muito conhecida, alguns estudos de espectroscopia apontam uma ponte secundária entre dois monômeros a partir do grupo amina (FERREIRA; TENREIRO; ABRANTES, 2006).

Figura 9: Representação da estrutura do monômero tionina



Fonte: YANG et al., 1999

Um estudo de Kong et al. (2012) utilizando nanocompositos de TH-OG, evidenciou resultados a partir da técnica de FT-IR que a tionina é capaz de ligar-se as folhas de grafeno e sugere que este é capaz de contribuir ativamente para a polimerização da tionina através da formação de dímeros. Apesar de pouco reproduzível e de difícil de controle, os nanocompósitos formados a partir de grafeno são fortes e flexíveis, apresentando alta performance funcional melhorando as propriedades mecânicas (HU et al., 2014).

2.3 Técnicas de caracterização de plataformassensoras

2.3.1 Caracterização Eletroquímica

Técnicas eletroquímicas apresentam inúmeras vantagens quando aplicadas na construção de plataformas de diagnóstico, umas das maiores vantagens trata-se da economia adquiridas pela utilização de pequenas quantidades de reagentes nas análises, além disso, é possível manipular e combinar diversas variáveis a partir das diversas técnicas tais como: voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ), voltametria de pulso diferencial (VPD), impedância e cronoamperometria (BRETT & BRETT, 1993).

2.3.1.1 Voltametria Cíclica

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica capaz de mensurar informações sobre o analito através de variações de corrente resultantes de reações de redução e oxidação quando aplicado um potencial diferente. Nesse processo é gerado uma corrente relacionada a alterações dos eletrodos após aplicação do potencial, que decai rapidamente. Adicionalmente, correntes faradáicas podem ser mensuradas através da transferência de carga de reações redox de espécies eletroativas (BARD & FAULKNER, 2006; BRETT & BRETT, 1993). Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de

reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (LOWINSOHN & BERTOTTI, 2006).

A VC pode ser utilizada para caracterização estudos de modificação da superfície sensora, detalhando importantes informações do sistema, tais como número de elétrons transferidos, coeficiente de difusão, os potenciais de pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}), e as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}) mostrando detalhes e informações importantes sobre reversibilidade da transferência de elétrons (HOLLER, SKOOG & CROUCH, 2009). Quando se trata de uma reação reversível, as I_{pa} e I_{pc} são aproximadamente iguais em valor absoluto, onde a diferença entre os E_p é aproximadamente 59 mV independente da velocidade de varredura. Já nos sistemas irreversíveis existe ausência completa de picos de oxidação e redução reversos enquanto o deslocamento do E_p tem relação direta com a velocidade de varredura (BRETT & BRETT, 1993; BARD & FAULKNER, 2006).

2.3.1.2 Voltametria de onda quadrada

Voltametria de onda quadrada (SWV do inglês – “squarewavevoltammetry”) é uma técnica mais sensível que a VC e que possibilita também a avaliação cinética e mecanística do processo eletródico do sistema estudado. A SWV é capaz de formar uma curva de corrente-potencial que é proveniente da aplicação de potenciais na forma de ondas quadradas com duração e amplitudes definidas e que variam linearmente a um período de determinado. As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido como uma intensidade da corrente resultante de forma diferencial apresentando boa sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas. (SOUZA, MACHADO, AVACA, 2003).

2.3.2 Técnicas de caracterização estrutural e topográfica

As técnicas de caracterização estrutural e topográfica tem sido de grande importância em estudos de superfície de SPEs, sendo utilizadas por alguns autores na tentativa de encontrar relações entre a morfologia superficial dos eletrodos e seu desempenho eletroquímico (MARTÍNEZ-PAREDES, GONZÁLEZ-GARCÍA & COSTA-GARCÍA, 2009).

2.3.2.1 Microscopia eletrônica de força atômica

As análises por Microscopia de Força Atômica (AFM) permitem obtenção de imagens em duas e três dimensões e que são capazes de representar a topografia da superfície analisada, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas. Os componentes essenciais de um AFM são uma cerâmica piezelétrica (scanner), um cantilever acoplado a uma ponta na sua extremidade, um fotodetector, um sistema de realimentação e um computador, que armazena e processa as diferentes deflexões da sonda (FERREIRA & YAMANAKA, 2006).

O sistema do AFM opera sobre o controle de moduladores piezelétricos que permitem a movimentação vertical e horizontal da ponta à medida que a mesma se aproxima da superfície da amostra, causando uma deflexão do cantilever. Esta deflexão é mensurada através da mudança de direção (angular) de um feixe de laser colimado, emitido e refletido sobre a superfície superior do cantilever. As variações de posição e de intensidade da luz do feixe laser refletido são então captadas por um fotodetector. Durante o deslocamento da ponta pela superfície o computador analisa, em cada posição, a força de interação entre a ponta e a amostra e traça um diagrama de alturas, reconstruindo a topografia da amostra. Assim, a técnica de AFM dispensa a etapa de preparação da amostra com recobrimento por materiais condutores, permitindo a análise da mesma sem perda das suas propriedades (MORITA, WIESENDANGER & MEYER, 2002; PAQUIM & BRET, 2009).

3OBJETIVO

3.1 Geral

Desenvolver um sensor biomimético nanoestruturado baseado em um nanocompósito polimérico de óxido de grafeno e politionina visando à detecção eletroquímica do antígeno carcinoembrionário.

3.2 Específicos

- Caracterizar eletroquimicamente a construção do nanocompósito de politionina de e óxido de grafeno;
- Aplicar o filme nanocompósito padronizado para obtenção de superfície biomimética, empregando o CEA como molécula molde;
- Otimizar as condições experimentais de síntese biomimética (concentração do monômero, número de ciclos, velocidade de varredura, etc.);
- Aplicar as técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e de onda quadrada para caracterização do sensor biomimético formado;
- Caracterizar morfológicamente o sensor utilizando a técnica de Microscopia de Força Atômica
- Avaliar o desempenho analítico do MIP e seu controle (NIP) para detecção eletroquímica do CEA.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Reagentes

Acetato de Tionina salina (Th), *Carcino Embryonic Antigen* (CEA), Ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$), Ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) e o óxido de grafeno (GO) adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Para diluição das amostras biológicas e dissolução do polímero foi utilizado, tampão fosfato salino (PBS) (0,01 M; pH 7,4) preparado dissolvendo-se 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,24 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) e 1,44 g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), todos obtidos da VETEC (BRA), em 1L de água deionizada. As soluções utilizadas foram preparadas a partir de água deionizada ultra pura obtida através de sistema Millipore Milli-Q® (EUA) com resistividade maior que 18 M Ω /cm.

4.2 Equipamentos

Para realização das análises eletroquímicas foi utilizado um potenciostato/galvanostato modelo AUTOLAB PGST12/30/302 conectado a um microcomputador com software GPES manager soft, para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados. Durante a realização dos experimentos em laboratório, utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de vidro, com capacidade de 10 mL e tampa de policloreto de vinila. Foi utilizado também um sistema trieletródico composto por: um eletrodo de ouro (EAu) (trabalho); um eletrodo de fio de platina helicoidal (auxiliar) e um eletrodo (referência) de Ag/AgCl imerso em solução de KCl saturado (3,0 M).

4.3 Preparo da superfície de trabalho

Previamente às etapas de construção do sensor biomimético, a superfície do EAu foi submetida a um procedimento de limpeza mecânica com alumina de granulometria de 0,5 e 0,3 μ m sequencialmente durante 5 minutos através de movimentos circulares em um tecido macio. Após a limpeza, o eletrodo de trabalho foi submetido à análises por voltametria cíclica em uma janela de potencial de -0.2 a 0.6 V, velocidade de varredura de 50 mV/s e potencial de passo de 10 mV sem sonda de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM) preparado em KCl (0,1 M), para obtenção dos perfis dos picos de oxidação e redução. O voltamograma resultante foi utilizado como padrão ideal de limpeza para as modificações subsequentes.

4.4 Polimerização eletroquímica da Tionina

Preparou-se uma dispersão de tionina 1 mM em solução tampão pesando-se 0.014g do monômero para 5 mL de PBS, em seguida foi sonificado durante 10 minutos em banho de ultrassom. O filme de politionina foi construído facilmente sobre eletrodo de ouro com auxílio de sistema trieletródico através de voltametria cíclica sobre potencial de -0.5 e 1.4, velocidade de varredura de 50 mV/s⁻¹ a 10 mVs durante 25 ciclos, uma adaptação da proposta de YANG, et al (1999).

