



Universidade de Aveiro
2014

Departamento de Química

ALEXANDRA RAQUEL TAVARES DOS SANTOS **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR PARA UM BIOMARCADOR DO CANCRO DA MAMA**

DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR A BIOMARKER IN BREAST CANCER



Universidade de Aveiro
2014

Departamento de Química

**ALEXANDRA
RAQUEL TAVARES
DOS SANTOS** **DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR
PARA UM BIOMARCADOR DO CANCRO DA
MAMA**

**DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR FOR A
BIOMARKER IN BREAST CANCER**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Goreti Sales, Professora Adjunta do Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia do Porto, da Doutora Luísa Helguero, Investigadora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Felismina Moreira, Investigadora na unidade de investigação BioMark do Instituto Superior de Engenharia do Porto.

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha irmã e ao David pelo amor e por todo o apoio.

O júri

Presidente

Prof. Doutor Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues
Professor auxiliar com agregação ao departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes
Professor adjunto da Escola superior de tecnologia da saúde do Porto

Prof. Doutor Goreti Sales
Professor Auxiliar do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Agradecimentos

À minha orientadora Prof. Doutora Goreti Sales por ser uma inspiração e ter sempre uma palavra de incentivo, em todos os momentos. Obrigada por todo o tempo de trabalho que me dedicou e me ajudar incondicionalmente.

À Doutora Felismina Moreira por se ter tornado uma amiga, um incentivo e estar sempre disponível e nunca desistir desta dissertação e me ajudar incondicionalmente.

A toda a equipa da BioMark pela ajuda, apoio e carinho desde o início.

À Doutora Luísa Helguero por aceitar fazer parte deste trabalho e pela ajuda e disponibilidade prestada.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade de Aveiro por todo o conhecimento transmitido.

Aos meus pais pela paciência, presença, carinho e noites em claro. Obrigada por todo este investimento e por me deixarem sempre sonhar.

À minha irmã por todo carinho e presença ao longo da minha vida. Sem ti a minha vida não era tão feliz.

Ao David pela dedicação e pelo carinho transmitido ao longo destes anos.

Aos meus melhores amigos por serem o meu pilar, a minha força e a minha alegria.

Palavras-chave

Impressão molecular; Biossensor; Potentiometria; Eléttodos seletivos de ião; Cancro da Mama; Biomarcador; e CA15-3.

Resumo

A presente dissertação apresenta o desenvolvimento de um dispositivo dedicado ao diagnóstico do cancro da mama em *point-of-care* e que foi construído com base na preparação de um novo material biomimético e sua incorporação em membranas poliméricas de poli(cloreto de vinilo), PVC, plastificado, para subsequente deteção potenciométrica. Foi considerado para este estudo o biomarcador de interesse clínico convencional no contexto do cancro da mama, o *Breast Cancer Antigen* (CA15-3).

O desenho do novo material biossensor baseou-se na síntese de anticorpos plásticos por tecnologia de impressão molecular. O anticorpo plástico foi impresso por polimerização em volta da estrutura proteica do CA15-3, atuando este biomarcador como obstáculo ao crescimento da matriz polimérica. O polímero impresso foi obtido por eletropolimerização de pirrol, estabelecida na superfície de vidro condutor (com FTO) com base em voltametria cíclica, que compreendeu 40 ciclos entre -0,2 e 1,0 V. A mistura reacional utilizada continha monómero (pirrol, $5,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e proteína molde (CA15-3, 100U/mL), preparados em solução de tampão fosfato salino, com pH 7,2 e com 1% de etilenoglicol. O biomarcador foi removido da matriz polimérica por ação proteolítica da proteinase K.

O material biomimético preparado foi aplicado na construção de sensores potenciométricos e testado relativamente à sua afinidade e seletividade de ligação à CA15-3, por avaliação do desempenho analítico dos eléctodos resultantes. Para este efeito, o material biomimético foi disperso em membranas de PVC plastificado, que continham ou não um aditivo iónico lipofílico, e aplicado em suporte condutor sólido. O desempenho analítico foi avaliado inicialmente em meio tampão e posteriormente em soro sintético. As melhores características de resposta analítica em soro sintético foram obtidas com membranas preparadas com material impresso e com aditivo aniónico lipofílico, *tetrakis-4-(Clorofenil)borato*. Os limites de deteção correspondentes foram, em média, 4,6 U/mL de CEA, para uma resposta linear a partir de 5,4 U/mL e uma sensibilidade catiónica igual a 60,6 mV/década. As análises de soro sintético dopado indicaram resultados exatos e precisos.

Keywords

Molecular imprinting; Biosensor; Potentiometry; Ion-selective electrodes; Breast cancer; Biomarker; and CA15-3.

abstract

This thesis presents the development of a low cost sensor device for the diagnosis of breast cancer in point-of-care, made with new synthetic biomimetic materials that were incorporated in plasticized poly(vinyl chloride), PVC, membranes, for subsequent potentiometric detection. This concept was applied to target a conventional biomarker in breast cancer: *Breast Cancer Antigen* (CA15-3).

The new biomimetic material was obtained by molecularly-imprinted technology. In this, a plastic antibody was obtained by polymerizing around the biomarker that acted as an obstacle to the growth of the polymeric matrix. The imprinted polymer was specifically synthesized by electropolymerization on FTO conductive glass, by using cyclic voltammetry, including 40 cycles within -0.2 and 1.0 V. The solution where the polymerization took place contained monomer (pyrrol, 5.0×10^{-3} mol/L) and protein template (CA15-3, 100U/mL), all prepared in phosphate buffer saline, with a pH of 7.2 and 1% of ethylene glycol. The biomarker was removed from the imprinted sites by proteolytic action of proteinase K.

The biomimetic material was employed in the construction of potentiometric sensors and tested with regard to its affinity and selectivity for binding CA15-3, by checking the analytical performance of the obtained electrodes. For this purpose, the biomimetic material was dispersed in plasticized PVC membranes, including or not a lipophilic ionic additive, and applied on a solid conductive support of graphite. The analytical behavior was evaluated first in buffer and later in synthetic urine. The best analytical performance in buffer was obtained with membranes including biomimetic material and lipophilic anionic additive, *tetrakis-4-(Chlorophenyl)borate*. The average limits of detection were 4.6 U/mL of CEA, with a linear response down to 5.4 U/mL and a cationic slope of 60.6 mV/decade. The analysis of spiked serum samples showed accurate and precise results.

Índice

<i>Índice de Figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>v</i>
<i>Índice de Acrónimos</i>	<i>vi</i>
1. Introdução	1
1.1 Cancro da mama.....	1
1.2 Diagnóstico do cancro da mama.....	2
1.2.1 Biomarcadores circulantes no cancro da mama.....	4
1.2.2. Detecção do biomarcador CA15-3	6
1.3 Polímeros de impressão molecular	8
1.3 Biossensores	13
1.4 Potenciometria	14
1.4.1 Base teórica.....	15
1.4.2 Os elétrodos	16
1.4.3 Características gerais de resposta.....	19
1.4.3 Seletividade.....	21
2. Descrição Experimental	27
2.1 Material e equipamento utilizados	27
2.2 Reagentes e soluções	30
2.3 Preparação do material biomimético	31
2.4 Análise morfológica dos sensores	32
2.5 Preparação das membranas seletivas	32
2.6 Avaliação comparativa dos elétrodos	33
2.7 Seletividade dos elétrodos.....	34
2.8 Análise da amostra.....	35
3. Resultados e Discussão	37
3.1 O material biomimético	37
3.2 Análise de superfície dos materiais sensores	40
3.1 Características Gerais de Funcionamento dos Sensores	44
3.1.1 <i>Calibrações em solução tampão pH 5</i>	40
3.1.2 <i>Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade</i>	47
3.3 Seletividade do sensor	48
3.4 Análise de amostras.....	52
4. Conclusões	55
5. Referências Bibliográficas	57

Índice de Figuras

Figura 1	Síntese do polímero de impressão molecular.	9
Figura 2	Síntese do polímero de impressão molecular em superfície.....	10
Figura 3	Síntese do polímero de impressão molecular em “Bulk”.....	11
Figura 4	Célula eletroquímica de natureza potenciométrica. $E_{ref. Int}$: potencial de contato do eletrodo de referência interno; E_{int} : potencial da fase interna junto da membrana; E_{ext} : potencial da fase externa junto da membrana; $E_{ref. Ext}$: potencial de contato do eletrodo de referência externo; E_j : potencial de junção líquida da ponte salina; E_m : potencial de assimetria da membrana.	15
Figura 5	Representação esquemática de um eletrodo de referência AgCl/Ag de dupla junção.....	17
Figura 6	Representação esquemática de eletrodos de contato líquido (esquerda) ou sólido (direita).....	19
Figura 7	Características gerais da curva de calibração	20
Figura 8	Representação gráfica do tempo de resposta, $t (\Delta E/\Delta t)$, de uma célula de eletrodo selectivo de ião.	21
Figura 9	Efeito da presença de uma espécie interferente na curva de calibração.	23
Figura 10	Fotografia dos eletrodos seletivo (A) e de referência AgCl/Ag (B), ambos preparados no laboratório.	28
Figura 11	Montagem utilizada na leitura potenciométrica, incluindo equipamento de medida e acessórios, como agitador magnético e sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs.....	29
Figura 12	Eletrodos indicadores e de referência, mergulhados na solução para medição de potencial.....	29
Figura 13	Esquema geral de síntese do material impresso.	31
Figura 14	Visão de topo dos eletrodos seletivos de ião, após aplicação da membrana seletiva.....	34
Figura 15	Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [79].....	38
Figura 16	Organização nanoestrutural de polímeros de polipirrol, produzidos com diferentes velocidades de varrimento [79].....	39

Figura 17	Espectros de Raman individuais dos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s, e do material MIP, obtido a 50 mV/s.....	41
Figura 18	Espectros de Raman sobrepostos ao valor máximo de intensidade e com escalas variáveis, relativos aos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s, e ao material MIP, obtido a 50 mV/s.....	42
Figura 19	Espectros sobrepostos e de FTIR/ATR dos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s.....	43
Figura 20	Espectros de FTIR/ATR sobrepostos ao valor máximo de intensidade e com escalas variáveis, dos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s.....	44
Figura 21	Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL.....	47
Figura 22	Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Acetilcolina igual a $8,20 \times 10^{-5}$ g/mL.....	48
Figura 23	Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Creatina igual a $9,30 \times 10^{-5}$ g/mL.....	49
Figura 24	Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Creatinina igual a $1,20 \times 10^{-4}$ g/mL.....	49
Figura 25	Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Glucose igual a $1,05 \times 10^{-2}$ g/mL.....	50
Figura 26	Calibração com concentração de $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL de CA15-3 e $5,0 \times 10^{-4}$ g/mL de Cisteína, em tampão HEPES.....	50
Figura 27	Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Ureia igual a $4,00 \times 10^{-3}$ g/mL.....	51
Figura 28	Calibração dos ESIs em soro sintético, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL.....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1	Marcadores tumorais para deteção do cancro da mama.	5
Tabela 2	Outros biomarcadores promissores na deteção do cancro da mama [11].....	6
Tabela 3	Constituição das membranas seletivas de ião.	33
Tabela 4	Características gerais de funcionamento dos ESIs em tampão HEPES, 1,0×10 ⁻² mol/L.	46
Tabela 5	Valores de limite de deteção de diferentes ESIs na presença de várias espécies interferentes.	51
Tabela 7	Características gerais de funcionamentos dos ESIs em soro sintético.	53

Índice de Acrónimos

AdA	Aditivo aniónico
AdC	Aditivo catiónico
CA15-3	<i>Cancer Antigen</i>
EDMA	<i>Di(meta)acrilato de etileno glicol</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Eléctrodo seletivo de ião
<i>f.e.m.</i>	Força eletromotriz
FET	<i>Field-effect transistors</i>
FTIR	<i>Espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier</i>
FTO	<i>Fluorine doped tin oxide coated glass slide</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfónico
HPLC	<i>High performance Liquid Chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
U/l	<i>Unidade por litro</i>
LD	Limite de deteção
LIRL	Limite Inferior de Resposta Linear
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
MUC1	<i>Mucina 1</i>
NIP	<i>Non-Imprinted Polymer</i>
<i>o</i>NFOE	2-Nitrofeniloctiléter
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCITPB	<i>tetrakis(4-Clorofenil)borato</i>

PEM	<i>Polymorphic Epithelial Mucin</i>
PET	<i>Tomografia por Emissão de Positrões</i>
PoC	<i>Point-of-Care</i>
PPy	<i>Polypirrole</i>
PVC	Poli(cloreto de vinilo)
Py	Pirrol
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
TAC	<i>Tomografia Axial Computorizada</i>
TBO	Brometo de tetraoctilamonio
THF	Tetrahidrofurano
U/ml	<i>Unidade por mililitro</i>

1. Introdução

Neste capítulo são apresentados os vários aspetos teóricos que sustentam o objetivo e o percurso do trabalho realizado ao longo desta dissertação. Para este efeito, focam-se aspetos relacionados com o cancro da mama, bem como o biomarcador que é alvo deste estudo, CA15-3, e a sua importância no contexto clínico do cancro. Numa fase posterior referem-se aos aspetos técnico/científicos relevantes ao desenvolvimento de um biossensor para monitorização do biomarcador alvo.

1.1 Cancro da mama

Um dos tipos mais comuns de cancro a nível mundial é o cancro da mama [1], cuja incidência tende a aumentar na sequência da maior exposição a fatores de risco e do aumento da esperança média de vida [2]. O cancro de mama é um dos mais comuns entre as mulheres, sendo detetados em Portugal cerca de 4500 casos novos por ano, com 1500 mulheres a morrerem da doença anualmente.

A mama é uma glândula que se encontra dividida em vários lobos, por sua vez divididos em lóbulos que contêm grupos de pequenas glândulas capazes de produzir leite. A mama contém também vasos linfáticos, que transportam a linfa e que terminam nos gânglios linfáticos, localizados na região axilar. De uma forma geral, as células que compreendem o tecido mamário estão, como todas as outras, sujeitas a um padrão de regulação inter-celular no que diz respeito ao seu crescimento e à sua multiplicação. Este padrão de regulação permite que algumas células sobrevivam e proliferem e que outras, já danificadas ou em excesso, sofram apoptose ou morte celular programada [3]. As células

do tecido mamário podem no entanto sofrer alterações que permitem escapar a essa regulação inter-celular, levando ao aparecimento de células cancerígenas. São vários os processos associados a esta ocorrência, como mutações permanentes nos genes que regulam a proliferação celular e que podem, por exemplo, originar uma proliferação não controlada de células que contêm essas mesmas mutações e formam uma massa tumoral [4].

A presença de células tumorais cancerígenas constitui na maioria dos casos um perigo para a vida humana. Torna-se, por isso, de extrema importância a detecção de células tumorais na mama ou no tecido mamário, tendo em vista a sua eliminação. Os meios de diagnóstico assumem neste contexto um papel primordial.

1.2 Diagnóstico do cancro da mama

A primeira abordagem para o diagnóstico do cancro da mama é o exame clínico, que consiste na palpação, tendo em vista a detecção de nódulos ou gânglios alterados. Na palpação, os nódulos benignos são diferentes dos cancerígenos. Uma estrutura estranha que na palpação se apresenta macia, lisa, redonda e móvel é, provavelmente, benigna, enquanto uma estrutura dura, com forma estranha e irregular, que se sente presa (ou fixa) dentro da mama é, provavelmente, cancerígena [5].

Existem ainda vários exames complementares ao exame clínico, e que pretendem, no essencial, provar que o cancro existe e onde se encontra. A imagiologia é a metodologia mais usada neste contexto [6] abrangendo várias técnicas como a mamografia, a ecografia, ou a ressonância magnética. A mamografia permanece o método de eleição na detecção imagiológica do cancro da mama, sendo a primeira abordagem de rastreio clínico deste cancro [7]. Por outro lado, a ecografia contribui para a detecção de algumas neoplasias em mulheres jovens, para as quais é o exame de 1ª linha, e é um complemento do exame mamográfico na detecção de cancro em mamas densas sem tradução mamográfica (melhora a sensibilidade e a especificidade ao permitir uma melhor caracterização das lesões detetadas no exame mamográfico) [7]. A ressonância magnética é o método mais sensível na detecção do cancro da mama, mas está associada a muitos falsos positivos [7].

A imagiologia contribui também no diagnóstico definitivo do cancro da mama através da orientação guiada por estereotaxia, por ecografia e por ressonância, para colheita de material biológico para exame citológico e histológico [7]. Incluem-se aqui as punções aspirativas, as microbiópsias e as macrobiópsias. Para além do diagnóstico, a imagiologia tem assumido ainda um papel central e transversal no rastreio populacional, na vigilância de grupos de risco, na avaliação da resposta ao tratamento sistémico e no seguimento pós-tratamento [6].

O material biológico recolhido é sujeito a análise anatomo-patológica, que deverá anteceder qualquer terapêutica. Nesta análise são avaliados tipicamente os recetores de estrogéneos (ER), os recetores de progesterona (PR) e o HER2 (o *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*), tendo em vista identificar o subtipo de cancro em causa [8]. A presença de recetores pode ser identificada como positiva ou negativa para ER/PR, os recetores hormonais que abrem a porta a hormono-terapia, e/ou HER2, o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano, uma proteína transmembranar recetora do fator de crescimento da tirosina que se encontra dispersa na membrana celular. A proteína HER2 tem um papel importante no crescimento e no desenvolvimento de uma vasta categoria de células, como as células do tecido mamário responsáveis pela produção de leite, estando a sobre-expressão deste recetor associada ao cancro da mama denominado HER2 positivo (HER2+).

A identificação da presença/sobre-expressão dos recetores ER, PR e HER2 torna-se assim um eixo fundamental no combate ao cancro da mama, uma vez que estes recetores identificam de forma subtil a alteração molecular associada ao tumor, permitindo assim estabelecer terapias mais dirigidas e eficazes da doença. No entanto, a pesquisa destes recetores em tecidos recolhidos por biopsia constitui uma abordagem invasiva, com riscos para o paciente e com um elevado custo.

Apesar de identificação do subtipo de cancro em causa ser fundamental, a descoberta de recetores moleculares nas células tumorais cancerígenas abriu a porta a uma nova era do diagnóstico. Os avanços tecnológicos no domínio da análise molecular permitiram associar a expressão alterada desses recetores à presença de algumas biomoléculas na circulação sanguínea ou noutros fluidos biológicos como urina ou saliva [9], conduzindo assim a um

diagnóstico (ou prognóstico) não invasivo. Estas biomoléculas tomam a designação genérica de biomarcadores do cancro da mama, uma vez que sinalizam a sua presença.

1.2.1 Biomarcadores circulantes no cancro da mama

Um biomarcador do cancro da mama é uma biomolécula que pode ser quantificável laboratorialmente e atuar como indicador desta doença, sendo especialmente relevante quando se encontra em fluidos biológicos circulantes (de acesso não invasivo) e quando não são detetados em pessoas saudáveis [10]. São vários os biomarcadores que se relacionam com a presença de cancro da mama (Tabela 1), mas nenhum se encontra devidamente validado para rastreio, diagnóstico ou acompanhamento da terapêutica do cancro da mama. A procura por novos biomarcadores é incessante, surgindo continuamente estruturas promissoras na literatura (Tabela 2).

De uma forma geral, o biomarcador sérico mais utilizado no diagnóstico do cancro da mama é o CA15-3, que deteta formas solúveis da mucina MUC1 [11]. Este biomarcador é uma glicoproteína transmembranar expressa pelo gene MUC1, em células epiteliais da mama saudáveis e neoplásicas. A sua utilidade clínica está confinada à medição das formas solúveis da MUC1, que, por se encontrarem na fração externa da membrana plasmática das células neoplásicas, acabam por aparecer na circulação sanguínea após cisão proteolítica. O CA15-3 não é porém adequado à deteção precoce do cancro da mama, porque os seus níveis séricos raramente se encontram aumentados em indivíduos com cancro da mama em estágio inicial ou localizado.

O biomarcador CA15-3 também não é um marcador circulante específico do cancro da mama. Com efeito, indivíduos saudáveis podem apresentar concentrações de CA15-3 elevadas (6% desses indivíduos) e várias doenças benignas (doenças mamárias, hepáticas, bronco-pulmonares, digestivas inflamatórias, endócrinas e auto-imunes) e malignas não mamárias (do ovário, colo-retais, pancreáticas, hepatobiliares, pulmonares, gástricas e tiroideias) podem estar associadas a elevados valores de CA15-3. Os aumentos inespecíficos de CA15-3 estão na origem de uma percentagem significativa de falsos positivos.

Tabela 1 – Marcadores tumorais para deteção do cancro da mama.

