

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO
ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE
BIOMARCADORES PROTEICOS UTILIZANDO
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ARRANJO DE ELETRODOS
DESCARTÁVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE
PRÓSTATA**

***Camila dos Anjos Proença**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

*Bolsista CAPES

São Carlos/SP

2019



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Camila dos Anjos Proença, realizada em 05/04/2019:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
UFSCar

Profa. Dra. Roberta Cerasi Urban
UFSCar

Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini
UFSCar

Prof. Dr. Murilo Santhiago
CNPq

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota
UNICAMP

Dedico essa tese aos meus pais Ércio e Inesita e minha irmã minha Marielle por toda dedicação em buscar sempre o melhor para a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença em minha vida e por me permitir desenvolver este trabalho. Aos meus pais, Ércio e Inesita, e minha irmã, Marielle, pela paciência, carinho, apoio, compreensão e por todo amor que concedem.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela confiança em mim depositada, pelas discussões científicas, estímulos e tranquilidade. Ao Laboratório de Bioanalítica e Eletroanalítica (LaBiE), aos ex-integrantes Camila Rizzardi, Camila Erbereli, Grazi, Mari, Diego, Alexandrino e Thiago Guerreiro e aos atuais integrantes Tássia, Wilson, Carol, Elsa, Taíse e Karla. Em especial a Thaísa e Tayane pelas horas de companhia, paciência e estarem sempre dispostas a ajudar.

As pessoas do Grupo de Quimiometria Aplicada (GQA) Fred, Jorge, Bolaji, Cecília, Wallace, Danilo, Prof. Renato e, em especial, ao Benedito pelo companheirismo e ajuda. Ao pessoal do Laboratório de Analítica, Bioanalítica e Biossensores (LABBES) Paty, Ademar, Thiago Almeida, Laís, Bruna, Avaré, Elson, Anderson (Índio) e Geiser.

Ao Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) coordenado pela Prof. Márcia Cominetti, em especial, a Marina por preparar as culturas de células de próstata.

Ao Makoto (Makotinho) pelas relevantes discussões.

À Universidade do Estado de Colorado - *Colorado State University*, ao meu supervisor Prof. Dr. Charles S. Henry pela oportunidade de estágio e aos membros do grupo de pesquisa: Yuanyuan Yag (Shirley), Robert Channon (Rob), Kevin Klunder, Cynthia Mccord, Zarina Munshi, Julaluk Noiphung (Jeff), Katrina e Michael Nguyen (Mike). A família Sack: Acácia, Bodhi, Shelby e James que fizeram minha estadia nos EUA muito mais feliz.

Aos amigos que fiz em São Carlos, Dona Ilma, Mayara, Manoel, Pedro, Fabi (USP-São Paulo) Gabi (Fred), Tâmara, João, Val, Sérgio e Érica.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade, bem como os funcionários que o compõem. Por final, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no país e no exterior (Código de Financiamento 001).

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence os obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” (José de Alencar)

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab1 – Anticorpo monoclonal

Ab2 – Anticorpo policlonal

Ab2-PM-HRP – Bioconjugado composto por partícula magnética contendo anticorpo policlonal e Peroxidase ancorados

Ab* – Anticorpo conjugado com a enzima

Ag – Antígeno

AgAb – Complexo antígeno-anticorpo

Ag* – Antígeno conjugado com a enzima

AuNP – Nanopartícula de Ouro

AuNPs-GHS – Nanopartícula de Ouro modificada com Glutathione

BSA – Albumina de Soro Bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

DRE – Exame retal digital (do inglês, digital rectal exam)

ECL – Eletroquimioluminescência

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

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay (do inglês: Enzyme-linked immunosorbent assay)

GHS – Glutathione

HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)-piperazin-1-il]-etanossulfônico (do inglês, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid)

HRP – Peroxidase de raiz forte

HQ – Hidroquinona

H₂O₂-peróxido de hidrogênio

LbL – Layer-by-Layer

LoD – Limite de Detecção (do inglês, Limit of Detection)

MES – Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico

MNP – Nanopartículas magnéticas (do inglês, *magnetic nanoparticle*)

NHS – Hidroxisuccinamida

PAP –Fosfatase Ácida Prostática (do inglês,)

PBS – Tampão Fosfato Salino

PBS-Tween – Tampão Fosfato Salino + Tween-20

PDDA – cloreto de poli(dialil dimetil-amônio)

PM – Partícula Magnética

PSA – Antígeno Prostático Específico (do inglês,)

Tween-20 – Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Biomarcadores aplicados para o diagnóstico do câncer de próstata.	9
TABELA 4. 1 - Parâmetros analíticos para detecção de p16 por diferentes metodologias.	60
TABELA 5. 1 - Parâmetros analíticos para detecção de PSA por diferentes metodologias.	74
TABELA 6. 1 - Sensibilidade e Limite de detecção para FeONPs e CoZnFeONPs.	95
TABELA 6.2 - Parâmetros analíticos obtidos para detecção de CYFRA 21-1 com base nos imunoenaios realizado utilizando as diferentes MNPs.	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Representação esquemática dos componentes de um biossensor.	15
FIGURA 2.2 - Tipos de imunoenensaio ELISA: (A) configuração direta, (B) configuração indireta, (C) competitiva e (D) indireta do tipo sanduíche. (adaptado de Pensabio).	21
FIGURA 2.3 – (A) Eletrodos de carbono individuais e (B) arranjos de eletrodos comerciais. Fonte: <i>Dropsens</i> . ¹⁰⁶	23
FIGURA 2.4– Configurações de arranjos de eletrodos em (A) ¹⁰⁷ de trabalho e contra eletrodo e seu respectivo eletrodo de referência e (B) ^{75, 108} eletrodos de trabalho delimitados com papel adesivo vinílico formando micropoços.	24
FIGURA 4.1 – Representação esquemática das etapas de formação do imunossensor com formato sanduíche.	35
FIGURA 4.2- Representação da fabricação do arranjo de eletrodo de trabalho e contra eletrodo e pela técnica <i>screen printing</i>	39
FIGURA 4.3 - Fotografias do arranjo de eletrodo de trabalho e contra eletrodo em (A) e eletrodo de pseudo-referência em (B) obtidos pela técnica de <i>screen printing</i> patentado por Faria <i>et al.</i> via Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160109841, data de depósito: 13/05/2016.....	40
FIGURA 4.4 - Representação esquemática das etapas de modificação dos eletrodos.....	41
FIGURA 4.5 - Ilustração da reação covalente entre AuNP e anticorpo por meio da solução mista de EDC/NHS.....	42
FIGURA 4.6 - Representação das etapas de montagem do dispositivo microfluídico descartável desenvolvido, o qual contém o arranjo de eletrodos de trabalho e contra-eletrodo, o cartão adesivo contendo o canal microfluídico e o eletrodo de referência.	43
FIGURA 4.7 - Etapas para a preparação do bioconjugado Ab2-PM-HRP.	44

FIGURA 4.8 – Representação esquemática do processo de incubação utilizado para a detecção dos biomarcadores.....	45
FIGURA 4.9 - Representação esquemática do sistema microfluídico.....	46
FIGURA 4. 10 - Imagens de HRMET (A) e MET e B) e histograma (inserção) da AuNP-GSH (C), imagem de MEV da superfície do SPCE sem modificação (D), e com AuNP-GSH depositado (E) e análise EDS (F), MEV das PMs e histograma (G-I).....	48
FIGURA 4. 11 -Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (10-125 mV s ⁻¹) para (A) SPE e (B) AuNP-GSH/SPE modificados previamente com PDDA e AuNP-GSH utilizando ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol mL ⁻¹ preparados em KCl 0,5 mol L ⁻¹ e (C) gráfico da corrente de pico anódico vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura para SPE sem modificação (linha preta) e AuNP-GSH/SPE (linha vermelha).....	50
FIGURA 4.12 – Voltamogramas cíclicos de (A) SPE e (B) AuNP-GSH/SPE (3º ciclo) a 50 mV s ⁻¹ em meio de ácido ferroceno monocarboxílico em 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ e KCl 0,5 mol L ⁻¹	51
FIGURA 4. 13 – Voltamogramas cíclicos do (A) SPE e (B) AuNP-GSH/SPE (3º ciclo) em meio de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹ e velocidade de varredura igual a 50 mV s ⁻¹	52
FIGURA 4. 14 - Otimização do tempo de incubação para a imuno-captura do biomarcador p16 e detecção utilizando o dispositivo microfluídico. Concentração de p16 de 50 pg mL ⁻¹ em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10,0 mmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹ (n≥4).	55
FIGURA 4. 15 - Resposta transiente de corrente em função da vazão para a detecção de p16 utilizando o imunoensaios proposto. Concentração de p16 de 50 pg mL ⁻¹ preparada em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10 mmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹	56
FIGURA 4. 16- (A) Respostas amperométricas obtidas na detecção de p16 em soro de bezerro a -0,2 V vs. Ag AgCl desenvolvido pela injeção de uma mistura	