4.5 Otimização experimental

4.5.1 Concentração do monômero

Teste de concentração do monômero Th foram realizados com o objetivo de definir os parâmetros ideais para aplicação no sensor proposto. Para tal, diferentes eletrodos foram submetidos a eletropolimerização, nos padrões já descritos, na presença de soluções de Th nas concentrações de 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM. Todas as soluções de monômeros foram previamente dispersas em PBS (10 mM, pH 7.4).

4.5.2 Influência do número de ciclos

Para definição de ciclos usados na polimerização do nanocompósito, foram realizado diferentes experimentos de eletropolimerização de tionina sobre superfície de EAU, variando a quantidade de ciclos. Neste estudo, o EAU na presença da solução de Th foi submetido a testes com 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ciclos de eletropolimerização, através de técnica de voltametria cíclica. Após a formação de cada filme foi realizada a leitura em solução de K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ (5 mM) preparada em KCl (0,1 M).

4.6 Caracterização eletroquímica do nanocompósito

4.6.1 Construção do nanocompósito de OG e PTh

Três configurações de montagem do filme nanocompósito superfície do EAU foram investigadas com o objetivo de avaliar a contribuição dos diferentes materiais. No primeiro estudo foi avaliada a contribuição apenas do monômero de Theletropolimerizado sobre o EAU; no segundo estudo, após eletropolimerização da Th, um filme de OG foi depositado sobre o eletrodo modificado usando o método “*layer-by-layer*”; no terceiro estudo o foi feito

apenas a deposição do OG sobre eletrodo limpo e por fim, no quarto estudo um nanocompósito de Th e OG foi eletropolimerizado sobre EAU em uma única etapa. Após cada procedimento foi feita leitura em sonda de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ através de VC num potencial de -0.2 a 0.6 V, velocidade de varredura de 50 mV/s^{-1} no potencial de passo de 10 mVs.

4.6.2 Estabilidade eletroquímica do nanocompósito de PTh-OG

Após remoção da molécula molde da superfície biomimética de PTh e OG um estudo de estabilidade foi realizado. O MIP preparado foi então submetido a 20 sucessivas varredura cíclicas em uma janela de potencial -0,2 a 0,6 V. Ag/AgCl (KCl Sat.), sob velocidade de varredura de 50 mV/s^{-1} , em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparada em KCl (0,1 M) (SILVA et al., 2010). A estabilidade deste filme biomimético no EAU foi avaliado a partir do conhecimento do coeficiente de variação (CV) obtido entre os experimentos.

4.6.3 Influência da velocidade de varredura

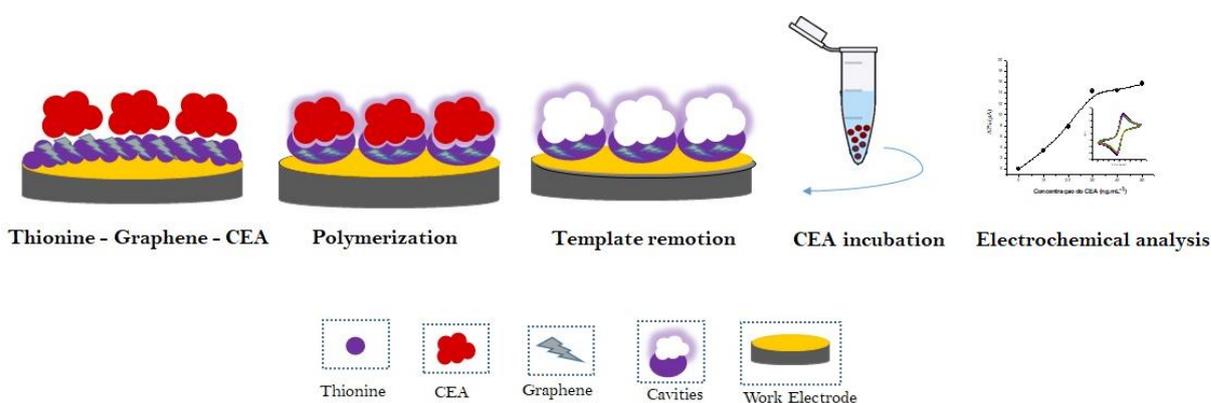
A superfície biomimética sobre o EAU foi submetido às análises por VC empregando diferentes velocidades de varredura (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 130; 140; 150 mV/s), em solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM) preparada em KCl (0,1M). O comportamento eletroquímico do MIP foi determinado medindo-se as amplitudes de corrente em relação aos potenciais de picos anódicos e catódicos vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

4.7 Construção do sensor biomimético a partir de nanocompósito de OG e PTh

Para construção das cavidades biomiméticas, uma solução de Th (2 mM), preparada em tampão PBS (10 mM, pH 7.4), e OG (0.2 mg/mL), disperso em água, na proporção de 1:1 foi eletropolimerizada sobre a superfície do EAU na presença do CEA. Para este procedimento uma mistura de Th e OG foi previamente homogeneizada durante 10 min em banho de ultrassom. Em seguida, 20 μL de CEA (100 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados à solução de Th-OG, deixando-o interagir por 2 h na temperatura de 4° C. A solução de Th, OG e CEA foi então polimerizada eletroquimicamente sobre EAU através da técnica de voltametria cíclica no potencial de -0,5 a 1,4 V, velocidade de varredura de 50 mV/s^{-1} , durante 25 ciclos (**figura 11**), uma adaptação da proposta de YANG et al. (1999).

A remoção da molécula de CEA do filme de politionina (PTh) e OG foi realizada a partir da imersão do eletrodo de trabalho em um solução de ácido acético (10%), durante 5 min sobre agitação magnética. Este procedimento foi realizado três vezes, de maneira a garantir a remoção da molécula de CEA. Ao final de cada procedimento foi realizada leitura da superfície do eletrodo em sonda de ferri/ferrocianeto de Potássio, e após a remoção do *template* a superfície do eletrodo foi testada com solução de CEA.

Figura 10: Representação esquemática do processo de obtenção do MIP de CEA por polimerização eletroquímica a partir de uma matriz de Th e OG.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.7.1 Construção do controle negativo N-MIP

O controle negativo construído para avaliar incapacidade do CEA se ligar a superfícies sem cavidades foi construído a partir de um nanocompósito semelhante ao de construção do sensor. Utilizou-se uma solução de Th (2 mM) e OG (0.2 mg/mL) na ausência da molécula molde CEA. A solução [1:1] de Th e OG foi agitada em banho de ultrassom por 10 min, porém nenhuma biomolécula foi adicionada. O EAU modificado o filme de PTh-OG foi mantido em repouso por 2h na geladeira na temperatura 4° C.

4.8 Desempenho analítico do sensor biomimético de CEA

Para testar a funcionalidade das cavidades biomiméticas formadas sobre o de PTh-OG, o eletrodo de trabalho foi incubado com sucessivas injeções de CEA (10 ng/mL). Entre cada etapa de incubação, deixou-se as cavidades biomiméticas interagirem com a molécula de CEA durante 30 min em câmara úmida. Após o tempo de espera, a superfície do eletrodo foi lavada com 1 mL água ultrapura e realizada leitura em sonda de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM).

Este procedimento foi repetido diversas vezes para avaliar a eficiência do MIP na detecção eletroquímica do CEA. A curva analítica do MIP e NIP foi construída em software Origin versão 8.0 usando uma tabela com as concentrações testadas *vs.* valores de delta de corrente obtidos das leituras voltamétricas após cada incubação.

4.9 Caracterização morfológica do sensor biomimético

Para análise morfológica da estrutura do sensor biomimético realizou-se a técnica de microscopia de força atômica (AFM – do inglês “Atomic force microscopy”). O nanocompósito de PTh-OG-CEA foi primeiramente eletrodepositado por VC em superfície do disco de ouro e em seguida os discos foram submetidos a análise.