Biomarcador	Tipo	Cancro	Fluído	Ref.
CA15-3	Antigénio	Mama, ovário, cólon, pulmão, pâncreas e metástase	Soro	[12-17]
CD-147	Glicoproteína	Mama	Tecido tumoral	[18]
CEA	Antigénio	Metástase mama	Soro	[14, 19, 20]
EGFR	Fator de crescimento	Mama	Soro	[21]
ErbB-2	Oncogene	Mama, ovário, estômago, bexiga e pulmões	RNA circulante	[22]
HER2	Oncogene	Mama	Soro	[23] [21, 24-28]
HER3	Oncogene	Próstata; Ovário; Mama	Soro	[29]
hNAT1	Oncogene	Mama	DNA circulante	[30]
Ki-67 gene	DNA	Mama	DNA circulante	[31]
Mamaglobina	DNA	Mama	Tecido tumoral	[32]
MCF-7	DNA	Mama	DNA circulante	[33]
MCF-7	RNA	Mama	RNA circulante	[34]
MCF-7	Celular	Mama	Tecido	[35]
PKC- α	Proteína	Mama	Tecido tumoral	[36]
TIMP-1	Anticorpo	Mama	Soro	[23]

Cancer Antigen 15-3(CA15-3), cluster of differentiation 147(CD-147), Carcinoembryonic antigen (CEA), epidermal growth factor receptor(EGFR), Human Epidermal growth factor Receptor 2 (ErbB-2 ou HER-2), human epidermal growth factor receptor 3(HER3), human arylamine N-acetyltransferase 1 (hNAT1), Michigan Cancer Foundation-7(MFC-7), Protein kinase C alpha(PKC- α), metalloproteinase inhibitor 1(TIM-1).

A grande utilidade do CA15-3 prende-se essencialmente com o acompanhamento do cancro da mama metastisado, uma vez que a glicoproteína MUC1 desempenha um papel relevante na adesão celular, tendo vindo a ser implicada em vários episódios de metástase [37]. A sua aplicação numa avaliação mais precisa do prognóstico da evolução da doença após cirurgia e/ou terapia é por isso de grande relevância, obviando assim vários estudos imagiológicos e/ou biopsia ou cirurgia [15-17, 38].

Tabela 2 – Outros biomarcadores promissores na detecção do cancro da mama [11].

Biomarcador	Tecnologia usada na descoberta	Tipo de biomolécula
RS/DJ-1	Resposta Humoral/Perfil sérico	Auto-anticorpo/proteína sérica
p53	Resposta Humoral	Auto-anticorpo
HSP60	Resposta Humoral	Auto-anticorpo
HSP90	Resposta Humoral	Auto-anticorpo
<i>Mucin-related</i>	Resposta Humoral	Auto-anticorpo
HER-2/neu	Perfil sérico	Proteína sérica
α -2-HS-glicoprotein	Aspiração fluido mamário	Proteína ductal
Lipofilina B	Aspiração fluido mamário	Proteína ductal
β -Globulina	Aspiração fluido mamário	Proteína ductal
Hemopexina	Aspiração fluido mamário	Proteína ductal
Vitamina D-Prot Binding	Aspiração fluido mamário	Proteína ductal

Heat shock proteins 60(HSP60), Heat shock proteins90 (HPS90), Human Epidermal growth factor Receptor 2(HER-2).

Não existe porém um valor padrão para CA15-3, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias U/mL ou kU/L. O valor limite típico no contexto clínico é de 30 U/ml, podendo variar entre 25 e 35 U/mL [39]. Existem atualmente vários métodos analíticos que permitem a determinação laboratorial deste biomarcador.

1.2.2. Detecção do biomarcador CA15-3

A dosagem do CA15-3 sérico em ambiente hospitalar ou de clínica laboratorial efetua-se por técnicas baseadas em reações anticorpo/antígeno, baseadas comumente no princípio de *sandwich* entre dois anticorpos (um anticorpo fixado ao suporte, tipicamente 115D8, e um anticorpo marcado, DF3). O anticorpo 115D8 é dirigido contra a membrana do glóbulo adiposo do leite humano, sendo obtido a partir de ratos imunizados com membranas de glóbulos de lípidos de leite humano. O anticorpo DF3 é dirigido contra a membrana de células humanas do cancro da mama, sendo obtido a partir de ratos imunizados com um extrato de uma linha celular (MCF-7) de um carcinoma do seio

metastisado humano. O epítoto do anticorpo DF3 encontra-se já identificado, interagindo com a sequência Thr-Arg-Pro-Ala-Gly-Ser.

Existem ainda na literatura métodos separativos ligados à determinação do CA15-3 como *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ou a eletroforese [40-42]. A principal utilização destes métodos prende-se, contudo, com a clarificação estrutural do biomarcador. Independentemente do seu propósito, estas metodologias não são consideradas adequadas ao controlo de rotina devido à impossibilidade de efetuar análises fora do contexto laboratorial, de baixo custo e de baixo impacto ambiental [43].

Efetivamente, a grande maioria dos métodos alternativos descritos baseia-se na reação de afinidade entre anticorpo e antigénio, cuja transdução pode recorrer a técnicas de natureza ótica e/ou eletro-analíticas. Os métodos mais referidos na literatura para este efeito incluem immunoensaios do tipo ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [40, 44], radioimunoensaio (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*) [42], imunocromatografia [36] e *Surface Plasmon Resonance* (SPR) [15]. Alguns dos trabalhos recorrem ainda a dispositivos denominados biossensores, que combinam um elemento de reconhecimento apropriado a um sistema de transdução de sinal ótico/elétrico. Existem ainda vários trabalhos de deteção eletroquímica, nos quais os anticorpos podem ser associados a sistemas enzimáticos, promovendo um ganho de seletividade decorrente da atividade catalítica das enzimas [13, 45, 46]. A associação da deteção eletroquímica com anticorpos a material nucleico encontra-se também patente na literatura [47].

De uma forma geral, o recurso a anticorpos permite que os métodos analíticos sejam no geral muito seletivos, porque se baseiam na interação biológica anticorpo/antigénio (embora a sua seletividade efetiva dependa do grau de afinidade entre o CA15-3 e o anticorpo utilizado). De uma forma geral, o recurso a metodologias com anticorpos pressupõe o desenvolvimento de dispositivos com estabilidade reduzida, uma vez que estes biomateriais requerem condições especiais de armazenagem. Além disso, a variabilidade na resposta pode ser elevada, dependendo essencialmente da origem dos anticorpos utilizados. Os dispositivos resultantes são também caros, em consequência do elevado custo destes materiais biológicos, inviabilizando/limitando assim a sua utilização em programas de rastreio ou em medições de rotina realizadas nos hospitais. Em geral, estas limitações podem ser evitadas através da substituição dos anticorpos naturais por recetores

biomiméticos (também reconhecidos por anticorpos plásticos) e obtidos comumente por técnicas de impressão molecular [48, 49].

Do ponto de vista de detecção, os métodos eletroanalíticos apresentam diversas vantagens comparativamente aos óticos, como: i) resposta rápida para quantidades de analito muito reduzidas; ii) baixo custo e fácil miniaturização, permitindo efetuar análises de campo; e iii) obviar a necessidade de processos de preparação de amostra [50, 51]. Do ponto de vista de desempenho analítico, a potenciometria é, entre as várias técnicas eletroanalíticas, aquela que permite obter gamas de resposta mais alargadas. O sinal baseia-se na medida de diferença de potencial de dois elétrodos mergulhados numa solução e a sua relação com a atividade em espécies iónicas nesta mesma solução em condições de corrente quase nula.

Atualmente, não se encontram referenciados na literatura biossensores potenciométricos para a determinação do biomarcador CA15-3, nem materiais biomiméticos para este biomarcador. Descrevem-se, por isso, de seguida, as técnicas e metodologias necessárias para esta combinação inovadora no contexto do CA15-3.

1.3 Polímeros de impressão molecular

Os polímeros de impressão molecular (do inglês, *molecularly-imprinted polymer*, MIPs) baseiam-se na impressão de locais específicos de reconhecimento numa estrutura polimérica, que permitem orientar a interação de uma molécula alvo para o seu molde, impresso nessa estrutura. Esta orientação é conferida pela formação de um complexo pré-polimérico entre a molécula alvo e os monómeros funcionais que participam na polimerização e dão origem à matriz polimérica (Figura 1). A polimerização conta também com a presença de um excesso de agente de reticulação, tendo em vista a formação de uma rede polimérica tridimensional. Após o processo de polimerização o molde é removido do polímero, deixando locais de reconhecimento específicos, de forma, tamanho e funcionalidade complementares à molécula molde (Figura 1).

Quando a molécula molde é uma proteína, o MIP resultante toma muitas vezes a designação de anticorpo plástico, em analogia à atuação dos anticorpos naturais. De uma forma geral, os anticorpos artificiais não apresentam a especificidade inerente aos

anticorpos naturais, mas são muito mais estáveis (ao longo do tempo e na presença de condições externas agressivas, como uso de temperatura ou reagentes químicos), mais baratos, podendo ainda ser reutilizados em condições específicas.

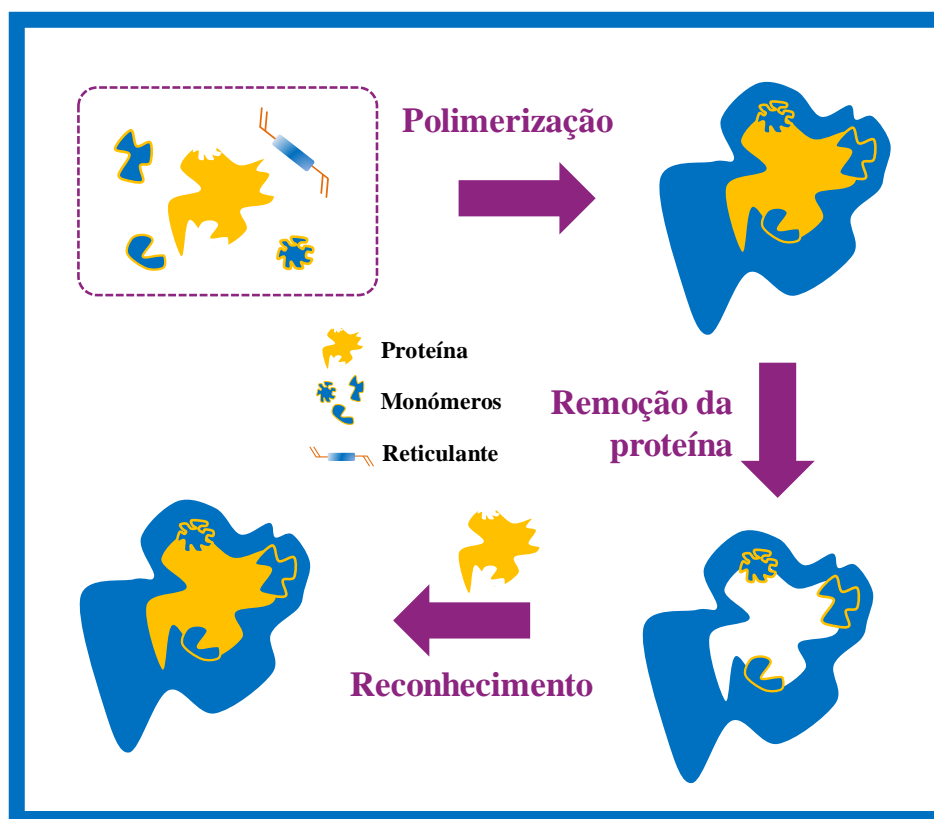


Figura 1 - Síntese do polímero de impressão molecular.

A interação entre a biomolécula impressa e o seu local de ligação no MIP baseia-se primordialmente em interações eletrostáticas, de natureza não covalente, entre os grupos funcionais na superfície externa da proteína e os grupos presentes nas cavidades de reconhecimento, tais como ligações de hidrogénio, forças de *Van der Waals*, ligações iónicas e interações hidrófobas. De uma forma geral, os pontos críticos no processo de impressão de proteínas relacionam-se com a elevada flexibilidade estrutural do composto molde, uma característica que é condição essencial à sua função biológica, e com a sua elevada dimensão.

Do ponto de vista técnico, o MIP pode ser impresso em *bulk* ou em *superfície*, referidos como impressão 3D e 2D, respectivamente. Na polimerização em *bulk* a molécula é aprisionada aleatoriamente na matriz polimérica 3D formada, enquanto na polimerização em superfície a proteína é mantida sobre uma superfície determinada e o polímero cresce em seu redor, formando uma estrutura polimérica 2D. Estes dois tipos de polimerização apresentam vantagens e desvantagens próprias.

A polimerização em *superfície* é particularmente utilizada na preparação de MIPs dirigidos a biomoléculas de grande dimensão [52]. O processo geral associado à sua obtenção encontra-se representado na Figura 2. Este tipo de polimerização permite obter uma elevada densidade de locais de ligação para uma rápida transferência de massa, sendo necessária uma menor quantidade de molécula molde. A eficácia dos locais de ligação depende porém de vários fatores, incluindo a forma como a molécula alvo se liga à superfície recetora, e se expõe para a superfície externa, e a capacidade de controlar a espessura da camada de polímero formada.

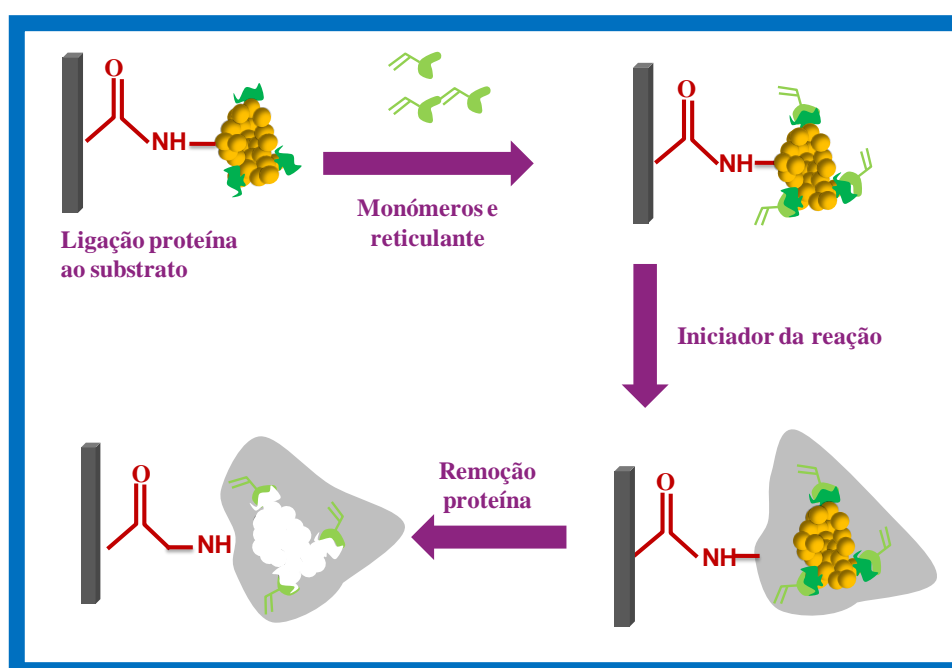


Figura 2 - Síntese do polímero de impressão molecular em superfície.

A polimerização em *Bulk* é sem dúvida a mais convencional, sendo a mais utilizada na produção de MIPs em geral. Esta técnica de polimerização tende a conduzir a grandes quantidades de material biomimético. Tipicamente, a reação de polimerização é iniciada na presença de quantidades iguais de um solvente inerte e um iniciador da reação. Na maioria dos casos, a remoção do molde é feita por extração ou por hidrólise, deixando locais complementares em tamanho e forma da molécula molde. O polímero resultante é, então, pulverizado e peneirado, de modo a produzir partículas de recetores impressos de tamanho apropriado (Figura 3) [53, 54].

Apesar de tecnicamente simples, a polimerização em *bulk* tem a desvantagem de ser demorada, dando origem muitas vezes a partículas de tamanho e forma irregular. Uma outra desvantagem relaciona-se com a destruição dos locais de ligação aquando da moagem da estrutura resultante, o que reduz a eficiência de ligação do material obtido [55]. Em oposição a estas desvantagens, a polimerização em *bulk* permite obter quantidades elevadas de material impresso, sendo fácil de concretizar em contexto laboratorial.

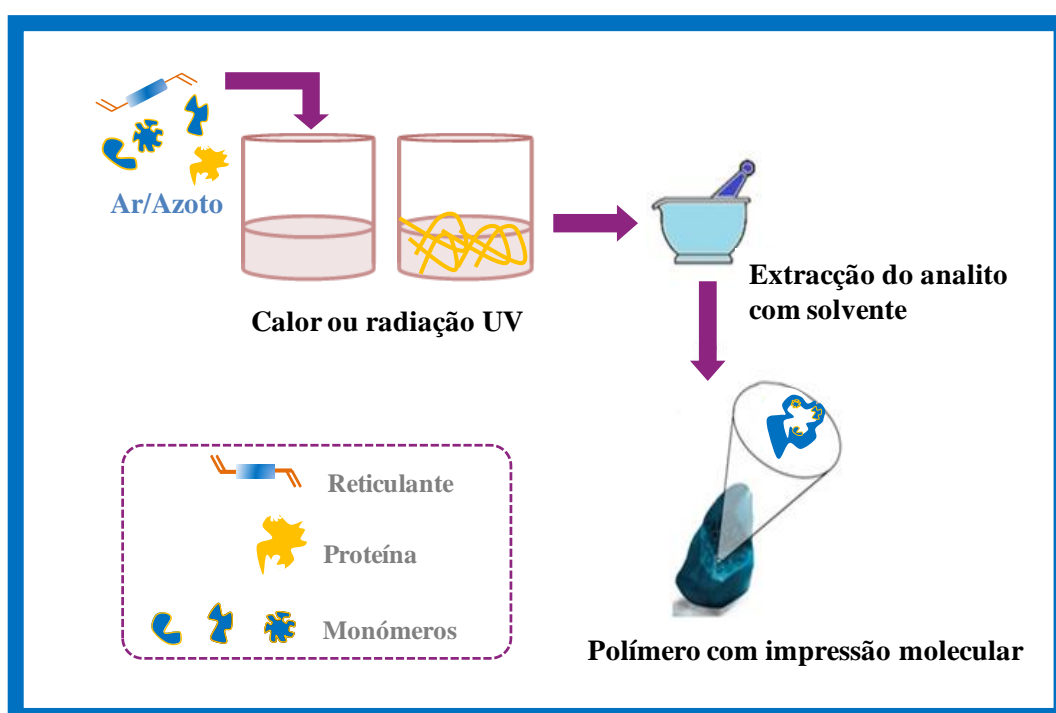


Figura 3 - Síntese do polímero de impressão molecular em “Bulk”.

Do ponto de vista da reação química propriamente dita, os MIP são maioritariamente preparados por *polimerização química*. Neste tipo de polimerização, a reação é desencadeada por uma espécie química externa adicionada ao sistema, tipicamente geradora de radicais. Mais recentemente, tem sido possível estabelecer reações de *polimerização eletroquímica*, nas quais a polimerização se inicia por um estímulo elétrico [56]. A grande vantagem deste tipo de polimerização é requerer uma baixa quantidade de solução de polimerização e permitir uma elevada repetibilidade do processo de polimerização. Do ponto de vista técnico, a polimerização eletroquímica pode decorrer em *bulk* ou em *superfície*. A combinação de *eletropolimerização em bulk* obvia as desvantagens de elevado consumo de reagentes decorrente da *polimerização química em bulk*.

Um dos polímeros mais utilizados no contexto da polimerização eletroquímica é o polipirrol (PPy). As propriedades de reconhecimento da estrutura polimérica resultantes decorrem do aprisionamento de uma espécie iónica no seu interior, gerando canais carregados quando o polímero passa para uma forma não condutora. Esta abordagem tem sido explorada no desenvolvimento de películas impressas baseados em polipirrol super-oxidado, que foram aplicadas com sucesso para a deteção de grandes modelos iónicos [56]. Neste caso concreto, um modelo aniónico é aprisionado dentro do polímero durante a eletropolimerização e a super-oxidação subsequente substitui a etapa de lavagem convencional, pois determina a expulsão do molde e a criação de cavidades complementares dentro do polímero. A super-oxidação remove a carga positiva no polímero através de um mecanismo complexo, permitindo a libertação do molde aniónico. Ao mesmo tempo, a introdução dos grupos carbonilo/carboxílico que contêm oxigénio e conferem propriedades de permeabilidade seletiva sobre a película, contribuem para o reconhecimento seletivo do modelo [56-61].

Neste contexto, a preparação de anticorpos plásticos por *eletropolimerização de polipirrol em bulk* parece ser uma possibilidade a seguir, tendo em vista a preparação de um material biomimético compatível adequado e sensível ao biomarcador CA15-3.

1.3 Biossensores

Um biossensor é um dispositivo bioanalítico que associa um componente biológico para reconhecimento biomolecular, com um componente físico-químico de transdução, que transforma a informação (bio)química num sinal de reconhecimento apropriado. Os biossensores podem ser definidos como dispositivos de *point-of-care* (PoC) podendo ser usados em casa ou no consultório médico [62]. Estes dispositivos apresentam inúmeras vantagens, como a portabilidade, a facilidade de utilização, a rapidez, o baixo custo e os baixos limites de deteção.

