



RENATO SANTOS FERREIRA

Licenciado em Ciências da Engenharia Biomédica

NANOSSENSORES BASEADOS EM ANTICORPOS DA PROTEÍNA STANNIOCALCINA-1 PARA DETEÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
setembro, 2022

NANOSSENSORES BASEADOS EM ANTICORPOS DA PROTEÍNA STANNIOCALCINA-1 PARA DETEÇÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA

RENATO SANTOS FERREIRA

Licenciado em Ciências da Engenharia Biomédica

Orientadora: MARIA DE FÁTIMA GUERREIRO DA SILVA CAMPOS RAPOSO,
Professora Associada com Agregação, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientador: ADELINO VICENTE MENDONÇA CANÁRIO,
Professor Catedrático, Universidade do Algarve

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
setembro, 2022

Nanosensores baseados em anticorpos da proteína Stanniocalcina-1 para o diagnóstico do Cancro da Próstata.

Copyright © Renato Santos Ferreira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À minha mãe Francisca Santos
Ao meu falecido pai Armindo Ferreira
À minha namorada Liliana Correia

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Maria de Fátima Raposo, pela orientação, profissionalismo, dedicação, disponibilidade e confiança ao longo da realização deste trabalho, sem este apoio este trabalho não seria realizado.

Ao meu coorientador Professor Doutor Adelino Vicente Mendonça Canário por todas as reuniões de esclarecimento de dúvidas, pela disponibilidade, atenção e apoio nos materiais para a realização do trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Ribeiro pela amizade e colaboração.

À minha mãe, Francisca Santos e a minha namorada, Liliana Correia pelo apoio incondicional ao longo dos 5 anos de curso. Retribuo tudo o que fizeram e fazem por mim com o meu amor.

A toda à minha família e amigos externos a faculdade que de uma forma ou de outra fizeram parte desta longa caminhada.

A todos os Professores da FCT-UNL que estiveram envolvidos na minha formação.

A todos os colegas de curso e em especial ao Rodrigo Braga, Ricardo Brás, José Loja, Cláudio Pedrosa, Tiago Reis, António Fortes e Orlando Ferreira pelos momentos de amizade e de partilha de conhecimento.

A nível institucional agradeço à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa pelo acolhimento como aluno de Mestrado Integrado.

"You cannot teach a man anything; you can only help him
discover it in himself." (Galileo).

RESUMO

O cancro da próstata é um dos tumores mais prevalentes nos homens, sendo responsável por cerca de 7,3% das mortes por cancro. Embora existam várias estratégias para o diagnóstico do cancro da próstata, estas só são válidas quando o cancro já se encontra numa fase muito avançada, pelo que o diagnóstico precoce é de extrema importância. A stanniocalcina (STC) é uma glicoproteína segregada, que foi descoberta inicialmente nos corpúsculos de *Stannius* de peixes teleósteos e que em estudos em humanos indicaram que o aumento da expressão de STC está associado ao desenvolvimento e/ou progressão de diferentes tipos de tumores malignos, o que levou a sugerir que a STC poderia ser usada como marcador tumoral. Neste trabalho, desenvolveu-se um protótipo de uma língua eletrónica (LE) baseada num conjunto de 4 sensores preparados a partir de filmes finos que incluíam anticorpos de STC1 para a deteção de cancro de próstata. Na preparação dos filmes finos foram usados polieletrólitos de poli hidrocloreto de alilamina, de poli estireno sulfonato de sódio e poli etilenoimina e as biomoléculas de quitosana, proteína A, e anticorpo de STC1. Estes foram depositados sobre lamelas de quartzo e sobre suportes sólidos usando as técnicas de camada sobre camada e automontagem. A deposição dos filmes foi caracterizada por espectroscopia de ultra-violeta visível e a deteção da presença de STC1 em soluções aquosas de PBS foi caracterizada por espectroscopia de impedância. Os dados de impedância foram posteriormente analisados estatisticamente através da técnica de Análise em Componentes Principais. As LEs formadas pelos 4 sensores e pelos 3 melhores sensores, mostraram ser capaz de detetar concentrações de antigene na gama de concentração de 5×10^{-11} à 5×10^{-4} (v/v) e apresentaram uma dependência linear com o logaritmo da concentração de antigene, exibindo uma sensibilidade de 1617 ± 247 e de 1463 ± 190 por década de concentração, respetivamente. Finalmente, os resultados obtidos permitem concluir que este protótipo pode avançar para a fase de calibração com amostras reais.

Palavras chave: Cancro, Stanniocalcina, Nanosensores, Língua Eletrónica, Espectroscopia, filmes finos, Análise em Componentes principais.

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most prevalent tumors in men, accounting for about 7.3% of cancer deaths. Although there are several strategies for diagnosing prostate cancer, these are only valid when the cancer is already at a very advanced stage, so early diagnosis is extremely important. Stanniocalcin (STC) is a secreted glycoprotein, which was initially discovered in the Stannius corpuscles of teleost fish and which in human studies indicated that increased STC expression is associated with the development and/or progression of different types of malignant tumors, which led to the suggestion that STC could be used as a tumor marker. In this work, a prototype of an electronic tongue (LE) was developed based on a set of 4 sensors prepared from thin films that included STC1 antibodies for the detection of prostate cancer. In the preparation of thin films, polyelectrolytes of poly allylamine hydrochloride, poly styrene sulfonate of sodium and poly ethyleneimine and the biomolecules chitosan, protein A, and STC1 antibody were used. These films were deposited on quartz lamellae and on solid supports using layer-on-layer and self-assembly techniques. The deposition of the films was characterized by ultraviolet visible spectroscopy and the detection of the presence of STC1 in aqueous solutions of PBS was characterized by impedance spectroscopy. The impedance data were later statistically analyzed using the Principal Component Analysis technique. The LEs formed by the 4 sensors and the 3 best sensors showed to be able to detect antigen concentrations in the concentration range of 5×10^{-11} to 5×10^{-4} (v/v) and showed a linear dependence with the logarithm of the antigen concentration, exhibiting a sensitivity of 1617 ± 247 and 1463 ± 190 per decade of concentration, respectively. Finally, the results obtained allow us to conclude that this prototype can advance to the calibration phase with real samples.

Keywords: Cancer, Stanniocalcin, Nanosensors, Electronic Tongue, Spectroscopy, Thin Films, Principal Component Analysis.

ÍNDICE

RESUMO.....	VIII
ÍNDICE.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
SIGLAS.....	XVI
SIMBOLOGIA.....	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Contextualização e motivação	1
1.2 Objetivos da Dissertação.....	4
1.3 Estrutura da Dissertação.....	4
2 CONCEITOS TEÓRICOS.....	5
2.1 Stanniocalcina-1	5
2.2 Os Anticorpos.....	9
2.3 Biossensores.....	10
2.4 Língua Eletrónica (LE).....	11
2.5 Espectroscopia de Impedância	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE BIOSSENSORES DE CANCRO.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Materiais	17
4.1.1 Polieletrólitos.....	17
4.1.2 Quitosana	18
4.1.3 Proteína A (imobilização)	20
4.1.4 Anticorpo e antígeno.....	22
4.1.5 Dispositivos Sensores com Eléttodos interdigitados (IDEs).....	23

4.2	Métodos.....	26
4.2.1	Filmes finos.....	26
4.2.2	Deposição camada sobre camada (LbL).....	26
4.2.3	Deposição por automontagem	28
4.2.4	Produção dos sensores.....	28
4.2.5	Caracterização da superfície dos sensores.....	29
4.2.6	Método matemático de quantificação dos sensores	32
5	ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	35
5.1	Caracterização de filmes LBL	35
5.1.1	Crescimento dos filmes LBL	35
5.1.2	Estudo da dessorção dos filmes finos.....	40
5.2	Caraterização elétrica dos filmes em soluções aquosas de PBS	42
5.3	Produção dos sensores.....	46
5.3.1	Estudo da influência de tempo exposição e saturação dos sensores (quando em imerso em solução de antigene).	48
5.3.2	Testagem dos sensores em diferentes concentrações de antigene.....	49
5.3.3	Análise em Componentes Principais (PCA)	55
5.3.4	Reprodutibilidade	57
6	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	59
6.1	Conclusões.....	59
6.2	Limitações e perspetivas futuras	60
7	BIBLIOGRAFIA.....	63
8	ANEXOS.....	69
8.1	Sensor 2	69
8.2	Sensor 3	70
8.3	Sensor 4	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Exemplos de alguns biomarcadores não-PSA que podem ser usados no diagnóstico do cancro da próstata.....	3
Figura 2.1 - Rede de regulação da STC1..	6
Figura 2.2 - Representação gráfica do fenómeno da criação do microambiente hipóxico.....	8
Figura 2.3 - Estrutura de um anticorpo.....	9
Figura 2.4 - Representação gráfica dos anticorpos policlonais	10
Figura 2.5 - Representação gráfica dos anticorpos monoclonais.....	10
Figura 2.6 - Esquemático de uma matriz de sensores (língua eletrónica).....	12
Figura 4.1 - Estruturas moleculares dos polieletrólitos usados	18
Figura 4.2 - Estrutura molecular da quitosana	19
Figura 4.3 - Protonação da quitosana em ácido acético e formação do polícatião	20
Figura 4.4 - Alteração do grupo amina da proteína A para um grupo tiol através da adição do 2 - iminothiolane.	22
Figura 4.5 - Dispositivos sensores com Eléktodos interdigitados	23
Figura 4.6 - Circuito RC em paralelo	24
Figura 4.7 - Vista de cima e vista de corte lateral do sensor e a disposição das linhas de campo.....	24
Figura 4.8 - Esquema representativo da técnica de deposição LbL.....	26
Figura 4.9 - Esquema representativo da técnica LbL na produção de uma monocamada PAH/PSS	27
Figura 4.10 - Esquema representativo dos sensores produzidos	29
Figura 4.11 - Esquemático representativo do funcionamento do espectrofotómetro.....	31
Figura 4.12 - Esquema representativo do aparelho de medição de impedância	32
Figura 5.1 - Crescimento das absorvâncias das várias bicamadas dos diferentes filmes finos..	37
Figura 5.2 - Estudo da linearidade de crescimento das várias bicamadas dos filmes finos nos picos de absorvância a 195 nm e 227 nm.....	39
Figura 5.3 - Gráficos normalizados dos espectros de absorvância dos filmes finos quando expostos durante 1h a diferentes concentrações de PBS e o estudo da dessorção dos diferentes filmes finos em função da concentração de PBS.....	41

Figura 5.4 - Medição da impedância do eletrodo sem filmes finos em diferentes concentrações de PBS.....	43
Figura 5.5 - Medição da impedância do eletrodo sem filmes, após formação dos filmes finos	44
Figura 5.6 - Medição da impedância do eletrodo sem filmes, após formação dos filmes finos e ainda a exposição à 1h em diferentes concentrações de PBS.	45
Figura 5.7 - Medição da impedância das soluções das biomoléculas a serem usadas e a respectiva comparação com o PBS 0,1M.....	46
Figura 5.8 - Estudo da adsorção das biomoléculas sobre a superfície do sensor 1.	48
Figura 5.9 - Estudo do tempo de saturação dos 4 sensores quando exposto à uma concentração de antígeno de 5×10^{-4} (v/v).	49
Figura 5.10 - Espectro de impedância dos 4 sensores quando imersos em diferentes concentrações de antígeno.....	51
Figura 5.11 - Análise da resposta dos sensores à uma frequência fixa de 1Hz quando imersos nas diferentes concentrações de antígeno	52
Figura 5.12 - Espectro da tangente de perdas dos vários sensores quando imersos em diferentes concentrações de antígeno.	54
Figura 5.13 - Respostas dos diferentes sensores às diferentes concentrações de antígeno considerando apenas valores de tangente de perdas para uma frequência fixa de 1Hz.....	54
Figura 5.14 - PCA dos 4 sensores diferentes quando imersos a diferentes concentrações de antígeno.....	55
Figura 5.15 - PCA das línguas eletrônicas formadas pelos sensores quando imersos em diferentes concentrações de antígeno.....	56
Figura 5.16 - Representação da relação entre a concentração de antígeno e as componentes principais PC1 e PC2 da LE formado pelos 3 melhores sensores.....	56
Figura 5.17 - Estudo da reprodutibilidade da Língua eletrônica formada pelos 4 sensores. Medida 1 correspondente a medidas feitas em julho e medida 2 correspondente a medidas feitas durante o mês de setembro.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Expressão da STC1 e efeito nos diferentes tipos de tumores. Seta para cima significa aumento da expressão e seta para baixo significa diminuição da expressão de STC1.	6
Tabela 3.1 - Comparação entre os diferentes estudos de sensores para a deteção do cancro da próstata e cancro de ovário usando anticorpos e ainda estudo de uma forma de imobilização de anticorpos na superfície de sensores.	15
Tabela 4.1 - Compostos químicos usados na preparação da solução tampão, respetivas fórmulas moleculares, concentrações, massas molares e quantidades a serem usadas.	21
Tabela 4.2 - Biomoléculas adsorvidas sobre os sensores e os respetivos tempos de adsorção. O * refere-se a proteína A tiolada para o caso do sensor 4.....	28
Tabela 4.3 - Parâmetros definidos a partir do software <i>SMaRT Impedance</i> e respetivos valores.	31
Tabela 5.1 - Valores do grau de ionização do PAH, PEI e quitosana em função do pH.	38
Tabela 5.2 - Resumo comparativo das características de cada um dos sensores, da língua eletrónica formada pelos 4 sensores e da língua eletrónica formada pelos 3 melhores sensores através da análise de parâmetros como a sensibilidade e resolução fornecida a partir do PCA.	57

SIGLAS

AFM	Microscópio de força atómica
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
EIS	Espectroscopia de impedância
FAB	Fração de ligação ao antigene
FC	Fração cristalizável
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
HIFs	Fatores indúciáveis por hipóxia
HPB	Hiperplasia benigna da próstata
IDEs	Dispositivos sensores com Eléktodos interdigitados
LbL	Camada por camada
LE	Língua eletrónica
PAH	Poli (hidroclorato de alilamina)
PAH/PSS	Filmes automontados de PAH e PSS
PBS	tampão fosfato salino
PCA	Análise em componentes principais
PCB	Placa de circuito impresso
PEI	Poli (etilenoimina)
PEI/PSS	Filmes automontados PEI e PSS
PSA	Antigene específico do cancro da próstata
PSS	Poli (estireno sulfonato de sódio)
QT	Quitosana
QT/PSS	Filmes automontados de QT/PSS
SAM	Monocamadas automontadas
STC	Stanniocalcina
STC1	Stanniocalcina-1
STC2	Stanniocalcina-2
TNBC	Cancro da mama triplo negativo
UCP2	Proteína de desacoplamento 2
UNL	Universidade Nova de Lisboa
UV	Ultra-violeta

SIMBOLOGIA

A	Absorvância
α	Absorbtividade molar
C	Capacitância
D	Distância máxima do campo elétrico
I	Intensidade medida em relação a intensidade de referência
I_0	Intensidade de referência
i_C	Corrente capacitiva
i_R	Corrente resistiva
i_t	Corrente total
l	Espessura do filme
M_w	Peso molecular médio
R	Resistência
S	Largura dos elétrodos
$tg \theta$	Tangente de perdas
v	Volume
v	Tensão elétrica
W	Distância entre elétrodos
w	Peso
ω	Frequência angular
Z'	Impedância real
Z''	Impedância imaginária
Z_C	Impedância capacitiva
Z_R	Impedância resistiva
Z_t	Impedância total

INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização e motivação

O cancro da próstata é um dos tumores que mais afeta os homens, sendo responsável por cerca de 7,3% das mortes por cancro, apresentando-se, portanto, como um dos 5 principais tumores com maior taxa de mortalidade [1], [2]. A origem deste cancro é controversa e estudos sugerem que se desenvolva a partir de células epiteliais basais e luminais [3], [4].

As alterações ou perda de comunicação entre as células epiteliais e o estroma por expressão aberrante de moléculas sinalizadoras de recetores de superfície podem estimular a transformação maligna das células prostáticas. Estudos avaliando os padrões celulares e a sua comunicação mostraram que as células do estroma ajudam a direccionar a diferenciação e o desenvolvimento das células epiteliais e a segregar uma série de fatores de crescimento que podem influenciar positiva ou negativamente o crescimento e a diferenciação da próstata [3], [4].

São vários os fatores responsáveis pelo aparecimento do cancro de próstata, entre eles, o consumo excessivo de carne vermelha, exposição a poluentes ambientais e metais pesados, sendo, contudo mais relevantes os fatores genéticos e hereditários [5]. É um tipo de tumor que quando detetado precocemente apresenta um prognóstico bom e normalmente tratável. Porém, quando detetado tardiamente o prognóstico torna-se ruim, pois embora com ausência de sintomas significativos, pode apresentar metástase ósseas ou noutros órgãos o que aumenta drasticamente a taxa de mortalidade [1].

São várias as estratégias de tratamento do cancro da próstata, dependendo da extensão/gravidade do cancro, das características do paciente, da idade, preferência pessoal, entre

outros. Algumas destas estratégias incluem: quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia hormonal, vigilância ativa, ou ainda uma combinação das mesmas [6].

No entanto, quando o cancro já se encontra numa fase mais avançada algumas destas estratégias tendem a falhar, tornando assim o diagnóstico prematuro um fator de extrema importância, para garantir uma alta taxa de sobrevivência, aumentando em 5 anos para quase 100% dos pacientes quando detetado precocemente e diminuindo para 31% nos casos de não deteção precoce [7], [8].

As técnicas comumente usadas para o diagnóstico do cancro da próstata são: o exame retal, biópsia do tecido e/ ou análise do antígeno específico da próstata (PSA) [9]. O exame retal tem como principal objetivo a análise de mudanças na textura, tamanho ou forma da próstata que possam indicar presença de cancro. Embora seja muito usada, apresenta uma sensibilidade (18 - 22%) e especificidade baixa, fazendo com que a sua contribuição para a redução da taxa de mortalidade seja muito baixa [10]. Já o PSA é um biomarcador de cancro de próstata, pois é apenas segregado pela próstata, e a sua expressão tende a aumentar na presença de cancro [9]. Uma concentração de PSA no sangue acima de 4 ng/mL corresponde a um diagnóstico positivo. Porém, outras condições como o envelhecimento, hiperplasia benigna da próstata (HPB), prostatite, podem levar a um aumento da expressão de PSA e consequentemente a falsos positivos [11]. Para além disso, vários pacientes com diagnóstico positivo para o cancro da próstata apresentam valores de PSA inferiores ao valor de referência, e o mesmo não distingue se o cancro se encontra numa fase proliferativa, de crescimento lento, ou invasivo, resultando assim em tratamentos extensivos, excessivos, desnecessários que afetam a qualidade de vida dos pacientes a nível psicológico e físico [12].

Com o objetivo de ultrapassar as limitações acima referidas, têm sido estudados novos biomarcadores de cancro de próstata. Quando os tumores crescem, libertam várias células, proteínas, metabolitos que estão diretamente relacionadas com os estágios da doença e que podem ser usados como biomarcadores para diagnóstico [13], [14]. Vários biomarcadores não-PSA têm sido atualmente usados, mas apenas alguns revelam bons resultados. Na figura 1.1 estão representados alguns biomarcadores que podem ser usados para o diagnóstico do cancro da próstata [1].

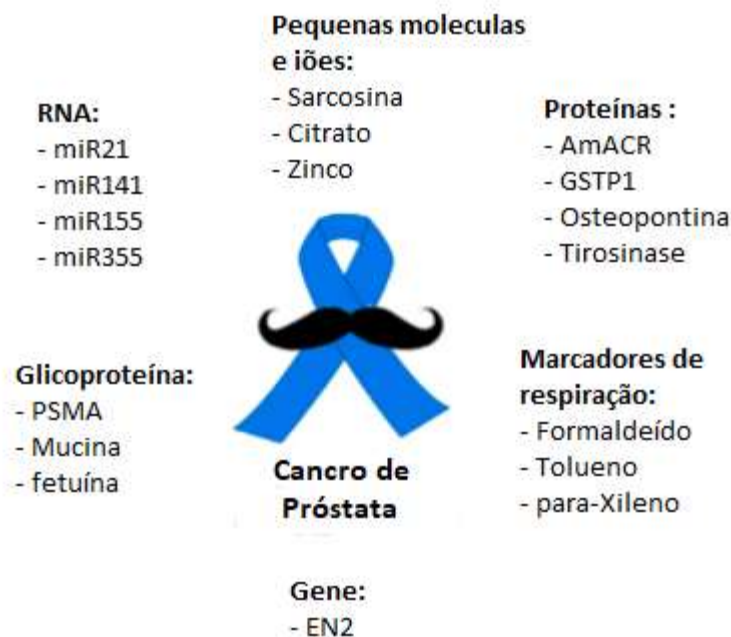


Figura 1.1 - Exemplos de alguns biomarcadores não-PSA que podem ser usados no diagnóstico do cancro da próstata. Adaptado [1].

A stanniocalcina-1 (STC1) é uma glicoproteína segregada, que foi descoberta inicialmente nos corpúsculos de *Stannius* de peixes teleósteos. Estudos em humanos indicaram que o aumento da expressão de STC1 está associado ao desenvolvimento e/ou progressão de diferentes tipos de tumores malignos, uma observação que levou a sugerir que poderia ser usada como marcador tumoral para o cancro da próstata [15]–[17].

Recentemente, o conceito de língua eletrónica (LE) [18] tem vindo a ser utilizado com sucesso na deteção de moléculas em matrizes complexas, nomeadamente, moléculas como o triclosan [19] e estrogénios [20]. A LE consiste num conjunto de sensores cujos sinais elétricos ou óticos após tratamento matemático permitem distinguir a matriz a ser analisada. Neste trabalho, pretende-se usar o conceito de língua eletrónica bem como desenvolver nanosensores baseados em anticorpos de STC1 que possam vir a permitir futuramente a deteção de cancro da próstata.

1.2 Objetivos da Dissertação

O objetivo principal do trabalho consiste no desenvolvimento de um protótipo de uma língua eletrónica baseada em anticorpos stanniocalcina - 1 (STC1) para a deteção do cancro da próstata. Para atingir este objetivo principal é necessário fabricar sensores capazes de detetar antígeno STC1 depositando filmes finos sobre suportes sólidos com elétrodos interdigitados e por fim estudar as propriedades elétricas dos sensores.

1.3 Estrutura da Dissertação

Para além deste capítulo, esta dissertação é dividida em mais 4 capítulos. No capítulo 2 são apresentados os conceitos teóricos necessários para a compreensão da dissertação.

No capítulo 3 é apresentado um resumo do estado da arte e dos sensores que já foram desenvolvidos para a deteção do cancro da próstata.

No capítulo 4 são apresentados os materiais e métodos usados para a produção dos sensores e por fim, no capítulo 5 são analisados e discutidos os resultados obtidos no trabalho.

CONCEITOS TEÓRICOS

Neste capítulo são apresentados os conceitos necessários para a compreensão do trabalho bem como para fabricação do dispositivo.

2.1 Stanniocalcina-1

A (STC1) de humanos é uma glicoproteína homóloga da hormona stanniocalcina (STC) que foi descoberta pela primeira vez em corpúsculos *Stannius* de peixes ósseos [15]. A STC atua como uma hormona endócrina regulando a homeostase de fosfato e do cálcio sérico nos peixes ósseos. O gene *STC1* foi descoberto pela primeira vez nos mamíferos em 1995, encontrando-se localizado no braço curto do cromossoma 8. Posteriormente, foi descoberta uma outra proteína homóloga e foram nomeadas por (STC1) e (STC2). A STC1 em humanos é expressa em vários tecidos e órgãos responsivos a hormonas, mas, normalmente é indetetável no soro, pelo que se acredita que deverá atuar como hormona parácrina/autócrina em vez de endócrina, estando envolvida em múltiplos processos fisiológicos e patológicos [15]–[17].

A STC1 em humanos atua na gravidez, lactação, isquemia cerebral, fibrose pulmonar, desenvolvimento ósseo, estresse oxidativo, regulação de cálcio, entre outras diversas funções. Vários estudos indicam que o aumento/ diminuição da expressão de *STC1* poderá estar envolvido em diversos tipos de tumores (ver tabela 2.1) [15], [16].

A expressão da STC1 é regulada por uma rede complexa de fatores que podem promover ou inibir a proliferação do tecido tumoral (figura 2.1). A localização do tumor e o nível de expressão do gene podem estar na origem das diferenças do efeito da STC1 nos diferentes tipos de cancro [16], [21].

Tabela 2.1 - Expressão da STC1 e efeito nos diferentes tipos de tumores. Seta para cima significa aumento da expressão e seta para baixo significa diminuição da expressão de STC1. Adaptado de [16].

Tipo de cancro	Nível de expressão STC1	Efeito da STC1 no cancro
Cancro cervical	↑	inibição da proliferação celular, migração e invasão
Cancro do cólon	↑	estimula a migração e invasão
Cancro do ovário	↑	aumenta a proliferação celular e migração
Cancro do ovário	↓	inibição da proliferação celular, promove a apoptose
Cancro gástrico	↑	associado a metástase linfática e estágio clínico avançado
Leucemia	↑	promove a quimiorresistência
Cancro da mama (TNBC)	↑	promove a metástase
Cancro da mama (ER+)	↑	promove a proliferação

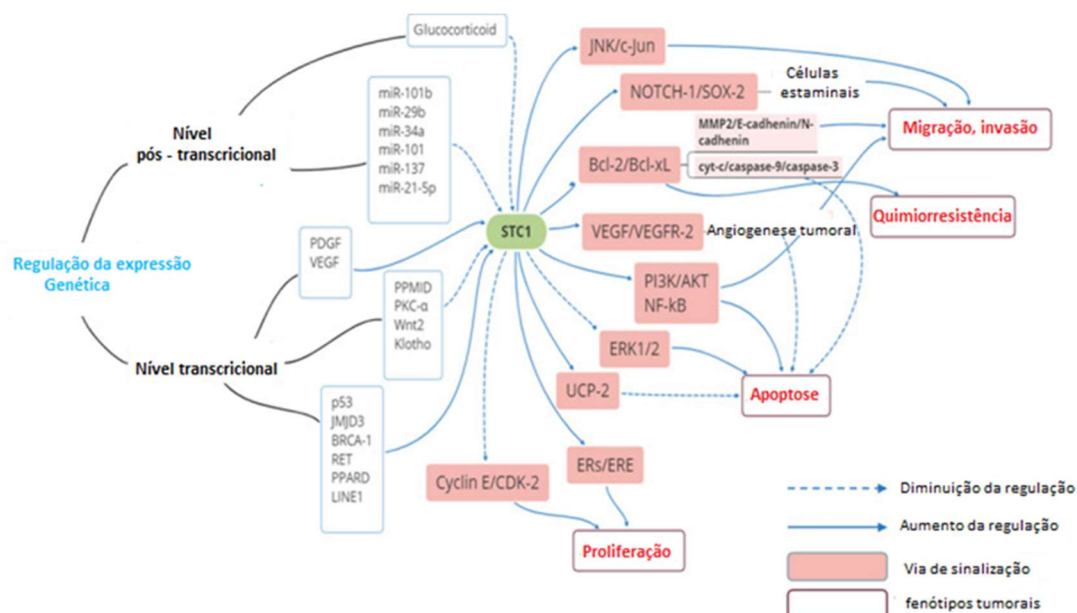


Figura 2.1 - Rede de regulação da STC1. A STC1 é regulada por uma rede muito complexa de proteínas causando diferentes efeitos na sinalização de acordo com a sua inibição ou estimulação e consequentemente tendo efeito direto sobre os fenótipos do tumor. Adaptado de [16].