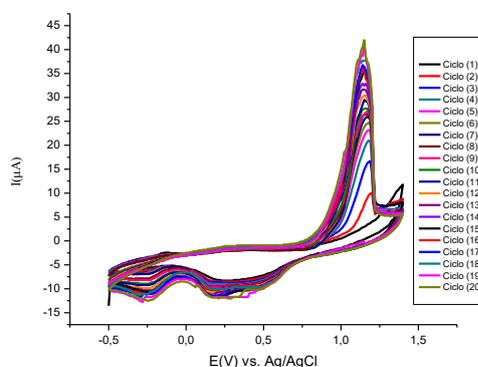
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Polimerização eletroquímica da Tionina

A eletropolimerização dos monômeros de Th sobre a superfície de um EAu foi inicialmente padronizada com o objetivo de definir os parâmetros ideais de formação do filme polimérico com características desejáveis para construção do sensor biomimético. A **Figura 11** apresenta o perfil eletroquímico da polimerização da Th sobre a superfície de ouro durante 20 ciclos voltamétricos num potencial de -0.4 a 1.4V, sob velocidade de varredura de 50 mV/s. A reação de eletropolimerização teve início a um potencial de aproximadamente 0,9V e e pico máximo num potencial elevado de 1,1V, determinada pela formação de radicais catiônicos reativos. Os monômeros de tionina constituem polímeros através de pontes formadas a partir das ligações NH_2 nas posições α ou β dos anéis aromáticos (YANG et al., 1999).

Durante o processo de eletropolimerização da Th, as amplitudes de corrente dos picos de oxidação e redução nos potenciais de 1.1V e -0,2V, respectivamente, alteram-se gradualmente e tendem a estabilidade com o aumento do número de ciclos, confirmando assim a eletrodeposição do filme polimérico. Neste caso, ocorre a diminuição dos potenciais de oxidação indicando a catálise e formação do polímero. Os potenciais dos picos evidenciados no voltamograma coincidem com os resultados de Yang et al. (1999) que sugere que a formação de PTh é obtida quando o potencial do eletrodo é maior do que o potencial de oxidação dos grupos NH_2 da molécula de tionina, e não deve-se ser aplicado um potencial menor que 1.1 V.

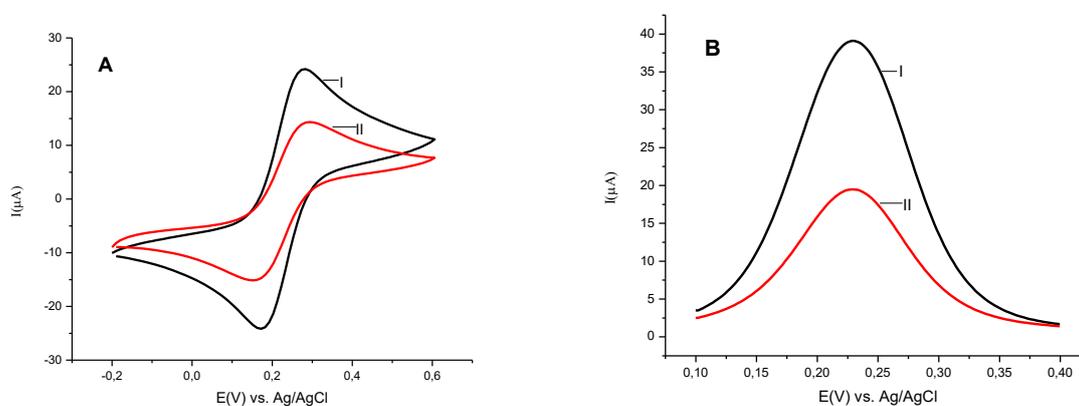
Figura 11: Voltamogramas cíclicos dos sucessivos ciclos de polimerização eletroquímica da Th sobre a superfície do EAu. Medidas realizadas em solução de 1mM de Th.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os voltamogramas cíclicos e de onda quadrada na **Figura 12(A e B, respectivamente)** apresentam o perfil do EAu em solução de $(K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6)$ (5 mM) após eletropolimerização da Th. Nos resultados observa-se uma redução dos picos redox em relação ao eletrodo limpo. O valor médio calculado em triplicata a partir de análises de VCsevidenciaram uma diminuição da corrente em $\pm 19 \mu A$ dos picos de oxidação após a formação do filme de PTh, confirmando sua característica semicondutora na superfície do eletrodo.

Figura 12. Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) do EAu limpo e eletropolimerizado com PTh. Medidas realizadas em $(K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6)$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0,1 M).



Fonte: Elaborada pelo autor

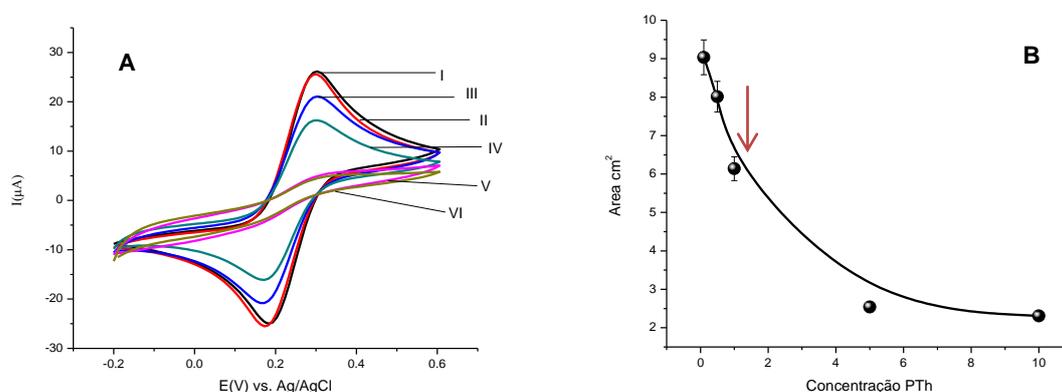
5.2 Otimização experimental

5.2.1 Concentração do monômero de Th

Um estudo sobre a influência da concentração do monômero de Th foi realizado, inicialmente, para otimização da resposta eletroquímica do filme polimérico para o sensor proposto. No ensaio, o EAu foi imerso em soluções com diferentes concentrações de Th e submetidos à eletropolimerização. Os valores das áreas dos voltamogramas obtidos após o registro do perfil dos eletrodos em sonda redox de 5mM de ferri/ferrocianeto de potássio em 0,1 M de KCl foram plotados em relação às concentrações dos monômeros (**Figura 13 (a)**). Observou-se uma redução da área eletroativa proporcional ao aumento da concentração de monômeros da Th (**Figura 13 (b)**). A concentração intermediária de 1 mM de Th mostrou-se como recomendada para prosseguimento deste estudo, do capaz de ofertar grupos amins

suficientes para interagir com os outros componentes da plataforma, sem formarse necessariamente um filme de condutividade comprometida. Valores próximos a esta concentração foi também selecionados por prévios autores. Em estudos similares, KONG et al. (2011) usou 1 mM para formar um nanocompósito baseado em óxido de grafeno e nanopartículas de ouro; SUN et al. (2012) utilizou 0.2 mM de Th para construir um nanohíbrido de folhas de grafeno e monômeros derivados de fenotiazina.

Figura 13. A) Voltamograma cíclico registrados em sonda de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) do EAueletropolimerizado com diferentes concentrações de Th: I) eletrodo limpo, II) 0,1 mM, III) 0,5 mM, IV) 1 mM, V) 5 mM e VI) 10 mM; B) Área eletroativa dos voltamogramas cíclicos *versus* concentração do monômero de Th.