de 10,0 mmol L ⁻¹ HQ e 1,0 mmol L ⁻¹ H ₂ O ₂ e (B) curva de calibração para o p16.	58
FIGURA 4.17 - Determinação de p16 em pacientes com câncer de próstata usando os imunossensores propostos e o método ELISA.....	61
FIGURA 5. 1 - Modificação dos eletrodos de trabalho para a detecção multiplexada dos biomarcadores PSA e GSTP1.	66
FIGURA 5 2 - Otimização do tempo de incubação para a detecção de GSTP1 utilizando o imunoenensaio desenvolvido. Concentração de GSTP1de 50 pg mL ⁻¹ (n≥4).	68
FIGURA 5.3- Resposta transiente de corrente em função da vazão para a detecção de GSTP1 utilizando o imunoenensaio proposto. Concentração GSTP1 de 50 pg mL ⁻¹ preparada em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10 mmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹ . Na inserção encontra-se o gráfico de barras referente a média das correntes de pico obtida para cada vazão estudada (n≥4).	70
FIGURA 5.4 - Resposta transiente de corrente em função da vazão para a detecção de GSTP1 utilizando o imunoenensaio proposto. Concentração GSTP1 de 50 pg mL ⁻¹ preparada em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10 mmol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ 1,0 mmol L ⁻¹ . Na inserção encontra-se o gráfico de barras referente a média das correntes de pico obtida para cada vazão estudada (n≥4).	71
FIGURA 5.5 - Comparação dos resultados obtidos para detecção dos biomarcadores PSA e GSTP1 em soro de paciente utilizando o imunoenensaio desenvolvido, ELISA para GSTP1 e o ensaio de ECL para o PSA (n≥4).	75
FIGURA 6.1- Imagem MEV da superfície de carbono (A), superfície de carbono modificada GO (BC), análise EDX de SPE (i) e SPE/GO (ii) (D), imagens MET obtidas para Fe ₃ O ₄ (E), Co _{0.25} Zn _{0.75} Fe ₂ O ₄ (F) com histogramas (inseridos).	86
FIGURA 6. 2 - Rugosidade dos eletrodos SPE sem modificação (A) e modificado com GO (B).....	87
FIGURA 6.3 - Otimização da quantidade de GO utilizado na modificação de eletrodos de carbono (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg mL ⁻¹) via técnica de CV em solução	

contendo ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em cloreto de potássio 0,5 mol L ⁻¹ a uma velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	89
FIGURA 6.4 - Voltamogramas cíclicos realizados com os eletrodos de carbono (A) não modificados e (C) modificados com GO (3° ciclo), em diferentes velocidades de varredura, na presença de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mmol L ⁻¹ . Variação de j vs. $v^{1/2}$ dos eletrodos (B) não modificados e (D) modificados com GO.	90
FIGURA 6.5 - Voltamogramas obtidos com os eletrodos: sem modificação (linha preta) e com FeONPs (linha vermelha) e CoZnFeONPs (linha azul) (3° ciclo), na presença de 1,0 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ em PBS. $v=50$ mV s ⁻¹	91
FIGURA 6.6 - Voltamogramas dos eletrodos modificados com FeONPs (A) e CoZnFeONPs (B) (3° ciclo) na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ (0-15 μmol L ⁻¹) preparados em 0,01 mol L ⁻¹ de PBS. $v=50$ mV s ⁻¹ . Inserções mostram as variações de corrente em função da concentração de H ₂ O ₂	93
FIGURA 6.7 - Influência da purga de N ₂ na (A) voltametria cíclica de FeONPs e (B) CoZnFeONPs (3° ciclo) na superfície de eletrodos de SPE na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ em 0,01 mol L ⁻¹ de PBS.	94
FIGURA 6.8 - Gráfico de Lineweaver-Burk da redução de H ₂ O ₂ catalisada por eletrodos modificados com (A) FeONPs e (B) CoZnFeONPs.	96
FIGURA 6.9 - Perfis amperométricos para CYFRA 21-1 em um sistema microfluídico utilizando 0,01 mol L ⁻¹ de PBS em -0,3 V vs. Ag AgCl, após injeção de 50 μmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂ para (A) FeONPs e (C) CoZnFeONPs e correspondentes curvas de calibração para (B) FeONPs e (D) CoZnFeONPs (n≥4).....	99
FIGURA 6.10 - Detecção de CYFRA 21-1 em amostras de soro de pacientes com câncer de próstata (PCA) e indivíduos saudáveis (C) utilizando o imunoensaios desenvolvidos e o ELISA.	103

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES PROTEICOS UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E ARRANJO DE ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Este trabalho descreve o desenvolvimento de imunoenaios eletroquímicos utilizando dispositivos descartáveis à base de eletrodos fabricados com materiais de baixo custo como alternativa para detecção dos biomarcadores p16, GSTP1, PSA e CYFRA-21-1 voltados para o diagnóstico de câncer de próstata. Nos imunoenaios desenvolvidos foram utilizados micro/nanopartículas magnéticas as quais proporcionaram a captura e separação dos biomarcadores e amplificação do sinal analítico, permitindo atingir alta seletividade e baixos limites de detecção. Para isso, uma célula microfluídica descartável foi desenvolvida contendo 8 eletrodos de trabalho à base de carbono, um eletrodo de Ag|AgCl como pseudo eletrodo de referência e um eletrodo de carbono como eletrodo auxiliar. Três diferentes imunoenaios foram desenvolvidos. O primeiro trabalho consistiu no desenvolvimento de um imunoensoio eletroquímico para a detecção do biomarcador p16. As imunoanálises foram realizadas após a otimização dos parâmetros, como tempo de incubação e vazão do fluxo utilizada no sistema microfluídico. A curva de calibração foi construída com solução padrão dos biomarcadores preparadas em soro de bezerro com concentração de p16 no intervalo de 1,38 a 27,7 fg mL⁻¹. O dispositivo apresentou limite de detecção (LoD) de 0,04 fg mL⁻¹, sensibilidade de 11,6 nA(fg/mL)⁻¹ e coeficiente de correlação de 0,995. O segundo método consistiu na detecção simultânea dos biomarcadores PSA e GSTP1. As correntes de pico obtidas apresentaram resposta linear entre 0,7 - 27,8 fg mL⁻¹ para GSTP1 e 0,28 - 277 fg mL⁻¹ para o PSA. As sensibilidades alcançadas para GSTP1 e PSA foram de 22,4 nA(fg/mL)⁻¹ para ambos biomarcadores e os LoDs foram de 0,15 fg mL⁻¹ para o GSTP1 e 0,16 fg mL⁻¹ para o PSA. Por fim, o terceiro imunoensoio consistiu na aplicação de

nanopartículas magnéticas sintetizadas (MNPs) de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (CoZnFeONPs) e de Fe_3O_4 (FeONPs) que foram utilizadas para mimetizar a enzima peroxidase. O uso de eletrodos de trabalho de carbono modificado com óxido de grafeno (GO) e MNPs permitiram a detecção eletroquímica de CYFRA-21-1 com LoDs de $0,30 \text{ fg mL}^{-1}$ e $0,19 \text{ fg mL}^{-1}$, para FeONPs e CoZnFeONPs, respectivamente. Por fim, foi possível testar os imunossensores frente a soro de pacientes fornecidos pelo Hospital de Amor de Barretos/SP obtendo respostas concordantes com o método ELISA, evidenciando que o dispositivo é uma escolha promissora para uso no diagnóstico de câncer de próstata frente aos métodos tradicionais ECL e ELISA.

Palavras chave: Imunoensaio, Diagnóstico, Partículas magnéticas, Câncer de próstata, GSTP1, PSA, p16 e CYFRA-21-1.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOASSAY FOR PROTEIN BIOMARKERS DETECTION USING MAGNETIC PARTICLES AND DISPOSABLE ELECTRODES ARRAY FOR THE DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER

This work describes the development of electrochemical immunoassays using electrode disposable devices made from low cost materials as an alternative for detection of the biomarkers p16, GSTP1, PSA and CYFRA-21-1 for prostate cancer diagnosis. In the immunoassays developed, magnetic micro/nanoparticles were used in order to provide the capture and separation of the biomarker and the amplification of the analytical signal allowing to reach high selectivity and low limits of detection. For this propose, disposable microfluidic cell was developed and constructed containing 8 carbon-based working electrodes, an Ag|AgCl electrode as a pseudo reference electrode and a carbon electrode as an auxiliary electrode. Three different immunoassays were developed. The first work consisted in the development of an electrochemical immunoassay for the detection of the p16 biomarker. Immunoassays were performed after optimization of the parameters, such as incubation time and flow rate used in the microfluidic system. The calibration curve was prepared in calf serum with p16 concentration in the range of 1.38 to 27.7 fg mL⁻¹. The device presented detection limit (LoD) of 0.04 fg mL⁻¹ and sensitivity of 11.6 nA (fg/mL)⁻¹. The second method consisted of the simultaneous detection of PSA and GSTP1 biomarkers. Peak currents obtained showed a linear response between 0.7 - 27.8 fg mL⁻¹ for GSTP1 and 0.28-277 fg mL⁻¹ for PSA. The sensitivities reached for GSTP1 and PSA were 22.4 nA (fg/mL)⁻¹ for both biomarkers and the LoDs were of 0.15 fg mL⁻¹ for GSTP1 and 0.16 fg mL⁻¹ for the PSA. Finally, the third immunoassay consisted of the application of synthetic nanoparticles (MNPs) of Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄ (CoZnFeONPs) and Fe₃O₄ (FeONPs) used to mimic the enzyme peroxidase. The use of modified carbon work with graphene oxide (GO) and MNPs allowed the

electrochemical detection of CYFRA-21-1 with LoDs of 0.30 fg mL^{-1} and 0.19 fg mL^{-1} for FeONPs and CoZnFeONPs, respectively. Finally, it was possible to test the immunosensor in serum of patients provided by the Hospital de Amor from Barretos city obtaining concordant results with ELISA method, which showed that the device is a promising choice for diagnosis of prostate cancer in relation to traditional methods as ECL and ELISA.