Existem vários tipos de biossensores, tipicamente classificados de acordo com o elemento de bioreconhecimento (enzimas, recetores celulares, ácidos nucleicos, microrganismos, anticorpos, e recetores artificiais) ou com o modo de transdução de sinal, variando entre eletroquímico (potenciométricos, amperométricos, condutimétricos/capacitivos e impedimétricos), ótico (colorimétricos, fluorescência, luminescência e interferométricos), calorimétrico (piezoelétrico/ondas acústicas) ou magnético [63]. Os dispositivos mais comuns são os *biossensores enzimáticos* e os *imunossensores* (com anticorpos), associado a transdução de um sinal ótico ou elétrico.

Os *biossensores enzimáticos* apresentam enzimas como elemento de reconhecimento. As enzimas conferem a seletividade desejada à resposta obtida, através da sua atividade catalítica sobre o analito ou sobre um reagente que promove a alteração desejada no sinal do transdutor. Os biossensores enzimáticos apresentam como principal desvantagem a grande dependência da atividade catalítica do meio envolvente, no qual, por exemplo, uma variação de pH ligeira pode condicionar e limitar a atividade catalítica da enzima por restrição/alteração da sua conformação “ativa” [64, 65].

Os *imunossensores* baseiam-se na reação de ligação entre um antigénio e o seu anticorpo [10, 66], recorrendo a condições que permitam a minimização das interações não-específicas do antigénio com a plataforma biossensora. Os mecanismos de deteção da interação entre o antigénio e o anticorpo podem ser diretos ou indiretos, recorrendo a um marcador enzimático acoplado ao anticorpo ou ao antigénio com a finalidade de aumentar a sensibilidade destes imunossensores, exigindo assim etapas de síntese adicionais [10, 65, 67].

Na literatura encontram-se apenas alguns com immunssensores para o CA15-3 [11, 13, 46, 47] sendo a miniaturização destes dispositivos associada a *Ion-Selective Field Effect Transistors* (ISFETs), com transdução voltamétrica e impedimétrica [68]. Estes trabalhos apresentam boas características de resposta, recorrendo a anticorpos como elemento de bioreconhecimento, combinados ou não com sistemas enzimáticos ou proteicos externos.

Do ponto de vista prático, as desvantagens da utilização de elementos de reconhecimento com natureza proteica decorrem essencialmente da sua baixa estabilidade e do seu elevado custo [65, 67]. Os anticorpos plásticos constituem por isso uma alternativa na construção de um biossensor para o CA15-3. Por outro lado a deteção potenciométrica parece mais barata, simples e expedita do que a eletroquímica convencional, recorrendo apenas a material/equipamento corrente de laboratório. Esta abordagem nunca foi tentada no contexto da deteção deste biomarcador do cancro da mama.

1.4 Potenciometria

A potenciometria é uma técnica que estabelece uma relação entre a diferença de potencial de dois elétrodos mergulhados numa mesma solução e a atividade de espécies presentes nessa solução, medida em condições de corrente elétrica quase nula (corrente zero). Em termos práticos, a potenciometria baseia-se na determinação do valor da diferença de potencial entre o elétrodo de referência e o elétrodo indicador, que constituem uma célula eletroquímica (Figura 4).

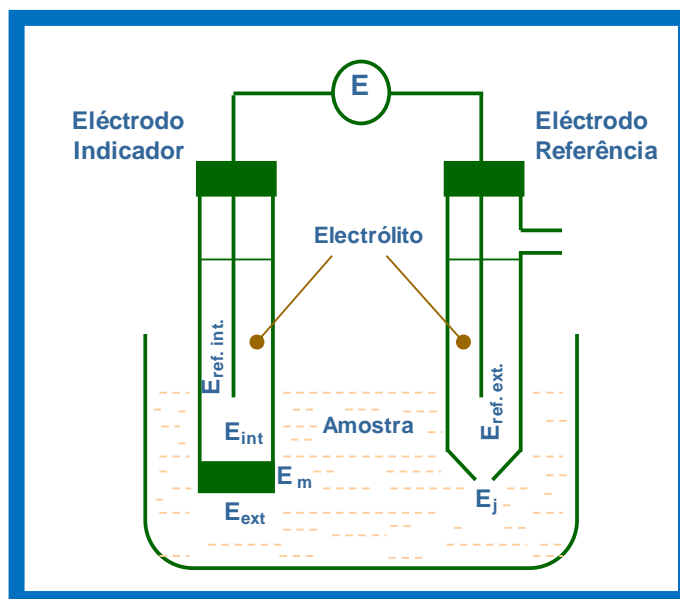


Figura 4- Célula eletroquímica de natureza potenciométrica. $E_{\text{ref. int.}}$: potencial de contato do eléctrodo de referência interno; E_{int} : potencial da fase interna junto da membrana; E_{ext} : potencial da fase externa junto da membrana; $E_{\text{ref. ext.}}$: potencial de contato do eléctrodo de referência externo; E_j : potencial de junção líquida da ponte salina; E_m : potencial de assimetria da membrana.

São exemplos de eléctrodos que variam o potencial de uma membrana e relacionam essa variação de forma previsível com a concentração de uma espécie iónica, os eléctrodos seletivos de ião (ESIs) e os *field-effect transistors* (FET) [65, 67]. Os mais utilizados são os ESIs, sendo o sistema mais comum neste contexto o medidor de pH. Este sistema inclui um potenciômetro ligado a um eléctrodo de vidro combinado, que combina numa única unidade os eléctrodos indicador (seletivo à espécie H^+) e de referência.

1.4.1 Base teórica

De acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), 1994, o ESI é um sensor eletroquímico, baseado num pequeno filme ou numa membrana seletiva como elemento de reconhecimento, sem envolvimento de reacção redox [69].

As diferenças de potencial obtidas são medidas entre dois eléctrodos (ESI *versus* eléctrodo de referência “externo”) e variam linearmente com logaritmo da actividade de um dado ião em solução (medido pelo ESI), de acordo com a equação 1.1, a equação *Nernst-Nicolski* (E : valor experimental de potencial de um ESI (mV); R : constante dos gases

perfeitos, $8.3144 \text{ J}/(\text{K}\times\text{mol})$; T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, $9.64846\times 10^4 \text{ C/mol}$; z_A : carga do ião principal; a_A : atividade do ião principal, mol/L ou mol/kg; “constante”: inclui o potencial normal do eletrodo seletivo, o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV).

$$\Delta E = \text{“Constante”} + \frac{2,303RT}{z_A F} \times \log a_A \quad (1.1)$$

1.4.2 Os eletrodos

Tal como referido anteriormente, a célula potenciométrica compreende dois eletrodos: um eletrodo de referência, cujo potencial de mantém constante, e um eletrodo indicador (ou ESI), cujo potencial varia com a concentração da espécie iónica para o qual é sensível ou seletivo.

1.4.2.1 Eletrodo de referência

O eletrodo de referência deve manter um valor de potencial constante durante as medidas experimentais, ser reversível e obedecer à equação de Nernst. Deve ainda ser de fácil preparação e construção; apresentar baixa histerese (baixa dependência relativamente à temperatura) e baixa polarizabilidade (baixa dependência da corrente que passe pelo eletrodo).

O eletrodo de cloreto de prata/prata (AgCl/Ag) é o eletrodo de referência mais utilizado na atualidade, sobretudo devido à simplicidade da sua construção, que envolve materiais de baixo custo. Estes eletrodos são constituídos por um fio de prata recoberto com cloreto de prata e em contacto com uma solução de anião cloreto, cuja concentração é conhecida e dever ser constante ao longo do tempo.

Do ponto de vista das reações envolvidas na formação de potencial, o eletrodo de AgCl/Ag é denominado de eletrodo de segunda espécie, uma vez que o potencial gerado depende da concentração de cloreto [70]. Esta concentração controla a concentração disponível de Ag^+ , de acordo com o equilíbrio químico relativo ao produto de solubilidade de AgCl, e que na realidade é a espécie que determina o potencial do eletrodo (Ag/Ag⁺).

A manutenção do valor de concentração de cloreto em contacto com o fio de Ag recoberto de AgCl é por isso determinante para o bom desempenho do eléctrodo de referência. Uma das estratégias mais utilizadas para este efeito é a introdução de um compartimento externo, que evita o contacto directo entre a solução teste e o eléctrodo de referência (Figura 5). Este eléctrodo é também chamado de dupla junção, uma vez que há uma primeira junção eléctrica a separar o compartimento interno (onde se encontra o fio e a solução de concentração de cloreto constante) do compartimento externo, e uma segunda junção eléctrica que separa o compartimento externo da solução teste.

A presença de um compartimento externo no eléctrodo de referência pode ser obviada sempre que as soluções de medida não contenham cloreto ou que a concentração desta espécie se mantenha constante ao longo das medidas.

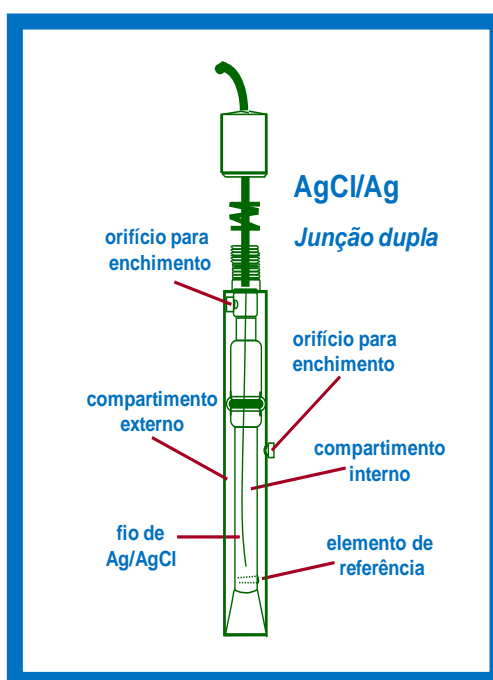


Figura 5 – Representação esquemática de um eléctrodo de referência AgCl/Ag de dupla junção.

1.4.2.2 Eléctrodo indicador

O eléctrodo indicador indica a variação de potencial decorrente da variação da concentração do ião em estudo na solução e deve oferecer um elevado grau de

reprodutibilidade, para uma resposta rápida e seletiva a uma determinada espécie de interesse. De acordo com o tipo de membrana que incorporam ou com o mecanismo envolvido no seu funcionamento, os ESIs podem subdividir-se em elétrodos seletivos de ião primário, de membrana múltipla ou de compostos e de contacto metálico ou *all-solid state*. Dentro da primeira categoria incluem-se os elétrodos cristalinos, homogéneos ou heterogéneos, e os não cristalinos, de matriz rígida ou de condutor móvel [71].

Os *ESIs de membrana não cristalina com locais de trocas móveis* são os mais utilizados atualmente na monitorização de compostos orgânicos. Estes elétrodos são constituídos por membranas poliméricas (PVC, borracha de silicone, etc.), plastificadas por ação de um solvente mediador (agentes lipofílicos, plastificantes, como 2-nitrofeniloctiléter ou derivados de sebacatos e ftalatos) e com um agente permutador, ou ionóforo, responsável pela interação seletiva com uma determinado ião.

O *ionóforo* é o agente crucial para a seletividade da membrana. Este componente pode apresentar-se neutro ou carregado (positiva/negativamente), e deter uma elevada lipofilia, uma característica fundamental para a manutenção deste composto no interior da membrana durante o momento em que esta se encontra mergulhada numa solução aquosa. Os ionóforos convencionais são de natureza química diversa, incluindo ciclodextrinas, porfirinas, sais de amónio quaternário, boratos, complexos de coordenação metálica, etc.. Entre os ionóforos mais emergentes incluem-se os MIPs, introduzidos com sucesso para a deteção de pequenas moléculas orgânicas, por volta do ano de 2007 [72], e mais recentemente para deteção de proteínas [73].

Do ponto de vista físico, o contacto elétrico entre a membrana e o sistema de medida pode ser de líquido ou sólido (Figura 6). O *contacto líquido* é estabelecido entre a membrana seletiva e uma solução de referência interna que contém o ião a medir, tipicamente em concentração elevada, sendo o circuito elétrico fechado por intermédio de um fio metálico mergulhado nessa solução. O *contacto sólido* é obtido por deposição direta da membrana seletiva num suporte condutor sólido.

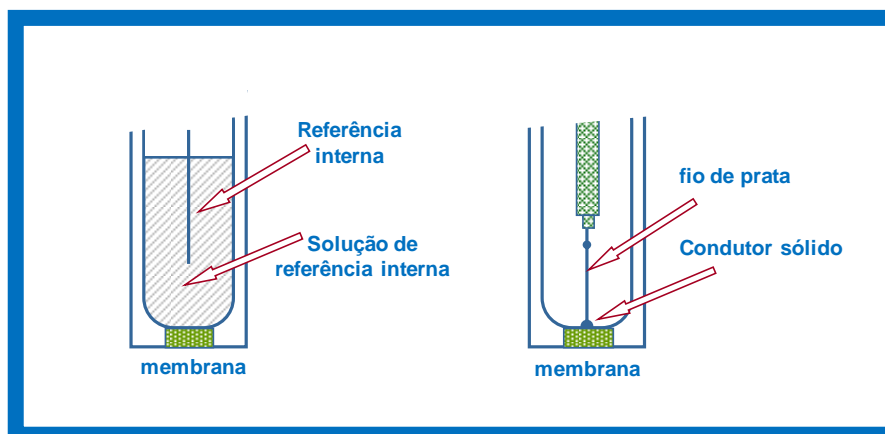


Figura 6 – Representação esquemática de eletrodos de contacto líquido (esquerda) ou sólido (direita).

De uma forma geral, os eletrodos de contacto líquido permitem uma redução substancial do limite de detecção e uma maior reprodutibilidade entre medidas efetuadas com a mesma unidade, mas apresentam limitações práticas do ponto de vista da sua miniaturização, apresentando ainda tempos de vida mais reduzidos em virtude da pressão osmótica exercida pela solução de referência interna na membrana seletiva. A escolha do tipo de contacto depende da forma como se adequa esta combinação de vantagens/desvantagens aos propósitos estabelecidos para o estudo em causa.

1.4.3 Características gerais de resposta

As características gerais de resposta de um dado eletrodo são obtidas a partir da sua curva de calibração, que corresponde à representação gráfica de atividade/concentração em função da diferença de potencial (de acordo com a equação de *Nernst-Nicolski*, equação 1.1). As curvas de calibração potenciométrica apresentam três parâmetros relevantes: o limite inferior de resposta linear (LIRL), o limite de detecção (LD) e o declive (Figura 7). O LIRL é o valor de concentração a partir do qual a resposta potenciométrica apresenta um comportamento linear. O LD é o valor de interceção entre os segmentos que prolongam os comportamentos linear e não linear. O declive traduz a qualidade da resposta potenciométrica, devendo assumir, em condições normais de pressão e temperatura, um valor de cerca de $59/z_A$ mV/década. Em alguns casos, é ainda possível estabelecer também um limite superior de resposta linear (LSRL), por desvio à resposta linear típica do eletrodo, dada a presença de concentrações de analito mais elevadas.

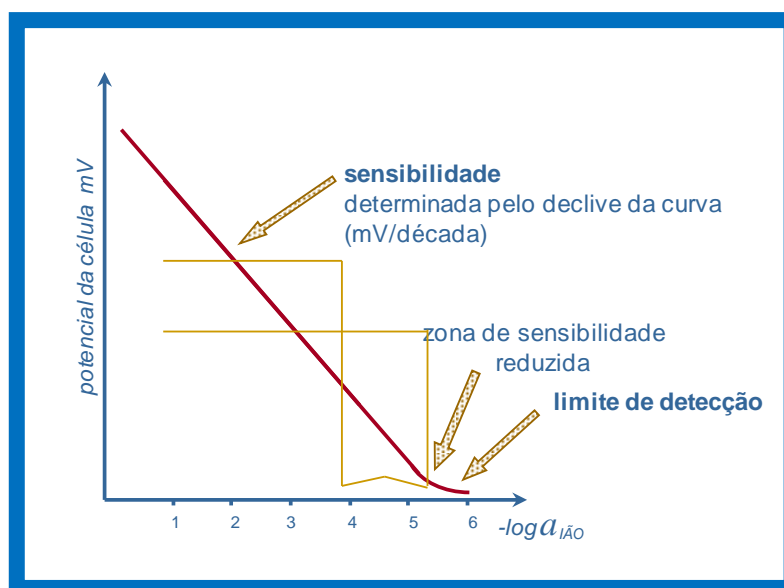


Figura 7 - Características gerais da curva de calibração

Para que se possa utilizar a entidade concentração em vez de atividade, e consequentemente validar a equação de *Nernst-Nicolski*, é necessário proceder-se ao ajuste da força iónica (I) das soluções. O valor de força iónica traduz, de forma simples, a carga iónica global da solução, sendo calculada de acordo com a equação 1.2 (c_i : concentração do ião, mol/L; e z_i : carga do ião). Como ajustador são utilizados eletrólitos simples, cuja composição não deverá conter o ião principal. Nos casos em que o ajuste de pH é implícito por questões que se prendem com a composição da amostra, este ajuste de força iónica pode ser realizado por meio de uma solução tampão apropriada (na qual pH e força iónica se encontra ajustados).

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1.2)$$

Ainda de acordo com as recomendações da IUPAC, o tempo de resposta dos elétrodos é aquele que decorre entre o momento em que os elétrodos, indicador e seletivo de ião, são colocados em contacto com uma solução da amostra (ou na qual se varia a atividade ou a

concentração de íão principal) e o primeiro instante em que o declive $\Delta E/\Delta t$ iguala um valor limite estabelecido. Este valor limite era estabelecido com base em questões de ordem experimental ou na exatidão pretendida para a leitura potenciométrica. De uma forma geral, o tempo de resposta dos ESIs tem um comportamento próximo ao indicado na [Figura 8](#), na qual se exemplifica o tempo de resposta para um limite de 1 mV. Em contexto prático, os ESIs convencionais apresentam tempos de resposta da ordem dos segundos, sendo este tempo superior para as concentrações mais elevadas da curva de calibração.

A capacidade de distinguir o íão de interesse presente na solução em estudo, entre outros íões que se encontram na solução, é uma das maiores vantagens dos ESIs. Considerando que a especificidade dos ESIs tem sido tecnicamente impossível, torna-se necessário caracterizar a seletividade da célula potenciométrica para o íão alvo.

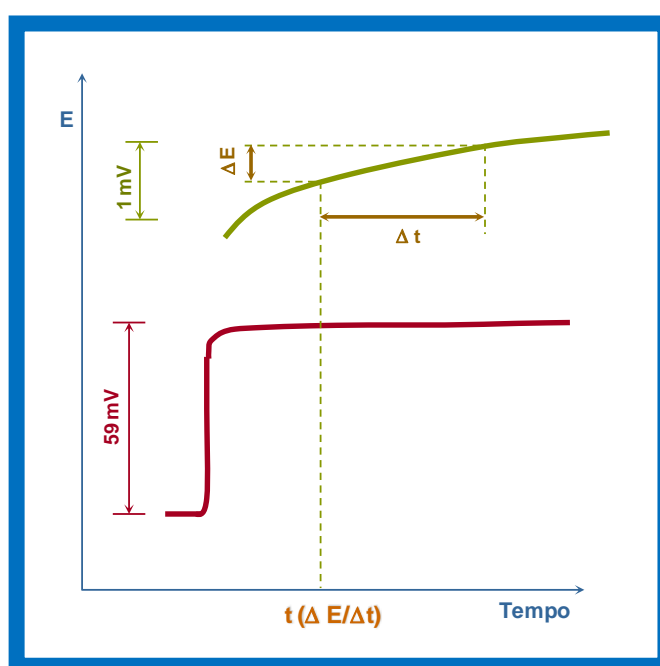


Figura 8 - Representação gráfica do tempo de resposta, $t(\Delta E/\Delta t)$, de uma célula de eletrodo seletivo de íão.

1.4.3 Seletividade

A seletividade de uma unidade potenciométrica traduz a sua capacidade de discriminar, em meios complexos, o íão para o qual o ESI é seletivo. Neste sentido, o potencial de uma

célula eletroquímica de ESI numa solução que contenha o ião principal, A, e um outro ião, B, é expresso pela equação 1.3, de Nicolsky-Eisenmam (E: valor experimental de potencial de um ESI (mV); R: constante dos gases perfeitos, 8.3144 J/(K×mol); T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, 9.64846×10^4 C/mol; a_A : atividade do ião principal, mol/L ou mol/kg; a_B : atividade de espécie iônica interferente; z_A : número inteiro de sinal e magnitude da carga do ião principal; z_B : número inteiro de sinal e magnitude da carga de iões interferentes; “constante”: inclui o potencial normal do eletrodo seletivo, o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV; e K: coeficiente de seletividade potenciométrica relativamente ao ião interferente.). A influência do ião coexistente é traduzida pela sua concentração e pelo coeficiente de seletividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$.

$$E = \text{“Constante”} + \frac{2,303RT}{z_A F} \times \log \left[a_A + \sum_{i=1}^n K_{A,B}^{pot} [a_{Bi}]^{z_A/z_{Bi}} \right] \quad (1.3)$$

As consequências práticas da presença de uma espécie interferente numa amostra resultam de uma forma geral numa perda de qualidade de resposta potenciométrica. A propriedade onde este efeito é mais evidente é o limite de deteção, tal como indicado na [Figura 9](#). De uma forma geral, a espécie interferente promove um aumento do sinal de potencial base da célula potenciométrica, fazendo com o que a resposta analítica só seja detetada para concentrações de ião principal superiores.