Fonte: Elaborado pelo autor

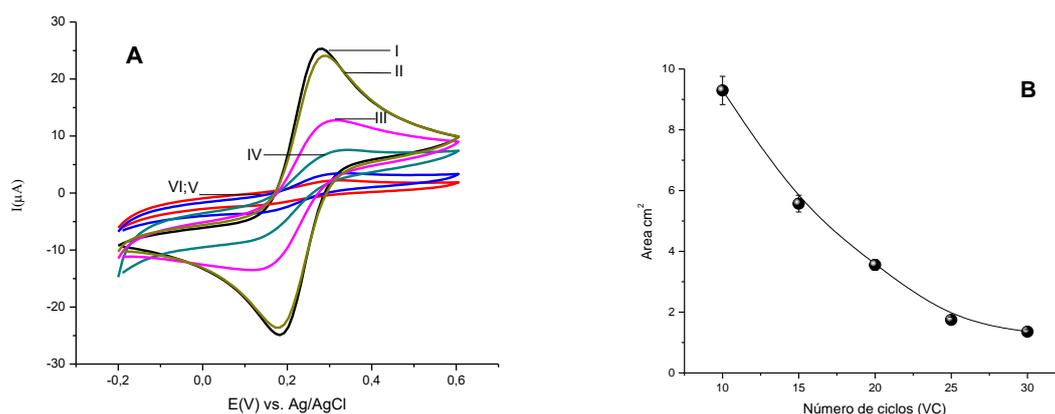
5.2.2 Influência do número de ciclos de polimerização

A quantidade de potencial aplicado no processo de polimerização eletroquímica deve ser uma das características otimizadas para reduzir o tempo de fabricação, com melhor valor de condutividade elétrica pela formação das cadeias poliméricas. Neste estudo, utilizando-se a VC, a quantidade ideal de números de ciclos foi determinada, utilizando diferentes experimentos de eletropolimerização de Th sobre superfície de eletrodo de ouro. Na **Figura 14 (a)** são mostrados os voltamogramas cíclicos realizados em presença da sonda redox após a formação de cada filme utilizando a quantidade de ciclos de polimerização de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 ciclos voltamétricos. A **Figura 14 (b)** mostra a correlação dos valores da área dos voltamogramas *versus* números de ciclos de polimerização, demonstrando uma redução proporcional desta de acordo com o aumento do número de ciclos. Deste modo, através deste resultado estabeleceu-se 20 ciclos como ideal para prosseguimentos das etapas subsequentes,

visto que polimerizações realizadas acima de 20 ciclos resultam em filmes de PTh mais isolantes devido a característica porosa do polímero.

Resultados similares foram alcançados por AHAMMAD et al. (2013), no qual além do número de ciclos, os autores concluíram que o pH tem grande importância no processo de eletropolimerização de Th. Neste estudo, observou-se que os potenciais de pico de oxidação foram deslocados negativamente com o aumento do pH da solução de monômeros, indicando fortemente o papel significativo dos prótons no processo de eletropolimerização, definindo o pH de 6,5 como valor otimizado e o tampão PBS como solução ideal.

Figura 14: A- Voltamograma cíclico demonstrando perfil do eletrodo de ouro após formação de filme de PTh variando o número de ciclos: I) 10 ciclos, II) 15 ciclos, III) 20 ciclos, IV) 25 ciclos e V) 30 ciclos; B) Número de ciclos versus área dos voltamogramas cíclicos correspondentes. Leituras realizadas em sonda de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0,1 M).



Fonte: Elaborado pelo autor

5.3 Caracterização eletroquímica do nanocompósito

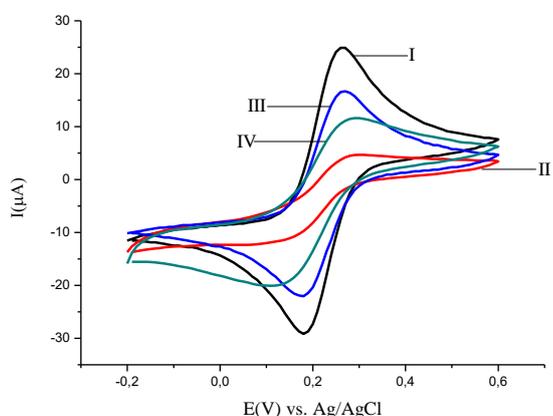
5.3.1 Construção do nanocompósito de OG e PTh

Os estudos iniciais de construção da matriz polimérica, base para formação do MIP, avaliaram a presença da PTh e do OG nas suas respectivas contribuições. Os voltamogramas cíclicos da **Figura 15** mostram o perfil eletroquímico da contribuição dos componentes sobre o EAU, em varreduras lidas na presença da sonda redox de $(K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6)$ (5 mM). A formação do filme de PTh (1mM) (**curva II**) sobre a superfície do EAU resultou numa redução significativa dos valores de corrente de pico anódico e catódico (I_{pa} e I_{pc} , respectivamente) em relação ao eletrodo limpo (**curva I**), confirmando a sua característica de semicondutor. Utilizando o método de construção de filme de camada por camada (“*layer-by-layer*”), o OG foi depositado sobre o filme de PTh previamente eletropolimerizado no EAU.

Nos resultados obtidos (**curva III**), observou-se um aumento dos valores de corrente em relação aos estudos controle, característica que pode ser atribuída ao melhoramento da mobilidade de elétrons do filme nanocompósito associada a propriedade condutora do nanomaterial. Quando os monômeros de Th e o OG foram eletropolimerizados em conjunto, em uma única etapa, um filme com valores de corrente intermediários, a partir das características de cada material foi obtido (**curva IV**). O óxido de grafeno foi eletropolimerizado conjuntamente com monômeros de Them solução, foi capaz de formar um nanocompósito polimérico a partir das duas ligações $-NH_2$ presentes no monômero derivado de fenotiazina justamente com grupos carboxila (COOH) disponíveis no óxido de grafeno. (KONG et al., 2012).

Nesta perspectiva, sabendo-se que o sinergismo entre o filme polimérico de PTh e do OG foi capaz de resultar em um nanocompósito funcional com boa condutividade construído em apenas um passo de síntese, estes estudos preliminares indicaram boas perspectivas para emprego deste no sensor proposto baseado em MIP para rastreamento de CEA. Apesar de muitos sensores eletroquímicos para detecção de biomoléculas utilizarem o método *layer-by-layer* para confecção das plataformas, principalmente com o objetivo de explorar as propriedades de cada componente, este método não despertou interesse para aplicação neste sensor biomimético devido as desvantagens que possuem, incluindo fragilidade do filme e as várias etapas de construção.

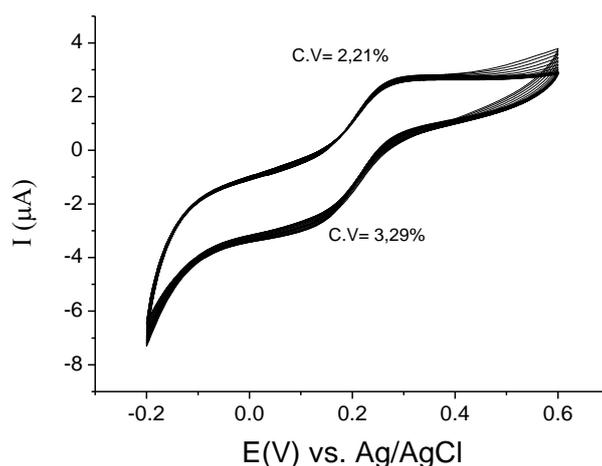
Figura 15. Voltamogramas cíclicos demonstrando o perfil eletroquímico da contribuição de cada componente do filme nanocompósito de PTh-OG: (II) PTh; (I) EAU limpo; (III) PTh/OG e (IV) PTh-OG. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M).



5.3.2 Estabilidade eletroquímica do nanocompósito de PTh-OG

Para avaliar a estabilidade eletroquímica do nanocompósito de PTh-OG, o filme sobre a superfície do EAU foi submetido a 20 sucessivos ciclos voltamétricos em $(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6)$ (5 mM). A partir dos valores de I_{pa} e I_{pc} nos voltamogramas da **Figura 16**, calculou-se o desvio padrão e o coeficiente de variação dos 20 ciclos aplicados a superfície modificada do EAU com PTh-OG. O coeficiente de variação calculado para I_{pa} e I_{pc} do EAU/PTh-OG foi de aproximadamente 2,2% e 3,3%, respectivamente, demonstrando que o filme formado apresenta-se estável ($CV < 5,0\%$) (GOMES et al., 2014).

Figura 16: Estudo de estabilidade do filme de PTh-OG realizado a partir de VC, demonstrando as sucessivas varreduras durante 20 ciclos. Medidas obtidas através de equipamento AUTOLAB com software NOVA 2.1 usando célula eletroquímica com sonda de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM) preparada em solução de KCl (0,1 M).