Keywords: Immunoassay, Diagnostic, Magnetic Particles, Prostate Cancer, GSTP1, PSA, p16 and CYFRA-21-1.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO	2
2 - ESTADO DA ARTE	5
2.1 - Câncer de próstata (CaP)	5
2.2 - Biomarcadores para CaP reportados na literatura.....	7
2.2.1 - p16.....	10
2.2.2 - GSTP1.....	10
2.2.3 - CYFRA-21-1.....	11
2.3 - Dispositivos <i>Point-of-care</i> e Sistemas microfluídicos.....	12
2.4 – Biossensores	14
2.5 – Imunossensores eletroquímicos	17
2.5.1 - Eletrodos impressos à base de Carbono.....	22
2.5.2 - Técnicas de imobilização de biocompostos	25
2.5.3 - Partículas magnéticas (PMs) e amplificação de sinal.....	28
3 - OBJETIVOS	32
4 - DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL APLICADO NA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR P16 UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMERCIAIS.....	34
4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4.2 - PARTE EXPERIMENTAL	35
4.2.1 - Reagentes e Preparo de Soluções.....	35
4.2.2 -Equipamentos e aparatos.....	37

4.2.3 - Construção do arranjo de eletrodos descartável pela técnica de screen printing	38
4.2.4 - Modificação da superfície eletródica.....	40
4.2.5 -Etapas de modificação das PMs para o preparo do bioconjugado Ab ₂ -PM-HRP.....	43
4.2.6- Etapas de imuno-captura e magneto-separação dos biomarcadores da solução da amostra utilizando o bioconjugado Ab ₂ -PM-HRP e construção da curva analítica.....	44
4.3 – RESULTADOS.....	47
4.3.1 - Caracterização das AuNPs, PMs e do eletrodo de trabalho	47
4.3.2 - Caracterização eletroquímica do arranjo de eletrodos descartável desenvolvido	48
4.3.3 - Otimização das variáveis experimentais para o imunensaio imunomagnético desenvolvido	52
4.3.4 - Curva de calibração para determinação do biomarcador p16	56
4.3.5 - Aplicação do imunossensor em amostras de pacientes.....	60
4.4 – CONCLUSÕES	62
5 - DETECÇÃO ELETROQUÍMICA MULTIPLEXADA DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) E ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) EM AMOSTRAS DE PACIENTE COM CÂNCER DE PRÓSTATA	64
5.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
5.2 - PARTE EXPERIMENTAL	65
5.2.1- Reagentes	65

5.2.2 - Fabricação e modificação química do arranjo de eletrodos SPE e avaliação da resposta do imunoenensaio para a detecção dos biomarcadores proposto	65
5.3 – RESULTADOS.....	67
5.3.1- Otimização das variáveis experimentais para o desenvolvimento do imunossensor para detecção do GSTP1.....	67
5.3.2 - Detecção multiplexada de PSA e GSTP1 em soro de bezerro fortificado utilizando o imunoenensaio desenvolvido.....	70
5.3.3 - Aplicação do imunoenensaio desenvolvido em amostras reais de soro de pacientes	74
5.4 - CONCLUSÕES	76
6 - IMUNOENSAIO PARA A DETECÇÃO DE CYFRA 21-1 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS DE $\text{CO}_{0.25}\text{ZN}_{0.75}\text{FE}_2\text{O}_4$ E FE_3O_4 SEM A UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA APLICAÇÃO EM AMOSTRA DE PACIENTE COM CÂNCER DE PRÓSTATA.....	78
6.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	79
6.2 - PARTE EXPERIMENTAL	80
6.2.1 - Reagentes	80
6.2.2- Instrumentação.....	81
6.2.3 - Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas CoZnFeONPs	81
6.2.4 - Síntese de Nanopartículas magnéticas FeONP	82
6.2.5 - Síntese de óxido de grafeno (GO)	82
6.2.6 - Imobilização de anticorpo monoclonal anti-CYFRA-21-1 sobre a superfície dos eletrodos de trabalho.....	83

6.2.7 - Bioconjugação das nanopartículas magnéticas com anticorpo policlonal contra CYFRA 21-1.....	83
6.2.8 -Detecção de CYFRA 21-1 usando o dispositivo de imunoensaio microfluídico descartável.....	84
6.3- RESULTADOS	85
6.3.1 - Caracterização morfológica e topográfica de Fe₃O₄ (FeONP) e Co_{0,25}Zn_{0,75}Fe₂O₄ (CoZnFeONP) e superfície do eletrodo.....	85
6.3.2 - Desempenho eletroquímico dos eletrodos modificados com GO	87
6.3.4 – Avaliação do imunoensaio, envolvendo o uso de CoZnFeONPs e FeONPs, para detecção de CYFRA 21-1	97
6.3.5 - Aplicação do dispositivo microfluídico para detecção de CYFRA 21-1 em amostras de soro de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de próstata.....	102
6.4 - CONCLUSÕES.....	103
7 - CONCLUSÕES FINAIS.....	108
8 - REFERÊNCIAS.....	111

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

O aumento do câncer no mundo é um grande obstáculo para o desenvolvimento humano. Os números e estimativas para os próximos anos são sinais de que é necessária uma ação imediata para contornar os efeitos deletérios causados pela doença a longo prazo. Até 2035, é esperado que o número de casos da doença cresça em torno de 24 milhões e os gastos aumentem em função dos recursos necessários para os procedimentos, como cirurgias oncológicas, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e cuidados paliativos¹.

O câncer de próstata (CaP), o qual é o motivador deste trabalho, é aquele de maior incidência e mortalidade em homens em todo o mundo² excluindo-se ao câncer de pele não melanoma que se apresenta como a neoplasia sólida mais incidente^{3, 4}. Esse tipo de câncer não apresenta sintoma até que a doença atinja o estágio avançado ou metastático. Além disso, o teste de antígeno específico da próstata (teste de PSA) para CaP tem demonstrado algumas limitações, uma vez que sua especificidade clínica é de até 35%, e alguns homens com altos níveis de PSA não possuem câncer. Desta forma, a identificação e quantificação de biomarcadores específicos para o CaP por meio de técnicas com simples operação, alta sensibilidade e seletividade podem auxiliar no diagnóstico precoce e no monitoramento da recorrência da doença.

As pesquisas na área de Química Analítica têm concentrado seus inúmeros esforços no desenvolvimento de métodos para o diagnóstico precoce de doenças como o câncer. Ademais, com os avanços no conhecimento na área de oncologia com relação a identificação de biomoléculas que possuam sua concentração aumentada ou diminuída em fluidos biológicos (urina, saliva, sangue, lágrima, etc), tem-se guiado a escolha de anticorpos e antígenos que hoje podem ser usados como interface de reconhecimento em imunossensores para o diagnóstico de câncer precoce, no estadiamento e nos casos de recorrência. Além disso, tecnologias complementares, como, microfluídica, tecnologias *lab-on-a-*

chip, integração de sistemas, automação de dispositivos tem fornecido diversas vantagens para os sistemas de análises, como miniaturização e automação do sistema, facilitando o uso do dispositivo fora do ambiente laboratorial.

Nesse contexto, levando em conta a baixa concentração desses biomarcadores no sangue e a inviabilidade de reutilização de dispositivos de análises de detecção motivaram o presente trabalho visa desenvolver dispositivos descartáveis de baixo custo, utilizando imunossensores eletroquímicos acoplados ao uso de partículas magnéticas, obtidas comercialmente e sintetizadas. Estes foram utilizados tanto para a imunocaptura e separação do analito quanto para a amplificação de sinal, voltados para detecção de biomarcadores objetivando o diagnóstico precoce do câncer de próstata.

Capítulo 2 – ESTADO DA ARTE

2 - ESTADO DA ARTE

2.1 - Câncer de próstata (CaP)

O câncer de próstata (CaP) foi identificado pela primeira vez em 1853 pelo cirurgião J. Adams⁵. Devido à limitação dos diagnósticos da época, assim como para os demais cânceres, a expectativa de vida para os homens acometidos pela doença era relativamente muito baixa.