Com o intuito de estudar a expressão de *STC1*, foram coletadas amostras de tecidos cancerígeno e tecido com hiperplasia benigna da próstata (HPB) de 33 indivíduos com idades compreendidas entre 45 e 90 anos [21]. As 33 amostras foram analisadas por imunocitoquímica segundo a seguinte distribuição: 11 eram de tecido prostático benigno, 11 eram de tecido prostático cancerígeno com uma pontuação 6 na escala de Gleason e os restantes 11 com uma pontuação 8 na respetiva escala. Foram analisadas as linhas celulares PC-3 e LNCap de tecido cancerígeno e as linhas PNT1-A de tecido prostático normal. A análise dos dados de imunocitoquímica permitiu verificar que a expressão da *STC1* é maior para tecido prostático cancerígeno quando comparada com o tecido prostático normal, o que levou a concluir que um aumento na expressão de *STC1* está intrinsecamente ligada com a malignidade do tumor [21].

Outro estudo revelou que a *STC1* está envolvida no crescimento e na resistência a quimioterapia do cancro da mama e que o mesmo desempenha um papel oncológico associado a invasão e metástase do cancro da mama triplo negativo (TNBC) aumentando a invasão celular nas linhas celulares de TNBC MDA-MB-231 humana *in vitro* e promovendo a metástase pulmonar humana *in vivo*. Também provaram que o bloqueio da expressão de *STC1* reduziu a invasão e metástase celular (formação de uma nova lesão tumoral) em linhagens murinas e MDA-MB-231 [17].

A *STC1* foi identificada como um estimulador da respiração mitocondrial, pois estimula a atividade mitocondrial e o transporte de cálcio dependente da concentração de *STC1* presente, inibindo, portanto, a apoptose das células tumorais. A sua expressão é aumentada sob condições hipóxicas do tumor. A hipóxia aumenta a expressão dos fatores induzíveis por hipóxia (HIFs) que levam a uma super-expressão da *STC1*, passando a respiração das células cancerígenas a ser feita em modo glicose-hipóxia que é um modo muito mais anaeróbico de respiração. Durante este processo a *STC1* irá aumentar a expressão da proteína de desacoplamento 2 (UCP2) diminuindo o potencial da membrana. Como resultado a produção de lactato é aumentada durante a respiração anaeróbica, permitindo que as células tumorais possam ter um microambiente favorável e desempenhando um papel importante na iniciação, progressão, metástase e quimiorresistência dos tumores (figura 2.2). A *STC1* ainda irá diminuir a geração de ROS, que são espécies, reativas que causam dano oxidativo nas biomoléculas, facilitando mais uma vez, a sobrevivência e proliferação das células cancerígenas [16].

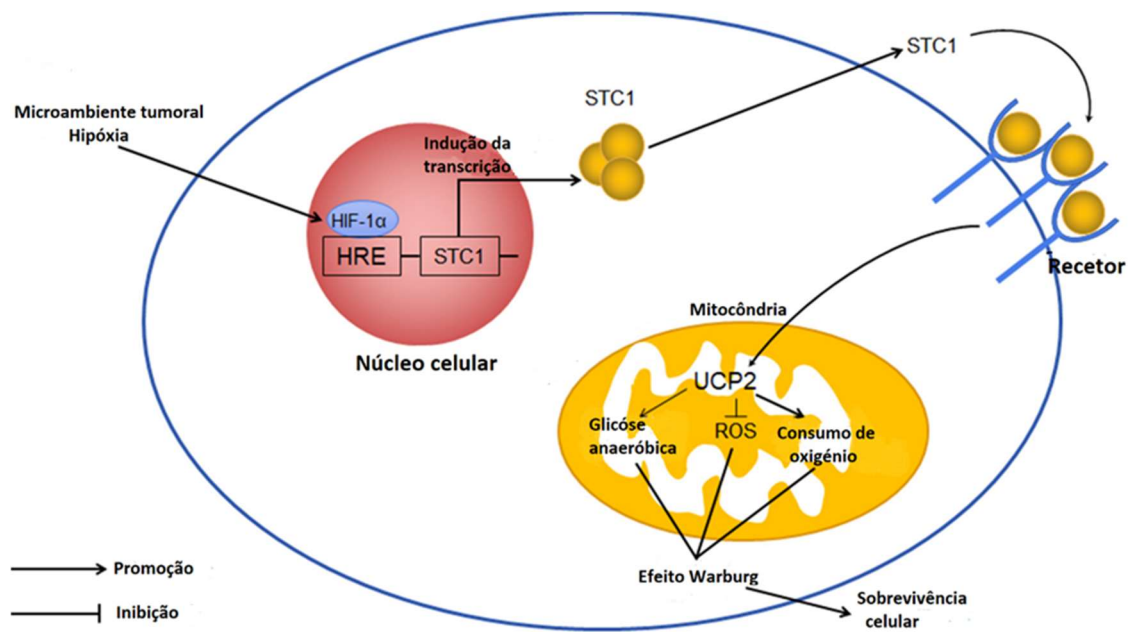


Figura 2.2 - Representação gráfica do fenómeno da criação do microambiente hipóxico. Condições hipoxias do tumor levam a um aumento da expressão dos HIFs e consequentemente aumento da expressão do STC1, este último aumenta a expressão do UCP2 levando a criação de um microambiente favorável as células tumorais, desempenhando, portanto, um papel importante na iniciação, progressão, metástase e quimiorresistência das células tumorais. Adaptado de [16].

As evidências acima descritas levam a concluir que a STC1 poderá ser utilizada como um biomarcador para diagnóstico de vários cancros inclusive do cancro da próstata e que também poderá ser um ótimo sinalizador para se verificar a evolução dos distúrbios tumorais. Estes resultados sugerem também formas de intervenção terapêutica, como o uso de anticorpos monoclonais ou terapia génica para neutralizar a sua expressão, restaurando assim os níveis de cAMP intracelular e inibindo, portanto, a proliferação das células tumorais. Atualmente os principais papéis fisiológicos e patológicos da STC1 são ainda desconhecidos, mas a compreensão dos mecanismos pelo qual a STC1 sinaliza e estabelece uma resposta celular é fundamental para entender a sua associação aos múltiplos distúrbios tumorais. Ainda não se sabe ao certo se a STC1 é a própria causa do tumor, ou se, por exemplo, apenas promove a proliferação das células neoplásicas [15]–[17], [21].

2.2 Os Anticorpos

O uso de anticorpos imobilizados na superfície de nanossensores é uma ferramenta essencial para diagnóstico e tratamento de muitas doenças. Os anticorpos são biomoléculas que possuem afinidade de ligação a antígenos específicos. Tal como é representado na figura 2.3 cada anticorpo é constituído por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves e duas cadeias pesadas e possuem a forma de um "Y". Os anticorpos são constituídos por duas regiões, uma região do fragmento cristalizável (FC) que constitui a cauda do anticorpo e que irá interagir com os recetores na superfície do biossensor e a região do fragmento de ligação ao antígeno (FAB) que como o nome indica irá ligar-se ao antígeno e lhe dá a especificidade [22], [23].

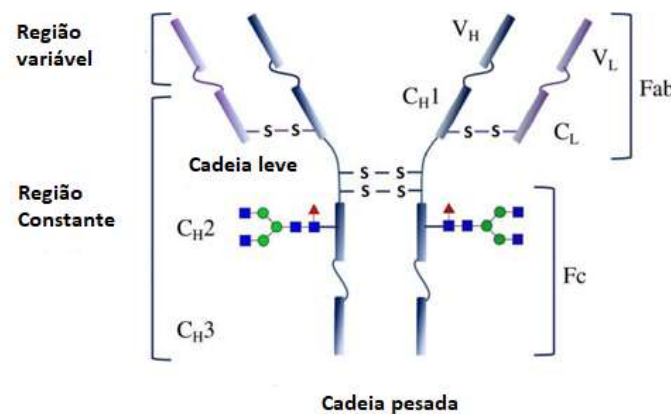


Figura 2.3 - Estrutura de um anticorpo. Identificação das cadeias pesadas e leves. Região do fragmento cristalizável que constitui a cauda do anticorpo e que irá se ligar ao recetor na superfície do biossensor e a região do fragmento de ligação ao antígeno. Adaptado de [22].

Quanto à forma como os anticorpos são produzidos pode ser classificado em 3 tipos: policlonais, monoclonais e recombinantes. Os anticorpos policlonais apresentam uma resposta multi-epítipo (figura 2.4) ao antígeno, tornando-os ideais para múltiplas aplicações. Porém a sua oferta é finita e existe dificuldade em gerar novos lotes com as mesmas respostas do anterior, o que muitas vezes leva a variações de desempenho dos anticorpos. Os anticorpos são resistentes a variações de temperatura e de pH, possuindo assim uma maior estabilidade e evitando falsos negativos [24].

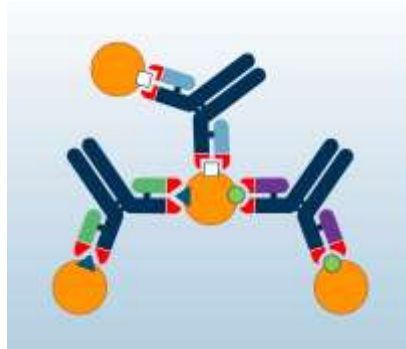


Figura 2.4 - Representação gráfica dos anticorpos policlonais. Ligação a vários epítopos dos antígenos [24].

Os anticorpos monoclonais são anticorpos que se ligam a apenas um epítipo do antígeno (figura 2.5), produzindo uma resposta mais precisa, porém, o tempo e os custos de geração são maiores. Por fim os anticorpos recombinantes são caros de produzir, pois são produzidas a partir de sequências conhecidas de ácido nucleico e não se encontram disponíveis comercialmente para uma ampla gama de proteínas [24].

Neste trabalho foram usados anticorpos policlonais de corpúsculos de *Stannius* do robalo (*Dicentrarchus labrax*).



Figura 2.5 - Representação gráfica dos anticorpos monoclonais. Ligação a apenas um epítipo do antígeno [24].

2.3 Biossensores

Os exames laboratoriais e protocolos hospitalares são formas tradicionais usadas para analisar e determinar biomarcadores, fornecendo diagnóstico correto de muitas condições e anomalias no corpo humano, no entanto, são necessários equipamentos caros e pessoal altamente especializado. Com vista a solucionar estes problemas surgiram os biossensores que permitem uma análise fácil, rápida e de baixo custo [25].

Os biossensores são dispositivos capazes de analisar componentes bioquímicos específicos (analitos), transformando-os num sinal mensurável. Fazem parte da sua composição vários componentes. Um dos componentes é o recetor, por exemplo, anticorpos, enzimas, aptâmeros, etc., que é a molécula de reconhecimento responsável pela seletividade do biossensor. Um segundo componente que é o transdutor, que é responsável pela conversão das interações entre o analito e o recetor num sinal elétrico. Os transdutores são denominados de elétrodos, sensores ou detetores e os modos de transdução podem ser físicos (piezoelétrico, calorimétrico, magnético) ou químico (ótico, eletroquímico) [26].

2.4 Língua Eletrónica (LE)

A língua eletrónica consiste numa matriz de sensores químicos cujo objetivo é mimetizar o funcionamento da língua humana. Cada um dos sensores possui uma determinada especificidade e seletividade para uma gama de moléculas específicas gerando um conjunto de informações complexas que posteriormente são analisadas através de um sistema de reconhecimento de padrões como por exemplo a análise de componentes principais (PCA), análise em componentes independentes e/ou redes neuronais. O objetivo de uma língua eletrónica é a de analisar as características elétricas ou óticas de vários sensores quando imersos em soluções aquosas com diferentes concentrações de analito. A análise destas características permite estudar a sensibilidade e a especificidade dos mesmos. As respostas destes sensores podem caracterizar qualitativamente e quantitativamente as amostras de meio aquoso analisadas [27].

2.5 Espectroscopia de Impedância

Podem ser aplicadas múltiplas técnicas de transdução aos sensores constituintes da língua eletrónica, porém, foi demonstrado que para sensores de filmes finos, a espectroscopia de impedância é vantajosa em relação a métodos potenciométricos e voltamétricos [28].

Esta técnica de espectroscopia de impedância tem por objetivo medir a impedância elétrica de um sistema, através da medição da corrente a gerada pela aplicação de uma diferença de potencial alternada a um filme fino depositado em substratos sólidos com elétrodos interdigitados imersos na solução aquosa de analito em estudo. A evolução da impedância a diferentes frequências permite avaliar quantitativamente as interações entre o recetor e o analito sendo caracterizada por possuir uma alta sensibilidade, especificidade, capacidade de deteção em tempo real e dispensa da utilização de um eléctrodo de referência [29]. O analisador

de impedâncias fornece medidas no domínio do tempo e da frequência. Na figura 2.6 é possível ver o esquema representativo de uma língua eletrônica e das etapas do processo desde a aquisição dos dados ao tratamento dos resultados.

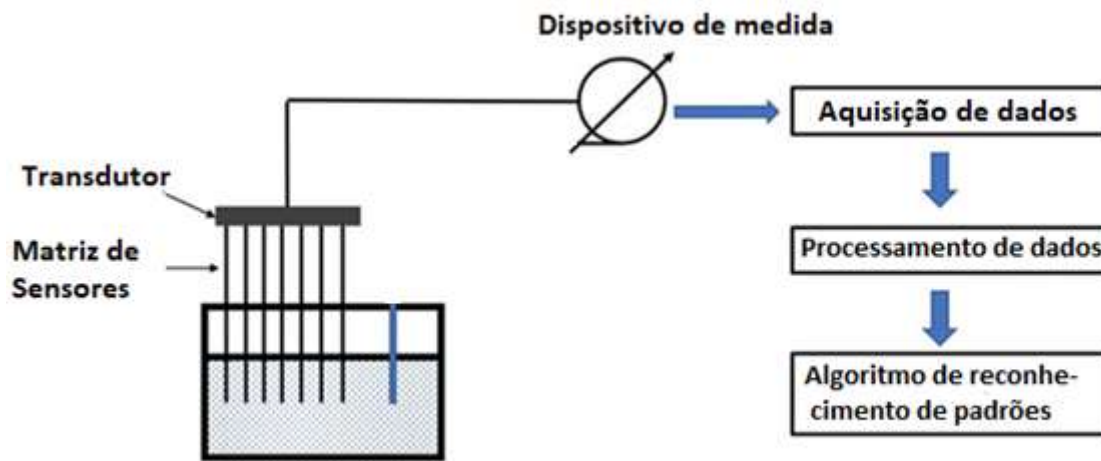


Figura 2.6 - Esquemático de uma matriz de sensores (língua eletrônica). Adaptado de [30].

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE BIOSENSORES DE CANCRO

O primeiro biossensor para a deteção rápida da ligação lectina-glicano foi desenvolvido pelo grupo de [La Belle J. \[31\]](#) em 2007. Este glicoconjugado está associado a vários tipos de cancro, uma vez que, muitos biomarcadores de cancro são fortemente glicosilados e a diferenciação das diferentes fases do processo de tumorização pode ser extremamente útil para se ter informações sobre a doença. Este sensor baseou-se na ligação anticorpo-antigene e a medição foi feita através do uso da espectroscopia de impedância (EIS). Foram usadas nanopartículas de ouro sobre superfície de elétrodos em uma placa de circuito impresso (PCB) e a lectina foi imobilizada sobre estas nanopartículas através de ligações covalentes. Este sensor foi capaz de detetar concentrações baixas de fetuína (10^{-15} M) muito rapidamente (80 segundos).

Em 2013, o grupo de [Hirabayashi et al. \[32\]](#) desenvolveu um sensor baseado num *microarray* de lectinas para diagnóstico de glicoproteínas (por exemplo fetuína, mucina que podem ser biomarcadores de cancro). O método baseava-se na imobilização de uma série de lectinas e anticorpos com ligação a carboidratos sobre uma lâmina de vidro usando a biotina, com a vantagem de consumo mínimo de reagentes. Este sensor apresentou uma baixa sensibilidade e especificidade e a técnica não era quantitativa pois, necessitava do uso de marcadores fluorescentes.

No mesmo ano, o grupo de [Bertok et al. \[33\]](#) relatou o desenvolvimento de um biossensor usando elétrodos planares de ouro policristalino para a deteção de glicoproteína fetuína. Eles relataram que a fixação de nanopartículas de ouro nos elétrodos de superfície resultou no aumento da transferência de eletrões, na biocompatibilidade e facilitou a imobilização da lectina na superfície. O biossensor consistia em 3 monocamadas automontadas (SAM). A primeira monocamada consistia na ligação entre a amina e a superfície do ouro. A segunda camada consistia numa mistura de monocamadas composta por ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA) e 6-mercaptohexanol (MCH) em nanopartículas de ouro e, finalmente a terceira monocamada, composta pelo grupo carboxilo (COOH) previamente ativado e

covalentemente ligado a lectina *Sambucus Nigra* como elemento de biorreconhecimento para a detecção de ácido siálico presente na glicoproteína fetuína. Este sensor apresentou um limite de detecção de $0,5 \times 10^{-18}$ M.

Em 2016 foram estudados os papéis da fetuína na fase inicial do diagnóstico do cancro da próstata usando um eletrodo de carbono vítreo. Neste trabalho um filme de PLL (poli-L-lisina) e nanotubos de carbono carboxilado foram depositados na superfície do eletrodo com o objetivo de fornecer grupos funcionais para a imobilização da lectina de *Cratillia mollis* [25]. Verificou-se que esta lectina tinha uma forte interação com os monossacarídeos de glicoconjugatos fetuínos conforme obtido também pelo biossensor descrito por La Belle J. [31], contudo este permitia uma detecção muito mais rápida e sem nível de ruído que possa levar a interpretações erráticas. O ensaio feito através da voltametria de onda quadrada (SWV) exibiu uma faixa de concentração linear de 0,5 à 25 µg/ mL e um limite de detecção de 0.017 µg/mL [25].

Em 2012 o grupo Sadhasivam S. et al. [34] desenvolveram um sensor de microbalança de cristal quartzo para o tumor ovário imobilizando anticorpos policlonais na superfície do sensor. Os sensores de microbalança de cristal de quartzo são considerados sensores que possuem uma alta rapidez de análise, uma sensibilidade satisfatória, simples instrumentação, são portáteis e de baixo custo e a imobilização da proteína é feita usando adsorção física. Naquele estudo o sistema de detecção foi baseado numa monocamada de tiol autocompensada na superfície de ouro do cristal posteriormente ativada com EDC-NHS antes de imobilizar o anticorpo associados ao tumor do ovário (OVAT-1). O sensor desenvolvido produziu uma faixa linear entre 5 - 10 µg/mL e era necessário cerca de 5 - 6h para uma completa detecção.

A imobilização dos anticorpos na superfície dos sensores é um dos passos mais importantes para se obter uma boa sensibilidade e especificidade. Técnicas como o uso de proteína A / G têm sido muito usadas atualmente [35]. Em 2018, Caroselli et al. [36] estudaram a imobilização orientada de anticorpos na superfície de um sensor fotónico usando a proteína A como camada intermediária. A proteína A tem a capacidade de orientar os anticorpos garantindo assim maior sensibilidade, e maior robustez, ou seja, permite uma maior orientação dos anticorpos, pois possui locais específicos de ligação ao anticorpo. Por outro lado, a sua ligação à superfície do biossensor pôde ser conseguida por adsorção física. A ligação anticorpo - proteína A é reversível podendo ser desfeita usando determinados reagentes.

Na tabela 3.1 encontra-se o resumo comparativo entre os vários sensores acima mencionados.

Tabela 3.1 - Comparação entre os diferentes estudos de sensores para a deteção do cancro da próstata e cancro de ovário usando anticorpos e ainda estudo de uma forma de imobilização de anticorpos na superfície de sensores.

Estudo	Técnica de imobilização	Método de transdução	Vantagens	Desvantagens
Microarray de lectina [30].	Lectina e anticorpos imobilizados usando técnicas como a afinidade a biotina	Uso de marcadores fluorescentes	Rápido, consumo mínimo de reagentes, boa estabilidade	Baixa sensibilidade e especificidade, anticorpos orientados aleatoriamente
Teste rápido para a deteção lectina -glicano [29].	A lectina é imobilizada covalentemente em elétrodos de cobre/níquel/ouro em uma placa PCB	Espectroscopia de impedância (EIS)	Teste rápido (80 segundos) e alta sensibilidade	Uso de nanopartículas para a amplificação do sinal devido a presença do ruído
Deteção da ligação lectina-feituína [31].	Uso de nanopartículas de ouro sobre elétrodos	Amperometria (variações de corrente)	Aumento da transferência de eletrões, biocompatibilidade e facilidade de imobilização da lectina	Uso de nanopartículas de ouro e carece de validação em contexto clínico
Uso de nanotubos de carbono para a deteção da feituína [25].	Ligação covalente	Voltametria de onda quadrada (SWV)	Menos ruído que o sensor de EIS e boa sensibilidade e especificidade	Técnica de imobilização por ligação covalente é complexa e é um biossensor de alto custo
Sensor de microbalança de quartzo [32].	Imobilização por adsorção física	Alteração na frequência de ressonância	Baixo custo, alta rapidez, simples instrumentação, uso de anticorpos policlonais	Orientação dos anticorpos de forma aleatória o que pode diminuir a sensibilidade, depende do momento dipolar do anticorpo e da carga da superfície de suporte e tempo de resposta longo
Sensor fotónico [34].	Uso da proteína A	Variações no comprimento de onda	Orientação dos anticorpos garantindo assim boa sensibilidade, ligação superfície proteína A por adsorção física, ligação proteína A - anticorpo reversível. Imobilização rápida, barata e fácil.	Adsorção extensiva da proteína A pode levar a desnaturação e perda de funcionalidade dos anticorpos

MATERIAIS E MÉTODOS

Ao longo deste capítulo são descritos os materiais e métodos usados na preparação dos sensores bem como os métodos de caracterização e quantificação dos mesmos.

4.1 Materiais

Todos os materiais descritos neste capítulo foram adquiridos à Sigma-Aldrich, exceto os suportes sólidos com elétrodos interdigitados depositados numa das superfícies utilizados na preparação dos sensores que foram adquiridos da Metrohm Dropsens.

4.1.1 Polieletrólitos

Os polieletrólitos são polímeros cujos monómeros possuem grupos que quando colocados em solução aquosa dissociam-se formando grupos iónicos, ou seja, grupos eletricamente carregados. A maioria dos polieletrólitos são moléculas isolantes, têm uma boa estabilidade ambiental (resistência a variações de pH e de temperatura) e biocompatibilidade [37].

As suas propriedades elétricas fazem com que sejam amplamente estudados para aplicações de dispositivos eletrónicos como sensores fornecendo boas características de sensibilidade, limites de deteção, reprodutibilidade, faixa linear e robustez. Dependendo também do tipo de técnica de produção dos filmes finos usado, permita-nos ter um excelente controlo da espessura do(s) polímero(s) depositado permitindo assim a construção nanosensores [37], [38]. Neste trabalho foram usados polieletrólitos de poli hidrocloreto de alilamina (PAH), de poli estireno sulfonato de sódio (PSS) e poli etilenoimina (PEI).

O PAH cuja estrutura química se encontra representada na figura 4.1a) é um polímero que possui um grupo NH_2 que pode ser protonado por HCl e, quando dissolvido em água, transforma-se num policatão, ou seja, um ião positivo. O peso molecular médio (M_w) das moléculas usadas foi de $17\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

O PSS quando dissolvido em água (figura 4.1b) transforma-se num polianião (ião negativo). O peso molecular médio (M_w) das moléculas usadas foi de $70\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Por último o PEI (figura 4.1c), cujo peso molecular médio (M_w) é de $75\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, encontra-se no estado líquido (50% de diluição em água). Dependendo se é um PEI linear ou ramificado pode conter apenas aminas primárias na sua estrutura, ou ainda primárias, secundárias e terciárias. Ao estar dissolvido na água toma a forma de ião positivo.

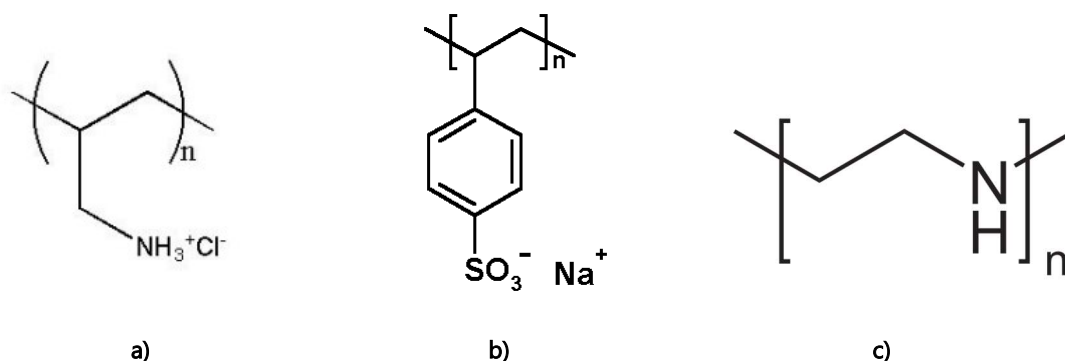


Figura 4.1 - Estruturas moleculares dos polieletrólitos usados, **a)** Estrutura molecular do PAH quando dissolvido em água, **b)** Estrutura molecular do PSS quando dissolvido em água, **c)** Estrutura molecular do PEI. Número cas: PAH- 71550-12-4, PSS - 25704-18-1, PEI - 49553-93-7.