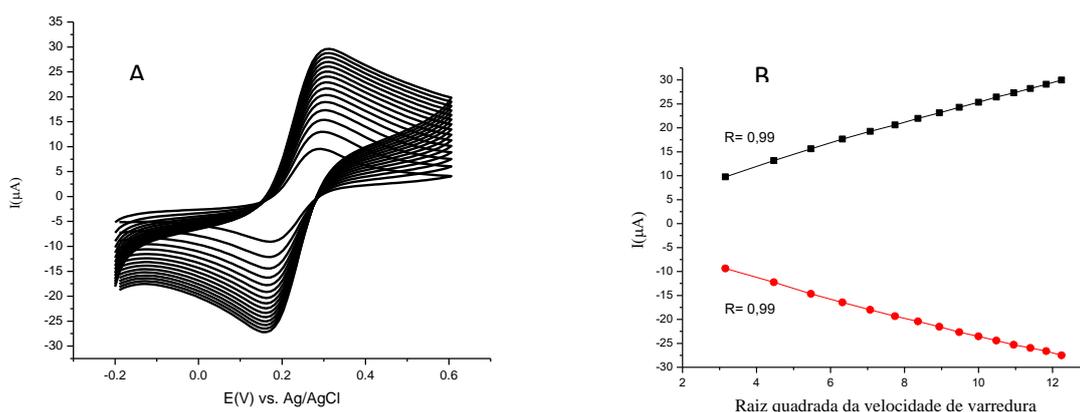
Fonte: Elaborado pelo autor

5.3.3 Estudo da velocidade de varredura sobre nanocompósito de PTh-OG

Os processos difusionais e transferência de massa sobre superfície interface biomimética e eletrólito foram estudados a luz da VC alterando-se as velocidades de varredura (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 130; 140; 150 mV/s^{-1}), em solução iônica de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mM) preparada em KCl (0,1M) (**Figura 17 (a)**). O comportamento eletroquímico do MIP foi avaliado através da relação da raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$) vs I_{pa} e I_{pc} .

De acordo com os VCs obtidos na **Figura 17 (b)**, foi obtido um incremento nos picos catódicos (I_{pC}) e anódicos (I_{pA}) com relação ao aumento da velocidade de varredura ($10 - 150 \text{ mVs}^{-1}$), com as seguintes equações de regressão linear $I_{pA} (\mu\text{A}) = 2,179 x - 3,5435$ ($r = 0,99$) and $I_{pC} (\mu\text{A}) = -1,9676 x - 3,7595$ ($r = 0,99$). Tais resultados sugerem que as reações na interface do sensor biomimético exibiram um processo de difusão controlada com o aumento da velocidade de varredura de potencial (SILVA et al., 2010). Além disso, os aumentos dos picos anódicos e catódicos foram proporcionais entre si, indicando um caráter de reversibilidade nas reações redox, indicando estabilidade eletroquímica do nanocompósito.

Figura 17: (A) Voltamogramas cíclicos do EAU/PTh-OG sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 mV s^{-1}). Medidas realizadas em ferrocianeto e ferricianeto de potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) preparado em KCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); (B) Dependência das correntes de I_{pA} e I_{pC} em relação a raiz quadrada da velocidade de varredura.



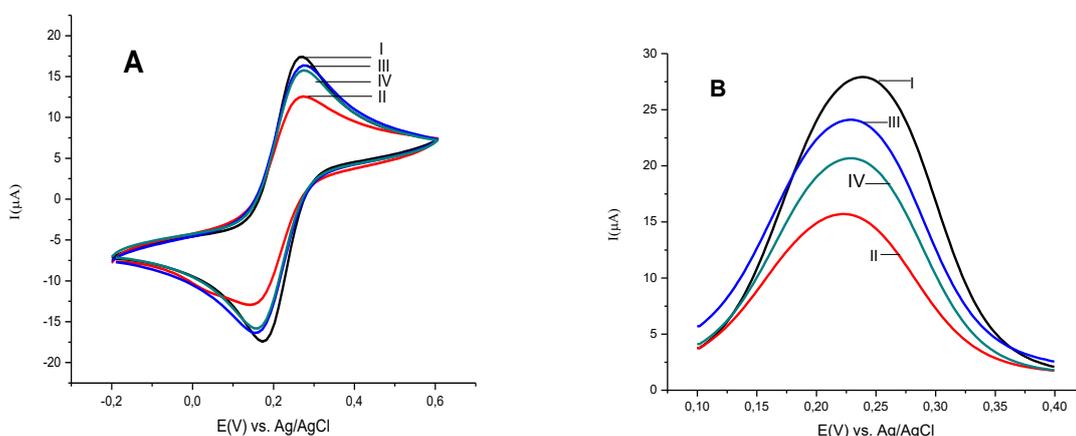
Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 Construção do sensor biomimético de CEA a partir de nanocompósito de OG e PTh

As etapas de construção do sensor biomimético de CEA a partir do nanocompósito de PTh-OG foram caracterizadas eletroquimicamente pelas técnicas de voltametria cíclica e de onda quadrada. Os voltamogramas cíclicos e onda quadrada na **Figura 18 (A e B, respectivamente)** apresentam o perfil eletroquímico obtido em sonda de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM). A eletropolimerização da PTh juntamente com o OG e a molécula molde de CEA resultou em uma redução de aproximadamente 40% e 35% nos valores de I_{pA} e I_{pC} , respectivamente (Figura 18(A)). Após a remoção da molécula de CEA, com ácido acético (10%), observou-se um aumento nos valores de corrente, indicando a

liberação do CEA do filme polimérico e formação de cavidades reativas pelo aumento em cerca de 30% e 28% nos valores de I_{pa} e I_{pc} , respectivamente. Posteriormente, quando a superfície biomimética é submetida a um teste com CEA (10 ng/mL) evidencia-se uma redução dos valores de pico anódicos e catódicos, indicando o preenchimento das cavidades biomiméticas no evento de re-ligação, devido a dificuldade de passagem de elétrons. Na figura 18(B), os perfis dos potenciais de picos anódicos da SWVs correlaciona os mesmos achados também descritos, comprovando o princípio de formação do MIP.

Figura 18. Voltamograma cíclicos (A) e de onda quadrada (B) da construção do sensor biomimético de PTh-OG-CEA: (I) EAU limpo; (II) após eletropolimerização da Th-OG-CEA; (III) remoção da biomolécula e (IV) após incubação com 10 ng/mL de CEA. Todas as medidas foram realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M).



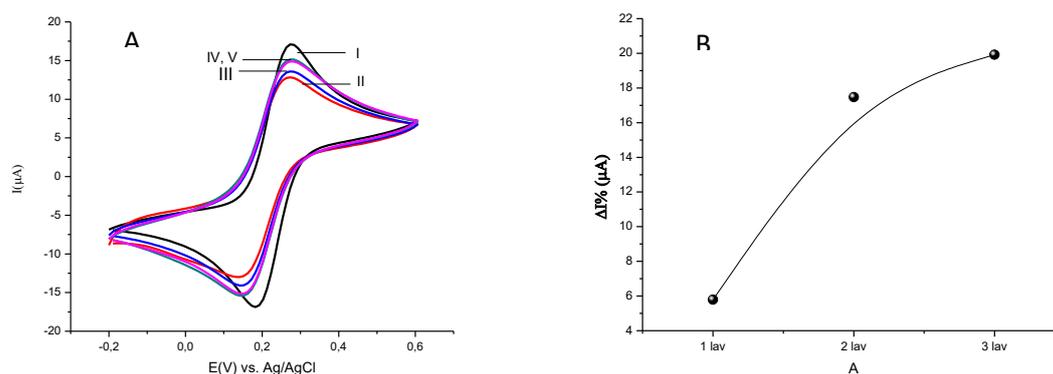
Fonte: Elaborado pelo autor

5.4.1 Otimização das lavagens para remoção da biomolécula

A remoção da molécula de CEA do filme de PTh com OG foi realizada a partir da imersão do eletrodo de trabalho modificado em solução de ácido acético (10% em solução aquosa) sobre agitação magnética. Para padronização da formação da superfície biomimética, um estudo avaliando a eficiência do número de lavagens do filme na remoção do CEA foi realizado. Os voltamogramas cíclicos na **Figura 19** evidenciaram um aumento dos valores das correntes de pico de oxidação e redução após a primeira e segunda lavagem. Entretanto, os valores de corrente I_{pa} e I_{pc} mostraram-se estáveis na terceira lavagem, sugerindo a remoção total de biomolécula e possível formação das cavidades de biorreconhecimento. Assim, o número de lavagens para remoção do *template*, foi mantido em três lavagens. Zhang et al. (2011) e Foguel et al. (2015) em seus estudos, utilizaram o ácido acético na mesma

concentração(10%), entretanto na presença de metanol, e encontraram que 3 lavagens era também um número suficiente para remoção do *template*.