A doença não possui causa definida, entretanto, foi observado que a idade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença, cujo avanço da idade compreende um fator de risco bem estabelecido, visto que tanto a incidência como a mortalidade aumentam após os 50 anos⁶. O histórico familiar em primeiro grau (pai, irmãos ou filhos) apresenta associação positiva para aumento do risco de desenvolvimento dessa neoplasia, assim como a cor de pele/etnia são relevantes na etiologia desse tipo de câncer^{7, 8}.

Ainda não se sabe com clareza quais as razões, mas homens negros apresentam risco de duas a três vezes maior que o restante da população masculina, bem como o dobro da probabilidade de morrer por conta da doença. E essa diferença pode se dar, em parte (cerca de 5% a 10%), devido a uma propensão genética, observada pelas altas taxas de incidência desse câncer em jamaicanos, caribenhos e americanos com ascendência africana. Japoneses e indígenas formam um grupo no qual a incidência da doença é até 70% menor em relação à branca. Outras associações estão descritas na literatura, como hormônios sexuais padrões dietéticos, alimentação rica em gordura animal e obesidade^{6, 9} também colaborarem para a incidência da doença^{3, 4, 10}. Consequência marcante desses fenômenos relaciona-se com a elevação, de três a sete vezes na incidência do câncer de próstata detectada, na primeira geração de japoneses e chineses, cujos pais migraram para São Francisco. A melhor explicação, a despeito do fator racial,

foi a mudança ambiental, destacando-se a aquisição de novos hábitos alimentares, como maior ingestão de gordura¹².

Antes da década de 1970, a maioria dos casos de CaP eram diagnosticados pelo exame retal digital (DRE) que permite que o profissional avalie a próstata em função da consistência, tamanho, lesões, presença de nódulos ou endurecimento. Nesse exame, leva-se em consideração a idade do homem, uma vez que com o passar da idade a glândula tende normalmente a crescer. Embora continue sendo um procedimento fundamental para o diagnóstico da doença, essas alterações ocorrem em estágios avançados, dificultando o diagnóstico inicial da doença¹¹.

Complementar ao exame de toque, a triagem clínica é também realizada em pacientes com suspeita de câncer de próstata por meio de exames de sangue para detecção do antígeno prostático específico (PSA, do inglês *Prostate specific antigen*). O PSA é uma glicoproteína de 237 aminoácidos da família das calicreína humanas (KLK-3). Codificado pelo gene KLK3, o PSA se localiza no cromossomo 19 e é secretado pelo epitélio prostático com a função de liquefazer o líquido seminal. A quantificação do PSA é realizada pelo método de Ensaio de imunoadsorção enzimática *do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, (ELISA) e pela técnica de eletroquimiluminescência, em geral, em grandes hospitais ou laboratórios de análises clínicas.

Os dois exames devem ser realizados anualmente por homens acima de 50 anos e, caso haja incidências da doença na família, deve ser realizado aos 45 anos. De acordo com a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), um em cada seis homens com idade acima de 45 anos desenvolverá o câncer durante a vida¹²⁻¹⁴.

O ponto de corte da doença é dado pelo histórico de homens já diagnosticados com a doença. Estatisticamente, cerca de 70 a 80% dos homens que possuem níveis de PSA até 4 ng mL⁻¹ são considerados isentos da doença. Cerca de 50% dos pacientes com valores de PSA acima de 4 ng mL⁻¹ e/ou exame

de toque alterado apresentaram a doença confirmada pela biópsia. Entretanto, não há valores consensuais que forneçam a efetiva separação entre pacientes saudáveis e doentes, pois pacientes com câncer de próstata podem apresentar níveis inferiores a 4 ng mL^{-1} de PSA¹⁵. Desta forma, não há um nível de PSA abaixo do qual o homem esteja restrito a doença, além de muitos casos não entrarem na estatística de valores¹⁵. Além disso, vale ressaltar que a única forma de efetivamente identificar a doença é pela biópsia, a qual é indicada para a confirmação e estadiamento da doença.

No passado, acreditava-se que o PSA era um biomarcador específico para o órgão próstata, no entanto, foi demonstrado posteriormente que outros órgãos também secretavam o PSA, inclusive em mulheres¹⁶. Seus resultados também foram criticados por fornecer resultados pouco confiáveis, incluindo falsos positivos e falsos negativos devido a sua baixa especificidade de 35%, levando a procedimentos arriscados, dolorosos e desnecessários aos pacientes¹⁷.

O teste também não permite a discriminação de hiperplasia benigna da próstata (BPH) e carcinoma, não faz distinção entre a doença no estágio inicial e de tumores indolentes “insignificante”¹⁸⁻²². Portanto, as limitações encontradas no teste de PSA fizeram com que houvesse uma busca por outros biomarcadores com a finalidade de melhorar o diagnóstico e evitar os tratamentos invasivos desnecessários²³.

2.2 - Biomarcadores para CaP reportados na literatura

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), um biomarcador de câncer é uma molécula biológica encontrada em fluidos corporais como, sangue, urina, saliva, suor ou tecidos e que atua no sinal de um processo normal ou anormal do organismo¹⁰.

Uma enorme variedade de biomarcadores pode ser encontrada na literatura, incluindo proteínas, como uma enzima ou receptores celulares, ácidos

nucléicos, como microRNA ou RNA, anticorpos e peptídeos, assim como outras categorias de compostos como aqueles estudados via metabolômica que levam em conta um conjunto de metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da) presente ou alterado após um estímulo fisiopatológico ou modificação genética²⁴.

A quantificação destes compostos, agora referidos como biomarcadores, pode ser utilizada para uma estimativa de risco da doença, para o rastreamento de cânceres primários ocultos e para as distinções da benignidade da malignidade. Além disso, os biomarcadores podem possibilitar o prognóstico para pacientes que foram diagnosticados com câncer e o monitoramento do estado da doença, seja para detectar recorrência ou determinar a resposta da progressão frente a terapia^{25, 26}.

Muito têm sido estudados com relação ao câncer de próstata no sentido de contornar os problemas associados à baixa precisão do PSA em relação ao seu mau diagnóstico. Dentre os biomarcadores de câncer de próstata relatados na literatura podem ser citados a fosfatase ácida prostática (PAP)^{27, 28} e a calicreína humana 2 (HK2)^{29, 30} a qual é da mesma família do PSA. O PAP foi o primeiro marcador tumoral usado no câncer de próstata. Este marcador possui limitações, pois costuma se apresentar elevado apenas nos estágios mais avançados da doença, não sendo por isso, de muita utilidade nos estágios iniciais. Já a HK2 é uma proteína que apresenta homologia de cerca de 80% ao PSA. Sua expressão aumenta exponencialmente desde o epitélio prostático benigno até o câncer de próstata e as metástases linfonodais. Estudo revelaram que a dosagem de hK2, em combinação com a relação PSA livre/PSA total, melhora a acurácia do diagnóstico do câncer de próstata em pacientes com PSA total entre 2,5 e 4,0 ng mL⁻¹ ^{31, 32}. O antígeno 3 específico (prostate cancer antigen 3 (PCA3))³³⁻³⁵ têm sido utilizado em testes comerciais de análise de urina vem demonstrando resultados promissores para sinalizar a doença. No teste, são analisados RNAs de células circundantes fornecendo interessante precisão e especificidade clínica de 80% e 93%, respectivamente. Entretanto, são testes demorados que levam entre

7-15 dias para ficar prontos. Enzimas, tal como a alfa metilacil CoA racemase (AMACR)³⁶⁻³⁸ identificada por meio da expressão de RNA, também tem sido reportadas, no entanto, a detecção desta enzima possui maior sensibilidade e especificidade para a análise de tecidos obtidos via biopsia, que necessita o avanço da doença para observar a alteração desse biomarcador. Os fatores de crescimento à insulina (IGF's)³⁹, tal como IGF-1, apresentam uma potente atividade mitótica em células normais e doentes sugerindo que estes fatores podem estar envolvidos com o câncer de próstata.

Vários biomarcadores teciduais, encontrados nos testes Prolaris® e Oncotype DX®, comercialmente disponíveis, têm sido propostos para fornecer uma avaliação precisa da agressividade do câncer. Entretanto, nenhum deles forneceu potencialidade para a detecção precoce. A Tabela 2.1 apresenta alguns biomarcadores estudados para a detecção do câncer de próstata.

TABELA 2.1 - Biomarcadores aplicados para o diagnóstico do câncer de próstata.

Biomarcador	Tipo de marcador	Amostra	Referência
PAP	Proteína	Sangue	Amorim <i>et al.</i> ²⁸
HK2	Proteína	Sangue	Finlay <i>et al.</i> ³⁰
PCA3	microRNA	Urina	Aubin <i>et al.</i> ³⁴ .
AMACR	Proteína	Tecido	Box <i>et al.</i> ³⁷
EPCA	Proteína	Tecido	Gauche <i>et al.</i> ⁴⁰
PSMA	Proteína	Tecido	Gauche <i>et al.</i> ⁴⁰
ERG-TMPRSS2	microRNA	Urina	Attard <i>et al.</i> ⁴¹
PSA	Proteína	Sangue	Yang <i>et al.</i> ⁴²

PAP: fosfatase ácida prostática; HK2:caliceína humana 2; PCA3: antígeno do câncer de próstata 3; EPCA: antígeno precoce da próstata; AMACR: alfa-metilacil-coenzima A; PSMA: antígeno específico de membrana; PSA: Antígeno prostático específico.