4.1.1.1 Preparação das soluções de polieletrólitos

Com o objetivo de obter soluções aquosas com a concentração de monómero de 10^{-3} M para cada um dos polieletrólitos, dissolveu-se 0,0234 g de PAH, 0,0395 g de PSS e 0,0193 g de PEI em 25 mL de água ultrapura. A água ultrapura foi obtida através do *waterMax* da *Diwer Technologies* (Resistividade de $19,8\text{ M}\Omega\text{cm}$ e um pH de 5,6).

4.1.2 Quitosana

A quitosana é um biopolímero não tóxico, inodoro, biocompatível e biodegradável obtido a partir do polímero natural quitina. A quitina faz parte das carapaças de caranguejos e de camarões e apresenta-se como sendo altamente hidrofílico e com boa capacidade de adsorção a iões metálicos devido a presença de grupos aminas e de grupos hidroxilo. É solúvel em ácido

através da protonação dos grupos NH_2 em NH_3^+ , transformando-se num ião positivo. Por outro lado, apresenta limitações como a baixa estabilidade mecânica, mas quando combinado com outros compostos pode apresentar alta permeabilidade e resistência.

A figura 4.2 é tem a estrutura molecular da quitosana.

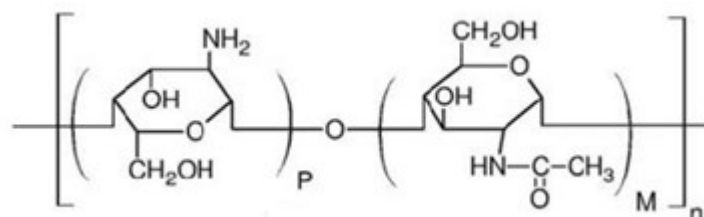


Figura 4.2 - Estrutura molecular da quitosana. Número cas: -9012-76-4.

4.1.2.1 Preparação da solução de quitosana

A quitosana possui peso molecular entre $1,5 \times 10^6$ e $1,8 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Foi preparada uma solução de 1% de quitosana (w/v), através da dissolução deste biopolímero em 0,05M de ácido acético. O ácido acético possui um peso molecular de $60,052 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e uma densidade de $1,05 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$. Com o objetivo de preparar uma solução de 1 g de quitosana em 100 mL água ultra-pura calculou-se a quantidade de ácido acético necessária para dissolver a quitosana em 0,286 mL:

$$100 \text{ mL} \times \frac{0,05 \text{ M}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{60,052 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,05 \text{ g}} = 0,286 \text{ mL}$$

Os cálculos feitos foram baseados no trabalho de [Sivaselvi k. \[39\]](#). Quando dissolvido em ácido acético a quitosana transforma-se num policatão e na figura 4.3 é apresentado a reação química que ocorre:

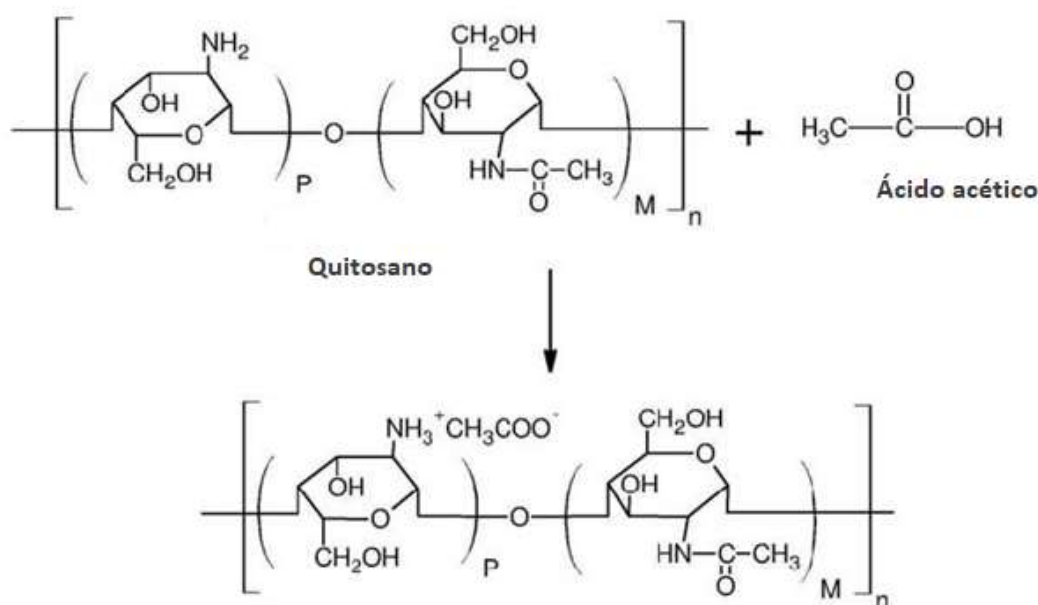


Figura 4.3 - Protonação da quitosana em ácido acético e formação do policatião.

4.1.3 Proteína A (imobilização)

Um dos passos mais importantes na construção de um sensor é a biofuncionalização da superfície para a identificação correta do analito em estudo. A correta imobilização de anticorpos na superfície dos sensores influencia diretamente no desempenho final do sensor.

A proteína A encontra-se na parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta proteína juntamente com a proteína G têm sido usadas na imobilização correta de anticorpos sobre a superfície de sensores de forma a aumentar a sensibilidade e especificidade dos mesmos na identificação dos antígenos e o desempenho final do sensor [22], [23].

A vantagem do uso da proteína A em detrimento do uso da proteína G é que a primeira possui uma maior quantidade de domínios de ligação aos anticorpos do que a segunda. Com base no estudo feito por Carosseli et al. [36] o uso da proteína A é muito importante, pois possui a capacidade de se ligar às frações cristalizáveis dos anticorpos, que são as regiões que se ligam à superfície dos sensores, deixando disponível as frações de ligação ao antígeno (Fab), fornecendo assim uma maior e melhor orientação dos anticorpos e aumentando a sensibilidade e especificidade do sensor.

Algumas das desvantagens do uso de proteínas para o aumento da orientação/ sensibilidade dos sensores é que existe uma menor quantidade de anticorpos adsorvidos por unidade de área e também poderá haver alterações nas conformações dos mesmos.

4.1.3.1 Preparação da solução de proteína A.

A solução de proteína A foi preparada em PBS de acordo com Caroselli et al. [36]. A importância do uso de uma solução tampão é que a mesma fornece um pH estável e próximo do pH ideal de ligação entre proteína A e os anticorpos, cujo valor é cerca de 8, maximizando assim a quantidade de anticorpos que se ligam ao substrato.

Na tabela 4.1 estão apresentados todos os compostos usados na preparação de 250 mL de solução tampão.

Tabela 4.1 - Compostos químicos usados na preparação da solução tampão, respetivas fórmulas moleculares, concentrações, massas molares e quantidades a serem usadas.

Composto químico	Fórmula molecular	Concentração (milimolar)	Massa molar (g/mol)	Quantidade (g)
Cloreto de sódio	NaCl	137	58,44	2
Cloreto de potássio	KCl	2,7	34,55	0,05
Fosfato dissódico	Na ₂ PO ₃ H	10	358,14	0,895
Fosfato monopotássico	KH ₂ PO ₄	1,8	136,09	0,061

A solução mãe de PBS possuía uma concentração de 1 M e foi posteriormente diluída em água ultrapura, de forma a obter uma concentração de PBS 0,1 M. De seguida 0,5 mg de proteína A - *Sepharose* de *Staphylococcus aureus* foi dissolvido em 1 mL de PBS 0,1 M, obtendo uma solução mãe de proteína A de concentração 0,5 mg/mL. A solução mãe de proteína A foi novamente diluída de forma a obter uma concentração de proteína A de 10 µg/mL e para isto foi necessário fazer o cálculo da quantidade do volume de proteína A a ser usado, $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \equiv V_1 \times 0,5 \text{ mg/mL} = 20 \text{ mL} \times 10 \text{ µg/mL} \equiv V_1 = 0,4 \text{ mL}$.

Após a adsorção da proteína A, se estas não cobrirem todos os locais, pode haver adsorção incorreta dos anticorpos nesses locais não cobertos pela proteína. Para evitar que isso aconteça foi necessário bloquear estes mesmos sítios usando a albumina de soro bovino (BSA). Foi então preparada uma solução de BSA 0,02% (w/v) em PBS 0,05 M.

De forma a aumentar a afinidade de ligação da proteína A ao ouro, os grupos amina foram convertidos em grupo tiol usando *2-iminothiolane*. Esta alteração foi feita adicionando 0,0014 g de *2-iminothiolane* a uma nova solução de 10 µg/mL de proteína A [40]. Na figura 4.4 encontra-se a reação química ocorrida:

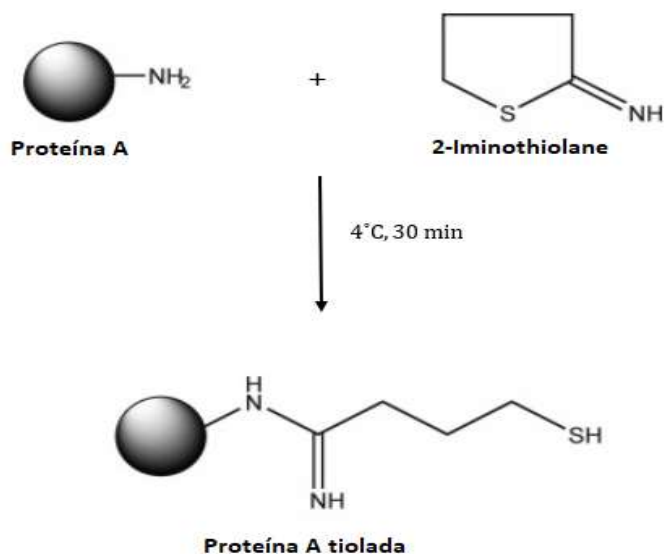


Figura 4.4 - Alteração do grupo amina da proteína A para um grupo tiol através da adição do 2-iminothiolane. Adaptado de [40].

4.1.4 Anticorpo e antígeno

O anticorpo e o antígeno foram fornecidos pelo meu coorientador Professor Adelino Canário (Universidade do Algarve). O anticorpo foi isolado diretamente de corpúsculos de *Stannius* do robalo (*Dicentrarchus labrax*) [41]. O mesmo encontrava-se armazenado num tubo de Falcon, cuja concentração era de 0,2533 mg/mL.

O antígeno por sua vez, é um péptido da região N-terminal da Staniocalcina-1A do peixe-balão (*Tetraodon nigroviridis*) [42]. Este encontrava-se armazenado em 4 *ependorfs*. Cada um dos *ependorfs* possuía um volume de 200 μL soro puro.

4.1.4.1 Preparação das soluções

A solução de anticorpo foi diluída numa solução tampão Tris-HCl (25 mM, pH - 8) com o objetivo de obter uma concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Calculou-se o volume de anticorpo a usar, $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \equiv V_1 \times 0,2533 \text{ mg/mL} = 20 \text{ mL} \times 30 \mu\text{g/mL} \equiv V_1 = 2,368 \text{ mL}$.

Esta solução de 20 mL de anticorpos (concentração 30 $\mu\text{g/mL}$) foi dividida em 10 *ependorfs* com 2 mL cada e armazenado no congelador a -80°C até o momento da sua utilização.

Para a preparação da solução de antígeno, 100 μL de soro foram diluídos em 200 mL de PBS 0,01 M com 0,02% (*w/v*) de azida de sódio e armazenada a 4°C .

4.1.5 Dispositivos Sensores com Eléttodos interdigitados (IDEs)

Os dispositivos sensores consistem de um suporte sólido de cerâmica com eléctrodos interdigitados de ouro depositados sobre uma das superfícies (figura 4.5) e permitem a detecção de propriedades físicas como: impedância, capacitância, resistência apenas variando a frequência aplicada [43].

Os filmes finos de polieletrólitos, quitosana e proteína A foram depositados sobre eléctrodos interdigitados revestidos de ouro adquiridos da Metrohm dropsense (DS). Os eléctrodos foram depositados num substrato cerâmico e possuem a vantagem de detetar pequenos volumes de amostras. O substrato cerâmico onde são depositados os eléctrodos de ouro possui as seguintes dimensões: 22,8 mm de comprimento, 7,6 mm de largura e 1 mm de altura. A configuração dos eléctrodos permite o aumento da sensibilidade do sensor e dos limites de detecção. Os filmes finos por sua vez aumentam a biocompatibilidade e amplificam o sinal [31].



Figura 4.5 - Dispositivos sensores com Eléttodos interdigitados

Segundo a Methrom dropsens (DS) os eléctrodos interdigitados possuem uma distância entre eléctrodos W e largura dos eléctrodos S de $200\text{ }\mu\text{m}$. A partir destes valores é possível estimar a distância máxima de alcance do campo eléctrico (D) criado pelos pólos positivo e negativo, sendo a mesma dada pela fórmula:

$$D = (S + W) \times 2$$

É muito importante ter este valor em consideração aquando da deposição das camadas dos filmes finos sobre os eléctrodos interdigitados de modo a evitar perdas de sensibilidade do sensor produzido.

4.1.5.1 Eléttodos interdigitados e espectroscopia de impedância

Os substratos de cerâmica sobre a qual os eléctrodos interdigitados são depositados possuem características isolantes no que diz respeito a condução eléctrica fazendo com que os sensores tenham um comportamento similar ao do circuito apresentado na figura 4.6.

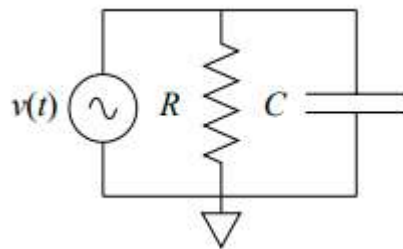


Figura 4.6 - Circuito RC em paralelo.

A tensão $v(t)$ é dada por:

$$v(t) = Ve^{j\omega t} \quad (\text{equação 4.1})$$

Quando se aplica uma tensão cria-se um campo eléctrico entre o eléctrodo positivo e o eléctrodo negativo como representado na figura 4.7 que irá penetrar o material (filme fino) previamente depositado sobre o eléctrodo alterando assim a sua constante dielétrica e consequentemente a impedância do sensor [44].

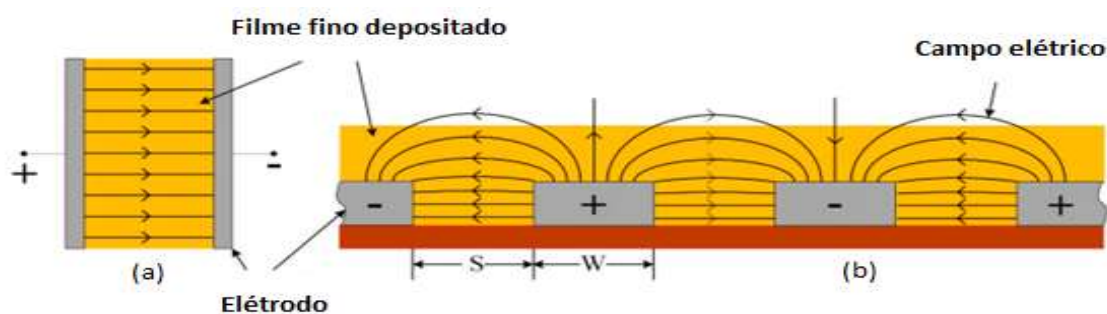


Figura 4.7 - a) Vista de cima do eléctrodo interdigitado. b) Vista de corte lateral do sensor e a disposição das linhas de campo. Adaptado de [44].

Com isto é possível aplicar a espectroscopia de impedância como ferramenta de caracterização dos sensores produzidos.

A impedância total (Z_t) medida entre os eléctrodos interdigitados corresponde ao somatório da impedância da resistência (Z_R) e do condensador (Z_C):

$$Z_t = Z_R + Z_C \quad (\text{equação 4.2})$$

Considerando o circuito RC em paralelo representado na figura 4.6 é possível calcular a corrente total (i_t) do circuito, sendo a mesma dada pela soma das correntes na resistência (i_R) e no condensador (i_C):

$$i_t = i_R + i_C \quad (\text{equação 4.3})$$

Em que i_R e i_C são-nos dadas por:

$$i_R = \frac{v(t)}{R} \quad e \quad i_C = C \frac{\partial v(t)}{\partial t} \quad (\text{equação 4.4})$$

O R corresponde ao valor da resistência e C o valor da capacitância.

Assim a corrente total (i_t) é dada por:

$$i_t = \left(\frac{1}{R} + jC\omega \right) v(t) \quad (\text{equação 4.5})$$

Com isto chega-se a conclusão que a impedância Z_t^* do sensor:

$$Z_t^* = \left(\frac{1}{R} + jC\omega \right)^{-1} \quad (\text{equação 4.6})$$

Resolvendo a equação 4.6 obtém-se uma impedância Z_t que é nos dado por uma componente real e uma componente imaginária:

$$Z_t^* = \frac{R}{1+(\omega CR)^2} - \frac{j\omega R^2 C}{1+(\omega CR)^2} \quad (\text{equação 4.7})$$

O medidor de impedância também nos fornece a medida da tangente de perdas designada por $\text{tg } \theta$, e é dada por:

$$\text{tg } \theta = -\frac{Z'}{Z''} \quad (\text{equação 4.8})$$

Em que Z' corresponde a parte real da impedância e Z'' a parte imaginária.

4.2 Métodos

4.2.1 Filmes finos

Uma das técnicas usadas atualmente para minimizar o tamanho dos materiais é a técnica de filmes finos ou revestimento. Um filme fino pode ser definido como uma fina camada de um material ou materiais em que a sua espessura é da ordem dos nanómetros [45].

4.2.2 Deposição camada sobre camada (LbL)

Esta técnica consiste na imersão de um substrato numa solução e os filmes são produzidos por interações electrostáticas entre os diferentes compostos com cargas opostas dando origem a filmes finos com uma espessura de cerca de 1 – 100 nm dependendo do nº de bicamadas produzidas, do pH, da temperatura, das forças iónicas e das massas moleculares dos compostos usados na produção das camadas adsorvidas [46]. Para além das interações electrostáticas a adsorção dos filmes finos ao substrato é acompanhada por uma afinidade não electrostática muito forte, como por exemplo por pontes de hidrogénio. Esta técnica permite assim a adsorção de espécies de cargas opostas umas sobre as outras (figura 4.8) tornando possível a fabricação de filmes finos em substratos 3D complexos e em substratos planares [47], [48].

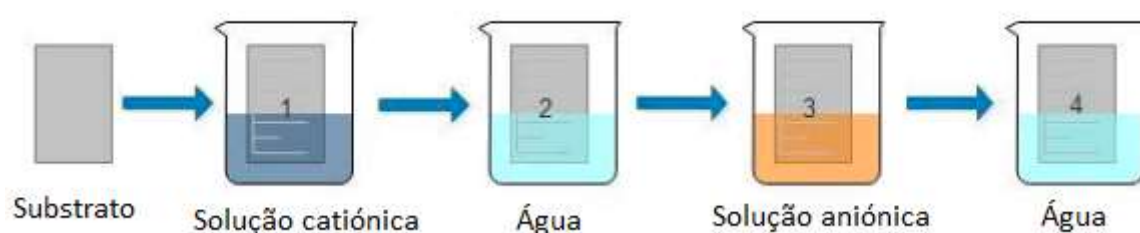


Figura 4.8 - Esquema representativo da técnica deposição camada sobre camada. Retirado de [49]. O substrato inicialmente sem filmes é imerso na solução catiónica, sendo posteriormente lavada e de seguida imersa na solução aniónica e lavada novamente, com isto forma-se a primeira bicamada.

Foram usados substratos de quartzo para se estudar a adsorção dos filmes finos e a formação das várias bicamadas. Estes foram previamente hidrofílicos em 100 mL de uma solução piranha preparada com 75 mL de ácido sulfúrico e 25 mL de peróxido de hidrogénio,

durante 1h e lavadas 5 vezes em água ultrapura para retirar os resíduos da solução piranha que ficaram adsorvidas aos substratos. Este passo da hidrofilização é muito importante pois, serve para retirar todos os resíduos orgânicos dos substratos e torná-los mais rugosos e ricos em grupo OH para uma melhor adsorção das moléculas. As lamelas de quartzo foram armazenadas em água ultrapura até ao momento da produção dos filmes finos, mantendo-as carregadas negativamente e permitindo assim uma melhor adsorção do PAH.

Para a produção dos filmes finos (figura 4.9) de (PAH/PSS)₂₀, a lamela de quartzo foi imersa em solução de PAH durante 1 minuto, depois em água ultrapura durante 5 segundos para retirar os resíduos de PAH não adsorvidos e secado com azoto comprimido. Após a formação desta primeira monocamada a lamela foi imersa na solução de PSS durante 1 minuto, seguido de água ultrapura durante 5 segundos e secado com azoto. Com isto formou-se a primeira bicamada. Este processo foi então repetido durante 20 vezes até a formação das 20 bicamadas, sendo que, a água ultrapura onde eram retirados os resíduos de PAH e PSS era trocada ao fim de 3 bicamadas para evitar a contaminação das lamelas.

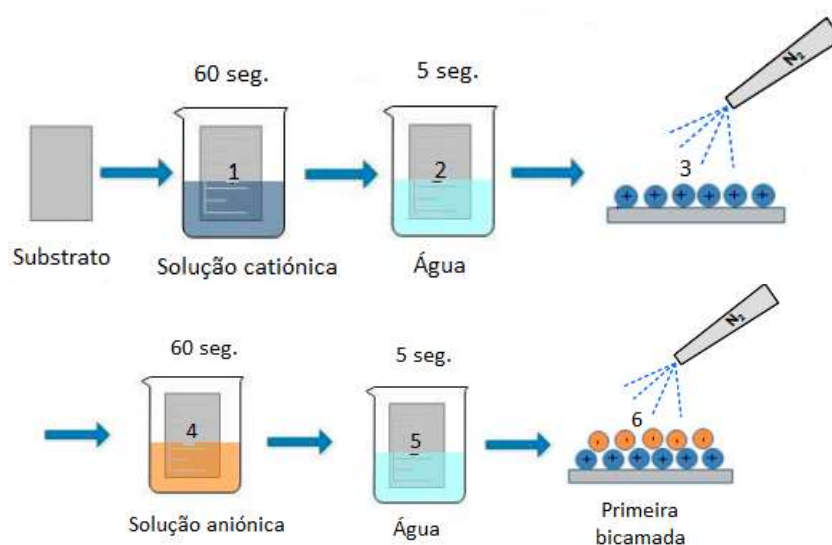


Figura 4.9 - Esquema representativo da técnica LbL na produção de uma monocamada (PAH/PSS). Adaptado de [49]. O substrato foi inicialmente imerso na solução catiônica durante 60 segundos, de seguida lavada com água ultrapura durante 5 segundos para retirar os resíduos não adsorvidos. Após a lavagem foi secado com azoto comprimido e imerso na solução aniônica durante 60 segundos, lavado com água ultrapura durante 5 segundos e secado. Com isto formou-se a primeira bicamada.

Para a produção dos outros filmes finos (QT/PSS)e (PEI/PSS) foi usada a mesma técnica acima descrita, com os mesmos tempos de imersão para o polimerização e polimerização, mesmo tempo de lavagem e a mesma técnica de secagem.

4.2.3 Deposição por automontagem

Esta técnica permite a formação espontânea de conjuntos moleculares por quimiossorção através da imersão de um substrato apropriado em uma solução de surfactante ativo num solvente orgânico. A deposição por automontagem também é muito usada para a formação de estruturas complexas com espessuras muito pequenas (nanómetros) [45], [50].

4.2.4 Produção dos sensores

Foram produzidos 4 tipos de sensores depositando ou não filmes finos de polieletrólitos sobre os suportes sólidos com os elétrodos interdigitados (IDEs). Os sensores (figura 4.10) revestidos com filmes de (PAH/PSS)₅/PAH, de (QT/PSS)₅/QT e de (PEI/PSS)₅/PEI são designados de sensor 1, sensor 2 sensor 3, respetivamente. Ao sensor 4 não foram adsorvidos filmes finos de polieletrólitos, consistindo apenas no suporte sólido com IDEs. As monocamadas de PAH, QT e PEI adsorvidas após a formação das 5 bicamadas são muito importantes para o passo seguinte que é a da adsorção da proteína A, visto que, os componentes usados possuem nas suas composições aminas que podem estabelecer ligações peptídicas com a proteína.

Sobre cada um dos sensores foram ainda adsorvidas a proteína A (sensor 1, 2 e 3) ou proteína A tiolada descrita na secção 4.1.3.1 para o caso do sensor 4, a BSA, o anticorpo e por fim o antígeno.

Na tabela 4.2 encontram-se os tempos de adsorção de cada camada anteriormente indicada:

Tabela 4.2 - Biomoléculas adsorvidas sobre os sensores e os respetivos tempos de adsorção. O * refere-se a proteína A tiolada para o caso do sensor 4.

Biomolécula	Proteína A/*	BSA	Anticorpo	Antigene
Tempo de adsorção (min)	35	10	20	20

A adsorção de cada uma das biomoléculas acima indicado foi feita a 4 °C sendo que de seguida o IDEs era lavado em PBS 0,1 M durante cerca de 1 minuto e depois secado com azoto industrial. Após a secagem o IDEs era sempre armazenado no frio a 4°C numa caixa de petri durante 15 minutos, com o objetivo de manter a temperatura o mais constante possível antes

da medição da impedância para verificar se a camada foi corretamente adsorvida. As medições foram feitas em 2 mL de solução aquosa de PBS 0,1 M, previamente depositada num copo de 5 mL de forma a garantir que apenas a região onde o filme será posteriormente depositado se encontrava em contato com a solução.

Para a testagem dos sensores nas diferentes concentrações de antigene foram produzidas soluções de antigene de concentração entre 5×10^{-4} à 5×10^{-11} (v/v) em décadas e depois cada um dos sensores foi imerso em cada uma das soluções durante 5 minutos (da concentração mais baixa até à mais alta) à uma temperatura de 4 °C e medindo-se de seguida a impedância em PBS 0,1 M.