Figura 19.(A) Voltamogramas cíclicos mostrando a influência do número de lavagens com ácido acético (10%) sobre a eficiência de remoção da molécula de CEA do filme polimérico: I) EAU limpo, II) PTH-OG-CEA, III) após 1ª lavagem, IV) após 2ª lavagem e V) após 3ª lavagem. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M), (B) $\Delta I\%$ vs números de lavagens com ácido acético 10% em água.

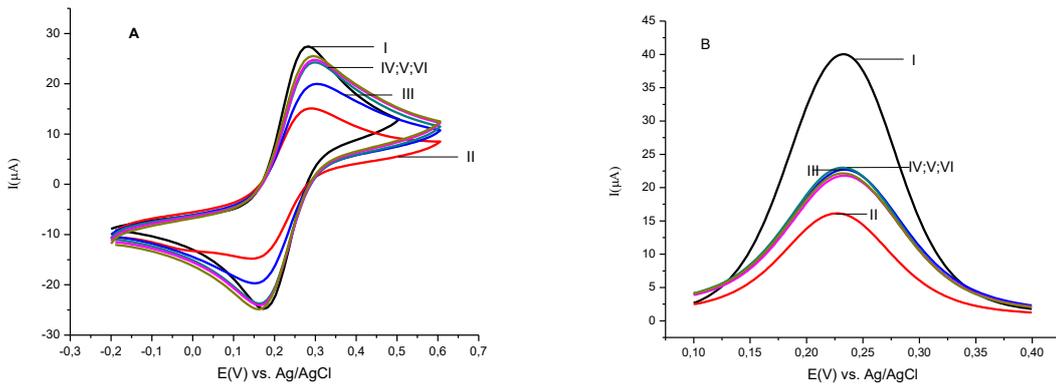


Fonte: Elaborado pelo autor

5.4.2 Construção do controle negativo (NIP)

Para confirmar a capacidade de resposta da superfície biomimética, foi realizada um polímero não molecularmente impresso (NIP), que foi obtido dispensando-se o uso de CEA e a plataforma foi construída apenas com PTh-OG (**Figura 20**). Neste estudo, o perfil eletroquímico do nanocompósito formado em relação ao EAU apresentou-se como descrito anteriormente, no qual observa-se a formação de um filme com características semicondutoras. Após construção do filme, o mesmo foi submetido à lavagem com solução aquosa de ácido acético (10%), mesma metodologia definida para construção do MIP, no qual resultaram em um discreto aumento da corrente, indicando que após a incubação na superfície do N-MIP com CEA não houve variação de corrente, confirmando a incapacidade de resposta do estudo controle.

Figura 20: Voltamogramas cíclicos (A) e de onda quadrada (B) das etapas de construção do controle negativo (NIP) do sensor biomimético: (I) EAU limpo; (II) após eletropolimerização do Th-OG; (III) após lavagem com ácido acético 10% e (IV) incubação com 10 ng/mL de CEA. Medidas realizadas em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0.1 M).

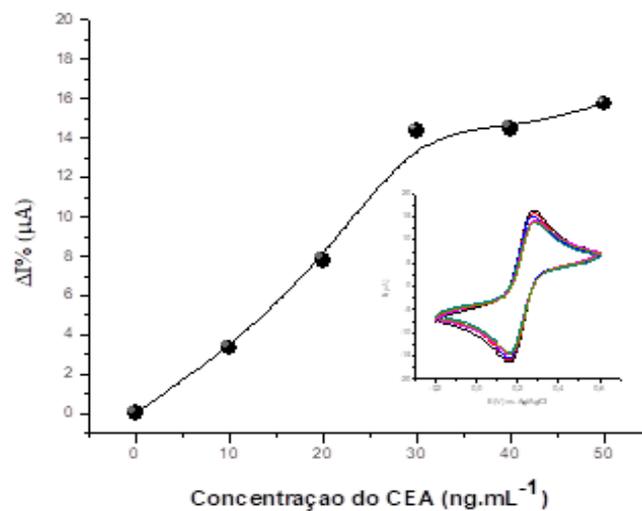


Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 Desempenho analítico do sensor biomimético de CEA

O desempenho analítico do sensor foi avaliado através de sucessivas injeções de CEA (10 ng/mL) sobre a superfície sensora. **Afigura 21**exibe um típico perfil da resposta analítica ao CEA curva adquire ponto de saturação com aproximadamente 30 ng/mL e um limite de detecção de 3,1 ng/mL. A capacidade de resposta do sensor foi avaliada usando o percentual de diminuição de corrente ($I\Delta\%$) através de medida de voltametria cíclica em sonda de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparados em solução de KCl (0,1 M).

Figura 21: Curva de detecção de antígeno carcinoembrionário sobre a plataforma de PTh-OG com valores de concentração de 10; 20; 30; 40; 50 ng/mL⁻¹.

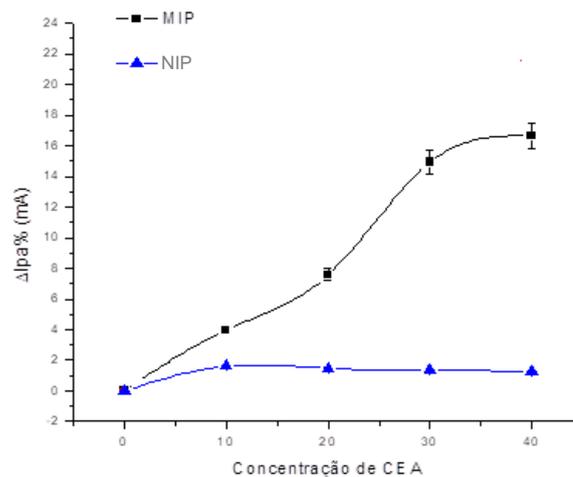


Fonte: Elaborado pelo autor

5.6 Comparação entre a plataforma MIPe o NIP

Neste estudo, o desempenho analítico do sensor a partir de superfície biomimética com MIP moldado a partir do nanocompósito de PTh-OG foi avaliado em relação ao NIP de acordo com diferentes concentrações de CEA. O NIP formado a partir da PTh-OG na ausência da molécula de CEA foi usado como controle do ensaio. A comparação entre MIP e N-MIP e seus respectivos valores de delta de corrente anódica está ilustrada na **Figura 23**. O MIP construído a partir do nanocompósito PTh-OG apresenta boa sensibilidade analítica para detecção de concentrações de CEA, enquanto o NIP não apresentou variações significativas de corrente às mesmas concentrações de CEA, sendo praticamente constante. Estes resultados indicam que o sensor biomimético desenvolvido foi capaz de identificar antígenos do CEA de modo sensível.

Figura 22: Comparação entre as curvas de MIP (linha preta) e NIP (linha azul).