Neste trabalho foi avaliado a utilização dos biomarcadores p16, GSTP1 e CYFRA-21-1 que já foram explorados em trabalhos na área da saúde e demonstraram ser potenciais biomarcadores para a detecção do câncer de próstata.

2.2.1 - p16

A proteína 16 (p16) formada pelo gene supressor de tumor p16 é um importante regulador do ciclo celular cuja perda funcional pode contribuir significativamente para a transformação e progressão maligna do câncer de próstata⁴³. Devido à capacidade de inibir a atividade catalítica, essas proteínas desempenham um papel importante na inibição de progressão do ciclo celular⁴⁴.

O biomarcador tem destaque não apenas no diagnóstico precoce, mas também, na avaliação de metástase, recidivas tumorais, prognóstico e no acompanhamento da eficácia das terapias anticâncer. Resultados apresentados por Gu⁴⁵ *et al.* indicaram que a inativação do gene p16 por meio da metilação da ilha CpG não são eventos comuns no câncer de próstata em estágio inicial. Entretanto, sugere-se que a diminuição de proteínas p16 em tumores prostáticos são eventos presentes durante a metástase e podem ter implicações prognósticas^{46, 47}.

2.2.2 - GSTP1

A Glutathione-S-Transferase 1 (GSTP1) tem sido reportada em muitos trabalhos como um marcador epigenético para o diagnóstico precoce do câncer de próstata. Esse biomarcador tem funções no metabolismo celular, como detoxificação de substâncias prejudiciais ao organismo, atuando como “vigilantes” de células prostáticas, sendo observada em mais de 90% dos tumores da próstata. As GSTP1 interagem com diversos fatores, tais como regulação de quinases, envolvido com proliferação de células, diferenciação e apoptose⁴⁸.

As alterações epigenéticas tais como a hipermetilação de um gene, estão frequentemente envolvidas no desenvolvimento de tumores, progressão e recorrência da doença. Cerca de 70-80% dos casos de câncer de próstata avaliados

apresentavam metilação do gene, enquanto que a hiperplasia benigna apresentava hipometilação⁴⁹.

Martignano *et al.* relataram que os tumores malignos não expressam GSTP1, enquanto que os tecidos saudáveis apresentaram a maior expressão desse biomarcador⁵⁰. Nesse contexto, a perda de expressão de GSTP1 pode estar associada à carcinogênese precoce ou mau prognóstico^{50, 51}. Ainda, foi demonstrado que a sensibilidade do GSTP1 no teste clínico foi de 42,3% e sua especificidade de 92,9% em comparação com PSA, o qual possui 89,9% e 35,7%, respectivamente, onde a sensibilidade clínica é definida como a capacidade do teste de identificar corretamente os indivíduos que possuem a doença (casos) e especificidade, a capacidade do teste de identificar corretamente os indivíduos que não possuem a doença (não-casos)⁴⁸.

Logo, a alta especificidade do GSTP1 em comparação ao PSA pode ser uma vantagem interessante para o rastreamento e diagnóstico do câncer de próstata, uma vez que o diagnóstico pode ser feito precocemente, diminuindo o número de falsos positivos e falsos negativos, bem como aumentando a taxa de sobrevivência dos pacientes.

2.2.3 - CYFRA-21-1

O CYFRA-21-1 é um biomarcador amplamente utilizado no câncer de pulmão, mama, cabeça, pescoço, bexiga, colo-retal, ovário e próstata⁵²⁻⁵⁵. O biomarcador foi reconhecido por dois anticorpos monoclonais de camundongo, um anticorpo específico para citoqueratina 19 monoclonal biotinizado (KS 19-1) e um anticorpo monoclonal específico para citoqueratina 19 (BM 19-21), direcionado contra dois epítomos diferentes de um fragmento de citoqueratina 19 que sofre clivagem com a ajuda da enzima caspase-3 e é liberada na circulação sanguínea durante a progressão e a regeneração de um tumor⁵⁵. Por este motivo, pode ser detectado e quantificado na corrente sanguínea, fluidos e tecidos biológicos^{52, 54}.

A concentração de CYFRA-21-1 em soro humano foi relatada como de 3,3 ng mL⁻¹ para uma pessoa saudável, no entanto, foi encontrado em uma concentração menor durante a supressão androgênica (terapia hormonal)⁵⁶.

2.3 - Dispositivos *Point-of-care* e Sistemas microfluídicos

A acessibilidade de análises clínicas requerem uma série de características para a detecção como, baixo custo, operável com pouco ou nenhuma fonte de energia, adaptável a vários tipos de ensaio em uma gama de condições, simples o suficiente para ser usado por qualquer pessoa, rápido, preciso e quantitativo⁵⁷.

Métodos como ELISA, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS)⁵⁸, ensaios de reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR)⁵⁹, radioimunoensaio (RIE) e *Western Blotting* têm sido utilizados para a detecção de doenças como o câncer. Entre as principais desvantagens encontradas nesses métodos convencionais estão a significativa complexidade das análises, o tempo e o custo envolvidos, que impõe limitações no número de amostras analisadas⁶⁰. Além disso, algumas delas são semi-quantitativas como é o caso da técnica *Western blotting*, tornando-o inviável para se acompanhar o aparecimento, evolução e prognóstico da doença⁶¹. Sendo assim, os métodos citados não preenchem os requisitos essenciais para a utilização imediata próximos ao paciente ou em áreas remotas.

As análises *point-of-care* (POC) constituem uma abordagem alternativa e essencial para a detecção rápidas da doença próximos ao paciente, o que facilita um melhor diagnóstico, monitoramento e gerenciamento das doenças. Além de permitir rápidas decisões médicas, uma vez que as doenças podem ser diagnosticadas precocemente, levando a melhores resultados de saúde para pacientes e permitindo o início precoce do tratamento, bem como o

monitoramento dos pacientes já diagnosticados podendo ser utilizados em casos de recorrência.

Tecnologias complementares, como microfluídica, tecnologias *lab-on-a-chip*, integração de sistemas, automação de dispositivos podem fornecer diversas vantagens para os sistemas POC. A tecnologia microfluídica possui características notáveis para o diagnóstico de doenças como, baixo custo e baixo consumo de reagentes, análise rápida, alta portabilidade e processamento integrados de fluidos biológicos complexos com alta sensibilidade para aplicações na área da saúde⁶²⁻⁶⁴. Logo, esses dispositivos microfluídicos podem atuar como uma ponte para melhorar o sistema global de saúde com alta eficiência e sensibilidade, especialmente para áreas remotas com poucos recursos, como em locais de assistência domiciliar e em situações de emergência.

Embora avanços significativos tenham sido feitos no desenvolvimento desses dispositivos a partir de métodos de prototipagem rápida usando materiais simples como polidimetilsiloxano (PDMS), poli(metacrilato de metila) (PMMA)⁶⁵, poli(olefina cíclica) (COC)⁶⁶, à base de papel⁶⁷⁻⁶⁹ e dispositivos híbridos⁷⁰, estes ainda precisam de etapas químicas que demandam longos tempos para fabricação trazendo limitações para produção em escala comercial^{71, 72}.

A prototipagem baseada em polímeros usando uma impressora de corte provou ser uma boa técnica para o desenvolvimento rápido e barato de dispositivos microfluídicos. Numerosos estudos envolvendo a aplicação de impressoras de corte usando *laser* para o desenvolvimento fácil e rápido de canais microfluídicos em materiais como poliéster, PDMS e PMMA foram recentemente relatados na literatura⁷³⁻⁷⁶. No entanto, apesar do progresso substancial neste campo, ainda há uma necessidade de desenvolver processos de fabricação simples e rápidos para produzir de forma rentável dispositivos microfluídicos portáteis e descartáveis para aplicações analíticas.

Uliana *et al.* reportaram um método de prototipagem rápida não-litográfica baseado no uso de uma impressora de corte (~ R\$ 1.000,00) e materiais simples e de baixo custo. O dispositivo foi constituído de oito eletrodos de trabalho modificados, um contra eletrodo e pseudo-referência. O dispositivo foi aplicado com sucesso para detecção do biomarcador receptor de estrogênio (ER α) em lisados de células doentes, empregando partículas magnéticas e detecção eletroquímica. O sistema apresentou-se como uma excelente plataforma para ensaios de alto rendimento, possibilitando até oito medições simultâneas apresentando grande potencial para detecção multiplexada de biomarcadores vinculados ao câncer⁷⁷.

Dentro deste contexto, técnicas emergentes na área de detecção e quantificação de biomarcadores, como as técnicas eletroanalíticas mais especificamente, no campo de biossensores têm demonstrado grande potencial na área de análises clínicas entre elas o câncer. Isto, vem associado à facilidade na manipulação dos instrumentos, necessidade de pequena quantidade de reagente e amostras, principalmente quando utilizado sistemas miniaturizados, além de permitir a fabricação de sistemas na configuração multiplexada e grande viabilidade de produção em larga escala⁷⁸⁻⁸⁰.