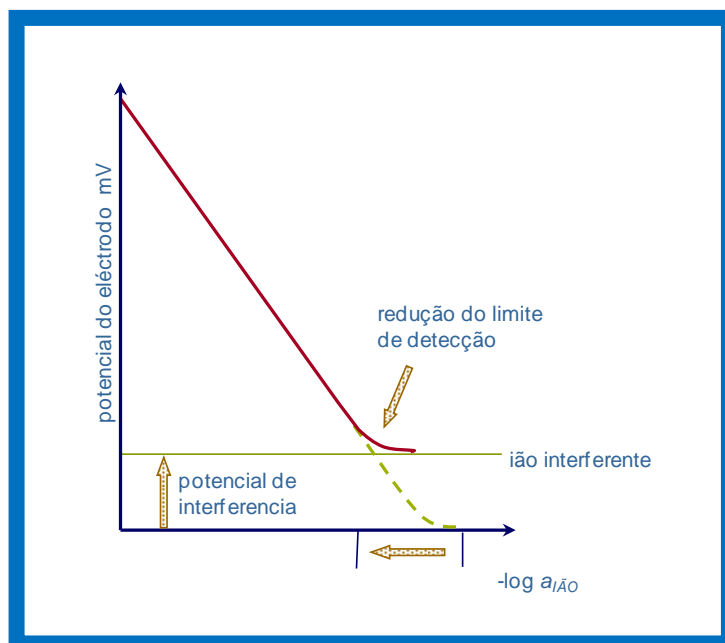


Figura 9 – Efeito da presença de uma espécie interferente na curva de calibração.

De uma forma geral, o coeficiente de seletividade potenciométrica $K_{A,B}^{pot}$ mede o grau de interferência de um dado íon, numa célula específica, em condições experimentais determinadas. Este coeficiente pode ser calculado por vários métodos: (i) o das soluções separadas; (ii) o das soluções mistas; (iii) e o *matched potential*.

O *método das soluções separadas* compara os potenciais de uma célula de ESI quando imersa numa solução de íon principal (A) ou numa solução de íon interferente (B), ambas com o mesmo valor de atividade (ou concentração), sendo o valor de coeficiente seletividade potenciométrico calculado de acordo com a equação 1.4. Considerando que o valor $(z_A F)/(2,303RT)$ corresponde ao inverso do valor do declive teórico de um ESI, este elemento da equação equivale ao valor experimental do declive da curva de calibração da célula potenciométrica em estudo. Uma das limitações associadas a este método é a ausência de competição entre o íon principal e interferente, considerando que estes íões se encontram individualizados em solução, algo que não acontece na realidade.

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A)z_A F}{2,303RT} + \left[1 - \frac{z_A}{z_B}\right] \log a_A \quad (1.4)$$

O método das soluções mistas resolve a questão de inter-dependência entre os iões principal e interferente, uma vez que compara os potenciais de uma célula de ESI quando imersa numa solução de ião interferente fixa (B) e adicionada de uma concentração crescente de ião principal (A) crescente. O valor do coeficiente seletividade potenciométrico correspondente é calculado de acordo com a equação 1.5. Nesta equação, a atividade do ião principal, a_A , corresponde à atividade mínima deste ião capaz de promover uma resposta linear. Este método pode ser realizado de forma inversa, no qual o ião principal é mantido numa concentração fixa e é adicionada uma quantidade crescente de ião interferente, até a célula eletroquímica apresentar uma resposta com padrão linear relativamente à espécie adicionada. Existem, porém, várias dificuldades inerentes a este método, sendo a falta de resposta *Nernsteniana* na curva de calibração registada uma limitação séria à sua aplicação prática.

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{a_B^{z_A/z_B}} \quad (1.5)$$

O método *matched potential* permite ultrapassar as dificuldades técnicas inerentes à falta de resposta *Nernsteniana*. O coeficiente é calculado de acordo com a equação 1.6, para o qual são necessárias duas medidas potenciométricas independentes: (1) a variação de potencial promovida por um aumento de concentração de ião principal, desde a menor atividade, a_A , à maior, a'_A ; (2) e a concentração de ião interferente que é necessária adicionar a a_A para que se observe a mesma variação de potencial. Este método é que se assemelha mais a uma condição experimental inerente à análise de uma amostra, embora tenha como limitação não apresentar qualquer relação com os pressupostos teóricos decorrentes da equação de *Nernst* [74-76].

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a'_A - a_A}{a_B} \quad (1.6)$$

O método a selecionar para cada caso é por isso não mais do que uma decisão pessoal de quem avalia o desempenho potenciométrico. O mais importante neste contexto parece ser a consciência prática de que cada um destes métodos produz valores diferentes, que só podem ser interpretados como valores meramente orientadores do grau de seletividade.

Na sequência do exposto em todos os pontos anteriores, o trabalho que se passa a descrever adiante tem por objetivo a construção de um sensor potenciométrico para CA15-3, que utiliza membranas seletivas cujos materiais sensores (os ionóforos) são do tipo MIP, obtidos por eletropolimerização em *bulk* e utilizados em elétrodos seletivos de contacto sólido.

2. Descrição Experimental

Neste capítulo descrevem-se de modo detalhado todos os aspetos de natureza experimental associados à preparação do sensor biomimético/potenciométrico para o biomarcador CA15-3. Incluem-se aqui os vários materiais e equipamentos envolvidos, bem como reagentes e procedimentos específicos necessários.

2.1 Material e equipamento utilizados

As soluções de concentração rigorosa foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com um volume variável entre 10,00 e 250,00 mL. A medição rigorosa de volumes inferiores a 25,00 mL foi efetuada com pipetas de vidro, classe A (entre 10,00 e 25,00 mL) ou em pipetas automáticas de volume regulável (2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL e de 1000-5000 μL , marca VWR).

Os sólidos foram pesados na balança RADWAG XA 110/X, com precisão de $\pm 0,0001$ g e em gobelés com capacidades entre 10 e 50 mL. O banho de ultrassons termostatizado, BANDELIN *Sonorex Digitec*, foi utilizado algumas vezes de forma a reduzir o tempo envolvido na dissolução de substâncias sólidas.

As medidas potenciométricas utilizaram dois eléctrodos: um eléctrodo de referência e um eléctrodo indicador (Figura 10). O eléctrodo indicador foi o ESI seletivo a CA15-3, preparado com base no corpo plástico de uma seringa de 1 mL, que foi empacotado com uma mistura condutora grafite e resina epoxídica (Figura 10A), e sobre a qual seria posteriormente depositada a membrana seletiva. O eléctrodo de referência utilizado foi um

fio de prata mergulhado em cloreto de ferro (III) e ligado eletricamente a um fio de cobre com terminal elétrico apropriado (Figura 10B). Os detalhes da construção destes elétrodos podem ser encontrados na referência [77].

A preparação do material biomimético utilizou o potenciômetro Autolab 302N equipado com um elétrodo de referência AgCl/Ag (Methrom, 6.0729.110), um elétrodo auxiliar de carbono vítreo (Methrom, 6.1241.060) e o vidro de FTO.

A diferença de potencial entre os elétrodos de referência e indicador foi medida no decimilivoltímetro Crison μ pH GLP 21 (sensibilidade $\pm 0,1$ mV), apresentado na Figura 11. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente e sob agitação constante, promovida pelo agitador acoplado ao equipamento e controlado pelo mesmo. O sinal de saída do medidor potenciométrico foi ligado a uma caixa de comutação com seis saídas, que permitiu a leitura simultânea de seis elétrodos indicadores mergulhados na solução ensaiada (Figura12).

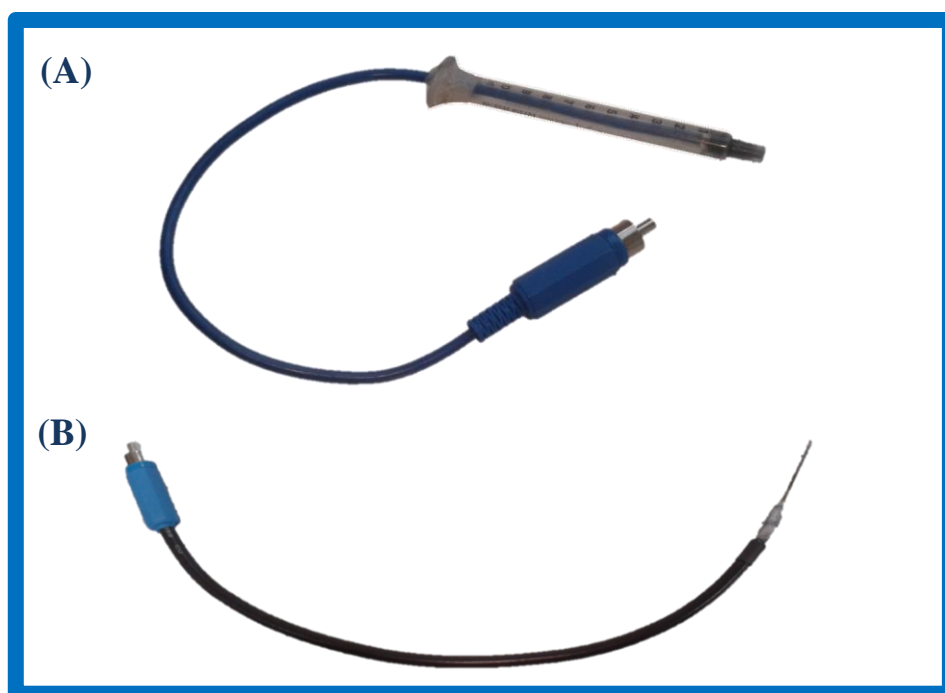


Figura 10 - Fotografia dos elétrodos seletivo (A) e de referência AgCl/Ag (B), ambos preparados no laboratório.

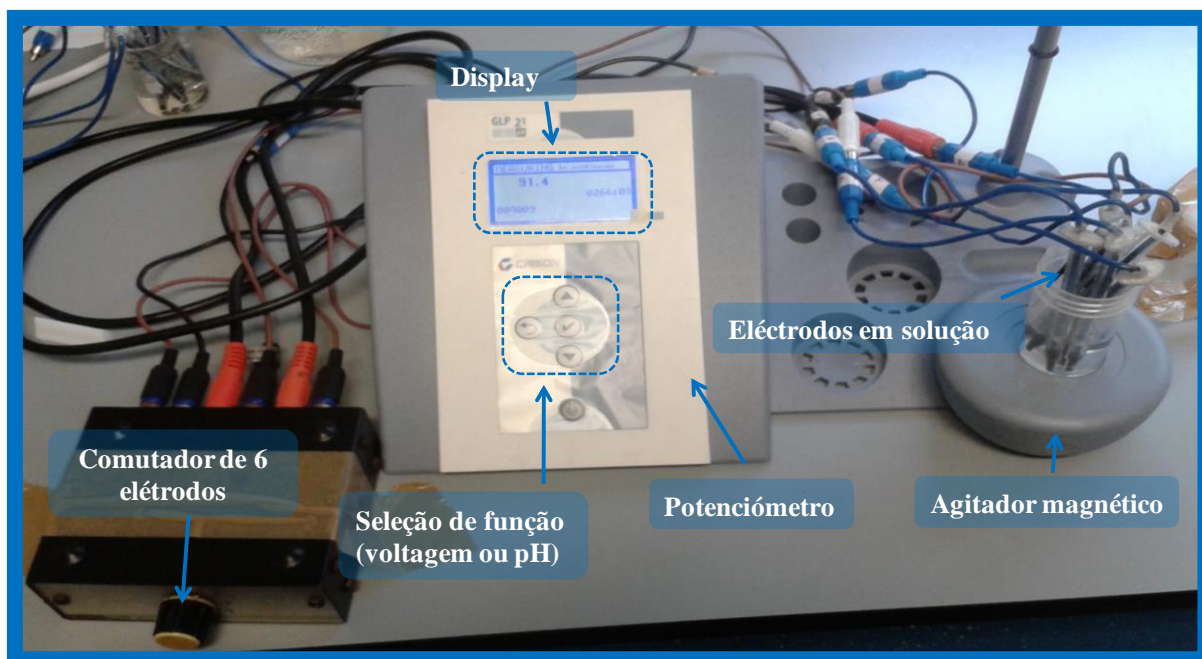


Figura 11 - Montagem utilizada na leitura potenciométrica, incluindo equipamento de medida e acessórios, como agitador magnético e sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs.

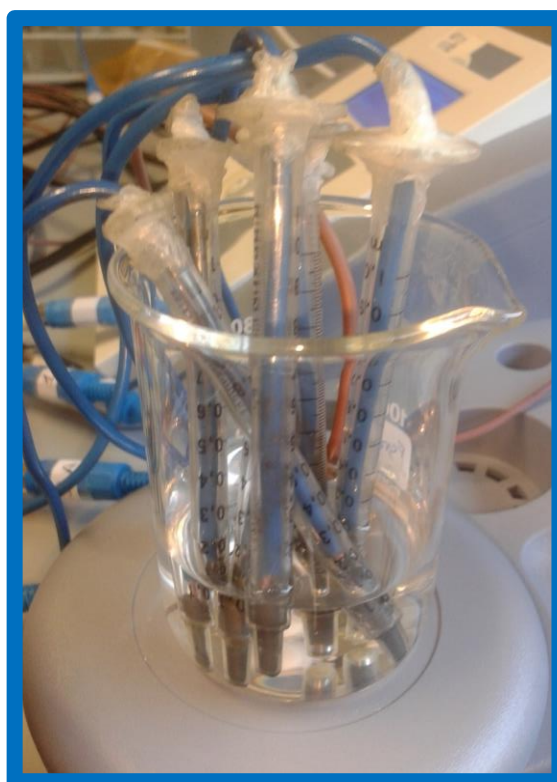


Figura 12 – Eléctrodos indicadores e de referência, mergulhados na solução para medição de potencial.

A análise de superfície dos sensores recorreu a duas técnicas óticas complementares, tendo-se utilizado o equipamento *Thermo Scientific Nicolet DXR*, na espectroscopia de Raman com microscopia confocal, e o equipamento *Thermo Scientific Nicolet iS10*, na espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Este último equipamento continha o acessório de reflexão total atenuada (ATR) para suporte e leitura direta das amostras (obviando qualquer tratamento prévio das mesmas).

2.2 Reagentes e soluções

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi desionizada e apresentava uma condutividade inferior a 0,1 inferior $\mu\text{S}/\text{cm}$. As soluções aquosas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes.

Os vários reagentes utilizados foram de qualidade p.a., sem qualquer purificação adicional. Utilizaram-se neste trabalho Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino-etanosulfónico (HEPES), CA15-3, Pirrol e Proteinase K, adquiridos à *Sigma*; 2-Nitrofeniloctil éter (oNFOE), *tetrakis*(4-Clorofenil)borato (PCIPB) e Brometo de tetraoctilamónio (BTA), adquiridos à *Fluka*; PVC, adquirido à *Aldrich*; Tetrahidrofurano (THF) adquirido à *Riedel-DeHaen*; pastilhas para tampão PBS adquiridas à *Amresco*; Albumina de soro bovino (BSA) adquiridos à Fisher BioReagents; Etilenoglicol adquirido à TCI e Etanol, adquirido à *Fluka*.

As soluções padrão de CA15-3, necessárias à realização deste trabalho, tinham uma concentração de 100U/mL. A solução tampão utilizada foi preparada com HEPES, com uma concentração igual a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. O pH desta solução foi alterado pela adição de quantidades adequadas de ácido clorídrico concentrado ou solução saturada de hidróxido de sódio, preparada na altura, para este efeito.

As soluções de espécies interferentes foram de concentrações variáveis, preparadas em solução tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de pH 7. A acetilcolina apresentava uma concentração igual a $8,2 \times 10^{-5}$ g/mL; a creatina $9,3 \times 10^{-5}$ g/mL; a creatinina $1,2 \times 10^{-4}$ g/mL; a cisteína $5,0 \times 10^{-4}$ g/mL; a ureia de $4,0 \times 10^{-4}$ g/mL e a glucose de $1,05 \times 10^{-3}$ g/mL.

O soro sintético tinha na sua composição 30g/L de albumina do soro bovino, diluída em tampão PBS.

2.3 Preparação do material biomimético

Prepararam-se dois tipos de sensores, um impresso, MIP (Figura 13), e outro não impresso, (NIP, do inglês *non-imprinted polymer*).

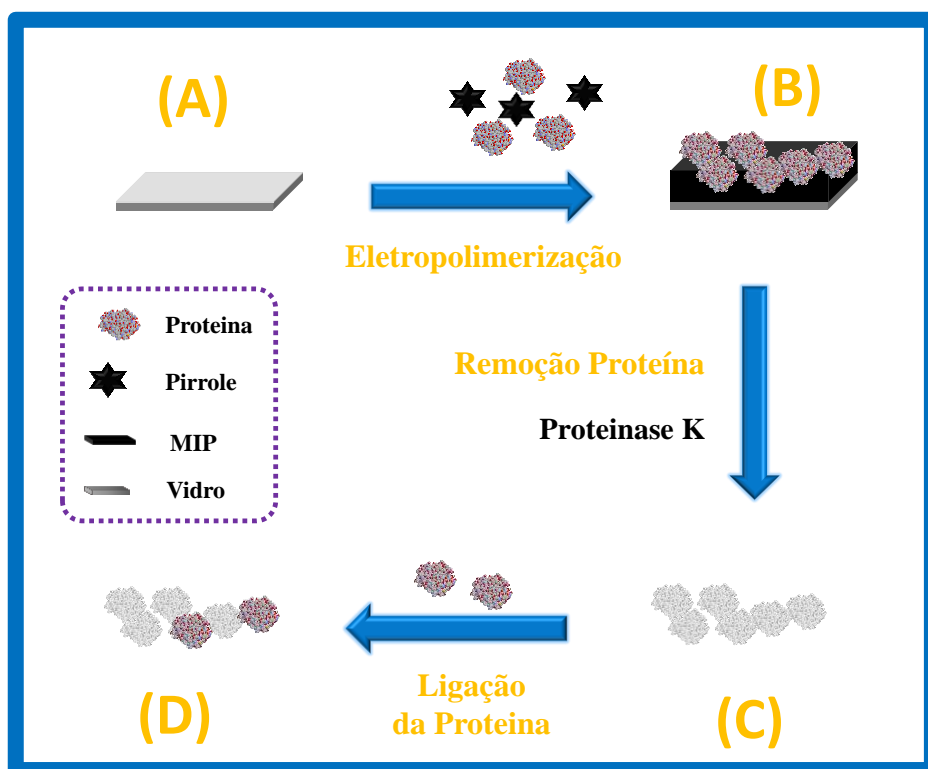


Figura 13 – Esquema geral de síntese do material impresso.

O material MIP foi obtido por eletropolimerização do monómero pirrol sobre a superfície de vidro FTO (Figura 13). Antes da eletropolimerização, os vidros de FTO foram limpos com álcool, seguindo-se uma limpeza eletroquímica por voltametria cíclica, com ácido sulfúrico 0,5 mol/L e varrimentos entre -0,2 e +1,6V, a 50 mV/s durante 15 ciclos. A polimerização propriamente dita foi realizada na superfície limpa do FTO, por voltametria cíclica, aplicando-se uma gama de potencial entre -0,2 e +1,0 V, durante 40 ciclos. A solução de polimerização foi constituída por uma mistura de pirrol ($5,0 \times 10^{-3}$ mol/L) com CA15-3 (100U/mL) e etilenoglicol (1 %), preparada em tampão PBS pH 7,2. O polímero formado sobre o FTO (polipirrol/CA15-3) apresentou-se como um filme escuro, sendo cuidadosamente lavado com água desionizada para posterior remoção (por

raspagem com uma espátula). O sólido recolhido foi incubado em Proteinase K (500 µg/mL) durante 5h, sob agitação constante, sendo posteriormente separado do sobrenadante por centrifugação e seco, a 60°C, em estufa. Em seguida, realizaram-se várias lavagens em tampão PBS para remover possíveis fragmentos de CA15-3 e de proteinase. Por fim, lavou-se o sólido com água desionizada e procedeu-se à sua secagem, em exsiccador, com atmosfera de azoto.