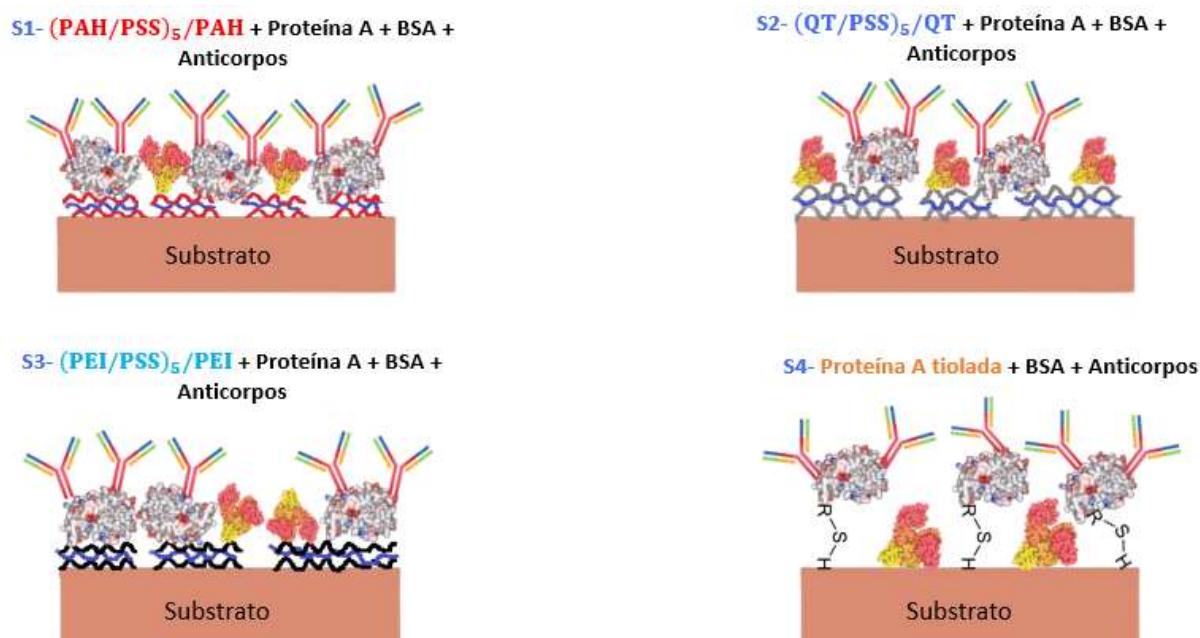


Figura 4.10 - Esquema representativo dos sensores produzidos depositando filmes finos sobre os suportes sólidos com elétrodos interdigitados.

4.2.5 Caracterização da superfície dos sensores

4.2.5.1 Espectrofotometria

Alguns dos compostos usados na produção dos filmes finos possuem bandas de absorção da radiação na região do visível e do ultravioleta tornando possível a monitorização do crescimento dos mesmos ao fim da formação de cada bicamada através da técnica de espectrofotometria de UV – visível usando um espectrofotómetro de duplo feixe Shimadzu UV – 2101 PC no laboratório de AFM, pertencente ao centro de investigação LIBPhys da FCT/UNL. Os

espectros foram recolhidos usando uma gama de comprimento de onda entre os 190 e os 900 nm. A espectrofotometria consiste num método analítico barato, simples e muito flexível usado para quantificar a presença de moléculas em substrato medindo a absorvância/ transmitância de luz em função do comprimento de onda, permitindo a análise da cinética de adsorção da molécula [51].

O espectrofotómetro é composto por uma lâmpada de tungsténio que emite luz na região do visível e uma lâmpada D2 que emite luz ultravioleta. A luz emitida por estas duas lâmpadas é direcionada para um espelho e posteriormente para um monocromador que é um dispositivo ótico que emite luz numa gama específica de comprimentos de onda. O feixe de luz que sai do monocromador é direcionado para amostra que se quer caracterizar e para a amostra de referência. A luz atravessa estas amostras e finalmente chega aos fotodetetores, e de seguida os dados são processados dando origem a um gráfico da absorvância em função do comprimento de onda (ver figura 4.11). O gráfico fornecido pelo espectrofotómetro é uma diferença entre a absorvância medida pela amostra a caracterizar (com filmes finos) e a amostra de referência (sem filmes finos) [51].

Através da lei de Lambert – Beer é possível relacionar a absorvância com as propriedades do material usado:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \alpha \times l \times C$$

em que A é a absorvância, I corresponde a intensidade da luz medida em relação a referência I_0 , α é a medida da absorbtividade molar, l a espessura do filme formado e C a concentração da substância.

Para a definição e controlo dos parâmetros do espectrofotómetro usou-se o *software* UVPC. Para se analisarem os filmes depositados sobre as lamelas de quartzo, definiu-se uma primeiramente a linha de base no espectrofotómetro sem lamelas dentro da mesma.

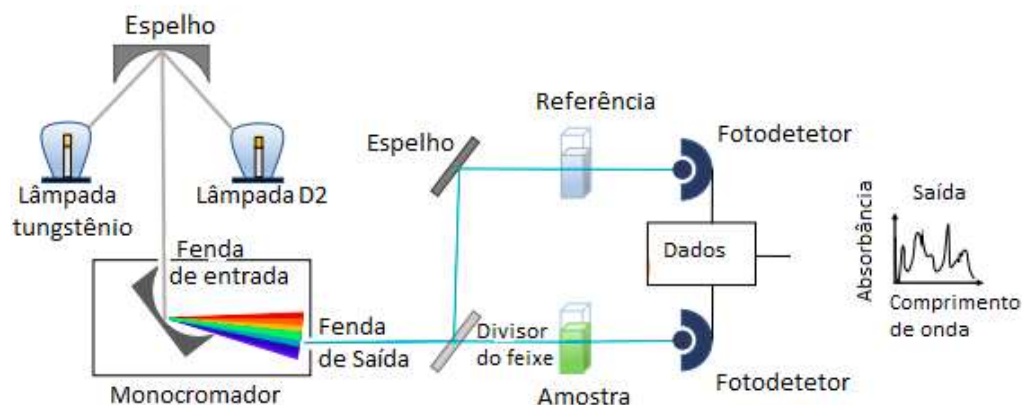


Figura 4.11 - Esquemático representativo do funcionamento do espectrofotómetro. Adaptado de [51]. Na figura encontram-se representadas as duas lâmpadas (D2 e de tungsténio) que enviam um feixe de luz a um espelho que posteriormente a um monocromador. A luz depois passa por um feixe de saída e atinge um divisor de feixes. Após este passo uma parte da luz atravessa a amostra a ser caracterizada e outra atravessa a amostra de referência ambos atingindo depois um fotodetector que recolhe os dados.

Posteriormente colocaram-se as lamelas limpas e correu-se o programa varrendo um comprimento de onda dos 900 nm aos 190 nm.

4.2.5.2 Espectroscopia de impedância

Como referido anteriormente a melhor forma de medir a sensibilidade dos sensores em meio líquido é usando a espectroscopia de impedância. Recorreu-se ao analisador de impedância da Solartron 1260 acoplado a uma interface dielétrica 1296A, com uma frequência entre 1Hz e 1×10^6 Hz. A voltagem aplicada (AC) foi de 25 mV, pois de acordo com o estudo de Zagalo P. et al. [52] tensões elétricas acima deste valor podem destruir os elétrodos e abaixo deste valor o IDEs começa a perder sensibilidade. Todas as medições começavam com 30 segundos de atraso para permitir que o sistema se estabilizasse e eram repetidas num ciclo de 3 vezes. Para o controlo dos parâmetros (tabela 4.3) como por exemplo: a voltagem (AC e DC), a faixa de frequências, o nº de medições, entre outros, recorreu-se ao software *SMaRT Impedance* instalado no computador do laboratório.

Tabela 4.3 - Parâmetros definidos a partir do software *SMaRT Impedance* e respetivos valores.

Parâmetros	Valor
Nível DC	0,00V
Nível AC	25,00mV
Frequência	1Hz – 1MHz

A figura 4.12 representa um esquema dos componentes que fazem parte do sistema de medida de impedância.

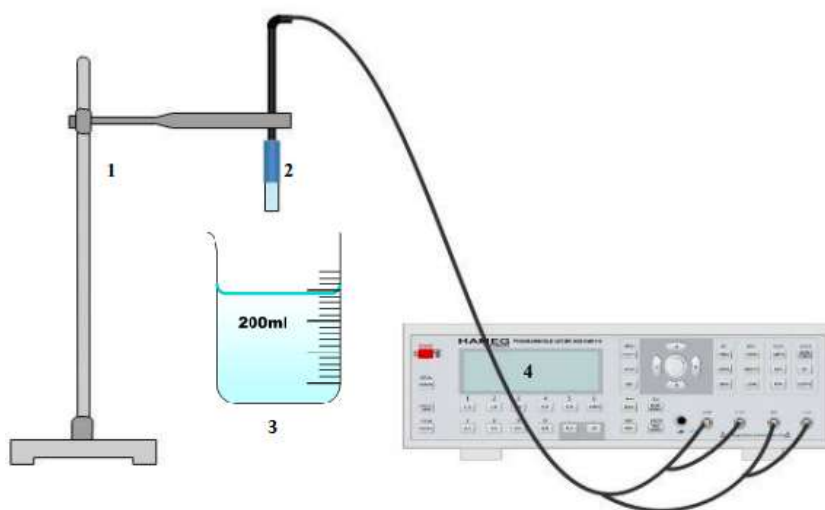


Figura 4.12 - Esquema representativo do aparelho. Adaptado de [53]. Na figura está representado o suporte do IDEs (1), a ponta onde é encaixado o IDEs (2), a solução de medida (3) e por fim o medidor de impedância (4).

4.2.6 Método matemático de quantificação dos sensores

4.2.6.1 Análise em Componentes principais (PCA)

A impedância espectroscópica gera um conjunto de dados multivariados de grande dimensão. A Análise em Componentes Principais é um método estatístico usado para reduzir a dimensionalidade de um conjunto muito grande de dados preservando as informações mais relevantes dos dados, transformando um conjunto de dados correlacionados em um conjunto menor de dados não correlacionados que maximizam a variância do sistema, ou seja, preservando o máximo da variabilidade possível – as componentes principais do sistema. O objetivo é encontrar novas variáveis que são funções lineares das variáveis iniciais, que maximizam a variabilidade entre elas e que não sejam correlacionadas entre si. A PCA também tem por objetivo eliminar algumas das variáveis que caracterizam o sistema, mas que têm pouco peso ou pouca informação estatística [54], [55]. Começa-se por encontrar a direção com maior informação estatística e de maior variabilidade, sendo esta definida como a primeira componente principal.

De seguida, a segunda componente principal será a de menor variância em relação a primeira, mas sempre respeitando a condição de esta ser ortogonal à mesma. E assim são encontradas as várias componentes principais do conjunto de dados em estudo. Com isto obtêm-se gráficos bidimensionais permitindo visualizar diferentes categorias agrupadas de acordo com a sua semelhança ou diferença.

A PCA foi realizada com recurso ao software OriginPro 2021b para alcançar uma interpretação mais simples dos dados. Para tornar os resultados mais robustos usou-se os dados de impedância e da tangente de perdas de todos os sensores (concentração de antigene 5×10^{-4} à 5×10^{-11} (v/v) em décadas) numa gama de frequência dos 1 – 30 Hz.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

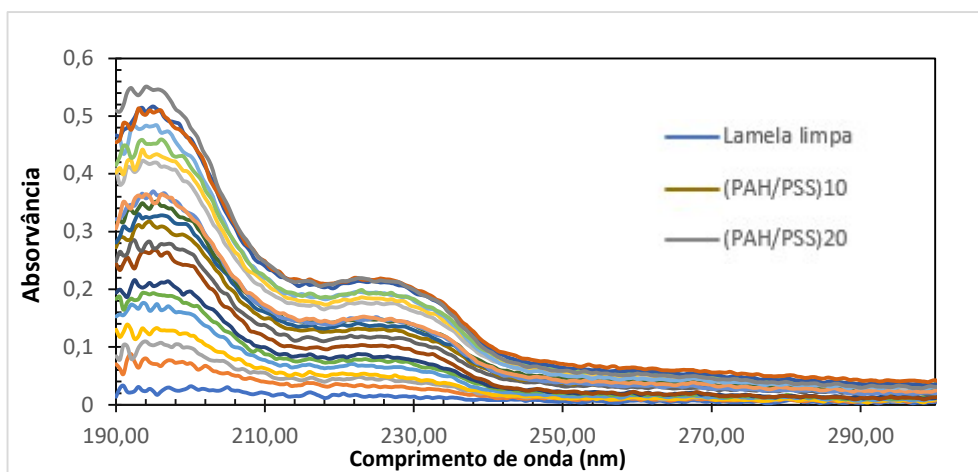
Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos. Começou-se por produzir filmes LbL de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS). O crescimento destes filmes bem como a dessorção destes filmes em soluções aquosas de diferentes concentrações de PBS foram caracterizados por espectrofotometria de UV-vis. Após confirmar que era possível a adsorção dos filmes finos procedeu-se com a produção e análise da resposta de 4 sensores diferentes quando imersos em soluções de antígenos com diferentes concentrações e a respetiva caracterização elétrica através dos espectros de impedância. Para a análise dos espectros de impedância considerou-se um intervalo de frequências entre 1 Hz - 100 Hz, pois era onde havia maior variação nos resultados.

5.1 Caracterização de filmes LBL

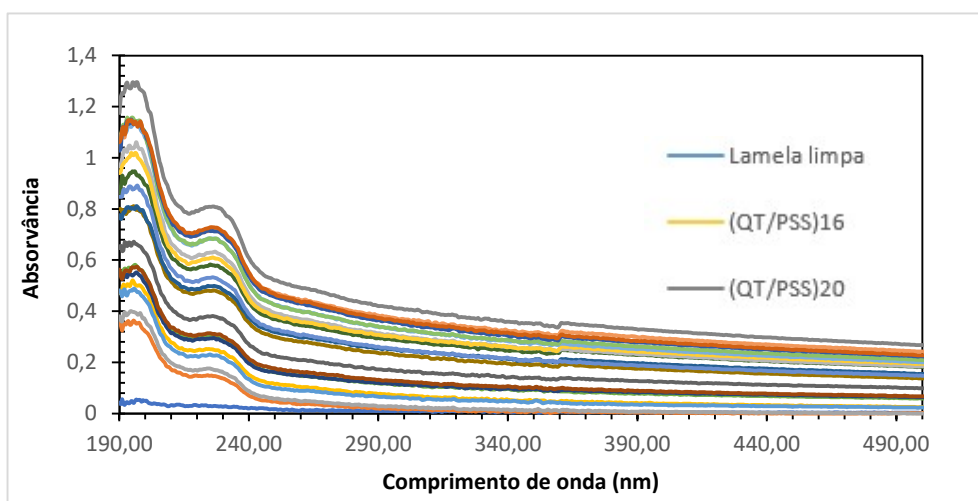
5.1.1 Crescimento dos filmes LBL

Para o desenvolvimento dos sensores é necessário em primeiro lugar preparar e caracterizar os filmes finos de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS). Como referido anteriormente alguns compostos usados na fabricação destes filmes possuem bandas de absorção na região do visível o que permite que estes filmes sejam analisados por espectroscopia de UV-vis.

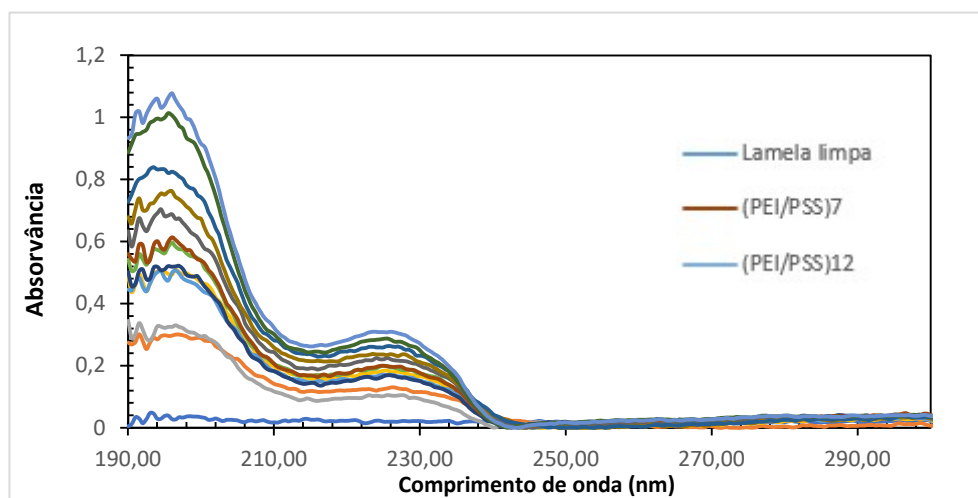
Assim, para se analisar a formação dos filmes finos, começou-se por estudar o crescimento destes filmes sobre as lamelas de quartzo, medindo-se o espectro de UV-visível em relação a lamela de referência (sem filmes) à medida que as bicamadas iam sendo adsorvidas. Os espectros dos filmes LbL de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS) em função do número de bicamadas adsorvidas encontram-se representados na figura 5.1 a), b) e c), respetivamente.



a)



b)



c)

Figura 5.1 - Crescimento das absorvâncias das várias bicamadas dos diferentes filmes finos, **a)** espectro de absorvância de todas as bicamadas do filme fino de (PAH/PSS)₂₀, **b)** espectro de absorvância de todas as bicamadas do filme fino de filme fino (QT/PSS)₂₀, **c)** espectro de absorvância de todas as bicamadas do filme fino filme fino de

12

A partir dos espectros obtidos nas figuras 5.1 a), b) e c) é possível verificar o crescimento dos filmes finos de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS) bem como o aumento da absorvância à medida que número de bicamadas aumenta.

No caso dos filmes de (PAH/PSS), figura 5.1 a), existem duas bandas de absorção cujos picos se encontram bem definidos a 195 e 227 nm. A banda de absorção cujo pico tem intensidade máxima nos 227 nm é devido a presença do Na⁺ no PSS (como indicado anteriormente na figura 4.1 b). O PAH não possui absorção na região do visível, possuindo uma banda de absorção por volta dos 150 nm devido as transições eletrónicas do grupo NH₃⁺ [56], pelo que é impossível a deteção do mesmo através espectroscopia de UV-vis. Contudo pelo facto do crescimento de filmes finos através da técnica LbL ser causado principalmente por interações eletroestáticas entre as cargas elétricas opostas dos grupos iónicos nos dois polieletrólitos, são estas interações que levam à adsorção de camada sobre o polieletrólito de carga oposta com consequente formação das várias bicamadas. Logo para o PSS estar presente na lamela de quartzo, o PAH também tem de estar adsorvido na mesma, pois o PSS apresenta grupos aniónicos enquanto o PAH grupos catiónicos.

De acordo com Q. Ferreira et al. [56] a banda de absorção com pico máximo nos 195 nm é associado às transições $\pi - \pi^*$ do grupo benzeno de PSS, cujo picos se encontram nos 186 nm e 215 nm [49], [56].

Fez-se o mesmo estudo para os filmes de (QT/PSS), figuras 5.1 b) sendo-se o comportamento similar ao dos filmes finos (PAH/PSS). Porém para o mesmo número de bicamadas a absorvância nos filmes de (QT/PSS)₂₀ é superior à dos filmes (PAH/PSS)₂₀.

Podem haver duas justificações principais para tal facto. A primeira é o grau de ionização. Os polieletrólitos podem ser classificados como polieletrólitos fortes ou fracos de acordo com o seu grau de ionização. Sabe-se ainda que os polieletrólitos fracos são muito sensíveis ao pH enquanto que os polieletrólitos fortes são menos sensíveis ao pH. O pH por sua vez controla o grau de ionização, a qual está diretamente relacionada com a constante de dissociação e com a conformação do polieletrólito. Quanto menor o grau de ionização maior é a adsorção independentemente da natureza do polieletrólito, mas outros fatores como rugosidade, intensidade das forças eletroestáticas e competição pelos locais de adsorção devem ser

considerados [57]. A tabela 5.1 lista os valores de grau de ionização na faixa de pH usada neste trabalho.

A segunda justificação é que, como visto na figura 4.3, quando a quitosana é dissolvido em ácido acético, dá-se a formação de NH_3 e que este absorve a um comprimento de onda entre os 200 nm e os 230 nm com diferentes picos de absorção [58], fazendo com que no espectro de absorvância do (QT/PSS) essa região represente a soma da contribuição da quitosana e do PSS.

Por último os espectros dos filmes de (PEI/PSS) com diferentes bicamadas, representados na figuras 5.1 c), apresentam uma vez mais a presença dos picos a 195 nm e 227 nm, referentes à presença do PSS sobre a lamela de quartzo dado que o PEI não possui banda de absorção no visível. Nota-se que os filmes de (PEI/PSS) possuem uma maior absorvância quando comparados com os filmes finos de (PAH/PSS) e de (QT/PSS) o que poderá estar diretamente relacionado com o fato de que para o mesmo pH o PEI possui um menor grau de ionização que o PAH e que a quitosana.

Tabela 5.1 - Valores do grau de ionização do PAH, PEI e quitosana em função do pH.

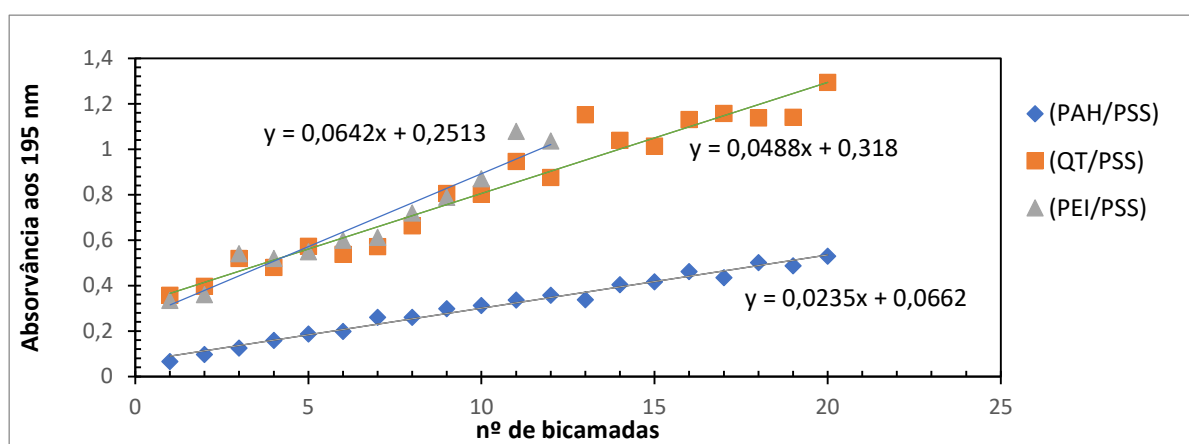
Composto	pH	Grau de ionização
PAH	5-6	0.8 [56]
PEI	5-6	0,65 [59]
Quitosana	4 - 6	1 [60]

Para compreender melhor o crescimento dos filmes finos de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS) foram representados os valores de absorvância a 195 nm e a 227 nm em função do número de bicamadas nas figuras 5.2 a) e b), respetivamente. Estas figuras mostram que o crescimento dos filmes finos é linear permitindo assim um controlo crítico da espessura dos mesmos que como referido no ponto 4.1.5 é muito importante para evitar a perda de sensibilidade do sensor devido ao alcance máximo das linhas de campo criadas aquando da aplicação do potencial elétrico.

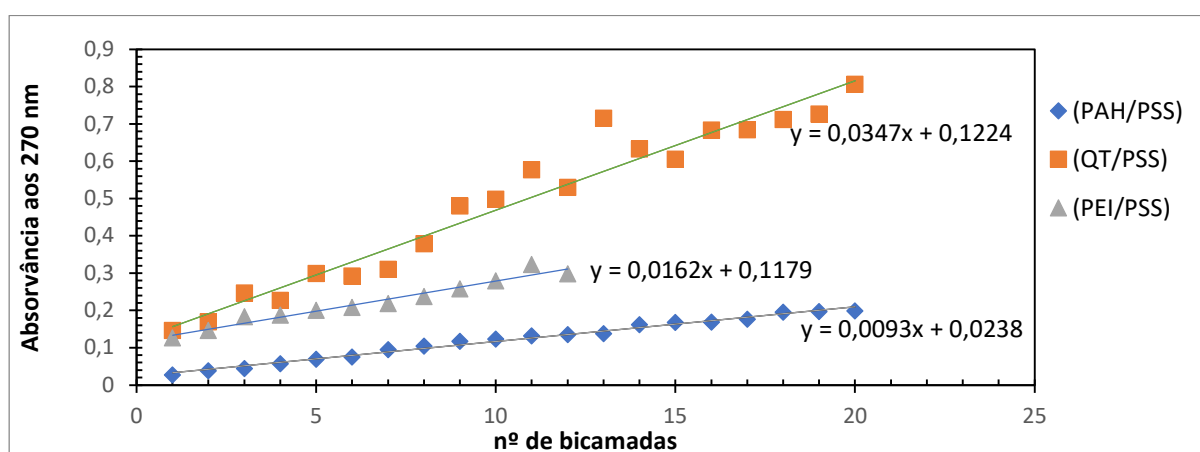
Como podemos constatar pela figura 5.2 a), que apresenta um máximo de absorção aos 195 nm, os filmes finos de (QT/PSS) e (PEI/PSS) apresentam um comportamento muito similar indicando que as quantidades adsorvidas por bicamada são semelhantes na presença de QT ou PEI, e que para o mesmo número de bicamadas apresentam valores de absorvância superiores ao do filme fino de (PAH/PSS), revelando que as quantidades de massa de PSS por unidade de área adsorvidas nestes filmes são cerca de metade quando comparadas com as adsorvidas sobre as camadas de QT ou PEI.

Analisando a figura 5.2 b), que mostra a absorvância associada ao máximo do pico de absorção aos 227 nm, para o mesmo número de bicamadas os filmes finos de (QT/PSS) apresentam maior valores de absorvância em comparação com os restantes filmes finos.