2.4 – Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico composto basicamente por um componente biológico (enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, tecidos, polissacarídeo, bactéria, etc.) ou biomimético de reconhecimento e um transdutor. O primeiro faz o reconhecimento de uma determinada substância (proteína, toxina, peptídeo, vitamina, açúcares, íon metálicos) por meio de uma reação bioquímica específica. Na interação do analito com o biocomposto, alguma variação irá ocorrer, como um aumento na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão

de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, potencial elétrico, corrente elétrica, condutância, impedância, etc. A principal função destinada ao sistema de reconhecimento é fornecer a unidade sensora, seletividade e especificidade para que o analito seja identificado e quantificado em amostras de matrizes complexas^{81, 82}.

Por fim, o transdutor, converte a energia destes eventos numa forma mensurável. O transdutor pode ser óptico, magnético, térmico, acústico ou elétrico. Com isto, o transdutor irá converter o evento em um sinal elétrico que será amplificado por meio de um amplificador (componente físico) e, então, enviado a um dispositivo que irá processar os dados (computador, celular, etc) para serem salvos e interpretados. A Figura 2.1 apresenta o esquema dos componentes básicos de um biossensor⁸³⁻⁸⁶.

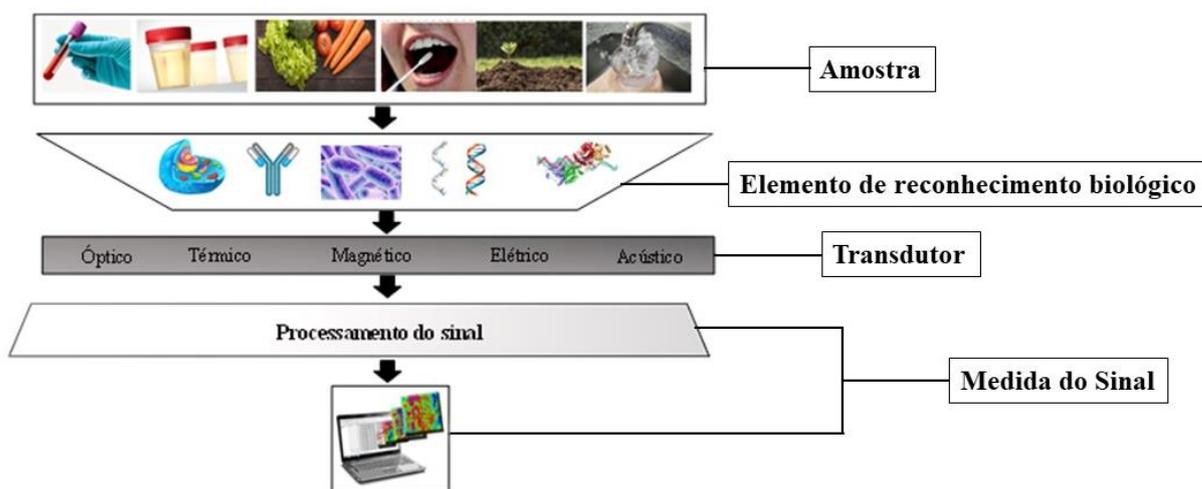


FIGURA 2.1 - Representação esquemática dos componentes de um biossensor.

O primeiro trabalho descrevendo um dispositivo biossensor ocorreu em 1962 por Clark e Lyons os quais realizaram o monitoramento do sangue em função da concentração de glicose e sugeriram que a superfície do eletrodo (eletrodo de oxigênio de Clark) poderia reter uma camada fina de enzima solúvel a partir do uso de uma membrana de diálise em que o consumo de oxigênio da reação catalítica era medido⁸¹. Anos depois, em 1967, Updike e Hicks relataram

a utilização do eletrodo de Clark para a imobilização da enzima glicose oxidase em gel poliacrilamida no monitoramento de glicose em sistemas biológicos. Esses sensores baseados em reações enzimáticas em função do oxigênio consumido foram considerados biossensores de primeira geração⁸⁷.

Com a evolução dos sistemas biossensores de primeira geração, os de segunda geração apresentaram independência em relação a quantidade de oxigênio dissolvida. Isso ocorre devido à presença de aceptores artificiais de elétrons que evitam a redução do oxigênio. Biossensores desse tipo são dependentes do potencial de oxidação ou redução do mediador. Já os biossensores de terceira geração apresentam a transferência direta de elétrons entre o eletrodo e o sítio ativo da molécula na qual durante a conversão do substrato um par redox no sítio ativo tende a ceder elétrons e a outra aceitar. Como vantagem, esses biossensores não necessitam da presença de um mediador, permitindo o uso de potenciais menos elevados, e conseqüentemente, diminuindo a ação de interferentes^{88, 89}

Os biossensores ainda podem ser classificados de acordo com a espécie biológica imobilizada sobre o eletrodo podendo ser DNA, células, anticorpos, organelas e enzimas, e por meio do tipo de transdutor de energia.

Dentro do mecanismo que confere a especificidade biológica, duas categorias podem ser discutidas, como, os biocatalisadores (enzimas, células e organelas), em que o reconhecimento de um analito é seguido de uma mudança química; e reações de afinidade utilizando anticorpos, DNA e receptores de membranas celulares denominados imunossensores e genossensores⁹⁰⁻⁹², respectivamente, estes possuem ligações reversíveis e não catalíticas.

A grande maioria dos biossensores estudados utilizam transdutores eletroquímicos devido ao baixo custo, facilidade de uso, portabilidade e a possibilidade de serem facilmente miniaturizados. Esses sensores transformam uma informação química, uma reação de oxirredução, em um sinal elétrico mensurável e proporcional a concentração do analito analisado e são classificados

em 4 principais categorias: potenciométricos⁹³, condutimétricos^{90, 94} impedimétricos^{95, 96} e voltamétricos/amperométricos⁹⁷.

2.5 – Imunossensores eletroquímicos

Os imunossensores utilizam como elemento de reconhecimento anticorpos ou antígenos integrados a um transdutor físico. O primeiro imunossensor eletroquímico para detecção de biomarcadores tumorais foi desenvolvido no final da década de 1970⁹⁸. O dispositivo envolveu o ensaio competitivo da gonadotrofina coriônica humana (hCG) marcado com a enzima catalase e o monitoramento da reação enzimática foi acompanhado pela técnica amperométrica. Posteriormente, muitos imunossensores para proteínas voltados para o diagnóstico de doenças foram relatados na literatura^{90, 99, 100}.

Imunossensores amperométricos vêm sendo amplamente utilizados na detecção de biomarcadores proteicos vinculados ao câncer^{85, 87-89}. Seu mecanismo de funcionamento é baseado na medida de corrente resultante da aplicação de um potencial constante no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência. A corrente obtida da oxidação ou redução é geralmente obtida pelo uso de algum marcador redox uma vez que nem o anticorpo nem o antígeno possuem propriedades redox. Desta forma a medida da corrente obtida será diretamente proporcional à concentração das espécies de interesse¹⁰¹.

Os Imunossensores eletroquímicos são baseados no ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA que é largamente utilizado para a detecção de antígenos e anticorpos onde a captura do antígeno (ou anticorpo) em uma amostra envolve o uso de anticorpos (ou antígenos) específicos. A detecção em geral envolve o uso de enzimas e substrato específicos que levam a uma mudança do mesmo¹⁰².

Os marcadores enzimáticos mais comumente utilizados são as enzimas *Horseradish peroxidase* (HRP), Beta galactosidase e a Fosfatase

alcalina, uma vez que estas apresentam alta pureza, alta atividade específica e substrato estável. São utilizados substratos cromogênicos específicos para as respectivas enzimas, os quais são hidrolisados gerando produtos com cor cujas intensidades são proporcionais a concentração do analito presente na amostra. Essas enzimas em contato com seus substratos também fornecem espécies eletroquimicamente ativas que podem oxidar ou reduzir normalmente de forma reversível.