O material NIP foi preparado de modo análogo ao descrito para o MIP, tendo-se retirado o biomarcador do processo de síntese. Para este efeito, utilizou-se uma solução de eletropolimerização que não continha proteína. O material NIP serviu de controlo ao processo de impressão realizado no MIP.

2.4 Análise morfológica dos materiais

Na espectroscopia de Raman com microscopia confocal, a imagem dos materiais foi focada em microscópio ótico, com lente de 50×. De seguida, o material foi irradiado com 0,2 mW de um laser de 532 nm, através de um *pinhole* de 50 µm.

Os espetros de FTIR foram recolhidos após colocação do material em estudo no cristal de Germânio presente no suporte de ATR. O traçado espectral foi realizado entre 400 a 4000 cm⁻¹ (número de onda) e correspondeu à aquisição consecutiva de 256 espetros, com uma resolução igual a 8.

2.5 Preparação das membranas seletivas

Foram preparadas 6 membranas seletivas para CA15-3 de acordo com a composição indicada na [Tabela 3](#), com o objetivo de avaliar o comportamento de vários componentes da membrana na resposta potenciométrica.

Em todas as membranas, foram colocados 0,06 g de solvente mediador (oNFOE) e 0,05 g de PVC. Relativamente ao ionóforo, algumas membranas continham ~0,002 g de material MIP (ESIs 1, 3 e 4) ou NIP (ESI 2), mas outras não continham qualquer material sensor (ESIs 5 e 6). Do ponto de vista do aditivo lipolífico, algumas membranas continham 0,0015 g de aditivo catiónico (ESIs 3 e 5) ou aniónico (ESIs 4 e 6), e outras foram

preparadas sem qualquer aditivo (ESIs 1 e 2). A mistura resultante foi agitada até o PVC ficar bem intumescido e disperso em 1mL de THF.

Tabela 3 – Constituição das membranas seletivas de ião.

<i>Componente</i>	<i>Massa (g)</i>					
	<i>ESI 1</i>	<i>ESI 2</i>	<i>ESI 3</i>	<i>ESI 4</i>	<i>ESI 5</i>	<i>ESI 6</i>
Ionóforo impresso, MIP	0,0019	—	0,0019	0,0021	—	—
Ionóforo não-impresso, NIP	—	0,0014	—	—	—	—
Aditivo catônico, TBO	—	—	0,0015	—	0,0015	—
Aditivo aniônico, PCIPB	—	—	—	0,0015	—	0,0015
Solvente mediador, oNFOE	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Polímero, PVC	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Solvente, THF	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

As soluções das membranas foram aplicadas, gota a gota, no suporte condutor de grafite, até que a cavidade deixada no corpo da seringa estivesse devidamente preenchida (

[Figura 14](#)). Ao fim de 24 h, as membranas encontravam-se secas, sendo depois hidratadas por imersão em água desionizada, ao longo de 24 h. A composição mássica das membranas resultantes encontra-se indicada na [Tabela 3](#).

2.6 Avaliação comparativa dos elétrodos

A avaliação comparativa do desempenho dos elétrodos preparados com membranas diferentes foi realizada com base no traçado de curvas de calibração. Todas as medidas potenciométricas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante, tendo-se retirado o valor de f.e.m. de cada elétrodo a um valor constante de pH e força iónica e para uma estabilização de $\pm 0,2$ mV.

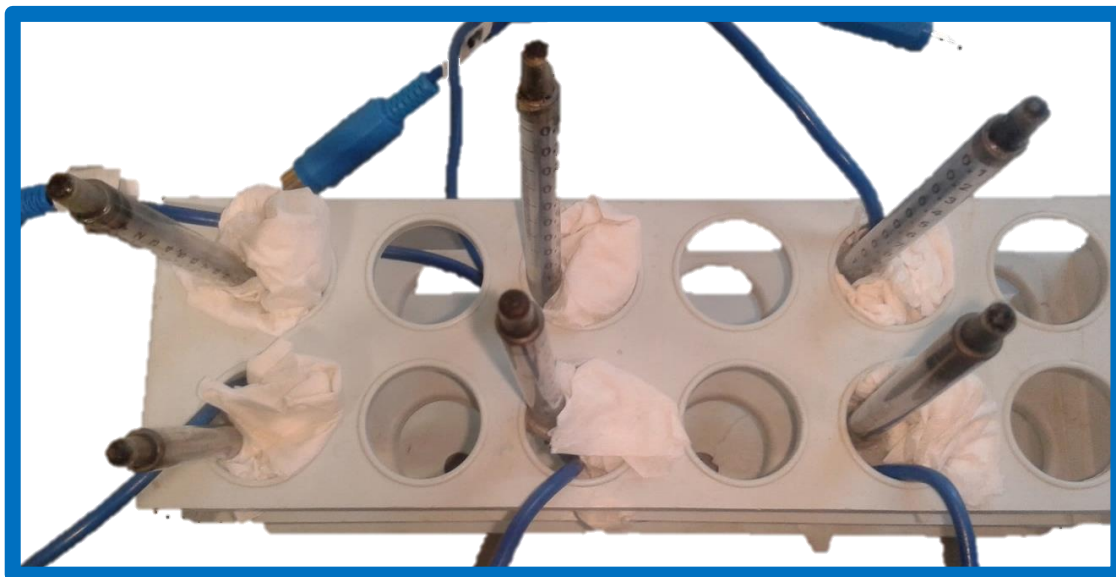


Figura 14 – Visão de topo dos elétrodos seletivos de ião, após aplicação da membrana seletiva.

As concentrações decrescentes de CA15-3 foram obtidas por transferência de várias alíquotas (entre 0,0025 – 2,00 mL) de solução tampão HEPES ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L), a uma solução inicial de 1,00 mL de CA15-3 com uma concentração de 100 U/mL, preparada na mesma solução tampão HEPES. Entre cada ensaio, os sensores foram acondicionados em água desionizada.

Foram realizadas pelo menos 3 curvas de calibrações nas mesmas condições em todos os ensaios e os seus parâmetros foram obtidos por tratamento das leituras efetuadas em *Microsoft Excel, Office 2010*. Os parâmetros considerados e avaliados foram o LIRL, LSRL, LD, declive e tempo de resposta. A partir dos valores de potencial individuais, foi ainda possível estimar a reprodutibilidade, que correspondeu à média do desvio padrão relativo (%) dos potenciais obtidos para o mesmo valor de concentração, em curvas de calibração realizadas em momentos diferentes, mas nas mesmas condições experimentais.

2.7 Seletividade dos elétrodos

O cálculo dos valores de coeficiente de seletividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$, foi efetuado pelo método das soluções misturadas. Neste método, a concentração de interferente foi mantida constante, fazendo-se variar a concentração de ião principal (CA15-3). Para este

efeito, foram adicionados 100 μL de solução de interferente (na concentração esperada para uma condição fisiológica normal), a uma solução contendo 250 μL CA15-3 (100 U/mL), 150 μL de soro sintético e 500 μL HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Posteriormente, efetuou-se a calibração do eletrodo nessa solução, para avaliação da resposta do eletrodo na presença do interferente.

2.8 Análise da amostra

As amostras de soro foram analisadas após monitorização dos parâmetros gerais da curva de calibração dos eletrodos na presença de CA15-3, preparado em soro sintético de controlo (sem CA15-3).

As amostras analisadas foram soro sintético dopado com CA15-3, por adição de 250 μL de uma solução de CA15-3 (100 U/mL), a uma solução contendo 150 μL de soro sintético e 600 μL de HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L. Os valores de concentração de CA15-3 encontrados para a solução dopada foram obtidos por substituição dos valores de potencial na curva de calibração de controlo (em soro sintético de controlo), realizada imediatamente antes da análise da amostra, e considerando os diversos fatores de diluição associados.

Os resultados obtidos e apresentados corresponderam sempre à média de, pelo menos, três calibrações e a sua precisão foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo foram abordados a ligação da CA15-3 durante a preparação do sensor e a avaliação comparativa dos elétrodos contendo as diferentes membranas preparadas. A interferência de alguns compostos na concentração final do íon principal, a análise da superfície sensora, e a morfologia das membranas de PVC foram também apresentadas e comentadas.

3.1 O material biomimético

A obtenção de um material biomimético para o CA15-3 com base em técnicas de impressão molecular implicava a utilização de condições de síntese experimental compatíveis com este material biológico. O biomarcador CA15-3 compreende fragmentos solúveis da glicoproteína transmembranar, com um grau de glicosilação aberrante, e que devem ser preservados aquando do processo de polimerização. Neste contexto, a polimerização deveria ocorrer em condições próximas daquelas presentes no sistema fisiológico (de pH e de força iónica, por exemplo) e não deveria impor um estímulo externo que conduzisse à sua alteração conformacional ou química (por ação física ou química, como temperatura ou agentes radicalares, entre outros).

Apesar de ser possível cumprir minimamente esses requisitos com base em polimerizações químicas, surgiram na literatura mais recente outras formas de polimerização eficazes, como a eletropolimerização [78]. A eletropolimerização permitiria um elevado controlo estrutural sobre o crescimento do polímero, contribuindo para uma

maior repetibilidade do processo; diminuiria a entrada de reagentes no sistema, contribuindo para a conservação da biomolécula no meio reacional; reduziria o consumo de reagentes associados ao processo de polimerização em *bulk*; e diminuiria a intervenção do operador e a complexidade do processo de impressão. Neste sentido, o material biomimético foi obtido por eletropolimerização, numa solução que continha monómero e biomarcador.

O monómero escolhido para a polimerização foi o pirrol, grandemente utilizado neste contexto. A reação de polimerização decorreu na sequência da aplicação de um potencial suficientemente alto para oxidar o monómero. Neste caso, o pirrol neutro perdeu primeiramente um elétron, para formar um radical catiónico (Figura 15). A formação do radical catião foi evidente no voltamograma cíclico obtido, onde ocorreu um aumento súbito de corrente a 0,8 V de potencial, *versus* o eléctrodo de referência AgCl/Ag. A fase seguinte de polimerização consistiu na dimerização do radical catiónico, por ligação subsequente a outra unidade de pirrol e perda de 2 iões H^+ (Figura 15). Devido ao elevado grau de conjugação, o dímero formado foi mais facilmente oxidado do que o pirrol original.

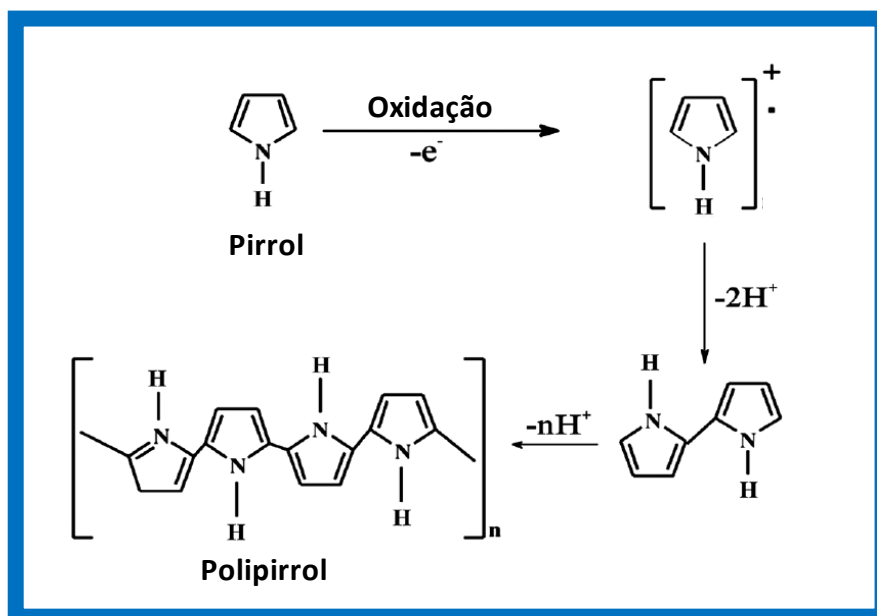


Figura 15 – Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [79].

O arranjo nanoestrutural do pirrol eletropolimerizado dependeu, porém, das condições afetas à eletropolimerização, podendo variar entre *nanobelts*, *nanobricks* ou *nanosheets* (Figura 16). À medida que a velocidade de varrimento da deposição polimérica aumentou, o tempo conferido para deposição e dissolução do polímero foi inferior, originando um menor grau de recristalização. Neste sentido, o decréscimo em tempo de deposição (maior velocidade de varrimento) originava uma estrutura mais porosa, organizada em múltiplas camadas de *nanosheets*, enquanto o aumento desse tempo originava uma estrutura mais densa e compacta de *nanobelts*, organizada de forma mais agregada [79]. É de notar que as condições de velocidade de varrimento apresentadas na Figura 16 reportam a eletropolimerização em suporte de aço inoxidável.

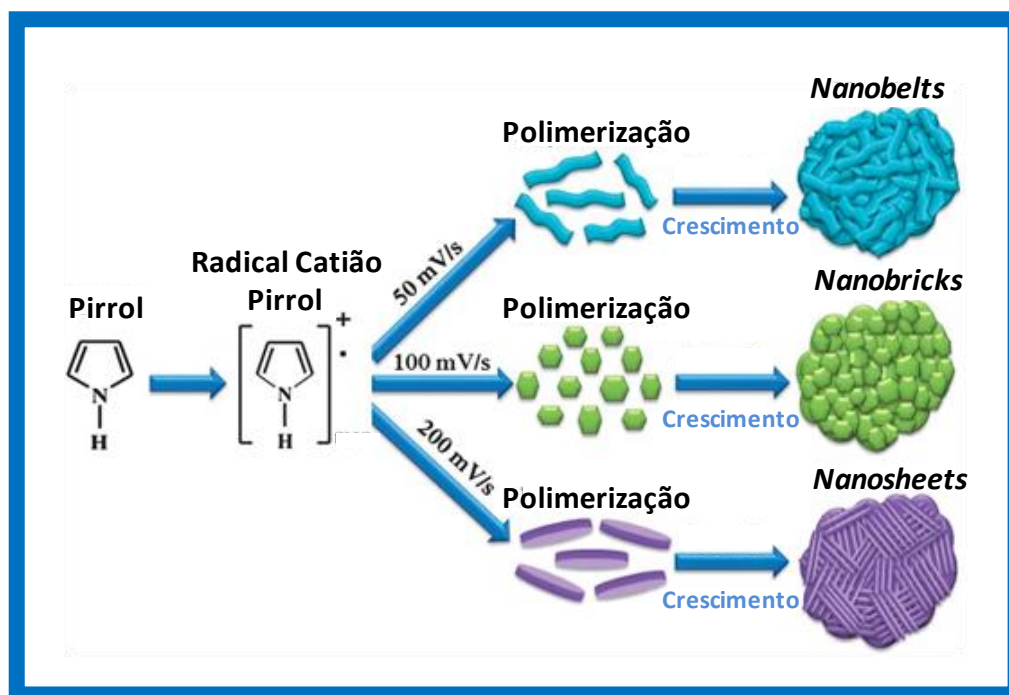


Figura 16 – Organização nanoestrutural de polímeros de polipirrol, produzidos com diferentes velocidades de varrimento [79].

Do ponto de vista da compatibilização desta nanoestrutura com a proteína alvo, a melhor configuração parece ser a *nanobelt*. Esta organização estrutural em tubo alongado poderá permitir uma moldagem mais eficaz da proteína e a manutenção da cavidade impressão após remoção da proteína alvo.

Neste sentido, o material impresso foi obtido por polimerização de pirrol na presença de CA15-3, em condições eletroquímicas que conduzissem à produção desses *nanobelts* de polipirrol (a formação destas nanoestruturas não foi, contudo, confirmada por microscopia eletrónica). A presença de CA15-3 na estrutura polimérica em crescimento serviu de obstáculo ao alinhamento nano-estrutural esperado para as moléculas de polímero, originando deformações na estrutura do polímero. Estas deformações correspondem, por isso, a proteínas CA15-3 aprisionadas na matriz polimérica.

O filme polimérico obtido foi entretanto raspado para recolha do material impresso, obtendo-se um pó fino neste processo. A fracionamento do filme de polímero em pó deu origem à exposição de algumas proteínas, por rompimento das cavidades onde estas se encontravam. A remoção da proteína na cavidade exposta decorreu por dessorção para a fase líquida ou por contacto com Proteinase K, que promoveu a sua degradação a fragmentos peptídicos de menor dimensão, mais fáceis de remover por lavagem.

O material impresso estava pronto a usar após remoção de qualquer fragmento proteico ou de resíduos da enzima que pudessem estar adsorvidos à estrutura polimérica. A remoção destas biomoléculas foi conseguida por lavagem intensiva do polímero, primeiro em solução tampão e depois em água.

3.2 Análise de superfície dos materiais sensores

A análise dos materiais sintetizados, MIP e NIP, foi efetuada com base no traçado de espectros por espectroscopia de Raman e por FTIR. Estes espectros permitiram avaliar a composição química dos materiais. Os espectros de Raman dos materiais sensores NIP preparados com velocidades de varrimento iguais a 50mV/s, 100mV/s e 200mV/s e materiais MIP preparados a 50 mV/s encontram-se representados na [Figura 17 e 18](#). Os espectros de FTIR dos mesmos materiais encontram-se representados na [Figura 19 e 20](#).

Todos os espectros de Raman apresentaram um perfil semelhante, com evidência de um pico de forte intensidade, centrado a 1576,78 cm^{-1} e representativo de estiramento das ligações C=C presentes no polipirrol. As duas bandas centradas a 1382,64 e a 1323 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos anti-simétricos de ligações C–N do polipirrol e a banda a 1048,02 cm^{-1} associada às vibrações C–H no plano e simétricas nos planos de flexão do

anel. Os dois picos 968,09 e 930,34 cm^{-1} corresponderam às vibrações de deformação do anel de pirrol [80, 81].

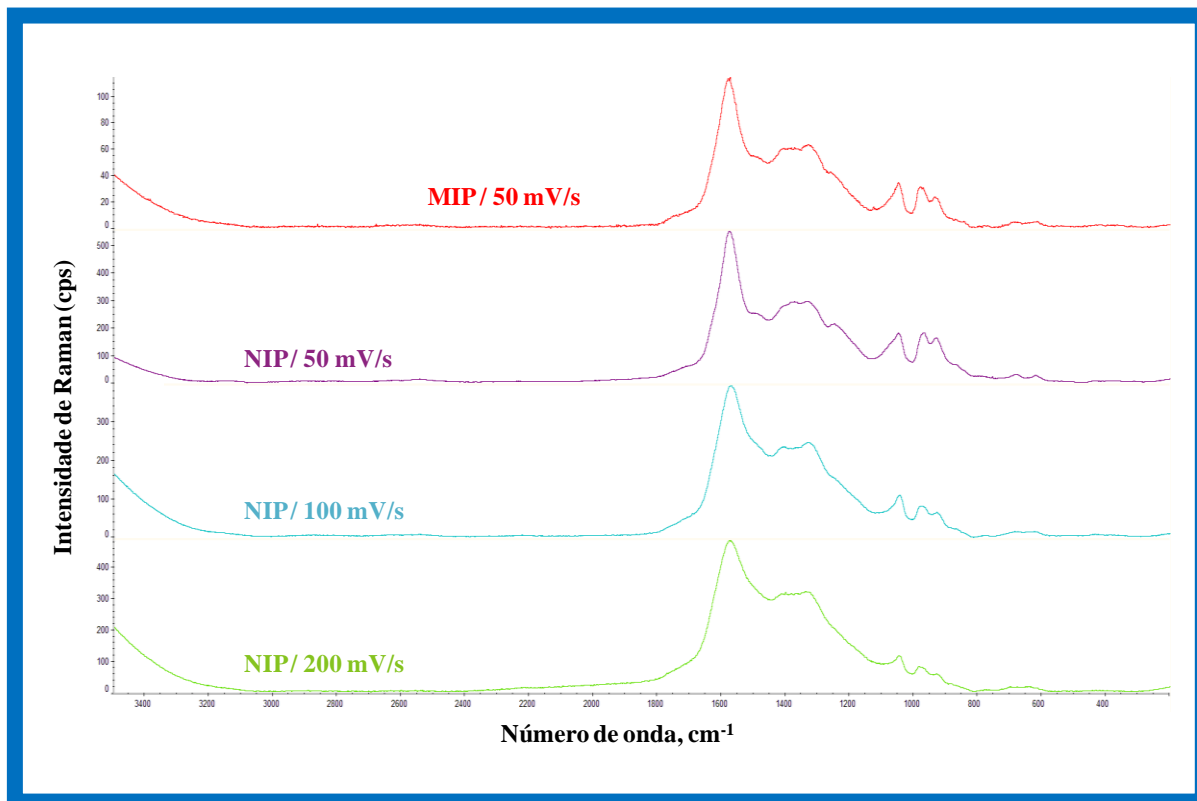


Figura 17 – Espectros de Raman individuais dos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s, e do material MIP, obtido a 50 mV/s.