Este comportamento de linearidade poderá, no entanto, apenas ser averiguado após a formação das primeiras bicamadas, pois depende inicialmente da rugosidade do substrato, seguido de interações electrostáticas e de interações físicas associadas ao pH das soluções, da concentração, do tempo de adsorção, do processo de secagem, entre outros fatores [61].



a)



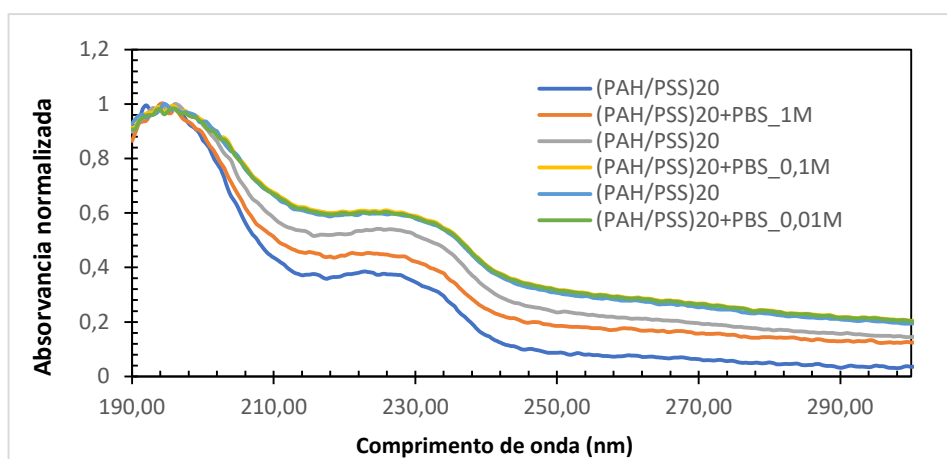
b)

Figura 5.2 - Estudo da linearidade de crescimento das várias bicamadas dos filmes finos nos picos de absorvância a a) 195 nm e b) 227 nm,

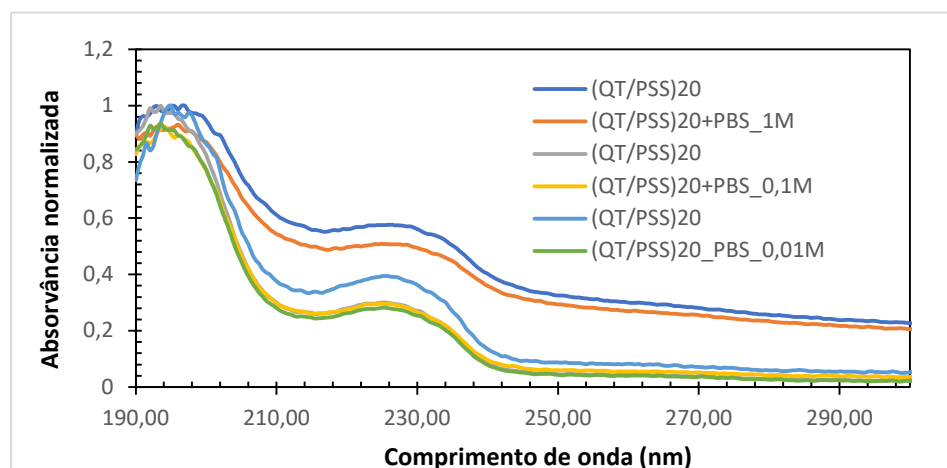
5.1.2 Estudo da dessorção dos filmes finos

Após a preparação dos filmes finos de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS), o objetivo seguinte foi o de proceder com a adsorção de uma camada de proteína A sobre os filmes com o objetivo de orientar posteriormente os anticorpos.

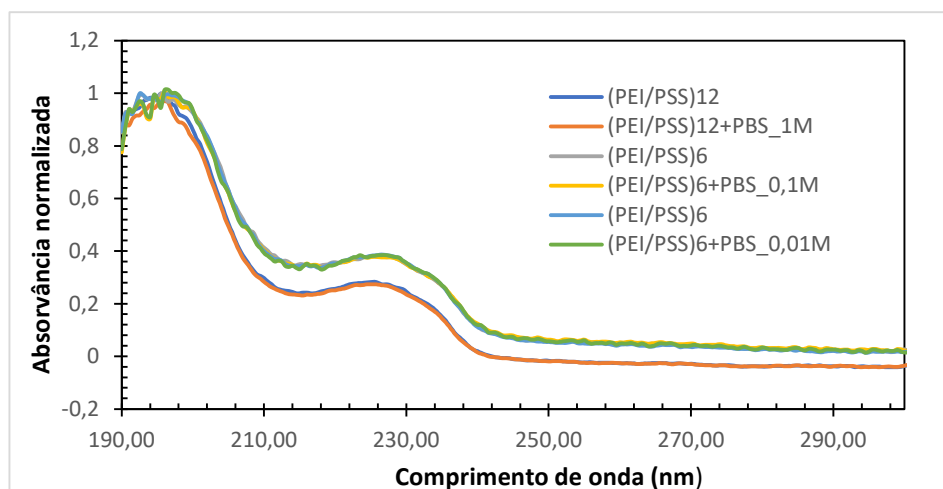
De acordo com Caroselli et al. [36] o tempo ideal para a adsorção da proteína A é de cerca de 1h. Como as soluções aquosas de proteína A foram preparadas em solução de PBS de concentração 0,1 M, foi estudado o comportamento dos filmes finos produzidos quando expostos a 1h de PBS às concentrações de 1 M, 0,1 M e 0,01 M, com o objetivo de verificar se havia ou não dessorção das várias bicamadas formadas.



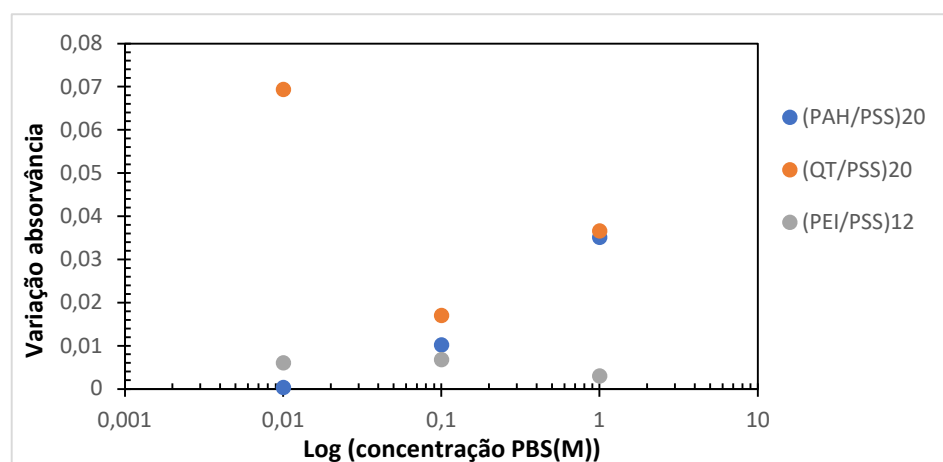
a)



b)



c)



d)

Figura 5.3 - Gráficos normalizados dos espectros de absorvância dos filmes finos quando expostos durante 1h a diferentes concentrações de PBS, **a)** filmes finos de (PAH/PSS), **b)** filmes finos de (QT/PSS), **c)** filmes finos de (PEI/PSS) e **d)** o estudo da dessorção dos diferentes filmes finos em função da concentração de PBS

A normalização dos espectros de absorvância dos diferentes filmes finos de (PAH/PSS), (QT/PSS) e (PEI/PSS), vide figuras 5.3 a), b) e c), que foram obtidas dividindo cada um dos espectros antes e após a dessorção, a diferentes concentrações de PBS, pelo máximo de absorvância do espectro à mesma concentração antes da exposição ao PBS. Esta normalização permitiu posteriormente relacionar a quantidade de desorvida em cada um dos filmes finos com a concentração de PBS. Para a obtenção do gráfico da figura 5.3 d), calculou-se a diferença de absorvância a 226 nm e 250 nm ($\Delta = abs_{226nm} - abs_{250nm}$) para cada filme fino antes (Δ_i) e depois da exposição a 1h de PBS (Δ_f). Finalmente calculou-se a $\Delta_i - \Delta_f$ para cada uma

das diferentes concentrações de PBS obtendo-se o comportamento da dessorção dos filmes finos em função da concentração de PBS.

Analisando a figura 5.3 d) conclui-se que para os filmes finos de (PAH/PSS) existe uma diminuição da absorvância após exposição ao PBS, cuja diferença aumenta à medida que aumenta a concentração do PBS. Isto poderá estar diretamente relacionado com o aumento da concentração de sal presente no PBS. Este aumento permite-nos concluir que houve dessorção e que a integridade dos filmes finos foi afetada.

Para o caso do (QT/PSS) obteve-se um comportamento semelhante ao dos filmes de (PAH/PSS), contudo houve uma maior dessorção para uma concentração PBS de 0,01M. Os valores associados às concentrações 0,1M e 1M são ligeiramente superiores aos dos filmes de (PAH/PSS).

Por último, o (PEI/PSS), apresenta pouca variância da diferença de absorvância antes e após a exposição a diferentes concentrações de PBS (figura 5.3 d). Os filmes de (PEI/PSS) apresentam menor diferença de absorvância antes e após a exposição a PBS às concentrações 0,1M e 1M que os filmes finos de (QT/PSS) e de (PAH/PSS).

Isto prova que para os filmes finos de (PEI/PSS) a adsorção da proteína A não afeta muito a integridade dos mesmos e que para os filmes de (QT/PSS) e (PAH/PSS) existe sim uma ligeira dessorção que pode afetar o desempenho final dos sensores.

5.2 Caraterização elétrica dos filmes em soluções aquosas de PBS

Começou-se por verificar a impedância dos suportes sólidos com elétrodos interdigitados (IDEs) sem filmes depositados, imersos em 3 mL das várias soluções a diferentes concentrações de PBS (0,01 M, 0,1 M e 1 M), em copos de ensaio de 10 mL à temperatura de 23 °C. Este processo foi repetido duas vezes para cada uma das concentrações com o objetivo de verificar a reprodutibilidade dos sensores.

É possível notar, a partir da análise das figuras 5.4 a), b) e c) que à medida que se diminui a concentração de sal, ou seja, quanto mais diluído for o PBS, maior é o valor de impedância, o que pode ser explicado pela diminuição da condução elétrica causada pela diminuição da concentração de sal já que este possui propriedades condutoras.

Também se nota que os valores das medidas no primeiro momento são coerentes com os valores das medidas no segundo momento, provando que os sensores são reproduzíveis.

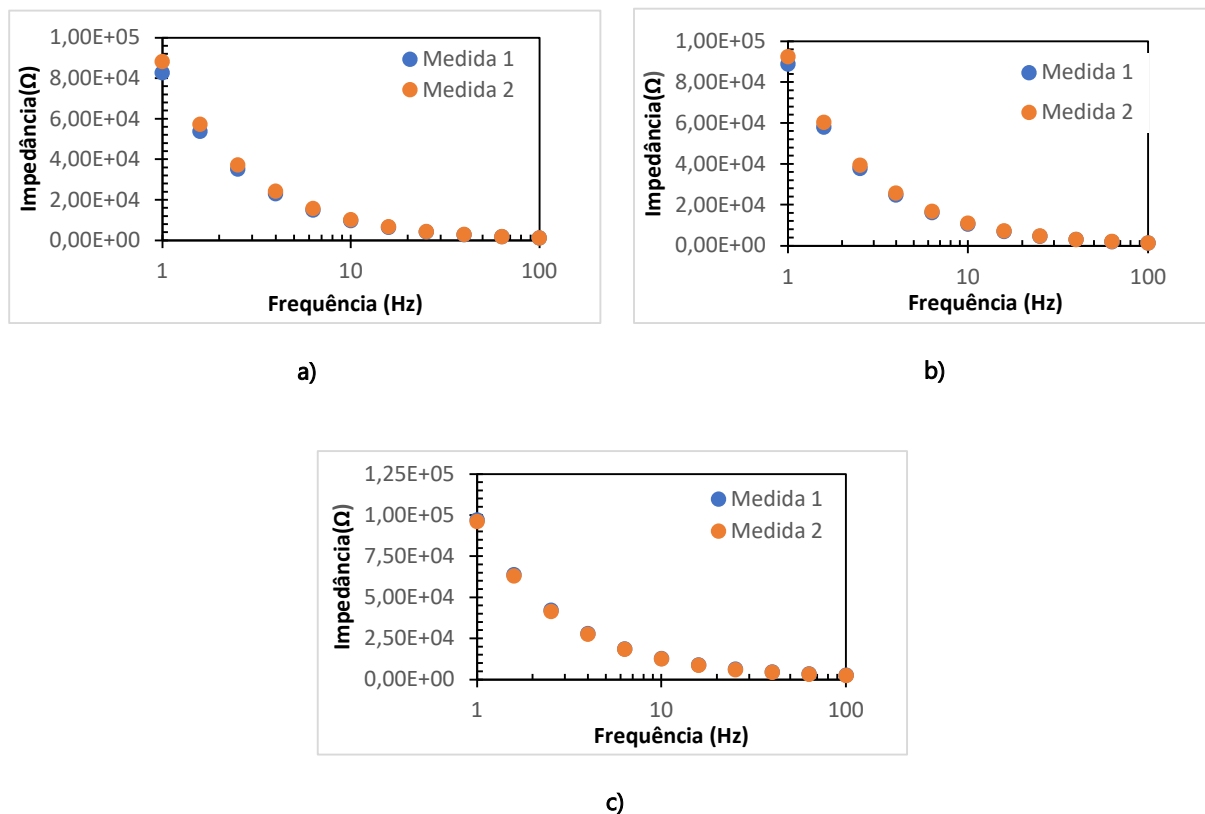
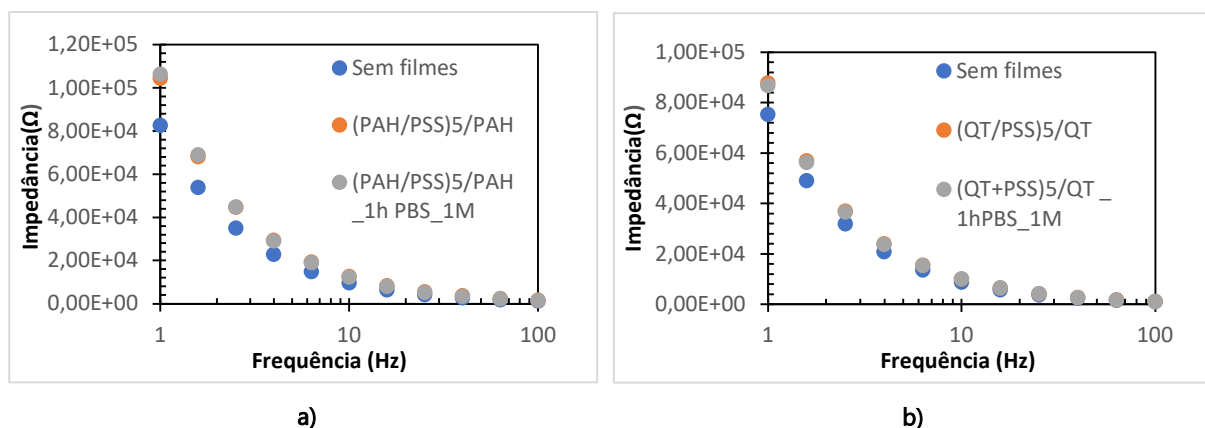
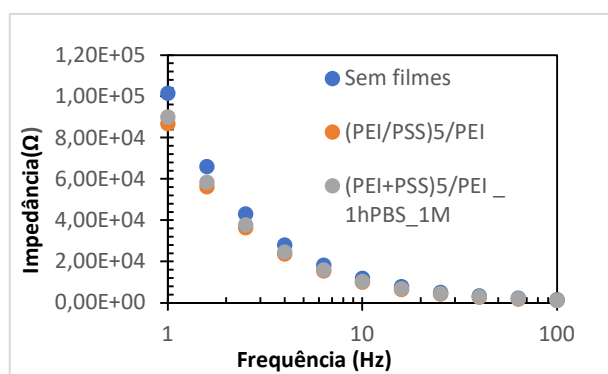


Figura 5.4 - Medição da impedância do elétrodo sem filmes finos em diferentes concentrações de PBS, **a)** PBS 1M, **b)** PBS 0,1 M e **c)** PBS 0,01M.

De seguida os IDEs foram revestidos de filmes finos (PAH/PSS)₅/PAH e (QT/PSS)₅/QT e (PEI/PSS)₅/PEI.

Fez-se o estudo da dessorção dos filmes após 1h em PBS com o objetivo de verificar se a integridade dos filmes era preservada nos elétrodos interdigitados.





c)

Figura 5.5 - Medição da impedância do eletrodo sem filmes, após formação dos filmes finos de **a)** (PAH/PSS)₅/PAH, **b)** (QT/PSS)₅/QT e **c)** (PEI/PSS)₅/PEI, e ainda a exposição dos filmes finos à 1h de PBS 1 M.

Através da visualização das figuras 5.5 a) e b) nota-se que quando se formam os filmes finos (PAH/PSS)₅/PAH e (QT/PSS)₅/QT, independentemente da concentração de PBS em que a medição esteja a ser feita, há sempre um aumento de impedância, uma vez que, ao adicionar-se uma nova camada extra ao sensor, o efeito de PAH como polieletrólito isolante é mais notória. Já para o caso da quitosana, sabe-se que a quitosana pura possui uma condutividade elétrica é cerca de $1.91 \times 10^{-4} \mu\text{S}/\text{cm}$ de acordo com [Marroquin et al.\[62\]](#) e que a condutividade da solução tampão, dependendo da concentração, é da ordem dos mS/cm, pelo que se esperava um aumento da impedância, tal como observado na figura 5.5 b), após a adsorção dos filmes finos.

Para o caso do PEI, figura 5.5 c) observou-se uma diminuição da impedância após a adsorção dos filmes finos.

Observou-se também que após 1h em PBS (independentemente da concentração deste) a integridade dos filmes é completamente preservada (figuras 5.6 a), b), c), d), e) e f)) tornando possível a adsorção da proteína A sem os afetar.

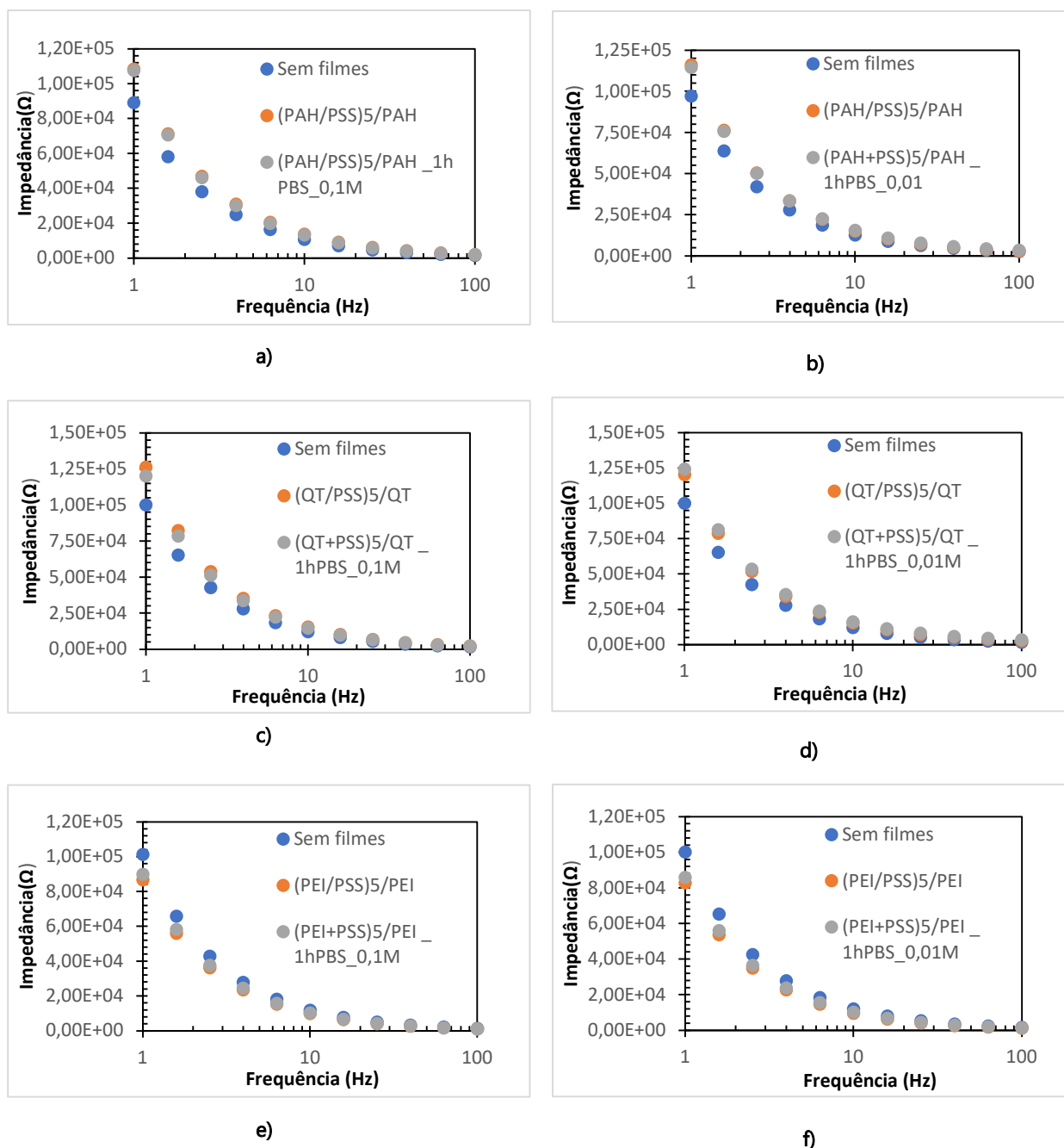


Figura 5.6 - Medição da impedância do eletrodo sem filmes, após formação dos filmes finos e ainda a exposição à 1h em diferentes concentrações de PBS, **a)** filme fino de (PAH/PSS)₅/PAH - PBS 0,1M, **b)** filme fino de (PAH/PSS)₅/PAH PBS 0,01M, **c)** filme fino de (QT/PSS)₅/QT - PBS 0,1M, **d)** filme fino de (QT/PSS)₅/QT - PBS 0,01M, **e)** filme fino de (PEI/PSS)₅/PEI - PBS 0,1M e **f)** filme fino de (PEI/PSS)₅/PEI - PBS 0,01M.

5.3 Produção dos sensores

Após a conclusão de todos os passos anteriores de verificação da formação das bicamadas dos filmes finos sobre as lamelas analisando os espectros de absorvância, do estudo da formação dos filmes finos sobre os elétrodos interdigitados e, por último, do estudo da integridade dos filmes após exposição ao PBS avançou-se para o passo seguinte que era o do estudo da adsorção das varias biomoléculas (proteína A, BSA e anticorpo) pretendidas no IDEs e conseqüente produção dos sensores, uma vez que, encontravam-se reunidas todas as condições pretendidas.

Começou-se por usar suportes sólidos com elétrodo interdigitados sem nenhum filme depositado para servir de controlo a impedância de cada uma das soluções a serem usadas na produção dos sensores (figura 5.7) e fez-se a comparação com a solução de PBS 0,1 M de forma a prever os resultados aquando da adsorção de cada camada na produção dos sensores.

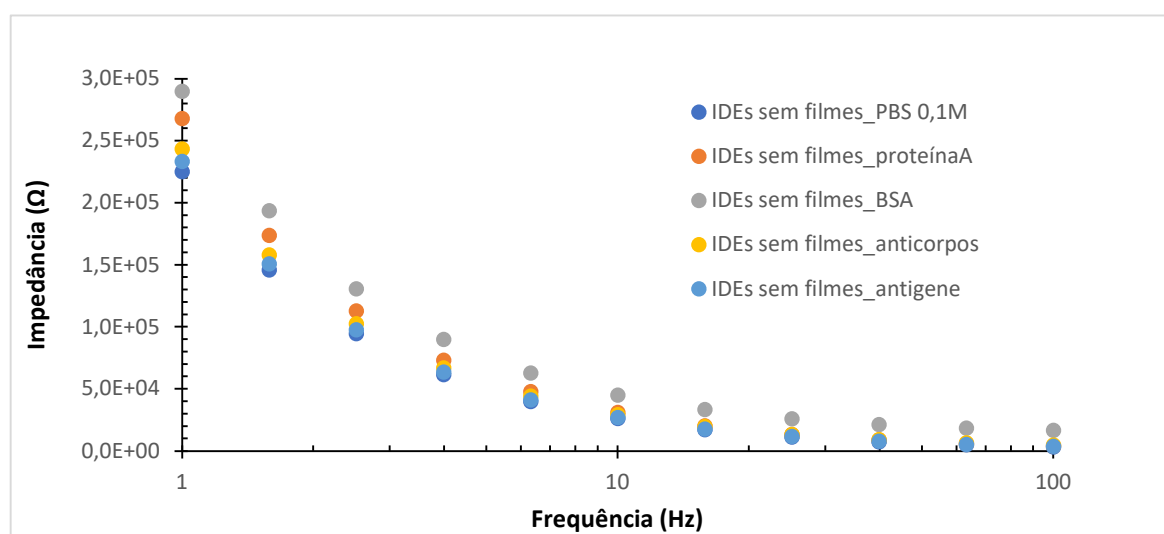


Figura 5.7 - Medição da impedância das soluções das biomoléculas (proteína A, BSA, anticorpos e antigene) a serem usadas e a respetiva comparação com o PBS 0,1M.

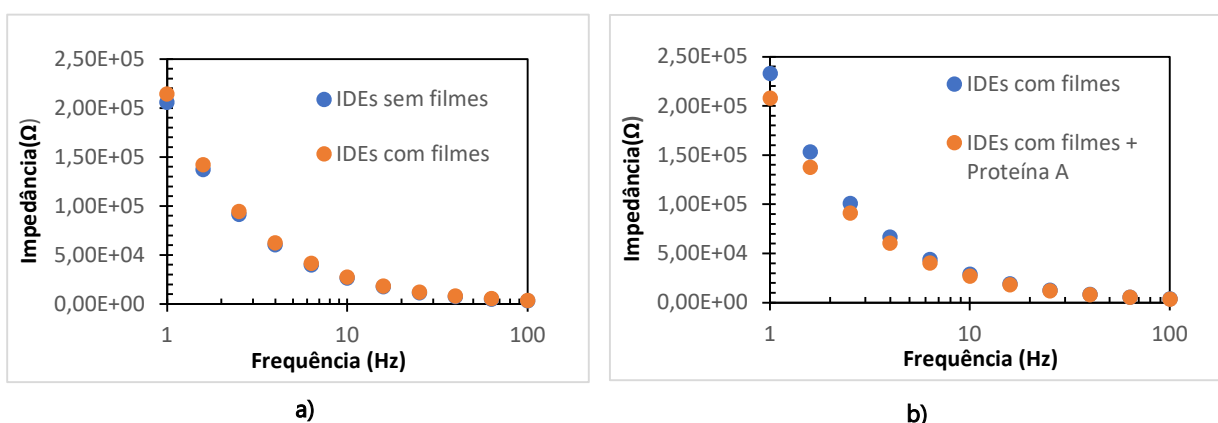
Com estes resultados podemos concluir que todas as soluções possuem uma impedância maior que a impedância da solução de medida que é o PBS 0,1 M. Após a adsorção da proteína A houve um aumento da impedância, uma vez que, esta possui, para as mesmas frequências valores maiores de impedância que a solução de PBS 0,1 M. A BSA em relação a proteína A e ao PBS, possui valores maiores de impedância que ambos existindo, portanto, um novo aumento de impedância.