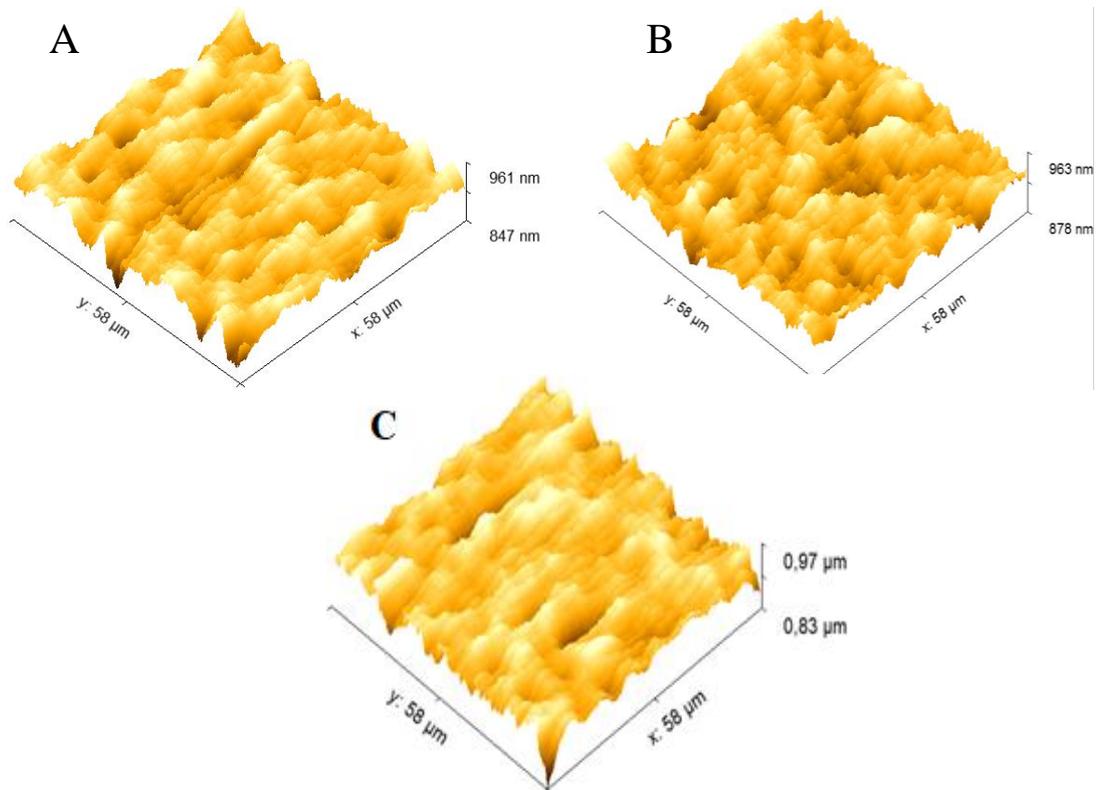
Fonte: Elaborado pelo autor

5.7 Caracterizações morfológicas do sensor biomimético

A caracterização morfológica da superfície biomimética de CEA impressa molecularmente no nanocompósito de PTh-OG foi realizada pela técnica de AFM. Todas as micrografias foram tratadas e analisadas em suas respectivas rugosidades médias pelo software Gwyddion (versão 2.5). A imagem da **Figura 22(a)**, exibe a AFM obtida do disco de ouro limpo, usada como controle para avaliar a formação do MIP de CEA. O disco de ouro limpo apresentou um valor médio de rugosidade de aproximadamente 114 nm. Embora tenha sido utilizado um eletrodo de ouro policristalino de superfície aparentemente regular, a AFM

revelou uma rugosidade média relativamente alta, atribuída provavelmente ao desgaste e danos à superfície causados pelos processos de limpeza mecânica e eletroquímica. A **Figura 22 (b)** apresenta micrografia da superfície de ouro após eletropolimerização do nanocompósito de PTh-OG-CEA. Um aumento na rugosidade média foi observada atingindo valor 197nm. Isto pode ser atribuído a formação do filme polimérico PTh-OG-CEA, preenchendo deformidades do disco. Após remoção da biomolécula de CEA do filme PTh-OG-CEA na **Figura 22 (c)**, uma nova análise demonstrou uma na rugosidade do filme para 185nm, uma diferença significativa de 12 nm em relação a medida anterior sugerindo uma remoção bem sucedida da molécula de molde da matriz de PTh-OG, visto que uma molécula de CEA tem uma massa de aproximadamente 200 kD (GRUNNET & SORENSEN, 2012; GOLDENBERG et al., 1981).

Figura 23. Microscopia de força atômica da superfície do disco de ouro nu (A); Disco de ouro com nanocompósito TH-OG-CEA (B), Disco de ouro após lavagem de remoção da molécula de CEA (C).



Fonte: Elaborado pelo autor

6 CONCLUSÃO

A modificação do eletrodo de ouro com o filme nanoestruturado de PTh-OG contribuiu para construção de um sensor eletroquimicamente estável e reativo-funcional, podendo ser empregado na construção de cavidades de biorreconhecimento para detectar o antígeno carcinoembrionário de maneira rápida e simples. As respostas analíticas obtidas foram de até 30 ng/mL e o sensor apresentou um limite de detecção de 3,1 ng/mL. Além disso, o sensor biomimético desenvolvido mostrou desempenho satisfatório na detecção do CEA em níveis de referência clínica similares, abrindo perspectivas para aplicação em ensaios eletroquímicos de rastreio de neoplasias diversas, uma vez que este antígeno é responsivo em diversos cânceres.

Neste estudo, constata-se que o emprego de nanomateriais em conjunção à monômeros possibilita eletropolimerização *in situ* de modo mais simples e com única etapa, de modo mais controlado. Atribui-se ao sinergismo do óxido de grafeno com o polímero enxertado, sendo um bom candidato para desenvolvimento de MIPs nanoestruturados.

7 PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como perspectivas futuras deste trabalho, tem-se a realização de alguns estudos complementares, incluindo microscopia eletrônica de varredura (MEV) e *Fourier-TransformInfraredspectroscopy* (FTIR) para caracterização topográfica e química do filme.

Adicionalmente, evidencia-se a importância de expandir a curva analítica e realizar testes com amostras de soro humano com diferentes concentrações do antígeno, bem como empregando soro enriquecido com outras biomoléculas para testes de seletividade. Estes ensaios irão permitir determinação da sensibilidade e seletividade diagnóstica do sensor biomimético proposto, além de sua confiabilidade e praticidade quando comparado a outros sistemas comerciais usados na determinação dos níveis séricos de CEA.

REFERÊNCIAS

- ABDULHALIM, I.; ZOUROB, M.; LAKHTAKIA, A. Overview of optical biosensing techniques. In: MARKS, R. S.; LOWE, C. R.; CULLEN, D. C.; WEETALL, H. H.; KARUBE, I. **Handbook of Biosensors and Biochips**. 2007.
- AHAMMAD, A. S.; LI, X. B.; RAHMAN, M. M.; NOH, K. M.; LEE, J. J. Characteristics of a poly (thionine) modified glassy carbon electrode and the detection of dopamine and uric acid. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 8, p. 7806-7815, 2013.
- ALMEIDA, J. R. C.; LIMA PEDROSA, N.; LEITE, J. B.; PRADO FLEMING, T. R.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. D. A. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.
- ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science and Engineering**, v. 33, n. 4, p. 1853-1859, 2013.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L.R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Ed. **WileyIndia**, New York, 2006.
- BERTÓK, T.; KATRLÍK, J.; GEMEINER, P.; TKAC, J. Electrochemical lectin based biosensors as a label free tool in glycomics. **MicrochemicalActa**, v. 180, p. 1-13, 2013.
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A.M.O. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. Ed. **Oxford University Press**, New York, 1993.
- CALIL, S. S.; SILVA, P.R.Q. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade, v. 23, 2011.
- CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441-56, 2002.
- CHEN, Q.; HUANG, W.; LI, C.; JIANG, L.; DING, H.; XIAO, Q. & HUANG, S. Comparison research of Array-ELISA and ECLIA in determination of six tumor markers in serum [J]. **Laboratory Medicine**, v. 1, p. 003, 2012.

CHIMELLO, P. H. P. Síntese e caracterização de polímero molecularmente impresso para determinação do corante tartrazina visando desenvolvimento e aplicação de novos sensores biomiméticos com transdução óptica. 2017.

CLARK, R. J.; LYONS, C. Electrode systems for continuo monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 334, p. 29-45, 1962.

DAI, Y.; LI, X.; FAN, L.; LU, X.; KAN, X. “Sign-on/off” sensing interface design and fabrication for propyl gallate recognition and sensitive detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 741-747, 2016.

DIKIN, A.K.; STANKOVICH, S.; ZIMNEY, E.J.; PINER, R.D.; DOMMETT, G.H.B; EVMENENKO, G.; NGUYEN, S.T.; RUOFF, R.S. Preparation and characterization of grapheme paper. **Nature**, v. 448, p. 457-460, 2007.

DING, X.; HEIDEN, P. A. Recent developments in molecularly imprinted nanoparticles by surface imprinting techniques. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 299, p. 268–282, 2014.

FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Atomic force microscopy applied to immunoassays. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

FERREIRA, V.; TENREIRO, A.; ABRANTES, L. M. Electrochemical, microgravimetric and AFM studies of polythionine films: application as new support for the immobilisation of nucleotides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 119, n. 2, p. 632-641, 2006.