De uma forma geral, a análise de espectroscopia de Raman permite confirmar a presença polipirrol nos materiais sensores e a impressão molecular, uma vez que espectros do NIP e MIP idênticos confirmam o sucesso no procedimento de remoção da proteína (Figura 17). A sobreposição de espectros de Raman para o máximo valor de intensidade observado em cada espectro encontra-se representada na Figura 18 e permite inferir sobre a variação relativa dos vários picos dentro de cada espectro. É possível observar que o perfil espectral dos vários materiais é equivalente, variando apenas os picos centrados a 1330-1380 cm^{-1} , cuja intensidade de Raman vai aumentando com o aumento da velocidade de varrimento. De uma forma geral, esta região está associada à presença de carbono com hibridação sp^3 , implicando tipicamente defeitos numa matriz de carbono com ressonância. No presente

contexto, o registo obtido parece indicar que a menor velocidade de varrimento promoveu a redução de desorganização estrutural, com formação mais evidente de estruturas com ressonância (e por conseguinte, hibridação sp^2). O aumento dos picos centrados a 1330-1380 cm^{-1} é por sua vez acompanhado pelo decréscimo na intensidade dos picos centrados a 1048,54 e a 968,09 cm^{-1} , confirmando mais uma vez a enorme influência da velocidade de varrimento aplicada no processo eletropolimerização do pirrol [79].

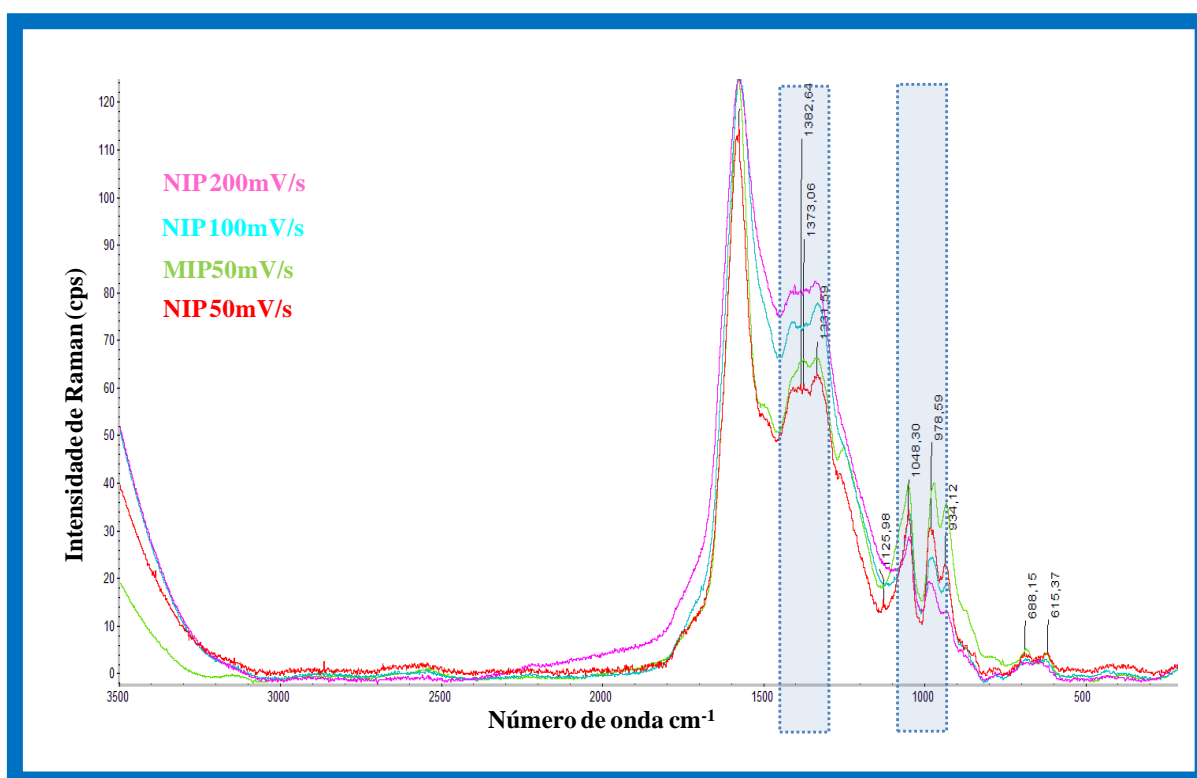


Figura 18- Espectros de Raman sobrepostos ao valor máximo de intensidade e com escalas variáveis, relativos aos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s, e ao material MIP, obtido a 50 mV/s.

Os resultados obtidos por FTIR para o material sensor NIP preparado a diferentes velocidades de varrimento (50, 100 e 200 mV/s), indicaram bandas de absorção em valores semelhantes de número de onda, mas com ligeiras diferenças nas intensidades de transmitância (Figura 19). Foram observadas bandas a 1537,73 e a 1450,98 cm^{-1} , associadas às vibrações de estiramento das ligações C=C e C–C do pirrol. Os picos de forte intensidade centrados em 1171,45 e a 1039,04 cm^{-1} foram associados às vibrações de estiramento das ligações C–H e C–N, respetivamente. A banda de absorção máxima a

902,52 cm^{-1} correspondeu à vibração de deformação da ligação C=C no plano do anel de pirrol. As várias bandas de absorção centradas a 785,80; 667,46 e 646,21 cm^{-1} corresponderam a vibrações de deformação, dentro e fora do plano, de ligações C–H nas unidades de pirrol [82, 83].

De uma forma geral, os espectros de FTIR obtidos neste trabalho confirmaram, novamente, a presença do polímero polipirrol nos materiais preparados. Esta afirmação foi sustentada pelos resultados apresentados na referência [82], onde o perfil genérico do espectro de FTIR apresentado é semelhante ao aqui obtido. A variação na velocidade de varrimento parece ter afetado essencialmente a intensidade do pico de absorção localizado a 902,52 cm^{-1} (Figura 20), relacionando-se, por isso, e de acordo com os resultados de Raman, com a organização estrutural envolvida em processos de ressonância. Além disso, os espectros parecem indicar a presença de um material tipo *nanobelt*, devido à ausência de uma banda situada a 1381 cm^{-1} [82].

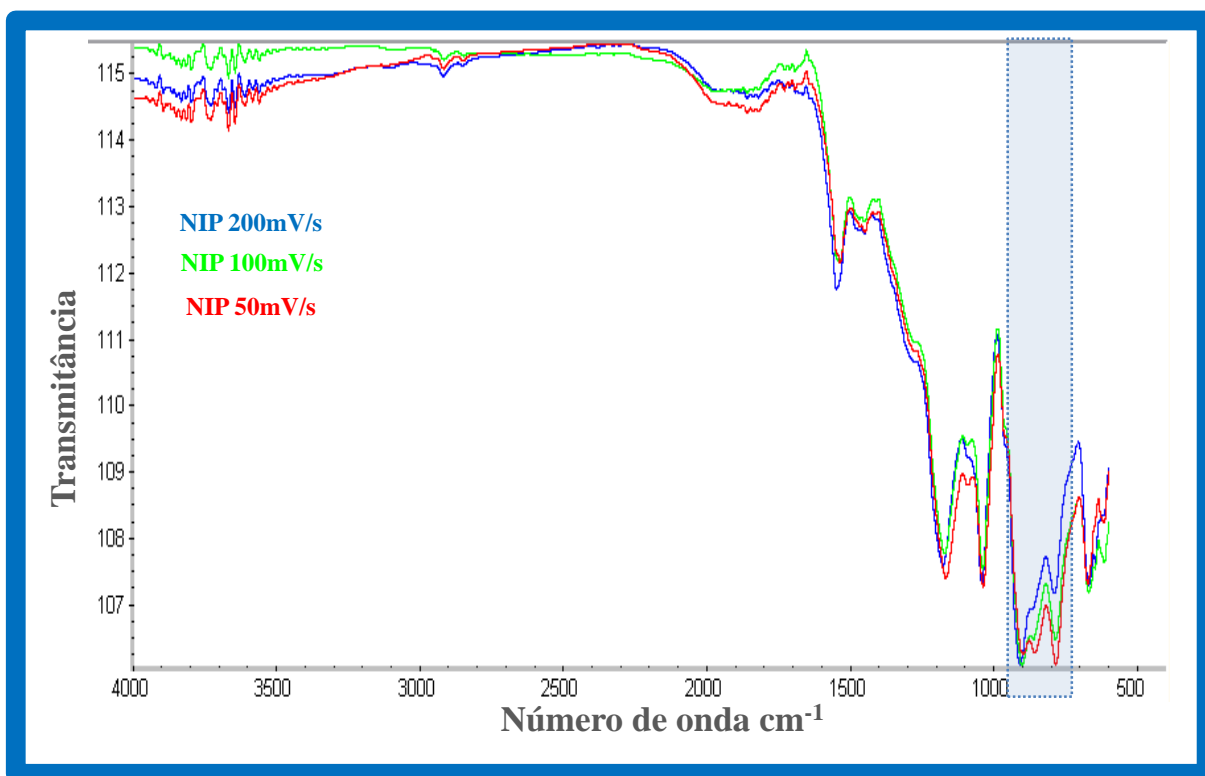


Figura 19 – Espectros sobrepostos e de FTIR/ATR dos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s.

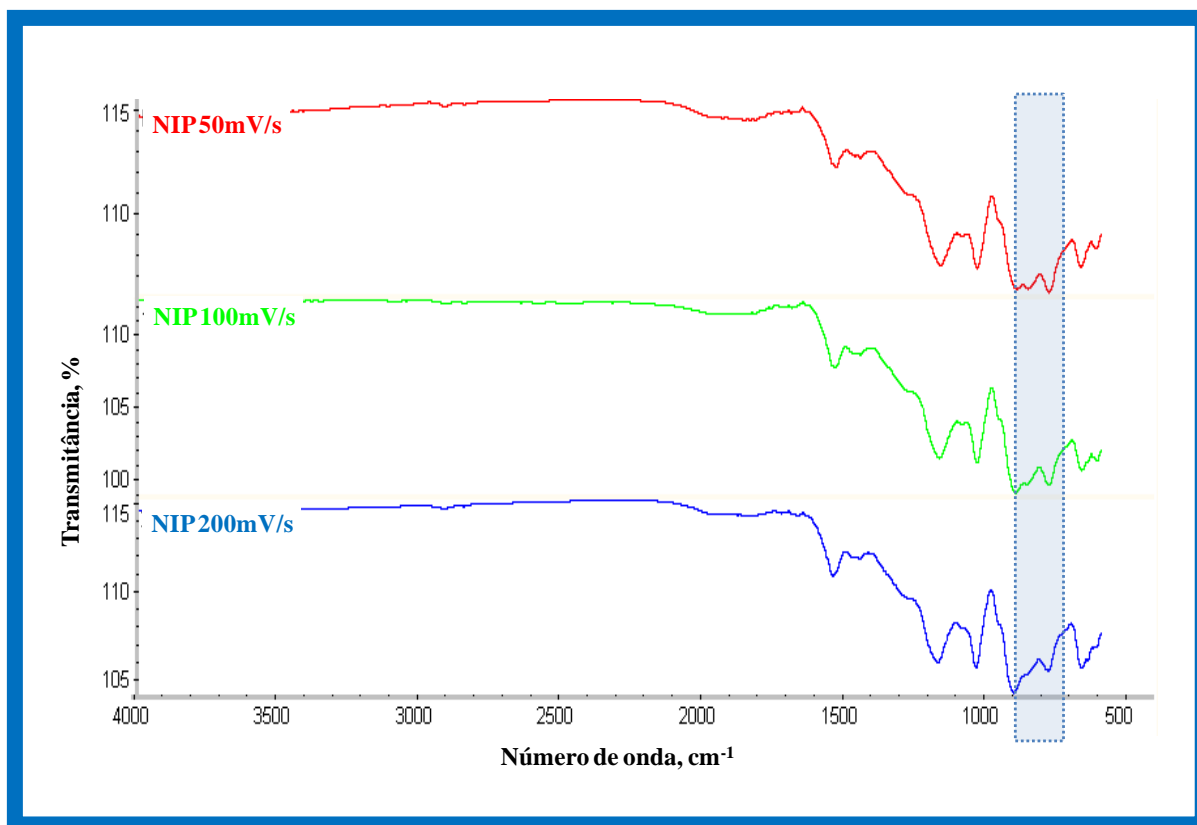


Figura 20 – Espectros de FTIR/ATR sobrepostos ao valor máximo de intensidade e com escalas variáveis, dos materiais NIP, obtidos a 50, 100 e 200mV/s.

3.1 Características Gerais de Funcionamento dos Sensores

As características gerais de funcionamento dos seis elétrodos seletivos preparados foram obtidas a partir de curvas de calibração, realizadas de acordo com o procedimento descrito em 2.6. Os parâmetros médios de calibração foram calculados a partir de 3 ensaios, de acordo com a informação aí indicada. O meio utilizado para a calibração foi tampão HEPES.

As membranas seletivas a CA15-3 foram preparadas com base em 2 componentes comuns, o PVC e o plastificante, variando-se o ionóforo e o aditivo lipofílico. Os dois ionóforos utilizados foram o material biomimético MIP ou o seu análogo não impresso, NIP. Estes materiais biomiméticos desempenham muitas vezes um papel de ionóforo neutro, não carregado, requerendo a adição de um aditivo lipofílico iônico à membrana.

Este aditivo fornece a carga necessária para aumentar a permeabilidade da membrana a espécies iônicas e a lipofilia imprescindível para evitar o seu leixivamento para a solução ensaiada. Para este efeito, foram utilizados aditivos lipofílicos de carga positiva, BTA, ou negativa, PCIFB (isto porque o tipo de carga da proteína depende do pH da solução). Neste sentido, a adição de um composto iônico de natureza lipofílica às membranas seletivas diminuiu a interferência de espécies de carga contrária e reduziu a resistência elétrica das membranas.

De uma forma geral, o parâmetro que mais condiciona a resposta de um eletrodo seletivo a uma proteína é o pH, dada a sua enorme influência na resposta do eletrodo, por um lado, e na ionização do analito, por outro. Neste sentido, e na sequência da informação recolhida na literatura para este efeito, optou-se pela avaliação da resposta dos eletrodos em solução tampão de pH igual a 5,0, cujos resultados se passam a descrever de seguida.

3.1.1 Calibrações em solução tampão

As curvas de calibração realizadas em solução tampão HEPES, de concentração igual a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, evidenciaram a existência de resposta potenciométrica para todos os ESIs envolvidos neste estudo. No entanto, a resposta obtida não originou, em muitos casos, qualquer utilidade prática, uma vez que o seu registo linear foi pouco consistente, relativamente ao que seria espectável para este tipo de eletrodos. Considerando que calibração por redução da concentração de CA15-3 limitou a variação de concentrações em estudo, optou-se pelo traçado de curvas de calibração com concentrações de CA15-3 diferentes.

Os registos mais adequados foram obtidos para concentrações de CA15-3 entre 22,4 e 3,0 U/mL. O resumo das características gerais de funcionamento dos eletrodos nestas condições encontra-se indicado na [Tabela 4](#). As curvas de calibração correspondentes foram representadas na [Figura 21](#).

De uma forma geral, os ESIs 3 e 6 apresentaram os valores de declive mais elevados (em valor absoluto), iguais a $-67,0$ e $-55,6$ mV/década, respetivamente, com um regime de resposta linear face ao logaritmo de concentração para valores de CA15-3 inferiores a 7,4 e 11,6 U/mL. Estes ESIs continham membranas com aditivo catiónico, dos quais apenas o primeiro eletrodo tinha material MIP, como ionóforo, na sua constituição. Este aditivo

poderia ter contribuído para atrair para a superfície do eletrodo a face mais “negativa” da proteína CA15-3, promovendo assim variações negativas no potencial registado. O comportamento do ESI 5, controlo de aditivo lipofílico aniónico, não foi lógico, não se encontrando nenhuma justificação para este registo.

Tabela 4 – Características gerais de funcionamento dos ESIs em tampão HEPES, $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L.

<i>Característica</i>	<i>ESI 1</i>	<i>ESI 2</i>	<i>ESI 3</i>	<i>ESI 4</i>	<i>ESI 5</i>	<i>ESI 6</i>
Declive , mV/década	+21,6	+23,0	-67,0	+28,4	-29,0	-55,6
R² , n=2	0,999	0,998	0,995	0,995	0,939	0,997
LD , U/mL	6,8	6,75	4,0	7,1	3,0	2,1
LIRL , U/mL	7,7	7,7	4,0	7,6	3,0	2,1
LSRL , U/mL	22,4	22,4	7,7	22,4	15,6	11,6
Tempo de resposta , s	<60	<60	<60	<60	<60	<60

Os restantes ESIs apresentaram declives mais baixos e valores de LD mais elevados. No entanto, o declive catiónico observado para estes eletrodos seria o esperado, uma vez que o ESI que não continha qualquer aditivo (apenas MIP, ESI 1) traduziu a leitura da proteína segundo a seu grau de protonação natural em solução aquosa (não forçando qualquer desvio por intermédio de outras cargas iónicas adicionadas à membrana). Sendo assim, estes eletrodos foram consistentes com a presença de proteína CA15-3 protonada com carga positiva a este valor de pH. Os valores absolutos de declive destes eletrodos pareceram apontar para uma molécula de CA15-3 com uma dupla carga positiva (teoricamente ~29 mV/década), mas no que diz respeito à deteção de iões complexos multicarga a resposta dos eletrodos seletivos pode não depender unicamente deste fator.

Considerando que o ionóforo MIP (ESI 1) foi capaz de produzir uma resposta semelhante aos eletrodos NIP (ESI 2) e MIP com aditivo (ESI 4), a resposta potenciométrica pareceu ser dominada pela interação do CA15-3 com o material polimérico, mais do que com o material impresso ou com o aditivo lipofílico aniónico.

3.1.2 Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade

O tempo de resposta apresentado correspondeu ao tempo necessário para que o potencial lido variasse menos de ± 1 mV. A concentração de CA15-3 foi decrescendo ao longo do tempo mas para esta estabilização a concentração inicial utilizada foi de 22,4 U/mL. Para a primeira variação de potencial, permitiu-se que o sistema estabilizasse ao longo de 15 minutos. Para as demais leituras de potencial, o tempo de resposta foi sempre inferior a 60 segundos.

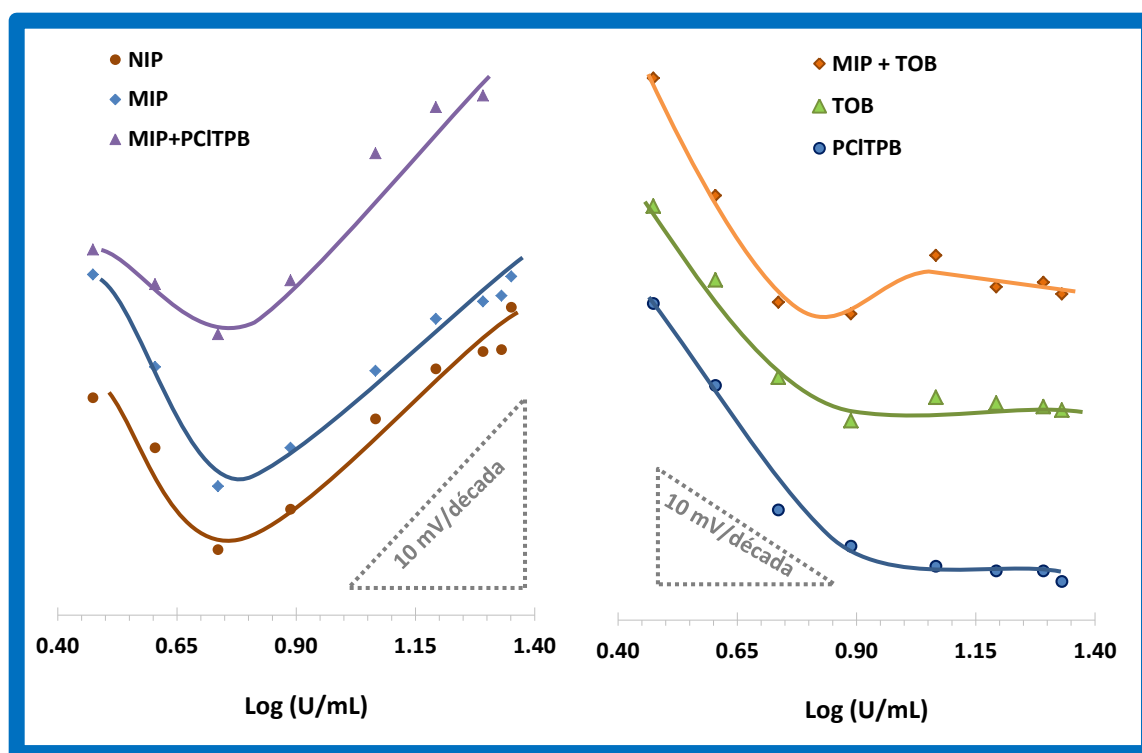


Figura 21 - Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL.