O anticorpo por sua vez, possui valores de impedância maiores do que os de PBS mas menores do que a BSA e a proteína A, ocorrendo assim uma diminuição de impedância em relação as duas camadas anteriormente adsorvidas. O antígeno também possui valores de impedância mais altos do que o PBS mas, menores que os da camada de anticorpos, BSA e proteína A, esperando haver mais uma diminuição de impedância após a adsorção do antígeno.

Após a medição da impedância das várias biomoléculas a serem usadas procedeu-se com a produção dos sensores. Os resultados apresentados na figura 5.8 são referentes a adsorção de cada uma das biomoléculas usadas na produção do sensor 1 (sensor cuja camada de filmes finos é formada por $(PAH/PSS)_5/PAH$), sendo comparável aos resultados obtidos para os restantes sensores.

Quando se formaram os filmes finos ocorreu um aumento de impedância no sensor 1 e sensor 2 $((QT/PSS)_5/QT)$ e uma diminuição de impedância no sensor 3 $((PEI/PSS)_5/PEI)$. Após a adsorção da proteína A, ocorreu um aumento de impedância em todos os sensores, mas em diferentes graus. Com a adsorção da BSA e do anticorpo houve a mesma tendência em todos os outros sensores (ver anexos) confirmando os resultados acima discutidos.

Estes resultados mostram que foi possível a formação das várias camadas pretendidas e que todos os sensores conseguiram detetar uma concentração de antígeno 5×10^{-4} (v/v), visto haver uma variação de impedância sempre em relação a camada anteriormente adsorvida.



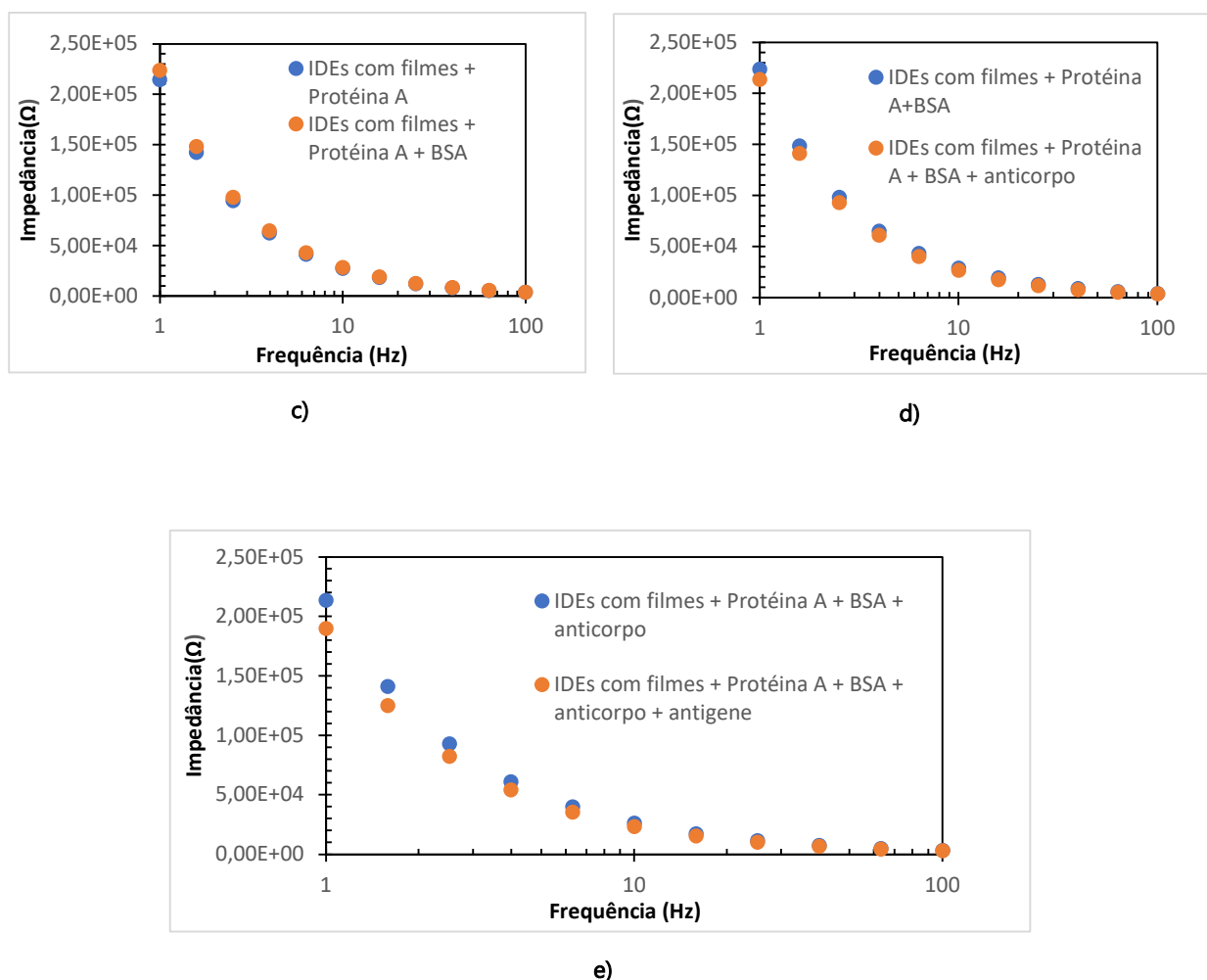


Figura 5.8 - Estudo da adsorção das biomoléculas sobre a superfície IDE para a produção do sensor 1, **a)** adsorção dos filmes finos de (PAH/PSS)₅/PAH sobre o substrato, **b)** adsorção da proteína A sobre os filmes finos, **c)** adsorção do BSA, **d)** adsorção dos anticorpos e **e)** adsorção do antígeno.

5.3.1 Estudo da influência de tempo exposição e saturação dos sensores (quando em imerso em solução de antígeno).

Após a análise dos resultados anteriores em que se concluiu que todos os sensores foram capazes de detetar uma concentração de antígeno 5×10^{-4} (v/v), foi feito um estudo com o objetivo de tentar perceber quando ocorria a saturação dos mesmos. Este estudo foi feito considerando apenas o valor da impedância para a frequência de 1 Hz, pois é o valor de frequência cuja variação de impedância é maior.

Estudou-se a influência do tempo de exposição nos sensores 1, 2 e 3 (figuras 5.9 a), b) e c) respetivamente) à solução de antígeno (concentração 5×10^{-4} (v/v)), concluindo-se que quanto maior for o tempo em que os sensores estão imersos na solução de antígeno, maior

será a diminuição de impedância, e que o primeiro sensor saturou aos 20 minutos, e os segundo e o terceiro sensores aos 25 minutos.

O sensor 4, figura 5.9 d) também saturou aos 20 minutos, mas, em vez de apresentar uma diminuição de impedância até o valor da saturação, apresentou um comportamento oposto (aumento de impedância).

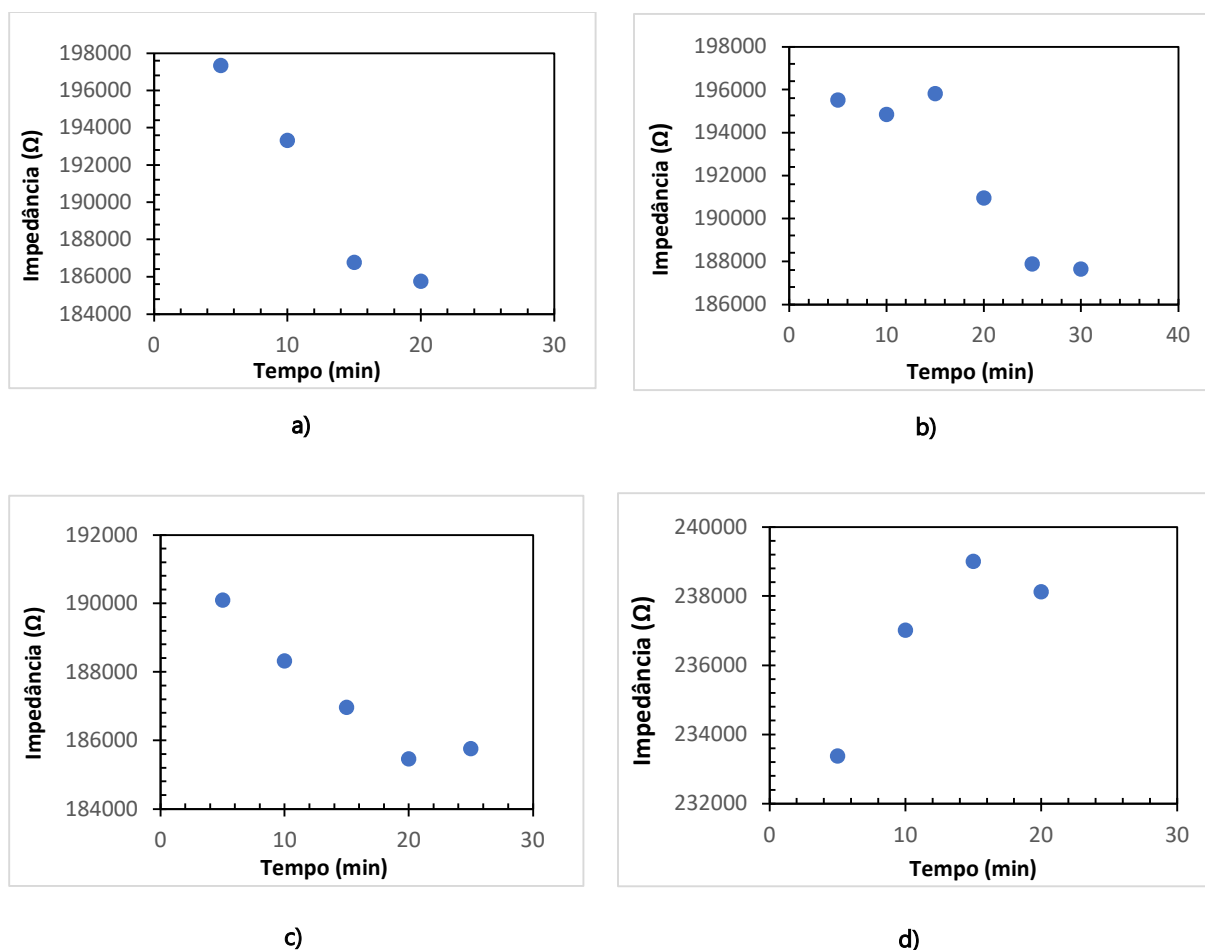
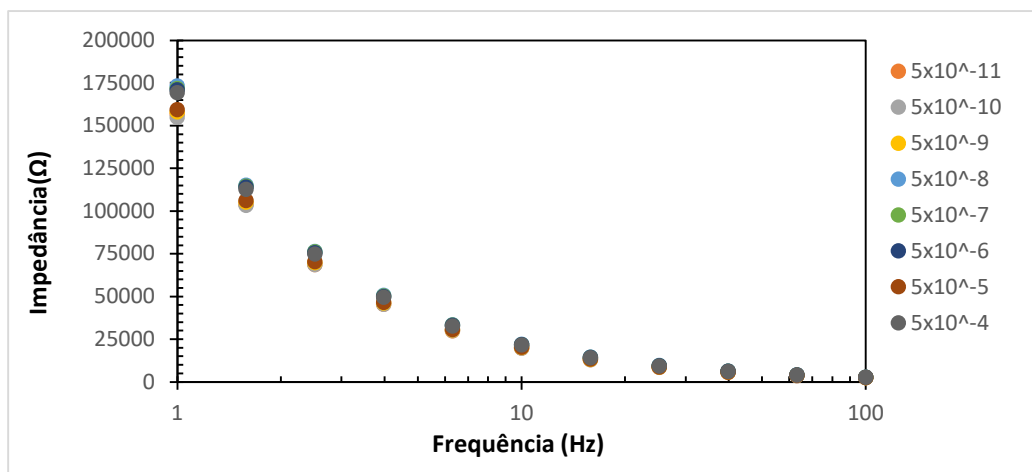


Figura 5.9 - Estudo do tempo de saturação dos 4 sensores quando exposto à uma concentração de antígeno de 5×10^{-4} (v/v), **a)** sensor 1, **b)** sensor 2, **c)** sensor 3 e **d)** sensor 4.

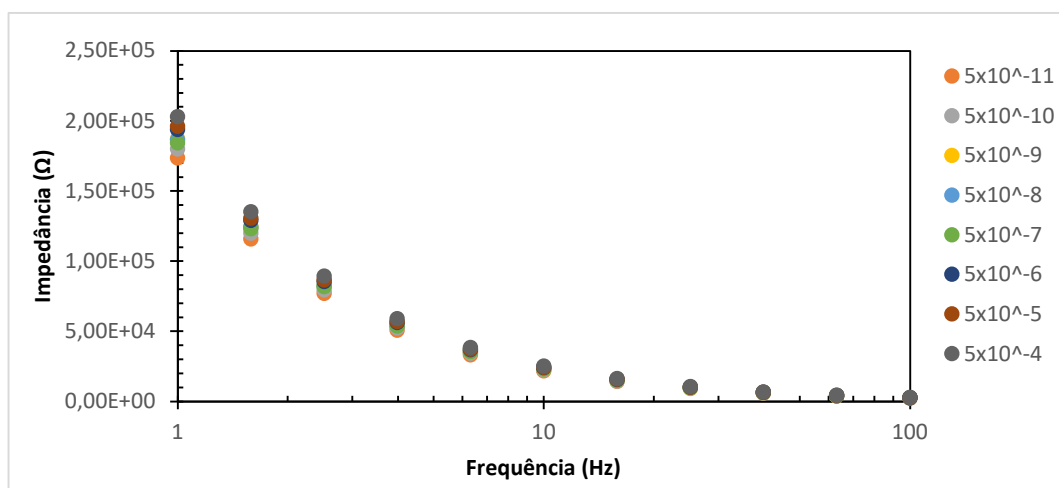
5.3.2 Testagem dos sensores em diferentes concentrações de antígeno.

O passo seguinte foi testar os sensores em diferentes concentrações de antígeno, com o objetivo de posteriormente se verificar qual ou quais os melhores sensores, calcular as sensibilidades dos sensores e limites de detecção usando a Análise em Componentes Principais (PCA).

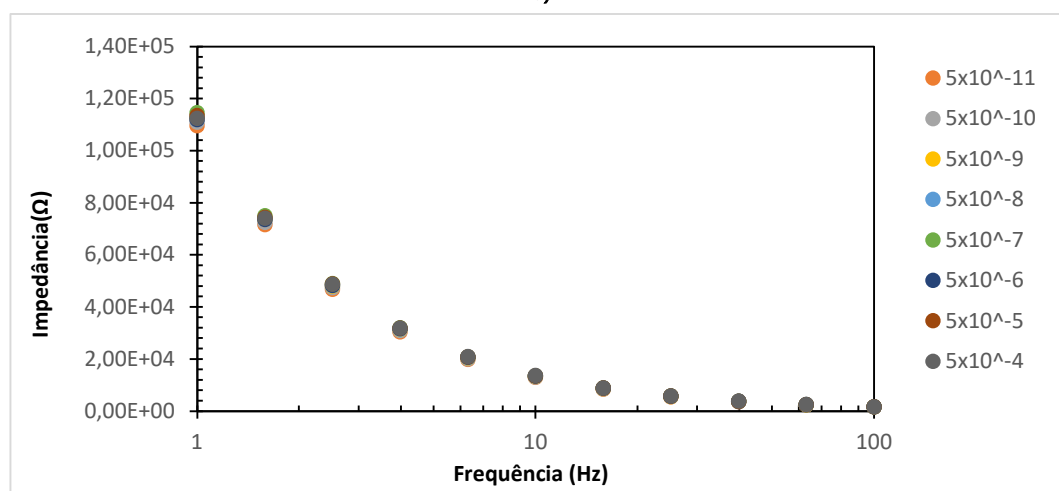
Começou-se por obter os espectros de impedância dos 4 sensores (figuras 5.10 a), b), c) e d) respetivamente) e pelos espectros percebe-se que a frequência de 1 Hz é aquela onde existe uma maior variabilidade dos valores de impedância.



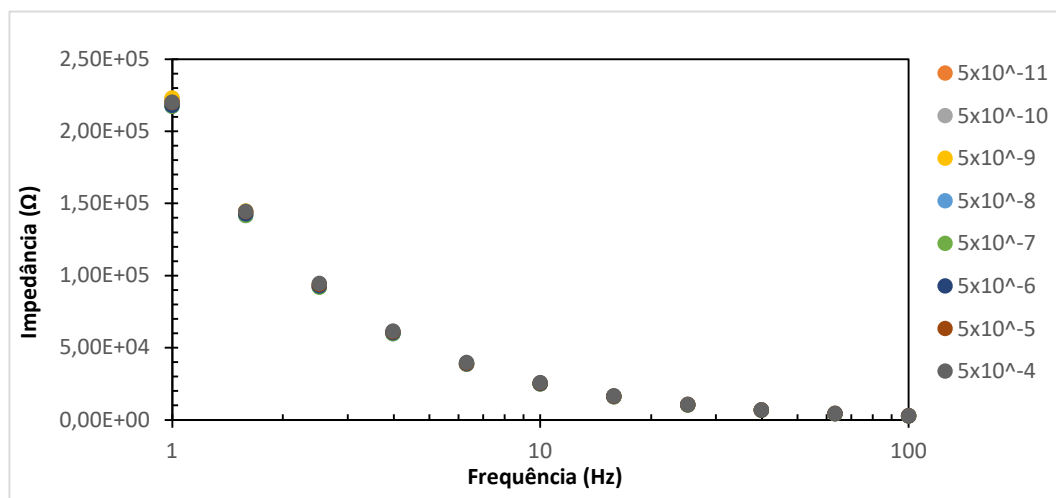
a)



b)



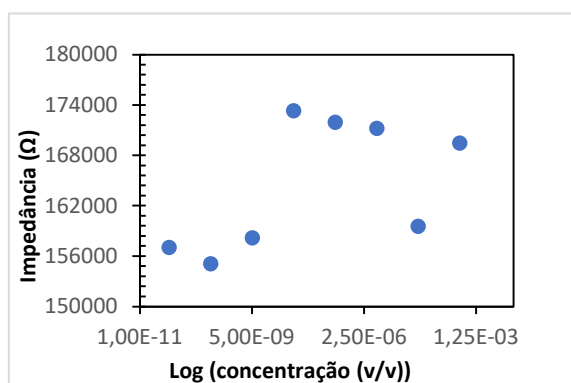
c)



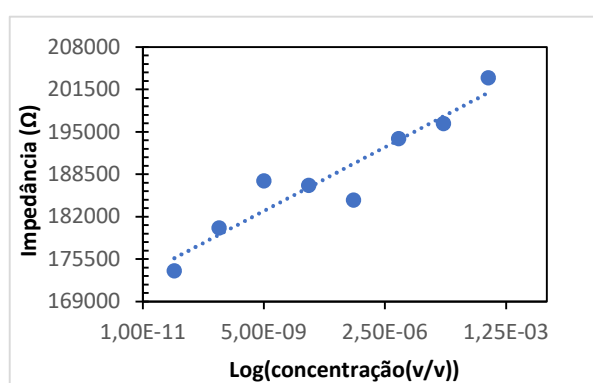
d)

Figura 5.10- Espectro de impedância dos 4 sensores quando imersos em diferentes concentrações de antígeno, **a)** sensor 1, **b)** sensor 2, **c)** sensor 3 e **d)** sensor 4.

Na figura 5.11 é possível verificar a resposta de cada um dos sensores as diferentes concentrações de antígeno, analisando os valores de impedância das mesmas a uma frequência fixa de 1 Hz. O sensor 2 e o sensor 3 são os que, numa primeira análise, parecem ter uma resposta mais linear com o aumento da concentração.



a)



b)

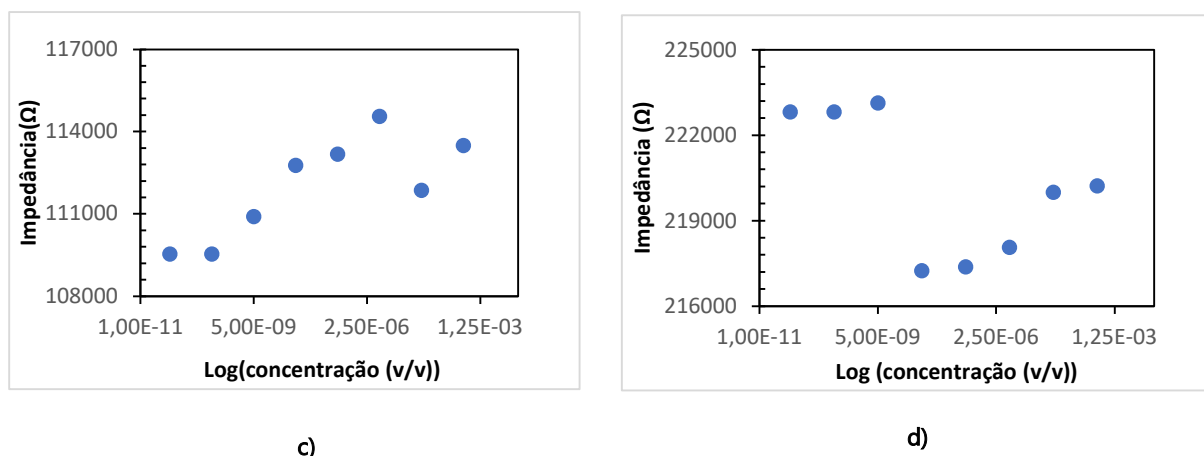
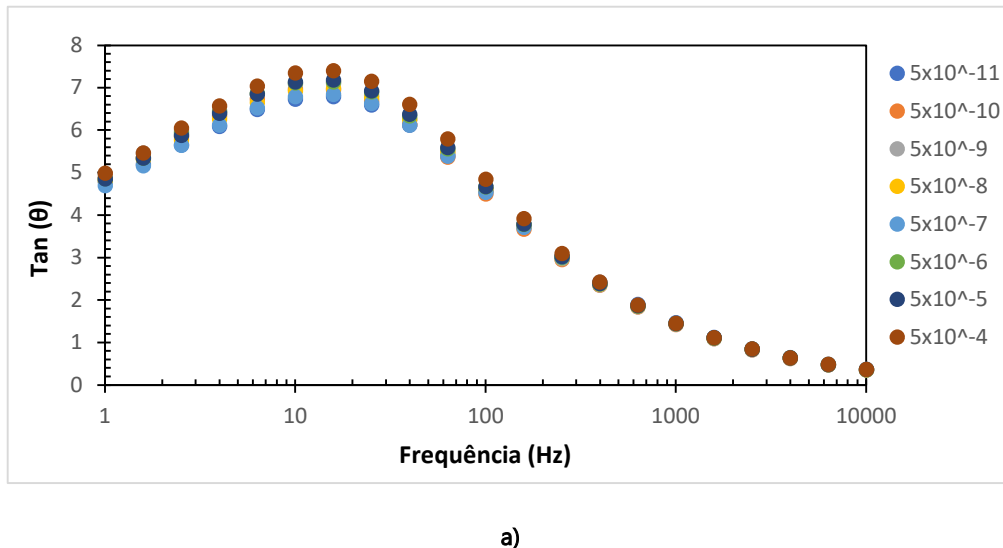
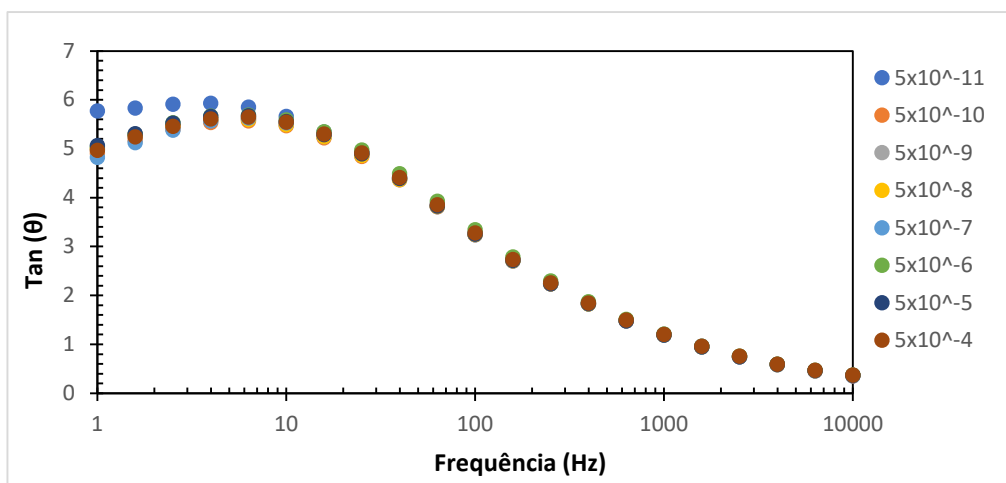


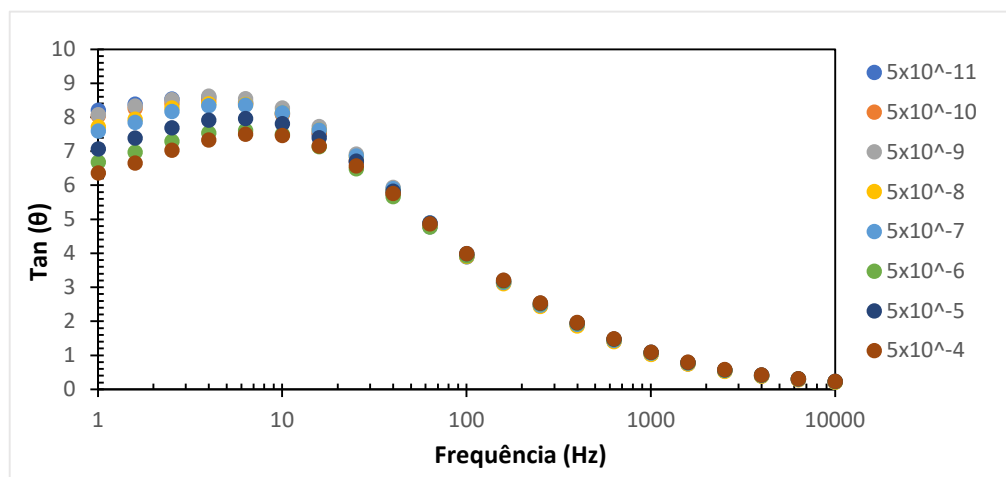
Figura 5.11 - Análise da resposta dos sensores à uma frequência fixa de 1Hz quando imersos nas diferentes concentrações de antígeno, **a)** sensor 1, **b)** sensor 2, **c)** sensor 3 e **d)** sensor 4.