O método pode ser realizado com diversas combinações utilizando enzimas e anticorpos nas quais vários tipos de ligações não covalentes contribuem para a interação entre antígeno e anticorpo. Dentre elas estão forças de *Van der Waals*, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A afinidade entre anticorpo e antígeno é dada pela constante de afinidade (K_a) a qual está relacionada com a formação do imunocomplexo antígeno/anticorpo (AgAc) mostrada na Equação 1. Altas sensibilidades dos imunoenaios são resultados de altos valores de constante de afinidade, que variam de 10^4 a 10^{12} L mol⁻¹.

$$K_a = \frac{AcAg}{[Ac][Ag]} \quad \text{Eq. (1)}$$

Dependendo do tipo de analito (peptídeos, proteína, anticorpos e hormônios) que se quer detectar, várias configurações podem ser construídas para o ensaio, como por exemplo: ELISA direto, indireto, competitivo e sanduíche indireto¹⁰². A Figura 2.2 apresenta ilustrações de algumas configurações possíveis para o imunoenaios ELISA

Na configuração direta um antígeno (ou um anticorpo) é imobilizado na superfície dos poços da microplaca e então, um excesso de outra proteína (normalmente albumina de soro bovino, caseína, etc) é adicionado para bloquear os sítios de ligação livre. Uma enzima ligada a um Ab numa reação separada é adicionada ao poço. O Ab interage com o seu Ag, formando um complexo Ag/Ab-

enzima, e o excesso de Ab-enzima não reagido com Ag é lavado. Após a lavagem, o substrato da enzima é adicionado e é convertido em um composto que fornece um sinal mensurável diretamente ligado à quantidade de Ag. A intensidade da cor produzida é medida por uma leitora de placas espectrofotométrica que medem a absorbância em cada poço utilizado. A FIGURA 2.2A apresenta a configuração do imunoenensaio ELISA na configuração direta.

Os marcadores enzimáticos mais comumente utilizados são a HRP, beta galactosidase e a fosfatase alcalina por apresentarem alta pureza, alta atividade específica e substrato estável (facilmente conjugáveis a sistema eletroquímico). São utilizados específicos substratos cromogênicos para as enzimas, os quais são hidrolisados gerando produtos com cor proporcionais a concentração do analito presente na amostra^{102, 103}.

Para peroxidase usa-se como substrato o *orto*-phenildiamina (OPD) e paranitrofenil fosfatase para a alcalina fosfatase. A enzima peroxidase HRP (*Horseradish*), obtida de raiz forte, é frequentemente empregada devido a suas excelentes propriedades redox que além do seu baixo custo e possibilidade de ser encontrada comercialmente em diversos graus de pureza, possui resposta estável por longos períodos de tempo a temperatura ambiente, num amplo intervalo de pH. A HRP é uma glicoproteína que consiste de 308 resíduos de aminoácido, possuindo dois íons Ca^{2+} e uma porção ferroprotoporfirina, denominado grupo heme, que está não covalentemente ligada à cadeia peptídica formando o grupo prostético (sítio ativo da enzima) e que tem como função catalisar a redução do peróxido¹⁰³.

O ELISA indireto ocorre em duas etapas que envolvem dois processos de ligação do anticorpo primário e anticorpo secundário marcado para ligar no Ag. O Ab primário é incubado com o Ag seguido da incubação com o Ab secundário. No entanto, isso pode levar a sinais não específicos por causa de uma reação cruzada que o Ab secundário pode causar. Essa técnica tem alta sensibilidade porque mais de um Ab está ligado à molécula de Ag. Durante o

procedimento, primeiramente, a solução contendo os anticorpos são adicionadas e, em seguida, realizado a etapa de lavagem para eliminar os anticorpos não ligados. Após a adição do Ag, e uma etapa de incubação e eliminação do excesso de antígeno, para etapa de detecção, uma solução do anticorpo secundário marcado com enzima é adicionada seguido da adição do seu substrato. A FIGURA 2.2B apresenta a configuração do imunoensaio ELISA na configuração indireta. Na microplaca incuba-se o antígeno e mantêm-no por um tempo determinado para interação. Em seguida, a placa é lavada e bloqueada com BSA.

O terceiro tipo, competitivo, apresentado na A FIGURA 2.2C tem como evento central um processo de ligação competitiva executado pelo Ag original (Ag da amostra) e Ag adicionado. Os procedimentos de ELISA competitivo são diferentes em alguns aspectos, em comparação com os ensaios ELISA indiretos, sanduíche e diretos. Em ensaios competitivos, as seguintes etapas sucessivas estão envolvidas: 1) O Ab primário (sem marcação) é incubado com a amostra (Ag), 2) Complexo de Ab-Ag é então adicionados a placas de 96 poços que são pré-revestidas com o mesmo Ag; 3) O Ab não ligado é removido lavando a placa (quanto mais Ags na amostra, menos Abs será capaz de se ligar ao Ag no poço, portanto, "competição"); 4) o Ab secundário que é específico para o Ab primário e conjugado com uma enzima é adicionado; 5) um substrato é adicionado, e as enzimas restantes provocam um sinal cromogênico ou fluorescente. Para o ELISA competitivo, quanto maior a concentração de Ag da amostra, mais fraco é o eventual sinal. A principal vantagem de um ELISA competitivo é a capacidade de usar amostras brutas ou impuras e ainda ligar seletivamente qualquer Ag que possa estar presente.

O ELISA do tipo sanduíche é o teste mais comumente utilizado para quantificação de antígenos. O ELISA no formato sanduíche quantifica antígeno entre duas camadas de anticorpos (Anticorpo de captura e detecção). Nesse método ao invés de ligar antígenos diretamente a placa, anticorpos primários de alta especificidade são imobilizados sobre a placa seguido da adição da amostra

contendo o antígeno de interesse permitindo a interação entre antígeno-anticorpo. Seguido a etapa de lavagem um segundo anticorpo marcado é adicionado. Os anticorpos não ligados são eliminados na etapa de lavagem. Por fim, o substrato é adicionado e hidrolisado pela enzima para formar o produto colorido. O Ag a ser medido deve conter pelo menos dois epítomos antigênicos capazes de se ligar ao Ab, já que pelo menos dois Abs atuam no sanduíche. Abs monoclonais ou policlonais podem ser usados como captura e detecção de Abs em sistemas ELISA tipo sanduíche. A FIGURA 2.2D apresenta a configuração do imunoenensaio ELISA na configuração sanduíche. A vantagem do ELISA sanduíche é que a amostra não precisa ser purificada antes da análise, e o ensaio pode ser muito mais sensível (até duas a cinco vezes mais sensível que o ELISA direto ou indireto). Muitos ELISA comerciais são construídos sobre sanduíche ELISA¹⁰⁴.

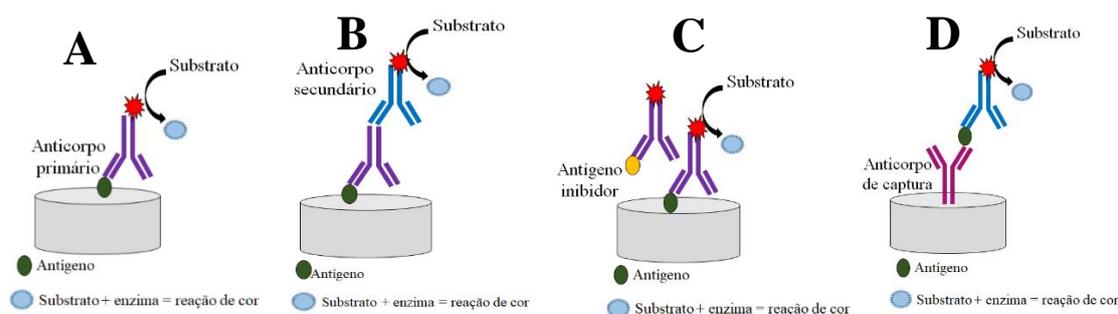


FIGURA 2.2 - Tipos de imunoenensaio ELISA: (A) configuração direta, (B) configuração indireta, (C) competitiva e (D) indireta do tipo sanduíche. (adaptado de Pensabio).

Para evitar confusões, o termo "imunoenensaio" é usado para testes baseados em imunorreações, enquanto o termo "imunossensor" é empregado especificamente para descrever instrumentos inteiros, ou seja, biossensores baseados em imunorreação.

Nos imunoenensaio heterogêneos, o Ab ou Ag é imobilizado num substrato sólido (por exemplo, microplaca), enquanto os imunoenensaio

homogêneos ocorrem em solução. Os imunoenaios heterogêneos são mais fáceis de conceber e construir, mas requerem uma separação do Ag e do Ab das amostras e a sua imobilização numa superfície sólida. Em contraste, os imunoenaios homogêneos geralmente envolvem a imobilização das biomoléculas em nano/microesferas, permitindo a integração de múltiplos processos de manipulação de líquidos. Os imunoenaios homogêneos acoplados a dispositivos microfluídicos são alternativas relativamente baratas e eficientes e podem ser utilizados para a detecção de amostras complexas, tais como urina ou sangue, sem qualquer pré-tratamento da amostra ou grande consumo de volume¹⁰².

2.5.1 - Eletrodos impressos à base de Carbono

Os materiais de carbono têm sido largamente empregados para construção de sensores e biossensores eletroquímicos, incluindo principalmente o eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de grafite pirolítico, tanto com orientação basal quanto *edge*^{105, 106}. Apesar do excelente desempenho destes eletrodos, estes possuem custo elevado e requer constante renovação da sua superfície a cada nova aplicação, e não são viáveis para aplicações do tipo *POC*.

Eletrodos de carbono impressos pela técnica de *screen printing* (SPE, do inglês, *screen printed electrode*) têm sido frequentemente preferidos devido à sua grande flexibilidade de construção aliado ao baixo custo quando comparado com eletrodos tradicionais. Além das dificuldades acima descritas para os eletrodos sólidos a sua reutilização pode apresentar limitações extras devido a possibilidade da amostra conter contaminantes biológicos, como frequentemente ocorre no caso das análises clínicas, tornando o emprego de SPE descartáveis extremamente interessantes devido a facilidade em sua construção, elevada reprodutibilidade e possibilidade de produção em larga escala¹⁰⁷.