Em relação tempo de vida e à estabilidade, foi possível constatar, em calibrações consecutivas, uma elevada reprodutibilidade nas características de resposta dos eletrodos e uma boa repetibilidade da f.e.m.. Em geral os parâmetros acima mencionados permaneceram mais ou menos invariáveis ao longo de um período de cerca 4 semanas.

3.3 Seletividade do sensor

Os elétrodos seletivos de ião são seletivos a um ião, mas não específicos para essa espécie, podendo detetar outros iões em solução. O estudo de seletividade dos elétrodos seletivos de ião permitiria o cálculo de coeficientes de seletividade potenciométrica, que estimava o grau de interferência exercido por uma dada espécie iónica. No presente trabalho, não foi possível efetuar o cálculo destes coeficientes, uma vez que este é determinado pela razão dos valores LD do CA15-3 e do respetivo interferente, cujas unidades de concentração não são iguais (U/mL e g/mL respetivamente).

Neste trabalho, a seletividade foi avaliada através do método *das soluções misturadas*. As espécies interferentes escolhidas para este estudo foram a Acetilcolina, a Creatinina, a Creatina, a Ureia, a Glucose e a Cisteína, nas concentrações máximas admitidos no soro, sendo a sua presença acima desses limites pouco provável. Os registos gráficos das calibrações na presença de interferente encontram-se representados nas Figuras 22 a 27.

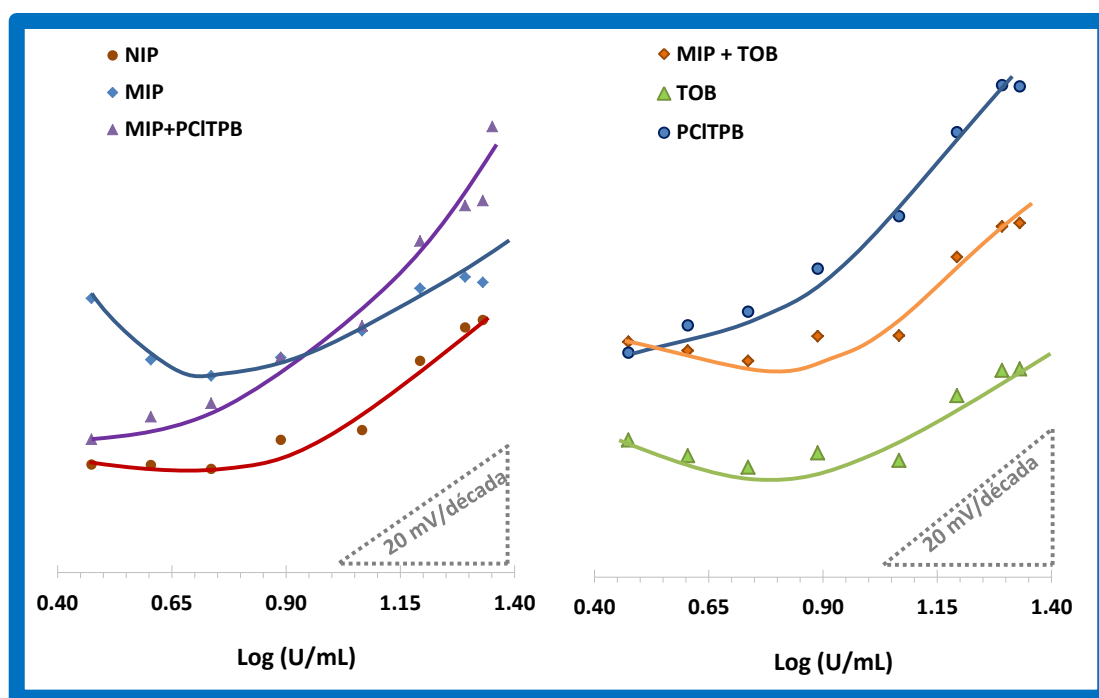


Figura 22 - Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Acetilcolina igual a $8,20 \times 10^{-5}$ g/mL.

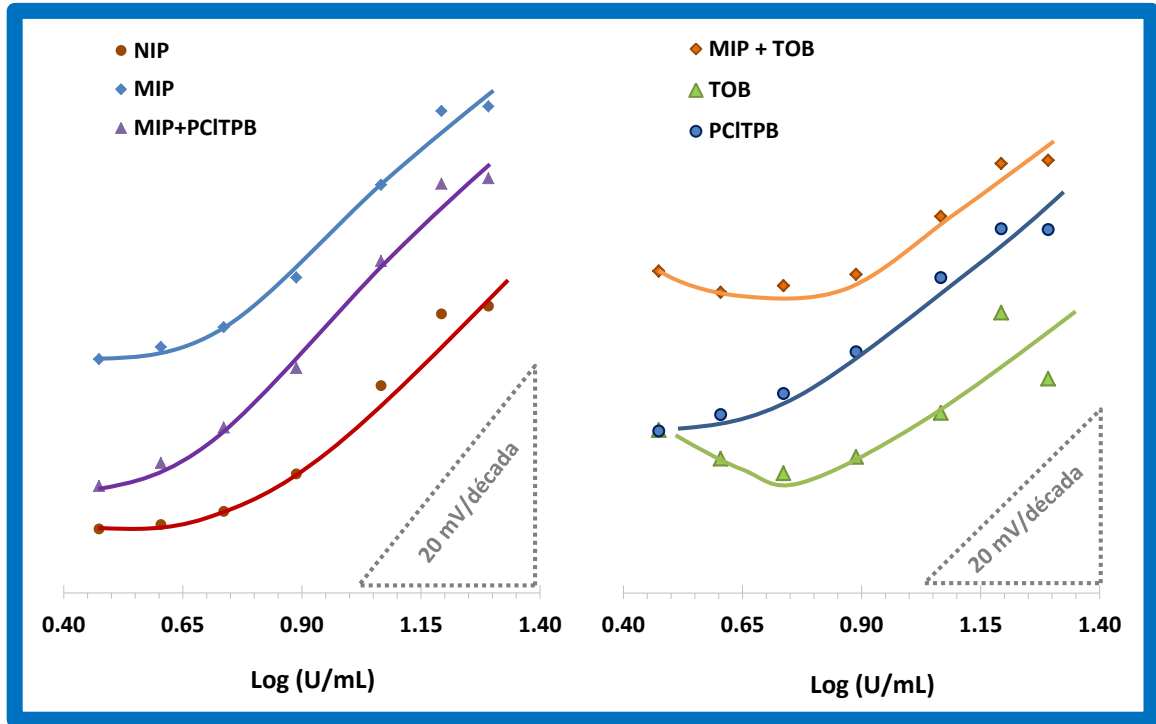


Figura 23 - Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Creatina igual a $9,30 \times 10^{-5}$ g/mL.

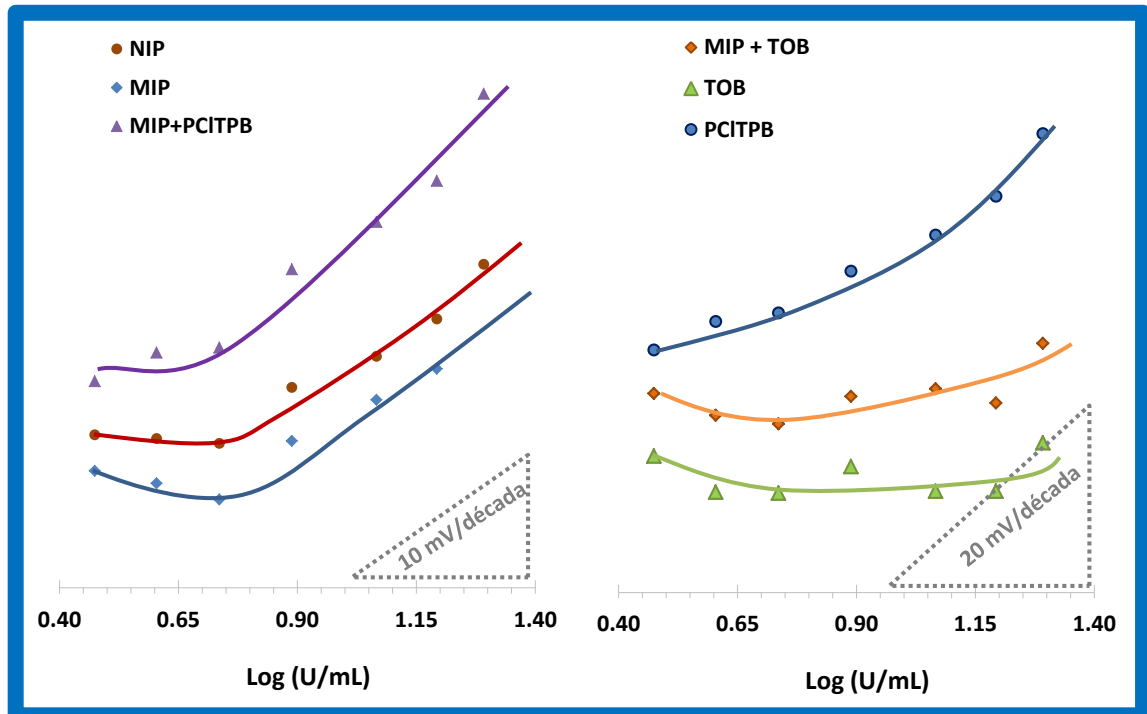


Figura 24 - Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Creatinina igual a $1,20 \times 10^{-4}$ g/mL.

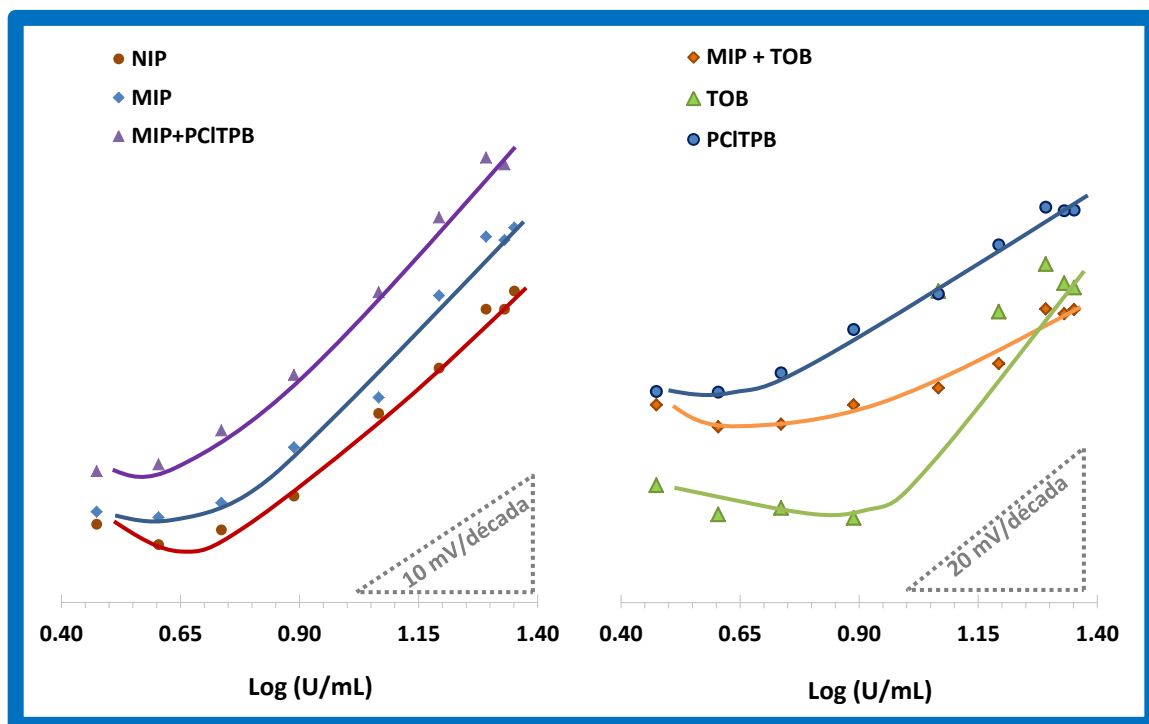


Figura 25 – Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Glucose igual a $1,05 \times 10^{-2}$ g/mL.

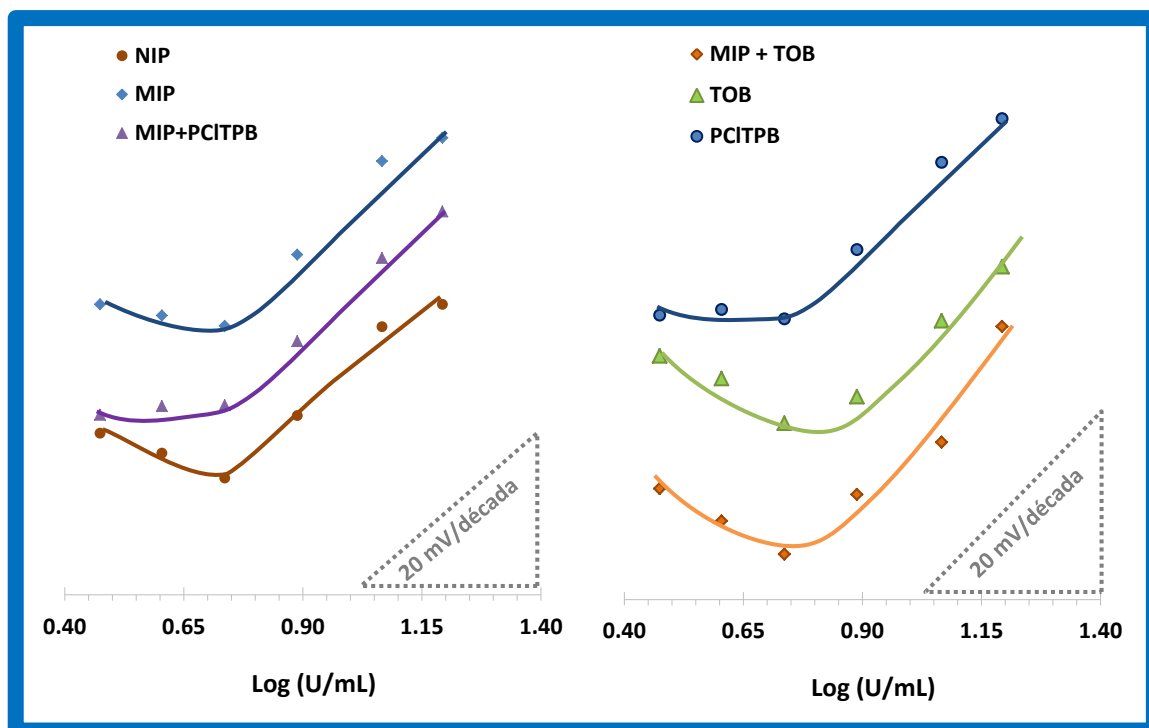


Figura 26 - Calibração com concentração de $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL de CA15-3 e $5,0 \times 10^{-4}$ g/mL de Cisteína, em tampão HEPES.

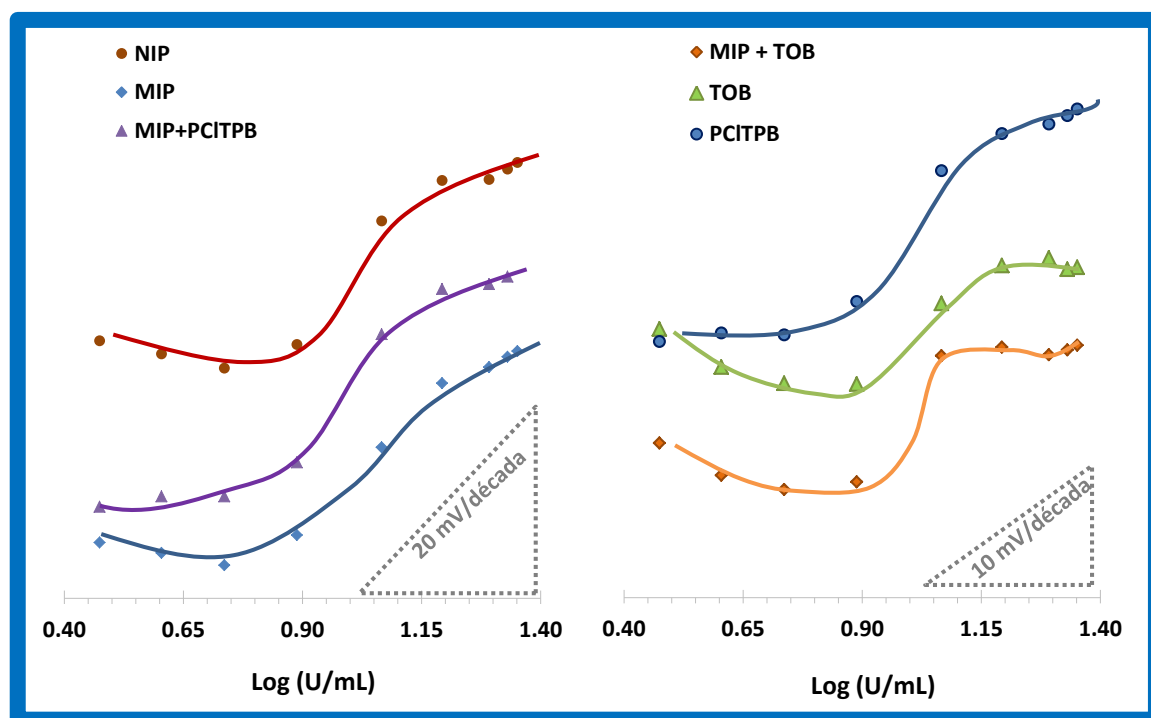


Figura 27 - Calibração dos ESIs em solução tampão HEPES, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL e uma concentração de Ureia igual a $4,00 \times 10^{-3}$ g/mL.

Tabela 5 – Valores de limite de detecção de diferentes ESIs na presença de várias espécies interferentes.

Interferente	Interferente g/mL	LD curva de calibração, U/mL		
		ESI 1	ESI 2	ESI 4
Acetilcolina	$8,20 \times 10^{-5}$	5,4	5,4	4,7
Creatina	$9,30 \times 10^{-5}$	3,0	5,0	3,8
Creatinina	$1,20 \times 10^{-4}$	4,9	5,2	4,5
Cisteína	$5,00 \times 10^{-4}$	5,1	5,1	5,1
Glucose	$1,05 \times 10^{-2}$	5,0	4,9	4,5
Urea	$4,00 \times 10^{-3}$	5,4	5,1	5,1
LD (soro)	—	5,1	5,4	4,6

De uma forma geral, as curvas de calibração dos ESIs 1, 2 e 4 não revelaram alterações de comportamento significativas quando na presença de uma espécie interferente, apresentando variações de LD pouco evidentes (Tabela 5). A única exceção a este registo foi a Ureia, que promoveu uma variação significativa na gama de linearidade observada com exceção do ESI 1, que continha apenas MIP na sua composição. Curiosamente, este efeito da ureia não se refletiu no valor de LD calculado em nenhum dos elétrodos uma vez que este parâmetro não foi grandemente afetado (o parâmetro realmente afetado foi o intervalo de linearidade, muito mais estreito neste caso).

O ESI 3 com material MIP+aditivo aniónico a servir de ionóforo, apresentou-se com valores de f.e.m. quase invariáveis, com flutuações ligeiras ao longo da curva de calibração. As variações de f.e.m. mais evidentes foram observadas para os interferentes Cisteína e Ureia, com um declive catiónico ao longo de todos os registos. No entanto, considerando que o padrão de comportamento destes elétrodos na ausência de interferência não se reproduziu na presença dessa interferência, não se tornou possível calcular os coeficientes de seletividade potenciométrica para este tipo de elétrodos. O mesmo se concluiu relativamente aos ESIs 5 e 6, elétrodos de controlo para os aditivos lipofílicos (sem ionóforo).

Neste sentido, os resultados sugeriram que a presença de um aditivo lipofílico na membrana promoveria e condicionaria a interferência de outras espécies iónicas na resposta do eléctrodo ao CA15-3, sendo o material MIP capaz de produzir uma resposta potenciométrica adequada, mesmo na ausência desse aditivo. Sendo assim, o material MIP na membrana atuou como um ionóforo carregado na membrana, fazendo dos ESIs 4 aqueles que apresentaram melhores características gerais de resposta potenciométrica.

3.4 Análise de amostras

Antes da análise das amostras propriamente dita, foram efetuadas calibrações com diferentes concentrações de CA15-3 em soro sintético, tendo por objetivo encontrar qual a menor concentração de CA15-3 que seria possível detetar nestas condições. Os resultados obtidos que mais se enquadravam na resposta desejada foram indicados na [tabela 6](#) e na [Figura 28](#).

Tabela 6 - Características gerais de funcionamentos dos ESIs em soro sintético.