De seguida fez-se o mesmo estudo através da análise das tangentes de perdas. Analisando as figuras 5.12 a), b), c) e d) é possível observar que para o caso dos sensores 1,3 e 4 a região de maior variabilidade da tangente de perdas corresponde a frequência de 1 Hz e que para o caso do sensor 2 corresponde aos 25 Hz.

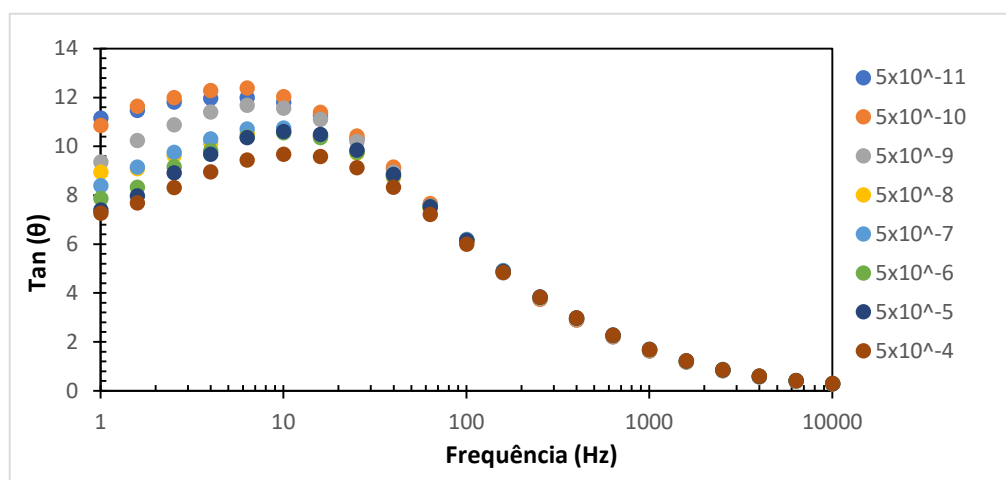




b)



c)



d)

Figura 5.12 - Espectro da tangente de perdas dos vários sensores quando imersos em diferentes concentrações de antígeno, **a)** sensor 1, **b)** sensor 2, **c)** sensor 3 e **d)** sensor 4.

Verificando a resposta de cada um dos sensores (figuras 5.13 a), b), c) e d)) para os valores de frequência acima indicados, chegou-se à conclusão de que os sensores 3,4 e 2 exibem uma maior linearidade com o aumento de concentração.

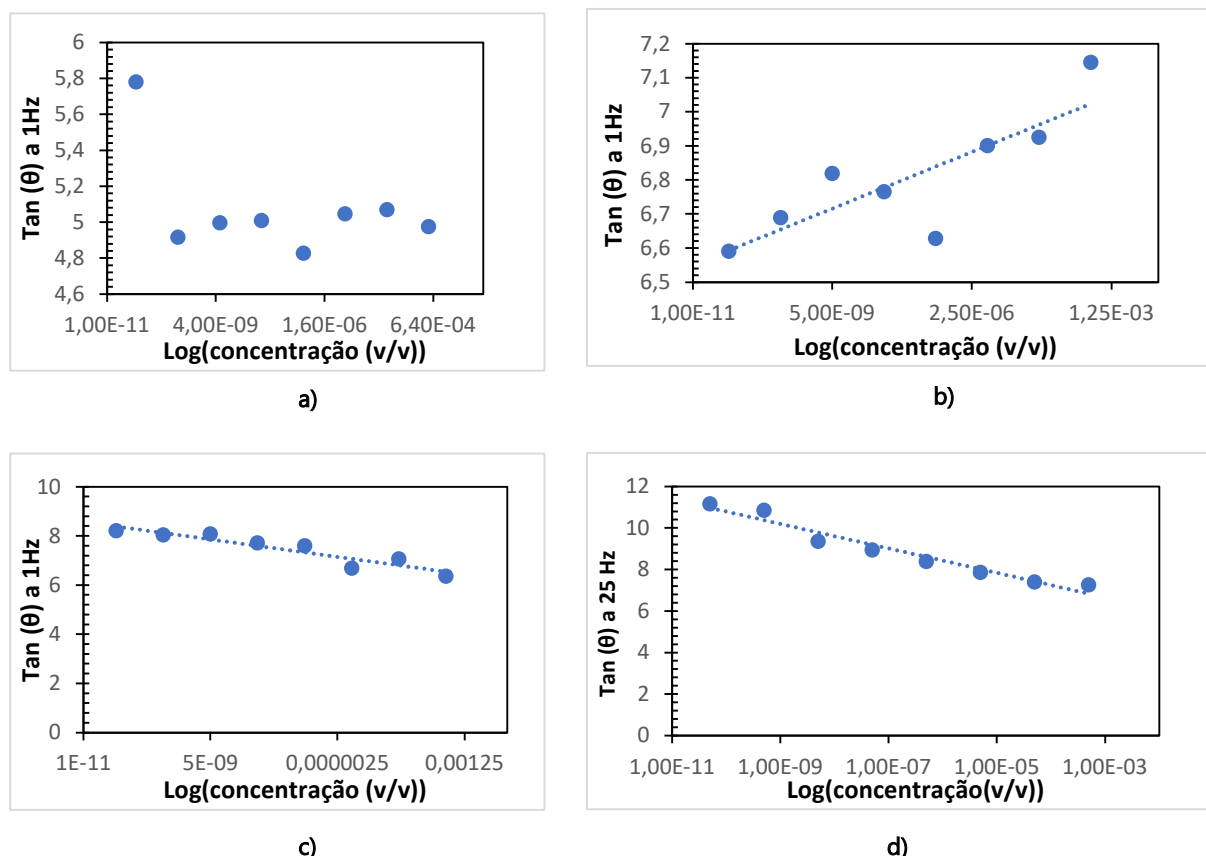


Figura 5.13 - Respostas dos diferentes sensores às diferentes concentrações de antígeno considerando apenas valores de tangente de perdas para uma frequência fixa de 1Hz para o caso dos sensores 1, 3 e 4 e 25 Hz para o caso do sensor 2. **a)** sensor 1, **b)** sensor 2, **c)** sensor 3 e **d)** sensor 4.

Estes resultados permitem-nos concluir que para a Análise em Componentes Principais (PCA), tanto de cada um dos sensores individuais, quanto da língua eletrónica (o conjunto de todos os sensores) é importante considerar uma determinada gama de frequências e não apenas um valor de frequência fixo e, também, que para além de ter em conta os valores de impedância é importante também considerar os valores da tangente de perdas pois, fornece bons resultados.

5.3.3 Análise em Componentes Principais (PCA)

Começou-se por verificar através da PCA se os sensores eram distinguíveis. Através da visualização da figura 5.14 é possível notar que a PC1 separa bem todos os sensores excetuando os sensores 1 e 2. São também os sensores 2, 3 e 4 aqueles que apresentam uma maior linearidade na resposta quando imersos nas diferentes concentrações de antigene (5×10^{-11} à 5×10^{-4} (v/v) por década de concentração). Para além de conseguir distinguir os sensores a PCA também é capaz de distinguir as diferentes concentrações.

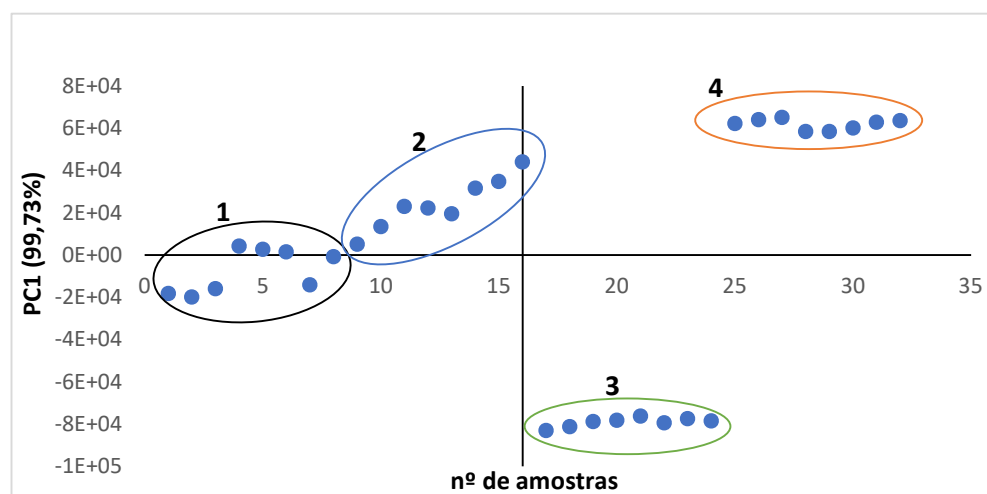


Figura 5.14 - PCA dos 4 sensores quando imersos a diferentes concentrações de antigene. Cada sensor possui 8 pontos referentes as 8 diferentes concentrações de antigene, começando da mais baixa até a concentração mais alta.

Após este passo analisaram-se os resultados para uma língua eletrónica formada pelos 4 sensores e comparou-se com os resultados de uma língua eletrónica formada pelos sensores 2, 3 e 4 (considerado os melhores sensores).

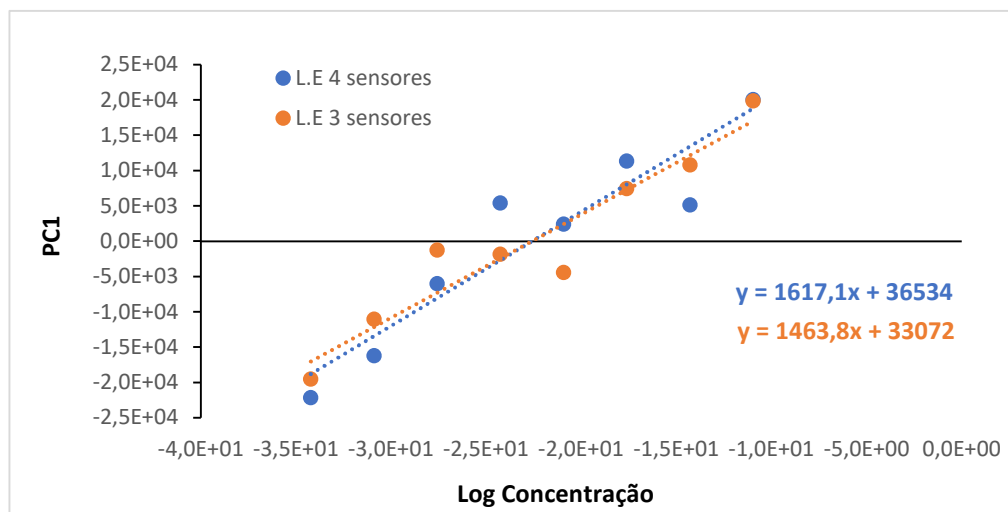


Figura 5.15 - PCA das línguas eletrônicas formadas pelos sensores quando imersos em diferentes concentrações de antígeno, língua eletrônica 4 sensores e língua eletrônica 3 melhores sensores.

Considerando as tendências e padrões das respostas das línguas eletrônicas quando imersos em solução de antígeno (figura 5.15), verifica-se que a língua eletrônica formada pelos 3 melhores sensores apresenta uma maior linearidade (amostras mais juntas à linha de tendência). Sabendo-se que a sensibilidade do sensor é dada pelo declive da reta que se ajusta ao gráfico dos dados é possível verificar que a língua eletrônica formada pelos 4 sensores possui uma sensibilidade maior, $S = 1617 \pm 247$ e que a língua eletrônica formada pelos 3 melhores sensores possui uma sensibilidade, $S = 1463 \pm 190$. Apesar de possuir uma sensibilidade maior possui uma incerteza relativa de 15,3% em comparação aos 13% da língua eletrônica formada pelos 3 melhores sensores, o que do ponto de vista laboratorial e hospitalar o uso da 2ª língua eletrônica é mais viável.

A figura 5.16 representa uma PCA a duas dimensões aplicada à LE com os 3 melhores sensores.

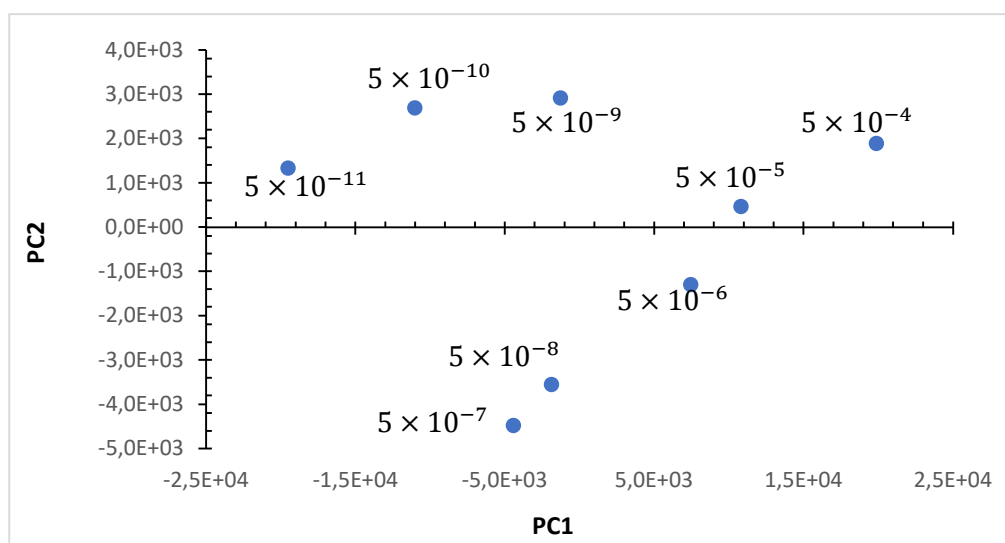


Figura 5.16 - Representação da relação entre a concentração de antígeno (v/v) e as componentes principais PC1 e PC2 da L.E formada pelos 3 melhores sensores.

Podemos observar que o PC1 apresenta uma tendência de crescimento a medida que a concentração de antígeno aumenta com exceção das concentrações 5×10^{-8} e 5×10^{-7} . O PC2 não apresenta nenhuma relação com a concentração.

Na tabela 5.2 encontra-se sintetizado o estudo comparativo entre a língua eletrônica formada por todos os sensores, considerando os 3 melhores sensores e o melhor sensor (sensor 3), onde são analisados os parâmetros da sensibilidade e resolução. A resolução dos

sensores é a menor quantidade de concentração que os mesmos conseguem discriminar e foi obtido através da seguinte expressão: $\Delta \log(C) = \log(C) - \log(C_i)$, em que C_i corresponde ao valor da concentração mais baixa usada e $\Delta \log(C) = \frac{\text{erro}}{\text{sensibilidade}} = k$. A resolução é dada por $C_i \times 10^k$.

Através da análise dos dados da tabela 5.2 podemos confirmar que o uso de uma matriz de sensores (língua eletrônica), torna os resultados mais robustos do que usando apenas o melhor sensor (sensor 2), pois a incerteza associada a sensibilidade é menor e os valores das resoluções são praticamente iguais. Também conclui-se que os sensores que usam as camadas de filmes finos de polieletrólitos (sensores 1, 2 e 3) possuem maior sensibilidade em relação ao sensor 4 (sem filmes finos de polieletrólitos).

Tabela 5.2 - Resumo comparativo das características de cada um dos sensores, da língua eletrônica formada pelos 4 sensores e da língua eletrônica formada pelos 3 melhores sensores através da análise de parâmetros como a sensibilidade e resolução fornecida a partir do PCA.

Tipo de Sensor	Componente principal	Intervalo de concentração (v/v)	Sensibilidade (por década de concentração)	Resolução
Sensor 1	PC1	$5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-4}$	720 ± 430	$1,98 \times 10^{-10}$
Sensor 2	PC1	$5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-4}$	1440 ± 190	$6,78 \times 10^{-11}$
Sensor 3	PC1	$5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-4}$	190 ± 80	$1,32 \times 10^{-10}$
Sensor 4	PC1	$5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-4}$	162 ± 22	$6,84 \times 10^{-11}$
L.E 4 sensores	PC1	$5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-4}$	1617 ± 247	$7,13 \times 10^{-11}$
L.E 3 melhores	PC1	$5 \times 10^{-11} - 5 \times 10^{-4}$	1463 ± 190	$6,73 \times 10^{-11}$

5.3.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade do sensor foi também analisada. Devido ao atraso de entrega nos materiais este estudo só foi possível ser realizado durante o mês de setembro com as soluções anteriormente usadas uma vez que já não havia material para a produção de soluções novas.

Na figura 5.17 é possível observar os resultados obtidos pela LE inicialmente produzida durante o mês de julho (medida 1) e a LE produzida durante o mês de setembro (medida 2). Pode-se observar que ambas as curvas apresentam o mesmo comportamento (evolução crescente com o aumento da concentração de antígeno), porém houve uma perda de sensibilidade (passou de $S = 1617 \pm 247$ para $S = 48,8 \pm 22$) que poderá estar associado a perda de atividade das biomoléculas usadas na produção dos sensores bem como do uso de novos dispositivos sensores com elétrodos interdigitados.

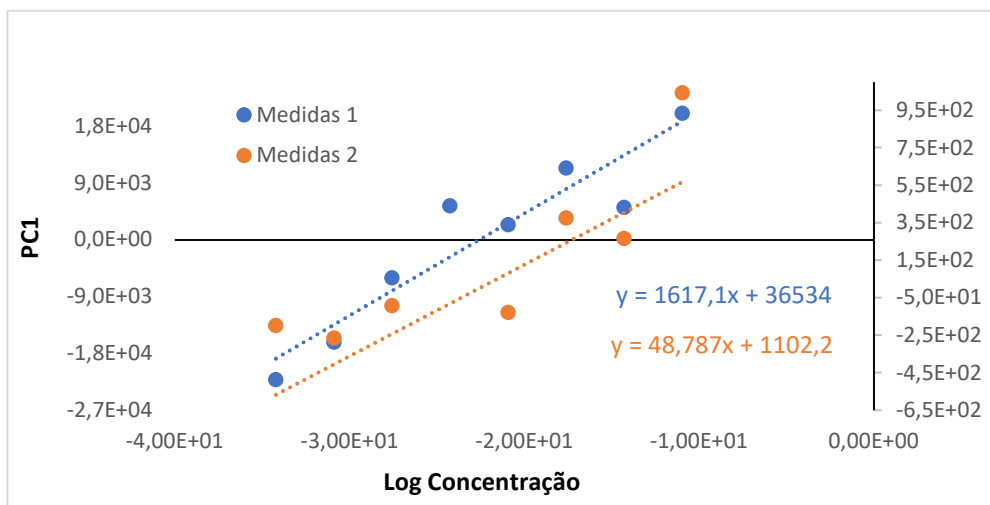


Figura 5.17 - Estudo da reprodutibilidade da Língua eletrônica formada pelos 4 sensores. Medida 1 correspondente a medidas feitas em julho e medida 2 correspondente a medidas feitas durante o mês de setembro.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

6.1 Conclusões

Neste trabalho desenvolveu-se um protótipo de uma língua eletrónica baseada em filmes finos de anticorpos da proteína Stanniocalcina-1 para o diagnóstico do cancro da próstata. Para tal desenvolveu-se uma matriz de sensores capaz de detetar concentrações de antígeno da proteína STC1 na gama de concentrações entre 5×10^{-11} e 5×10^{-4} (v/v).

Os sensores que compuseram a LE foram compostos por filmes finos de diferentes materiais depositados sobre dispositivos sensores com elétrodos interdigitados usando as técnicas de deposição camada – sobre – camada e automontagem. O uso destas técnicas permitiu-nos garantir que as camadas depositadas possuem espessuras na ordem dos nanómetros. Foram produzidos 4 tipos de sensores em que os suportes sólidos com elétrodos interdigitados foram revestidos de filmes finos de (PAH/PSS), (QT/PSS), e (PEI/PSS) e sobre cada um destes sensores foi ainda depositada a proteína A, o bloqueador de superfície BSA e os anticorpos STC1. Por fim o quarto sensor não possuía filmes finos de polieletrólitos, mas possuía a proteína A tiolada, o bloqueador de superfície e os anticorpos.

O crescimento dos filmes de (PAH/PSS), (QT/PSS), e (PEI/PSS) foi analisado por espectroscopia UV- visível em que através da análise de picos específicos no espectro comprovou-se que havia formação das várias bicamadas de filmes finos de polieletrólitos e que o crescimento destes filmes é proporcional ao número de bicamadas depositadas o que garante um controlo da espessura das camadas. Também se estudou a dessorção dos filmes finos em diferentes concentrações de PBS (1 M, 0,1 M e 0,01 M) uma vez que, para a produção das soluções das outras biomoléculas era necessário o uso do PBS de forma a garantir um pH estável aumentando assim a eficiência dos mesmos. Concluiu-se que para filmes finos de (PAH/PSS) houve uma dessorção e que o mesmo é tanto maior quanto maior for a concentração de PBS quando expostos durante 1h ao PBS. Para os filmes de (PEI/PSS) houve uma menor dessorção que os restantes filmes finos e esta dessorção mantém-se constante independentemente da concentração de PBS.

Recorreu-se também ao uso da Espectroscopia de Impedância para estudar a formação dos filmes finos dos polieletrólitos sobre os dispositivos sensores com elétrodos interdigitados

e concluiu-se que para os filmes de (PAH/PSS) e (QT/PSS) após a adsorção dos filmes finos houve um aumento da impedância ao longo de todo o espectro, provando que estes compostos possuem baixa condutividade (muito resistivos) e que para os filmes finos de (PEI/PSS) houve uma diminuição da impedância.

Todos os sensores demonstraram-se capazes de detetar a concentração de antigene de 5×10^{-4} e que o tempo médio de saturação era de cerca de 20 minutos. Todos os sensores foram capazes de distinguir diferentes concentrações de antigene, apesar dessa distinção ser mais perceptível para determinadas frequências (baixas).

Todo o conjunto de dados obtidos pelos diferentes sensores foi analisado estatisticamente através do método análise em componentes principais (PCA) e o mesmo revelou-se capaz de separar tanto os sensores como as respetivas concentrações com uma variabilidade nos dados de 99%. Os sensores que usam camada de polieletrólitos possuem maior sensibilidade.

Analisando a matriz de sensores (língua eletrónica), esta demonstrou resultados muito interessantes apresentando uma evolução positiva à medida que a concentração de antigene aumentava. A LE formada pelos 4 sensores apresentou uma sensibilidade de 1617 ± 247 e a LE formada pelos 3 melhores sensores uma sensibilidade de 1463 ± 190 , o que demonstra que para fins laboratoriais ou médicos seria mais aconselhável o uso da LE formada pelos 3 melhores sensores visto que, apresenta uma menor incerteza. Fez-se também a comparação deste resultado com o melhor dos sensores e chegou-se a conclusão de que o uso da LE de fato produz resultados mais robustos e credíveis. Finalmente, os resultados obtidos permitem concluir que este protótipo pode avançar para a fase de calibração com amostras reais.

6.2 Limitações e perspetivas futuras

Dada a dificuldade no controlo da temperatura e sabendo que os anticorpos e antigenes devem estar sempre armazenados a baixas temperaturas, a criação de um sistema de controlo de temperatura demonstra-se ser crucial para a obtenção de melhores resultados. Também seria interessante fazer novos estudos da reprodutibilidade dos sensores.

Em termos de técnicas de deposição dos filmes finos podia-se usar outras técnicas como MIPs (*molecularly imprinted polymers*), pois esta técnica permite um controlo uma grande seletividade para as moléculas adsorvidas e os filmes são também de espessura controlada e reprodutíveis. Os filmes deveriam também ser caracterizados por microscopia de força atómica.

Em relação a proteína STC1 a recolha de dados de concentração no tecido (criação de uma base de dados) e o respetivo relacionamento com os diversos estágios de evolução do cancro da próstata seria importante para perceber que intervalo de concentração de antígeno usar nos sensores desenvolvidos e como os resultados obtidos a partir da PCA se relacionam diretamente com o cancro da próstata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Dejous and U. M. Krishnan, "Sensors for Diagnosis of Prostate Cancer: Looking Beyond the Prostate Specific Antigen," *Biosens Bioelectron*, vol. 173, p. 112790, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112790.
- [2] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [3] L. Xin, "Cells of Origin for Cancer: an Updated View from Prostate Cancer," *Oncogene*, vol. 32, no. 32, pp. 3655–3663, Aug. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.541.
- [4] N. Choi, B. Zhang, L. Zhang, M. Ittmann, and L. Xin, "Adult Murine Prostate Basal and Luminal Cells Are Self-Sustained Lineages that Can Both Serve as Targets for Prostate Cancer Initiation," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 2, pp. 253–265, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.01.005.
- [5] S. Vasto, G. Carruba, G. Candore, E. Italiano, D. di Bona, and C. Caruso, "Inflammation and Prostate Cancer," *Future Oncology*, vol. 4, no. 5, pp. 637–645, Oct. 2008, doi: 10.2217/14796694.4.5.637.
- [6] K. D. Miller *et al.*, "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016," *CA Cancer J Clin*, vol. 66, no. 4, pp. 271–289, Jul. 2016, doi: 10.3322/caac.21349.
- [7] C. E. DeSantis *et al.*, "Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014," *CA Cancer J Clin*, vol. 64, no. 4, pp. 252–271, Jul. 2014, doi: 10.3322/caac.21235.
- [8] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer Statistics, 2016," *CA Cancer J Clin*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2016, doi: 10.3322/caac.21332.
- [9] D. v. Makarov, S. Loeb, R. H. Getzenberg, and A. W. Partin, "Biomarkers for Prostate Cancer," *Annu Rev Med*, vol. 60, no. 1, pp. 139–151, Feb. 2009, doi: 10.1146/annurev.med.60.042307.110714.