FOGUEL, M. V.; TON, X. A.; ZANONI, M. V.; MARIA DEL PILAR, T. S.; HAUPT, K.; BUI, B. T. S.A molecularly imprinted polymer-based evanescent wave fiber optic sensor for the detection of basic red 9 dye. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 218, p. 222-228, 2015.

GAO, H.; DUAN, H. 2D and 3D graphene materials: Preparation and bioelectrochemical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 404-419, 2015.

GOLDENBERG, D. M.; NEVILLE, A. M.; CARTER, A. C.; GO, V. L. W.; HOLYOKE, E. D.; ISSELBACHER, K. J.; SCHWARTZ, M. CEA (carcinoembryonic antigen): its role as a

marker in the management of cancer. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 101, n. 3, p. 239-242, 1981.

GRANQVIST, C. G.; HULTAKER, A. Transparent and conducting ITO films: new developments and applications. **Thin Solid Films**, v. 411, n. 1, p. 1-5, 2002.

GRUNNET, M.; SORENSEN, J. B. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. **Lung cancer**, v. 76, n. 2, p. 138-143, 2012.

HAJDU, S. I. A note from history: landmarks in history of cancer, part 3. **Cancer**, v. 118, n. 4, p. 1155-1168, 2012.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; LIN, Y.; DE LA GUARDIA, M. Nanomaterials for use in immunosensing of carcinoembryonic antigen (CEA): Recent advances. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 185-205, 2017.

HE, H.; KLINOWSKI, J.; FORSTER, M.; LERF, A. A new structural model for graphite oxide. **Chemical physics letters**, v. 287, n. 1, p. 53-56, 1998.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental. 6ª ed. São Paulo: **Ed. Bookman**, p. 1056, 2009.

HU, K.; KULKARNI, D.D.; CHOI, I.; TSUKRUK, V.V. Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 11, p. 1934-1972, 2014.

HUANG, J.; ZHANG, X.; LIU, S.; LIN, Q.; HE, X.; XING, X.; LIAN, W. Electrochemical sensor for bisphenol a detection based on molecularly imprinted polymers and gold nanoparticles. **J ApplElectrochem**, v. 41, p. 1323–1328, 2011.

HUYNH, T.-P.; PIETRZYK-LE, A.; BIKRAM K. C. C.; NOWORYTA, K. R.; SOBCZAK, J. W.; SHARMA, P. S.; D'SOUZA, F.; KUTNER, W. Electrochemically synthesized molecularly imprinted polymer of thiophene derivatives for flow-injection analysis determination of adenosine-5'-triphosphate. **BiosensorsandBioelectronics**, 41, 634–641, 2013.

INCA, T. Estimativa 2014–Incidência de Câncer no Brasil. **RevBrasCancerol**, v. 60, n. 1, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2011.

IRSHAD, M.; IQBAL, N.; MUJAHID, A.; AFZAL, A.; HUSSAIN, T.; SHARIF, A.; AHMAD, E.; ATHAR, M.M. molecularly imprinted nanomaterials for sensor applications. **Nanomaterials**, v. 3, p. 615-637, 2013.

KONG, F. Y.; LI, X. R.; ZHAO, W. W.; XU, J. J. & CHEN, H. Y. Graphene oxide–thionine–Au nanostructure composites: preparation and applications in non-enzymatic glucose sensing. **Electrochemistry Communications**, v. 14, n. 1, p. 59-62, 2012.

KONGSUPHOL, P.; NG, H. H.; PURSEY, J. P.; ARYA, S. K.; WONG, C. C.; STULZ, E.; PARK, M. K. EIS-based biosensor for ultra-sensitive detection of TNF- α from non-diluted human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 274-279, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças. **Elsevier Brasil**, 2015.

LI, M.; LI, Y.-T.; LI, D.-W.; LONG, Y.-T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. **Analytica chimica acta**, v. 734, p. 31-44, 2012.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, p. 1318-1325, 2006.

LU, B; SMYTH, M. R.; O'KENNEDY, R. Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. **Analyst**, v. 121, n. 3, p. 29-32, 1996.

LUZ, R. A. S.; IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Nanomaterials for biosensor and implantable biodevices. In: CRESPILO, F. N. Nanobioelectrochemistry: From Implantable Biosensors to Green Power Generation. **Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 27-48, 2013.

MARTÍNEZ-PAREDES, G.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; COSTA-GARCÍA, Agustín. In situ electrochemical generation of gold nanostructured screen-printed carbon electrodes.

Application to the detection of lead underpotential deposition. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 21, p. 4801-4808, 2009.

MEDEIROS, E.; OLIVEIRA, J.E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L.H.C. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 2: Aplicações em sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 3, p.144-158, 2012.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v.20, p.1113-1126, 2004.

MISTRY, K. K.; LAYEK, K.; MAHAPATRA, A.; ROYCHAUDHURI, C.; SAHA, H. A review on amperometric-type immunosensor based on screen-printed electrodes. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2289-2311, 2014.

MORITA, S.; GIESSIBL, F.J.; MEYER, E.; WIESENDANGER, R. **Noncontact atomic force microscopy**. Springer, 2015.

MUJAHIND, A.; IQBAL, N.; AFZAL, A. Bioimprinting strategies: From soft lithography to biomimetic sensor and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1435-1447, 2013.

PAQUIM, A. M.; BRETT, A. M. Microscopia de Força Atômica de moléculas de DNA adsorvidas na superfície de HOPG. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, p. 57-68, 2009.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, p. 1-15, 2014.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403-2412, 2010.

SANTOS, J. M.; RODRIGUES, S. M.; RIBEIRO, D. M.; PRIOR, J. V. Perspetivas de utilização de nanomateriais em nanodiagnóstico. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 3-14, 2014.

SCHIRHAGL, R.; REN, K.; ZARE, R. N. Surface-imprinted polymers in microfluidic devices. **Science China Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 469-483, 2012.

SHARMA, P. S.; PIETRZYK-LE, A.; D'SOUZA, F.; KUTNER, W. Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3177-3204, 2012.

SHI, Y.; YUAN, R.; CHAI, Y.; HE, X. Development of an amperometric immunosensor based on TiO₂ nanoparticles and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 11, p. 3518-3524, 2007.

SILVA, B. V.; CAVALCANTI, I. T.; MATTOS, A. B.; MOURA, P.; MARIA DEL PILAR, T. S.; DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 3, p. 1062-67, 2010.

SOBIN, Leslie H.; GOSPODAROWICZ, Mary K.; WITTEKIND, Christian (Ed.). **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2011.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensor: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 4, p. 159-173, 2003.

TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly (thionine) thin films: the effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 1, 2014.

UZUN, L.; TURNER, A. P. F. Molecularly-imprinted polymer sensors: Realising their potential. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 131–144, 2015.

VASHIST, S. K.; LUONG, J.H.T. Recent advances in electrochemical biosensing schemes using graphene and graphene-based nanocomposites. **Carbon**, v. 84, p. 519-550, 2015.

VESELOVSKY, A. V.; IVANOV, Y. D.; IVANOV, A. S.; ARCHAKOV, A. I.; LEWI, P.; JANSSEN, P. Protein–protein interactions: mechanisms and modification by drugs. **Journal of Molecular Recognition**, v. 15, n. 6, p. 405-422, 2002.

VOLKERT, A. A.; HAES, A. J. Advancements in nanosensors using plastic antibodies.

Analyst, v. 139, n. 1, p. 21-31, 2014.

WEI, Q.; MAO, K.; WU, D.; DAI, Y.; YANG, J.; DU, B.; LI, H novel label-free electrochemical immunosensor based on graphene and thionines nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 149, n. 1, p. 314-318, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Noncommunicable diseases country profiles 2014.

YANG, R.; RUAN, C.; DAI, W.; DENG, J.; KONG, J. Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H₂O₂ biosensor based on poly (thionine). *Electrochimica Acta*, v. 44, n. 10, p. 1585-1596, 1999.

ZARBIN, A.J.G; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1533-1539, 2013.

ZHANG, Z.; CHENG, Z.; ZHANG, C.; WANG, H.; LI, J. Precipitation polymerization of molecularly imprinted polymers for recognition of melamine molecule. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, n. 2, p. 962-967, 2012.