<i>Característica</i>	<i>ESI 1</i>	<i>ESI 2</i>	<i>ESI 3</i>	<i>ESI 4</i>	<i>ESI 5</i>	<i>ESI 6</i>
Declive, mV/década	+55,1	+48,4	+41,9	+60,6	+25,5	+54,3
R², n=2	0,998	0,997	0,993	0,998	0,997	0,994
LD, U/mL	5,1	5,4	5,1	4,6	4,9	3,7
LIRL, U/mL	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	7,7
LSRL, U/mL	22,4	21,4	22,4	22,4	19,5	22,4
Tempo de resposta(s)	<60	<60	<60	<60	<60	<60

De uma forma geral, todos os elétrodos apresentaram declives catiónicos e valores de declive mais elevados do que os observados em solução tampão (Figura 28), sendo possível medir a presença de CA15-3 a partir de concentrações ~ 5 U/mL (tabela 7). Os melhores declives foram registados com os ESIs 1 e 4, correspondentes ao material MIP e ao MIP com aditivo aniónico (Tabela 6). Uma vez que o ponto comum entre estes elétrodos foi o material MIP, parece que a sua presença favoreceu a sensibilidade a resposta potenciométrica quando avaliada em soro. Comparando os ESIs 1 e 2, encontrou-se pela primeira vez uma diferença decorrente da impressão molecular: o declive dos elétrodos com material MIP foi superior em 13 % ao observado para os elétrodos com material NIP, indicando que a impressão molecular contribuiu também para a resposta potenciométrica.

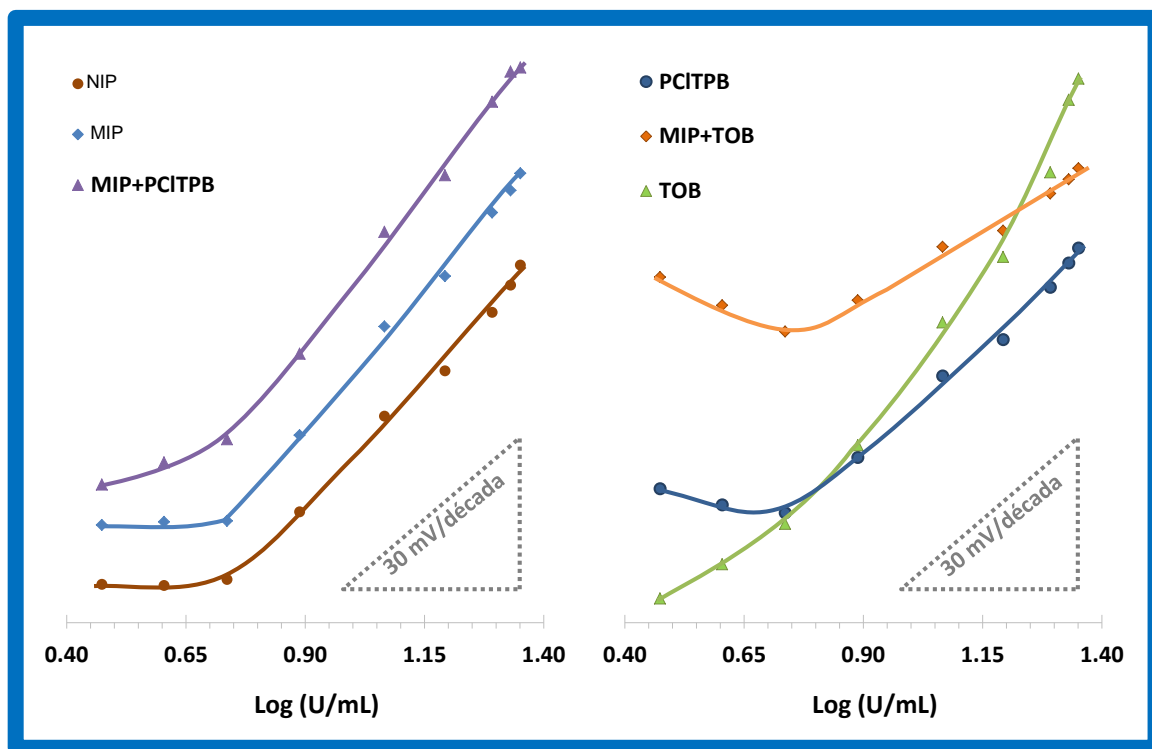


Figura 28 - Calibração dos ESIs em soro sintético, com uma concentração inicial de CA15-3 igual a $5,0 \times 10^{-2}$ U/mL.

Considerando os resultados anteriores, a análise potenciométrica de soro sintético dopado foi conduzida com o ESIs 1 e 4. As concentrações de CA15-3 dopadas no soro foram iguais a 5.4, 7.7 e 11.6, incluindo aqui o intervalo de CA15-3 esperado em indivíduos saudáveis/doentes.

Os resultados obtidos para o ESI 1 indicaram uma recuperação média igual a 99%, compreendida entre 98.2 e 100,2 %. O erro relativo correspondente a este estudo variou entre 0,15 e 1.87%.

Os resultados obtidos para o ESI 4 indicaram uma recuperação média igual a 97.8%, compreendida entre 96.8 e 99.0. O erro relativo correspondente variou entre 1.01% e 3,23%.

4. Conclusões

A técnica de polimerização por impressão molecular foi utilizada para produzir sensores de transdução potenciométrica. Esta técnica foi aplicada com sucesso no que diz respeito à produção de materiais biomiméticos sensíveis ao biomarcador cancerígeno CA15-3.

Os materiais sensores foram baseados em polipirrol, numa nanoestrutura compacta, confirmada quimicamente por ensaios de FTIR e de Raman. Este material polimérico pareceu ser o maior responsável pela resposta potenciométrica observada para o CA15-3 em todos os elétrodos. Este material teve um comportamento de ionóforo carregado no interior de membrana, uma vez que não foi necessária a presença de um aditivo lipofílico para promover variações de potencial face à variação da concentração de uma espécie iónica externa. A impressão molecular teve uma contribuição pouco significativa para a resposta observada em solução tampão, mas que se tornou mais evidente quando o meio em estudo foi o soro sintético.

As melhores características de resposta foram obtidas com elétrodos que continham membranas baseadas em materiais MIP, independentemente da presença ou ausência do aditivo lipofílico, na presença de soro sintético. Estes elétrodos apresentaram também as melhores características de seletividade, podendo o aditivo lipofílico promoveria a interferência de outras espécies iónicas na resposta do eléctrodo ao CA15-3. De uma forma geral, o método proposto foi simples, barato, preciso e de baixo custo em relação ao consumo de reagentes e equipamento envolvidos.

Presentemente, seria de todo o interesse dar continuidade a este trabalho em contexto real, uma vez que o dispositivo desenvolvido foi apenas testado em amostras sintéticas, mas o sistema parece revelar-se promissor para aplicação em contexto clínico.

Numa perspectiva futura, seria interessante tentar reproduzir a metodologia de impressão molecular, baseada em pirrol, em conjugação com outros materiais condutores como nanopartículas metálicas, alótropos de carbono (grafeno ou nanotubos de carbono) ou mesmo quantidades equimolares de outros monómeros condutores.

5. Referências Bibliográficas

1. Organization), G.W.H. *Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed 2013 11*]; Available from: http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf.
2. Banin Hirata, B.K., et al., *Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior*. Dis Markers, 2014. **2014**: p. 513158.
3. Mason, E.F. and J.C. Rathmell, *Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(4): p. 645-54.
4. Rachel Ann Clark, R.L., Suzanne Snedeker, , October 1997, *The Biology of Breast Cancer, Q&A's from the Cornell University Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors in New York State*. 1997.
6. Zita Teresa Seabra, J.L., *Imagiologia no Carcinoma da Mama*. Revista Portuguesa de Cirurgia 2013. **27**: p. 59-70.
7. co-autores, H.G.e., *Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama*. Alto comissariado da Saúde, 2009.
8. Caggiano, C.A.P.a.V., *Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers*. Journal of Cancer Epidemiology, 2014. **2014**: p. 11 pages.
9. Tang, S.S. and G.P. Gui, *Biomarkers in the diagnosis of primary and recurrent breast cancer*. Biomark Med, 2012. **6**(5): p. 567-85.
10. Diaconu, I., et al., *Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer*. Clin Chim Acta, 2013. **425**: p. 128-38.
11. Misek, D.E. and E.H. Kim, *Protein biomarkers for the early detection of breast cancer*. Int J Proteomics, 2011. **2011**: p. 343582.

12. Darwish, I.A., et al., *Novel automated flow-based immunosensor for real-time measurement of the breast cancer biomarker CA15-3 in serum*. *Talanta*, 2012. **97**: p. 499-504.
13. Li, H., et al., *Electrochemical immunosensor with N-doped graphene-modified electrode for label-free detection of the breast cancer biomarker CA 15-3*. *Biosens Bioelectron*, 2013. **43**: p. 25-9.
14. Ge, S., et al., *Disposable electrochemical immunosensor for simultaneous assay of a panel of breast cancer tumor markers*. *Analyst*, 2012. **137**(20): p. 4727-33.
15. Chang, C.C., et al., *High-sensitivity detection of carbohydrate antigen 15-3 using a gold/zinc oxide thin film surface plasmon resonance-based biosensor*. *Anal Chem*, 2010. **82**(4): p. 1207-12.
16. Zhu, H., et al., *Rapid and label-free detection of breast cancer biomarker CA15-3 in clinical human serum samples with optofluidic ring resonator sensors*. *Anal Chem*, 2009. **81**(24): p. 9858-65.
17. Zhang, H.G., et al., *Evaluation of a new CA15-3 protein assay method: optical protein-chip system for clinical application*. *Clin Chem*, 2005. **51**(6): p. 1038-40.
18. Zheng, D., et al., *Sensitive detection of CD147/EMMPRIN and its expression on cancer cells with electrochemical technique*. *Talanta*, 2013. **105**: p. 187-91.
19. Li, T., et al., *Detection of breast cancer cells specially and accurately by an electrochemical method*. *Biosens Bioelectron*, 2010. **25**(12): p. 2686-9.
20. Mukundan, H., et al., *Optimizing a waveguide-based sandwich immunoassay for tumor biomarkers: evaluating fluorescent labels and functional surfaces*. *Bioconjug Chem*, 2009. **20**(2): p. 222-30.
21. Myung, S., et al., *Graphene-encapsulated nanoparticle-based biosensor for the selective detection of cancer biomarkers*. *Adv Mater*, 2011. **23**(19): p. 2221-5.
22. Kim, M.Y. and S. Jeong, *In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells*. *Nucleic Acid Ther*, 2011. **21**(3): p. 173-8.
23. Gruhl, F.J. and K. Lange, *Surface modification of an acoustic biosensor allowing the detection of low concentrations of cancer markers*. *Analytical Biochemistry*, 2012. **420**(2): p. 188-190.
24. Kim, K.W., et al., *Label-free biosensor based on an electrical tracing-assisted silicon microring resonator with a low-cost broadband source*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013. **46**: p. 15-21.
25. Zielinski, R., et al., *Affitoxin--a novel recombinant, HER2-specific, anticancer agent for targeted therapy of HER2-positive tumors*. *J Immunother*, 2009. **32**(8): p. 817-25.
26. Park, H., et al., *SERS imaging of HER2-overexpressed MCF7 cells using antibody-conjugated gold nanorods*. *Phys Chem Chem Phys*, 2009. **11**(34): p. 7444-9.

27. Ekerljung, L., et al., *Dimeric HER2-specific affibody molecules inhibit proliferation of the SKBR-3 breast cancer cell line*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **377**(2): p. 489-94.
28. Martin, V.S., et al., *Surface plasmon resonance investigations of human epidermal growth factor receptor 2*. *Appl Spectrosc*, 2006. **60**(9): p. 994-1003.
29. Malm, M., et al., *Inhibiting HER3-mediated tumor cell growth with affibody molecules engineered to low picomolar affinity by position-directed error-prone PCR-like diversification*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e62791.
30. Laurieri, N., et al., *A novel color change mechanism for breast cancer biomarker detection: naphthoquinones as specific ligands of human arylamine N-acetyltransferase 1*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e70600.
31. Wang, H.N., et al., *Molecular sentinel-on-chip for SERS-based biosensing*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013. **15**(16): p. 6008-6015.
32. Xu, X., et al., *Electrochemical genosensor for detection of human mammaglobin in polymerase chain reaction amplification products of breast cancer patients*. *Anal Bioanal Chem*, 2013. **405**(10): p. 3097-103.
33. Zhu, X., et al., *Sensitive detection of human breast cancer cells based on aptamer-cell-aptamer sandwich architecture*. *Anal Chim Acta*, 2013. **764**: p. 59-63.
34. Zhao, J., et al., *A novel sensing platform using aptamer and RNA polymerase-based amplification for detection of cancer cells*. *Anal Chim Acta*, 2012. **745**: p. 106-11.
35. Zheng, X.T. and C.M. Li, *Single living cell detection of telomerase over-expression for cancer detection by an optical fiber nanobiosensor*. *Biosens Bioelectron*, 2010. **25**(6): p. 1548-52.
36. Kang, J.H., et al., *Gold nanoparticle-based colorimetric assay for cancer diagnosis*. *Biosens Bioelectron*, 2010. **25**(8): p. 1869-74.
37. Duffy, M.J., et al., *CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer*. *Int J Biol Markers*, 2000. **15**(4): p. 330-3.
38. Duffy, M.J., D. Evoy, and E.W. McDermott, *CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer*. *Clin Chim Acta*, 2010. **411**(23-24): p. 1869-74.
39. C. Mathelin , C.K., M.-C. Rio, *Marqueurs protéiques circulants et cancer du sein*. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 2006. **34**: p. 638–646.
40. Abd Hamid, U.M., et al., *A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression*. *Glycobiology*, 2008. **18**(12): p. 1105-18.
41. J. ALBERTO FERNANDEZ-POL, P.D.H., DENNIS J. KLOS, *Genomics, Proteomics and Cancer: Specific Ribosomal, Mitochondrial, and Tumor Reactive Proteins Can Be Used as Biomarkers for Early Detection of Breast Cancer in Serum*. *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS* 2005. **2**: p. 1-24.

42. Liu, Y.M., et al., *Sensitive detection of tumor marker CA15-3 in human serum by capillary electrophoretic immunoassay with chemiluminescence detection*. J Sep Sci, 2008. **31**(6-7): p. 1151-5.
43. Gonçalves, M.L.S.S., *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções. Análise Quantitativa*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa 1996.
44. Ali, H.Q., N.K. Mahdi, and M.H. Al-Jowher, *The value of CA15-3 in diagnosis, prognosis and treatment response in women with breast cancer*. J Pak Med Assoc, 2013. **63**(9): p. 1138-41.
45. Ge, S., X. Jiao, and D. Chen, *Ultrasensitive electrochemical immunosensor for CA 15-3 using thionine-nanoporous gold-graphene as a platform and horseradish peroxidase-encapsulated liposomes as signal amplification*. Analyst, 2012. **137**(19): p. 4440-7.
46. Park, S., et al., *Electroreduction-based electrochemical-enzymatic redox cycling for the detection of cancer antigen 15-3 using graphene oxide-modified indium-tin oxide electrodes*. Anal Chem, 2014. **86**(3): p. 1560-6.
47. Yadong Yang, Z.Z., Hongming Liu, Tangyou Zhu, Jinjin Wu, Mengxia Li, Dong Wang, , *Double-Layer Nanogold and Double-Strand DNA-Modified Electrode for Electrochemical Immunoassay of Cancer Antigen 15-3*. Electroanalysis, 2008. **24**(20): p. 2621–2628.
48. N. Masqué, R.M.M., F. Borrull, *New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water*. Trends in Analytical Chemistry, 1998. **17**: p. 384 - 394.
49. A. G. Mayes, K.M., *Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry?* Trends in Analytical Chemistry, 1997. **16**(321 - 332).
50. B. Uslu, S.A.O., *Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments*. Electrochemistry, 2011. **44**: p. 2644 - 2702.
51. Ozkan, S.A., *Principles and techniques of electroanalytical stripping methods for pharmaceutically active compounds in dosage forms and biological samples*. Current Pharmaceutical Analysis., 2009. **5**: p. 127 - 143.
52. Y. Wang, Z.Z., V. Jain, et al, *Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010. **146**: p. 381 - 387.
53. A. Merkoçi, S.A., *New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. **21**: p. 717 - 725.
54. F. Qiao, H.S., H. Yan, et al, *Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction*. Chromatographia, 2006. **64**: p. 625 - 634.
55. F. T. C. Moreira, R.A.F.D., J. P. C. Noronhad, et al, *Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **28**: p. 243– 250.

56. Sharma, P.S., et al., *Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(10): p. 3177-204.
57. Whitcombe, M.J., et al., *The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(3): p. 1547-71.
58. Malitesta, C., et al., *MIP sensors--the electrochemical approach*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(5): p. 1827-46.
59. Vasapollo, G., et al., *Molecularly imprinted polymers: present and future prospective*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(9): p. 5908-45.
60. Yang, K., et al., *Protein-imprinted materials: rational design, application and challenges*. Anal Bioanal Chem, 2012. **403**(8): p. 2173-83.
61. Saridakis, E. and N.E. Chayen, *Imprinted polymers assisting protein crystallization*. Trends Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 515-20.
62. Turner, A.P., *Biosensors: sense and sensibility*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(8): p. 3184-96.
63. Tothill, I.E., *Biosensors for cancer markers diagnosis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**: p. 55-62.
64. M. Pohanka, P.S., *Electrochemical biosensors – principles and applications*. Journal of Applied Biomedicine., 2008. **6**: p. 57 - 64.
65. Thevenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosens Bioelectron, 2001. **16**(1-2): p. 121-31.
66. P. B. Lippa, L.J.S., D. W. Chan, *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta., 2001. **314**: p. 1 - 26.
67. Holford, T.R., F. Davis, and S.P. Higson, *Recent trends in antibody based sensors*. Biosens Bioelectron, 2012. **34**(1): p. 12-24.
68. Pritiraj Mohantya, Y.C., Xihua Wanga, Mi K. Honga, Carol L. Rosenbergb, David T. Weaver, Shyamsunder Erramillia, *Field Effect Transistor Nanosensor for Breast Cancer Diagnostics*. Biosensors and Molecular Technologies for Cancer Diagnostics, 2012: p. 1-19.
69. Chemistry, I.U.o.P.a.A. *Compendium on Analytical Nomenclature*. 2000; Available from: http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/Cha08sec322.pdf.
70. Moreira, F., *Fast screening for diagnostic of heart ischemic episodes*. Dissertação (Doutoramento) -Universidade Nova de Lisboa, s n. Lisboa 2013.
71. IUPAC, I.U.o.P.a.A.C., Analytical Chemistry Division Commission on Electroanalytical Chemistry, BUCK R. P., LINDNER E, *Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes*. Pure Appl. Chem, 1994. **66**: p. 2527-2536.
72. Kamel, A.H., et al., *Novel potentiometric sensors of molecular imprinted polymers for specific binding of chlormequat*. Electroanalysis, 2008. **20**(2): p. 194-202.

73. Moreira, F.T.C., et al., *Myoglobin-biomimetic electroactive materials made by surface molecular imprinting on silica beads and their use as ionophores in polymeric membranes for potentiometric transduction*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011. **26**(12): p. 4760-4766.
74. Bakker, E. and E. Pretsch, *Modern potentiometry*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**(30): p. 5660-8.
75. Lindner, E. and B.D. Pendley, *A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: an analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfalls; tutorial*. *Anal Chim Acta*, 2013. **762**: p. 1-13.
76. R. P. Buck, E.L., *Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes*. International Union of Pure and Applied Chemistry, 1994. **66**: p. 2527 - 2536.
77. Kamel, A.H., et al., *Sulfadiazine-Potentiometric Sensors for Flow and Batch Determinations of Sulfadiazine in Drugs and Biological Fluids*. *Analytical Sciences*, 2009. **25**(3): p. 365-371.
78. Moreira, F.T.C., et al., *Protein-responsive polymers for point-of-care detection of cardiac biomarker*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014. **196**: p. 123-132.
79. Deepak P. Dubal, S.H.L., Jong Guk Kim, Won Bae Kim and Chandrakant D. Lokhande, *Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor*. *J. Mater. Chem*, 2012. **22**: p. 3044.
80. Mei Li , Z.W.a.L.J., *Polypyrrole nanofiber arrays synthesized by a biphasic electrochemical strategy*. *The Royal Society of Chemistry*, 2008. **18**: p. 2276-2280.
81. Sunjie Ye, L.F., Xutang Qing and Yun Lu, *Surface-enhanced Raman scattering study of Ag@PPy nanoparticles*. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2009. **41**(10): p. 1119-1123.
82. Deepak P. Dubal, S.H.L., Jong Guk Kim, Won Bae Kim and Chandrakant D. Lokhande, *Porous polypyrrole clusters prepared by electropolymerization for a high performance supercapacitor*. *Journal of Materials Chemistry*, 2012. **22**: p. 3044–3052.
83. Lisete C. Scienza , G.E.T., *Preparation and Surface Analysis of PPY/SDBS Films on Aluminum Substrates*. *Polímeros*, 2001. **3**: p. 142-148.