- [10] J.-A. O'Reilly, "Prostate Cancer Detection: Complexities and Strategies," *J Cancer Treatment Diagn*, vol. 2, no. 1, pp. 18–25, Dec. 2017, doi: 10.29245/2578-2967/2018/1.1111.
- [11] S. M. Bruno *et al.*, "PSA Density Help to Identify Patients with Elevated PSA Due to Prostate Cancer Rather Than Intraprostatic Inflammation: A Prospective Single Center Study," *Front Oncol*, vol. 11, May 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.693684.
- [12] C.-S. Chen *et al.*, "PSA Density as a Better Predictor of Prostate Cancer than Percent-Free PSA in a Repeat Biopsy," *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 74, no. 12, pp. 552–555, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.jcma.2011.10.004.
- [13] A. K. Greenberg and M. S. Lee, "Biomarkers for Lung Cancer: Clinical Uses," *Curr Opin Pulm Med*, vol. 13, no. 4, pp. 249–255, Jul. 2007, doi: 10.1097/MCP.0b013e32819f8f06.
- [14] "Biomarkers and Surrogate endpoints: Preferred Definitions and Conceptual Framework," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 69, no. 3, pp. 89–95, Mar. 2001, doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
- [15] S.-J. Chu, J. Zhang, R. Zhang, W.-W. Lu, and J.-S. Zhu, "Evolution and Functions of Stanniocalcins in Cancer," *Int J Immunopathol Pharmacol*, vol. 28, no. 1, pp. 14–20, Mar. 2015, doi: 10.1177/0394632015572745.
- [16] F. Zhao *et al.*, "Expression, Function and Clinical Application of Stanniocalcin-1 in Cancer," *J Cell Mol Med*, vol. 24, no. 14, pp. 7686–7696, Jul. 2020, doi: 10.1111/jcmm.15348.
- [17] F. Chen, Z. Zhang, and F. Pu, "Role of Stanniocalcin-1 in Breast Cancer (Review)," *Oncol Lett*, Aug. 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10777.
- [18] C. Magro, E. P. Mateus, M. Raposo, and A. B. Ribeiro, "Overview of Electronic Tongue Sensing in Environmental Aqueous Matrices: Potential for Monitoring Emerging Organic Contaminants," *Environmental Reviews*, vol. 27, no. 2, pp. 202–214, Jun. 2019, doi: 10.1139/er-2018-0019.
- [19] C. Magro *et al.*, "Polyelectrolyte Based Sensors as Key to Achieve Quantitative Electronic Tongues: Detection of Triclosan on Aqueous Environmental Matrices," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 4, p. 640, Mar. 2020, doi: 10.3390/nano10040640.
- [20] P. M. Zagalo, P. A. Ribeiro, and M. Raposo, "Detecting Traces of 17 α -Ethinylestradiol in Complex Water Matrices," *Sensors*, vol. 20, no. 24, p. 7324, Dec. 2020, doi: 10.3390/s20247324.
- [21] B. P. Costa *et al.*, "Stanniocalcin-1 Protein Expression Profile and Mechanisms in Proliferation and Cell Death Pathways in Prostate Cancer," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 502, p. 110659, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.mce.2019.110659.

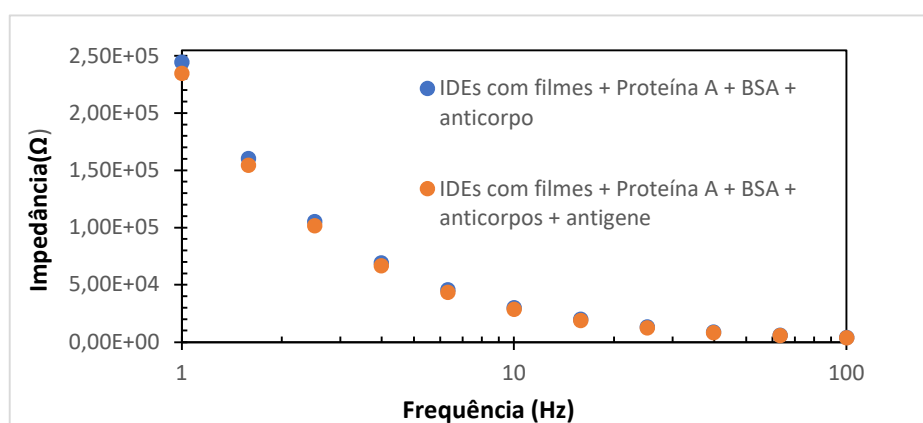
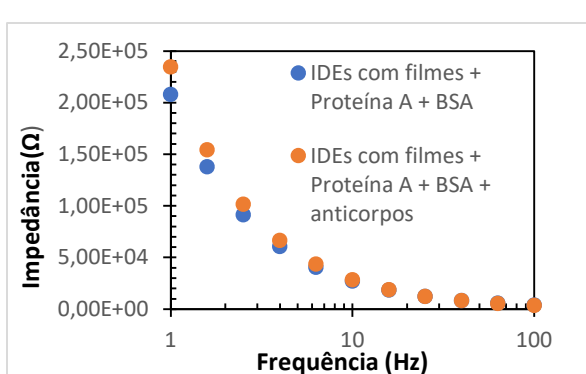
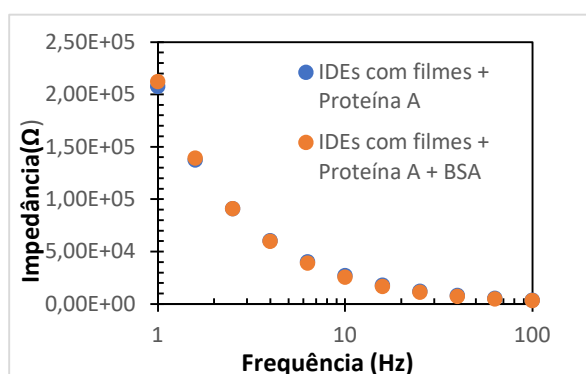
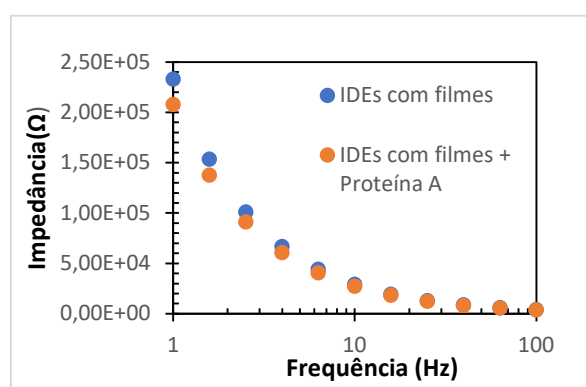
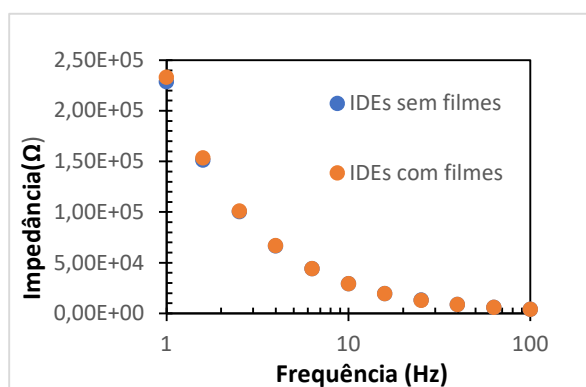
- [22] M. Shen, J. F. Rusling, and C. K. Dixit, "Site-Selective Orientated Immobilization of Antibodies and Conjugates for Immunodiagnosics Development," *Methods*, vol. 116, pp. 95–111, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.ymeth.2016.11.010.
- [23] N. G. Welch, J. A. Scoble, B. W. Muir, and P. J. Pigram, "Orientation and Characterization of Immobilized Antibodies for Improved Immunoassays (Review)," *Biointerphases*, vol. 12, no. 2, p. 02D301, Jun. 2017, doi: 10.1116/1.4978435.
- [24] C. A. Ascoli and B. Aggeler, "Overlooked Benefits of Using Polyclonal Antibodies," *Bio-techniques*, vol. 65, no. 3, pp. 127–136, Sep. 2018, doi: 10.2144/btn-2018-0065.
- [25] S. F. Abd Rahman, M. K. Md Arshad, S. C. B. Gopinath, M. F. M. Fathil, F. Sarry, and C. lbau, "Glycosylated Biomarker Sensors: Advancements in Prostate Cancer Diagnosis," *Chemical Communications*, vol. 57, no. 76, pp. 9640–9655, 2021, doi: 10.1039/D1CC03080A.
- [26] E. Simon, "Biological and Chemical Sensors for Cancer Diagnosis," *Meas Sci Technol*, vol. 21, no. 11, p. 112002, Nov. 2010, doi: 10.1088/0957-0233/21/11/112002.
- [27] M. del Valle, "Electronic Tongues Employing Electrochemical Sensors," *Electroanalysis*, p. n/a-n/a, Jul. 2010, doi: 10.1002/elan.201000013.
- [28] A. Riul *et al.*, "Artificial Taste Sensor: Efficient Combination of Sensors Made from Langmuir–Blodgett Films of Conducting Polymers and a Ruthenium Complex and Self-Assembled Films of an Azobenzene-Containing Polymer," *Langmuir*, vol. 18, no. 1, pp. 239–245, Jan. 2002, doi: 10.1021/la011017d.
- [29] L.-G. Zamfir, M. Puiu, and C. Bala, "Advances in Electrochemical Impedance Spectroscopy Detection of Endocrine Disruptors," *Sensors*, vol. 20, no. 22, p. 6443, Nov. 2020, doi: 10.3390/s20226443.
- [30] J. Tan and J. Xu, "Applications of Electronic Nose (e-nose) and Electronic Tongue (e-tongue) in Food Quality-Related Properties Determination: A Review," *Artificial Intelligence in Agriculture*, vol. 4, pp. 104–115, 2020, doi: 10.1016/j.aiia.2020.06.003.
- [31] J. T. la Belle, J. Q. Gerlach, S. Svarovsky, and L. Joshi, "Label-Free Impedimetric Detection of Glycan–Lectin Interactions," *Anal Chem*, vol. 79, no. 18, pp. 6959–6964, Sep. 2007, doi: 10.1021/ac070651e.
- [32] J. Hirabayashi, M. Yamada, A. Kuno, and H. Tateno, "Lectin Microarrays: Concept, Principle and Applications," *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 10, p. 4443, 2013, doi: 10.1039/c3cs35419a.

- [33] T. Bertok *et al.*, "Label-free Detection of Glycoproteins by the Lectin Biosensor down to Attomolar Level Using Gold Nanoparticles," *Talanta*, vol. 108, pp. 11–18, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.talanta.2013.02.052.
- [34] S. Sadhasivam, J.-C. Chen, S. Savitha, F.-H. Lin, Y.-Y. Yang, and C.-H. Lee, "A Real Time Detection of the Ovarian Tumor associated Antigen 1 (OVTA 1) in Human Serum by Quartz Crystal Microbalance Immobilized with Anti-OVTA 1 Polyclonal Chicken IgY Antibodies," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, no. 7, pp. 2073–2078, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.msec.2012.05.043.
- [35] S. Gao, J. M. Guisán, and J. Rocha-Martin, "Oriented Immobilization of Antibodies onto Sensing Platforms - A critical review," *Anal Chim Acta*, vol. 1189, p. 338907, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.aca.2021.338907.
- [36] R. Caroselli, J. García Castelló, J. Escorihuela, M. Bañuls, Á. Maquieira, and J. García-Rupérez, "Experimental Study of the Oriented Immobilization of Antibodies on Photonic Sensing Structures by Using Protein A as an Intermediate Layer," *Sensors*, vol. 18, no. 4, p. 1012, Mar. 2018, doi: 10.3390/s18041012.
- [37] M. G. Rasteiro, F. A. P. Garcia, P. J. Ferreira, E. Antunes, D. Hunkeler, and C. Wandrey, "Flocculation by Cationic Polyelectrolytes: Relating Efficiency with Polyelectrolyte Characteristics," *J Appl Polym Sci*, p. NA-NA, 2010, doi: 10.1002/app.31903.
- [38] J. D. Mendelsohn, C. J. Barrett, V. v. Chan, A. J. Pal, A. M. Mayes, and M. F. Rubner, "Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers," *Langmuir*, vol. 16, no. 11, pp. 5017–5023, May 2000, doi: 10.1021/la000075g.
- [39] K. Sivaselvi and P. Ghosh, "Characterization of Modified Chitosan Thin Film," *Mater Today Proc*, vol. 4, no. 2, pp. 442–451, 2017, doi: 10.1016/j.matpr.2017.01.043.
- [40] J. M. Fowler, M. C. Stuart, and D. K. Y. Wong, "Self-Assembled Layer of Thiolated Protein G as an Immunosensor Scaffold," *Anal Chem*, vol. 79, no. 1, pp. 350–354, Jan. 2007, doi: 10.1021/ac061175f.
- [41] P. F. S. Palma *et al.*, "STC1 and PTHrP Modify Carbohydrate and Lipid Metabolism in Liver of a Teleost Fish," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-36821-2.
- [42] V. Schein *et al.*, "Four Stanniocalcin Genes in Teleost Fish: Structure, Phylogenetic Analysis, Tissue Distribution and Expression During Hypercalcemic Challenge," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 175, no. 2, pp. 344–356, 2012, doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.033.
- [43] I. S. dos Santos-Neto *et al.*, "Interdigitated Electrode for Electrical Characterization of Commercial Pseudo-Binary Biodiesel–Diesel Blends," *Sensors*, vol. 21, no. 21, p. 7288, Nov. 2021, doi: 10.3390/s21217288.

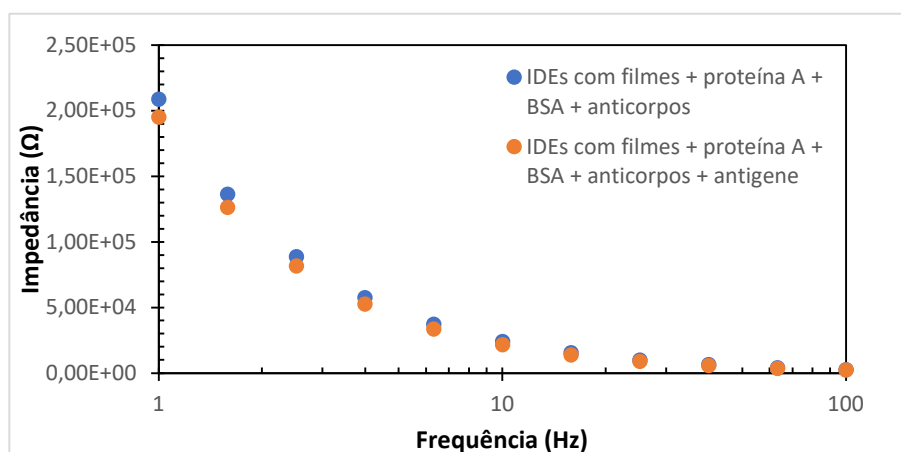
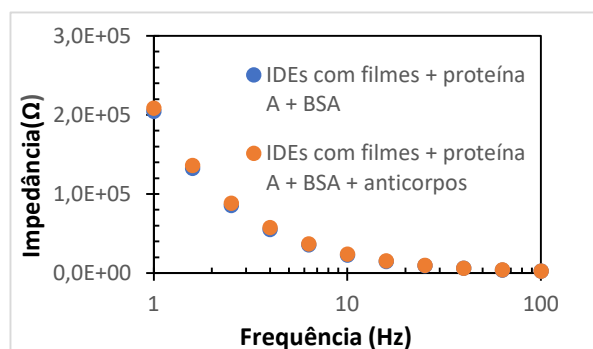
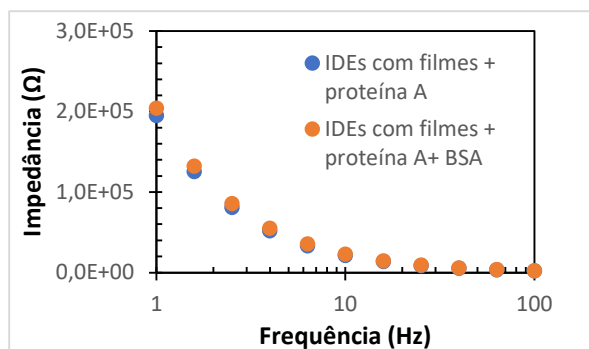
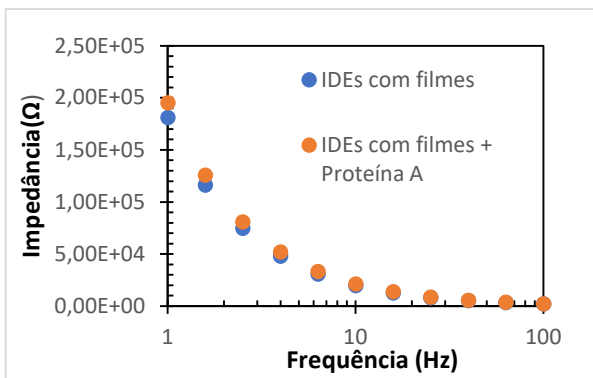
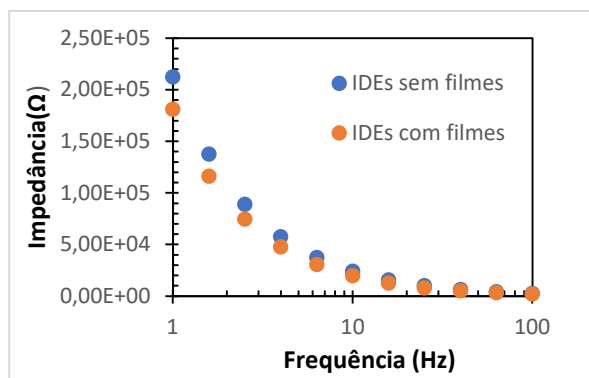
- [44] R. R. Khan and S. W. Kang, "Highly Sensitive Multi-Channel IDC Sensor Array for Low Concentration Taste Detection," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 6, pp. 13201–13221, Jun. 2015, doi: 10.3390/s150613201.
- [45] A. Jilani, M. S. Abdel-wahab, and A. H. Hammad, "Advance Deposition Techniques for Thin Film and Coating," in *Modern Technologies for Creating the Thin-film Systems and Coatings*, InTech, 2017. doi: 10.5772/65702.
- [46] W.-S. Jang, I. Rawson, and J. C. Grunlan, "Layer-by-Layer Assembly of Thin Film Oxygen Barrier," *Thin Solid Films*, vol. 516, no. 15, pp. 4819–4825, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.tsf.2007.08.141.
- [47] P.-G. Su and Y.-S. Chuang, "Flexible H₂ Sensors Fabricated by Layer-by-Layer Self-Assembly Thin Film of Multi-Walled Carbon Nanotubes and Modified in Situ with Pd Nanoparticles," *Sens Actuators B Chem*, vol. 145, no. 1, pp. 521–526, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.snb.2009.12.068.
- [48] Z. Wang *et al.*, "Layer-by-Layer Self-Assembled Nanostructured Electrodes for Lithium-Ion Batteries," *Small*, vol. 17, no. 6, p. 2006434, Feb. 2021, doi: 10.1002/smll.202006434.
- [49] Q. A. T. Ferreira, "Estudo da Formação de Filmes Nanoestruturados para Aplicação em Fotónica," Ph.D. Dissertation, DF, FCT-UNL, Almada, PT, 2007.
- [50] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology," *Chem Rev*, vol. 105, no. 4, pp. 1103–1170, Apr. 2005, doi: 10.1021/cr0300789.
- [51] F. S. Rocha, A. J. Gomes, C. N. Lunardi, S. Kaliaguine, and G. S. Patience, "Experimental Methods in Chemical Engineering: Ultraviolet Visible Spectroscopy-UV-Vis," *Can J Chem Eng*, vol. 96, no. 12, pp. 2512–2517, Dec. 2018, doi: 10.1002/cjce.23344.
- [52] P. M. Zagalo, P. A. Ribeiro, and M. Raposo, "Effect of Applied Electrical Stimuli to Interdigitated Electrode Sensors While Detecting 17 α -Ethinylestradiol in Water Samples," *Chemosensors*, vol. 10, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.3390/chemosensors10030114.
- [53] I. C. G. Marques, "Desenvolvimento de um Sensor de Triclosan em Meio Aquoso Complexo," M.S. thesis, DF, FCT-UNL, Almada, PT, 2016.
- [54] S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi, "Principal Component Analysis," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 2, no. 1–3, pp. 37–52, Aug. 1987, doi: 10.1016/0169-7439(87)80084-9.
- [55] I. T. Jolliffe and J. Cadima, "Principal Component Analysis: a Review and Recent Developments," *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and*

- Engineering Sciences*, vol. 374, no. 2065, p. 20150202, Apr. 2016, doi: 10.1098/rsta.2015.0202.
- [56] Q. Ferreira *et al.*, "Determination of Degree of Ionization of Poly(Allylamine Hydrochloride) (PAH) and Poly[1-[4-(3-Carboxy-4 Hydroxyphenylazo)Benzene Sulfonamido]-1,2-ethanediyl, Sodium Salt] (PAZO) in Layer-by-Layer Films Using Vacuum Photoabsorption Spectroscopy," *Langmuir*, vol. 29, no. 1, pp. 448–455, Jan. 2013, doi: 10.1021/la304036h.
- [57] Alarcón, F., Pérez, E., & Gama Goicochea, A., "Dissipative Particle Dynamics Simulations of Weak Polyelectrolyte Adsorption on Charged and Neutral Surfaces as a Function of the Degree of Ionization", *Soft Matter*, vol. 9, no. 14, pp. 3777–3788, 2013, <https://doi.org/10.1039/c2sm27332b>.
- [58] H. Manap *et al.*, "Amonia Detection in the UV Region Using an Optical Fiber Sensor", Presented at the IEEE Sensor 2009, Christchurch, New Zealand, 2009, doi:10.1109/icsens.2009.5398215.
- [59] X. Zhu, F. Tang, T. S. Suzuki, and Y. Sakka, "Role of the Initial Degree of Ionization of Polyethylenimine in the Dispersion of Silicon Carbide Nanoparticles," *National Institute for Materials Science*, vol. 86, no. 1, pp. 189–191, 2003, doi:10.1111/j.1151-2916.2003.tb03302.x.
- [60] M. Gierszewska and J. Ostrowska-Czubenko, "Equilibrium Swelling Study of Crosslinked Chitosan Membranes in Water, Buffer and Salt Solutions," *Prog Chem Appl Chitin Deriv*, vol. 21, pp. 55–62, 2016, doi: 10.15259/PCACD.21.05.
- [61] M. Raposo, "Tecnologia de Superfícies e Interfaces: Heteroestruturas Orgânicas como Sistemas Moleculares Funcionais," DF/FCT/UNL, Campus de Caparica, 2021.
- [62] J. B. Marroquin, K. Y. Rhee, and S. J. Park, "Chitosan Nanocomposite Films: Enhanced Electrical Conductivity, Thermal Stability, and Mechanical Properties," *Carbohydr Polym*, vol. 92, no. 2, pp. 1783–1791, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.042.

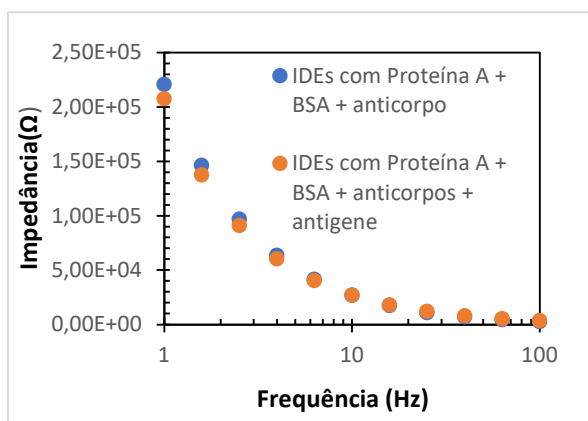
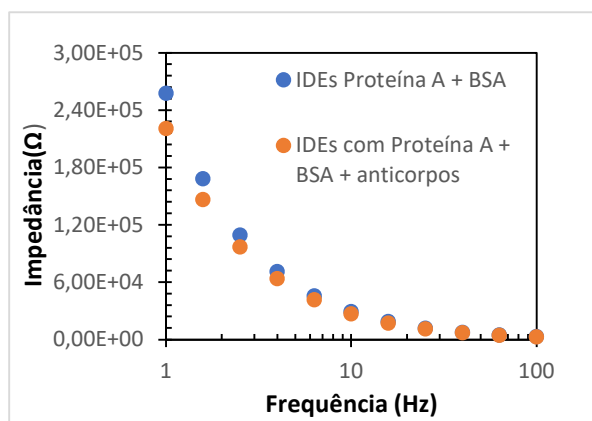
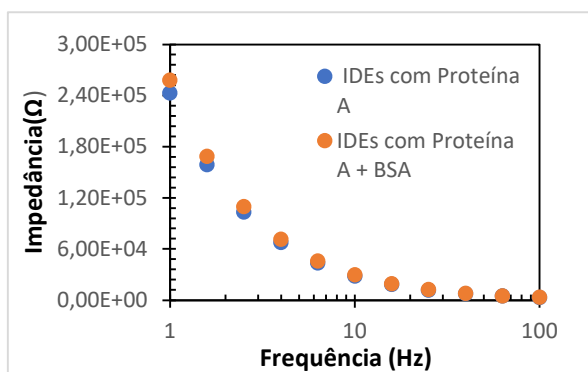
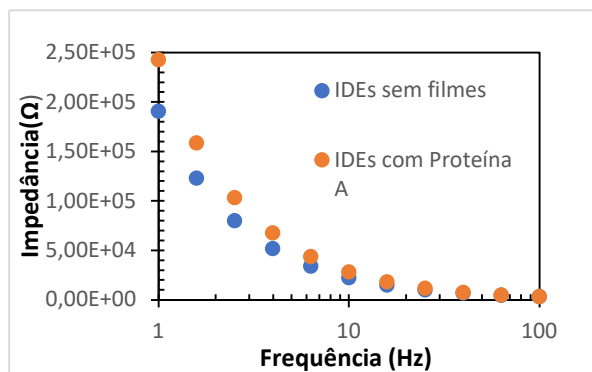
8.1 Sensor 2



8.2 Sensor 3



8.3 Sensor 4





2022

RENATO FERREIRA

NANOSSENSORES BASEADOS EM ANTICORPOS DA PROTEÍNA
STANNIOCALCINA – 1 PARA DIAGNÓSTICO DO CANCRO DA PRÓSTATA