A técnica *screen printing* ou serigrafia consiste na deposição de uma camada de tinta através de uma tela colocada sobre um substrato sólido. Diversos materiais isolantes podem ser empregados como substratos para a deposição de

tinta, como por exemplo, poliéster, cloreto de polivinila (PVC), materiais cerâmicos, poliamida, entre outros que podem facilmente ser modificados com uma grande variedade de tintas condutoras^{88, 107}.

Basicamente, as tintas de carbono consistem de partículas de grafite, um ligante polimérico e outros aditivos utilizados para dispersão e adesão da tinta. A formulação da tinta é considerada propriedade do fabricante e as diferenças na sua composição estão associadas ao tipo, tamanho ou carga de partículas de grafite, as quais podem interferir nas etapas de fabricação do eletrodo e cura da tinta^{88, 107}.

Os SPEs em geral consistem em uma configuração de três eletrodos (eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo). No eletrodo de referência é depositado uma camada de tinta que pode conter somente partículas de prata ou pode conter tanto Ag quanto AgCl. Para delimitação da área eletroativa do eletrodo um filme isolante é colado sobre o sistema. A Figura 2.3 apresenta algumas configurações de eletrodos comerciais impressos.

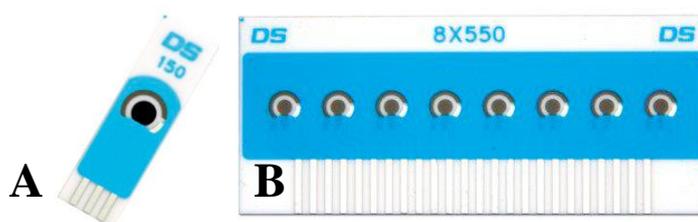


FIGURA 2.3 – (A) Eletrodos de carbono individuais e (B) arranjos de eletrodos comerciais. Fonte: *Dropsens*.¹⁰⁸

Uma gama de configurações e modificações podem ser obtidas via SPE comercial ou produzidos em laboratório. A Figura 2.4 apresenta algumas configurações obtidas pela técnica de *screen printing* utilizando materiais de baixo custo, como filme para transparência, papel adesivo vinílico e papel cartão dupla-face desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

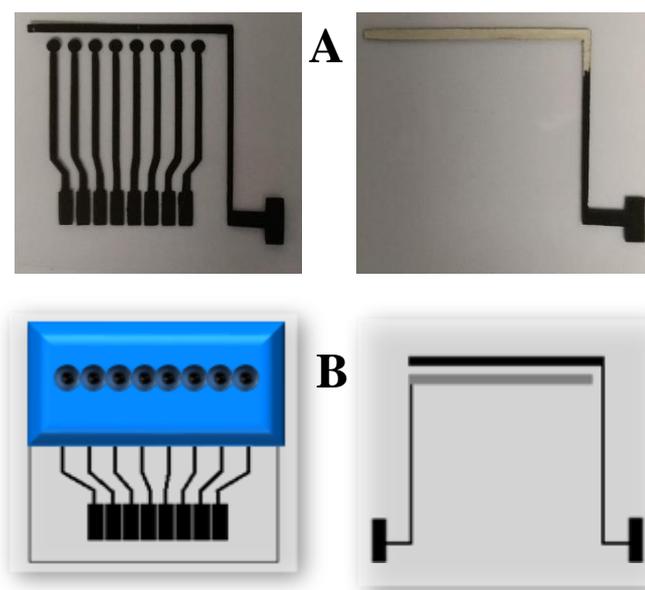


FIGURA 2.4 – Configurações de arranjos de eletrodos em (A)¹⁰⁹ de trabalho e contra eletrodo e seu respectivo eletrodo de referência e (B)^{77, 110} eletrodos de trabalho delimitados com papel adesivo vinílico formando micropoços.

Na literatura, existem poucos trabalhos relacionados ao uso de SPEs sem modificação, uma vez que a modificação aumenta o número de possíveis aplicações e melhoramento no desempenho dos sensores. A modificação em massa de SPEs é simples em comparação com os eletrodos de carbono vítreo, por exemplo, os quais precisam de várias etapas para preparação.

As modificações das propriedades eletroquímicas podem ser realizadas alterando a composição das tintas ou até mesmo por meio da deposição de compostos específicos na superfície dos eletrodos, tais como filmes metálicos, polímeros e enzimas. Além disso, um grande avanço no desenvolvimento de biossensores foi alcançado utilizando materiais nanoestruturados como Au, Ag, Pt, Pd¹¹¹, nanotubos de carbono (CNTs)¹¹², grafeno¹¹³ e negro de fumo. Estes materiais permitem tanto uma maior eficiência na imobilização de moléculas biológicas, quanto uma melhora na taxa de transferência de elétrons do eletrodo.

2.5.2 - Técnicas de imobilização de biocompostos

O desempenho de um imunoenensaio depende diretamente da efetiva ligação entre anticorpos e antígenos e a imobilização de anticorpos ou antígenos em um substrato deve manter a integridade do composto bem como uma orientação que favoreça seu potencial para captura do alvo. Estratégias como, modificação de superfície com substratos tridimensionais, monocamadas automontadas, técnicas de bioafinidade utilizando peptídeos, interação biotina-estreptavidina, imobilização dirigida por DNA, proteínas A e G e aptâmeros, adsorção física e afinidade com metal têm sido reportadas na literatura¹¹⁴.

As condições de imobilização também são importantes, como por exemplo o tipo de tampão e pH, temperatura, bem como o tempo de reação entre antígeno e anticorpo, e podem ser aprimoradas durante a otimização do dispositivo, além de estarem e estão diretamente relacionadas ao desempenho do sensor. Logo, dentro das estratégias para o desenvolvimento de imunoenensaio, a modificação adequada do eletrodo pode levar a um significativo aumento da resposta dos imunossensores e, conseqüentemente, melhorar a performance do imunoenensaio. Nas seções a seguir estão apresentadas algumas formas de imobilização de biomoléculas.

i) Adsorção física

Baseada em interações fracas como interação de *Van der Waals* e de hidrogênio, o processo de imobilização é simples e durante um intervalo de tempo pré-estabelecido para que ocorra a adsorção. Os suportes comumente usados são grafite, resina de troca iônica e eletrodos modificados com nanomateriais. Embora este método ofereça uma via de fixação mais simples, os anticorpos podem ser imobilizados de maneira orientada aleatória, podendo ser deslocados em etapas posteriores por lavagem¹¹⁵. Além disso, a orientação adequada do elemento de reconhecimento para a formação do imunocomplexo é pobre e a passivação da superfície do eletrodo ocorre com frequência¹⁰².

ii) Imobilização covalente

A imobilização por ligação covalente é a mais empregada na construção de imunossensores. Esta ocorre entre os grupos funcionais não essenciais, por exemplo amina, hidroxila, carboxila e tiol em cadeias laterais, para a atuação da biomolécula e grupos reativos disponíveis na superfície do suporte. Em geral, este método envolve as etapas de ativação do suporte com um reagente específico (bi ou multifuncional), e adição da biomolécula para formação da ligação entre as cadeias laterais da biomolécula e o suporte. Nas imobilizações por ligações covalentes, dificilmente a molécula irá desprender-se do suporte e a estabilidade diante de variações físico-químicas é aumentada¹¹⁶⁻¹¹⁸.

O acoplamento via ligação entre grupos amina e grupos carboxílicos, presentes no substrato e no biocompostos, obtidas com o auxílio de intermediários reativos à base de carbodiimida EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) com ésteres succinimídicos, como o NHS (hidroxisuccinamida), têm sido largamente empregados para efetiva imobilização covalente de biocompostos. Este método é conhecido como acoplamento EDC/NHS e resulta na formação da ligação amida^{119, 120}.

Dentre os materiais utilizados para a modificação da superfície eletródica podemos citar os materiais carbonáceos em suas diversas formas alotrópicas conhecidas, as quais podemos citar o grafite, grafeno¹²¹, negro de fumo (do inglês, *Carbon Black* (CB))¹²², nanotubos de carbono (*single e multi walls*)¹²³, diamante, grafeno e nanomateriais metálicos¹²⁴. A seguir são abordados os materiais utilizados neste trabalho para a modificação de superfície e para ancoramento de anticorpos

iii) Óxido de Grafeno (GO)

O grafeno possui uma estrutura bidimensional planar de carbono com a espessura de um átomo, sendo que os átomos de carbono apresentam hibridização sp^2 com ligações covalentes e estão empacotados em um retículo

cristalino de formato hexagonal. Possui propriedades interessantes, como condutividade elétrica (até 6000 S/cm) e térmica (5000 W/(m.K), impermeabilidade a gás e alto módulo de Young (1 TPa)¹²⁵.

Semelhante ao grafite, o GO é composto por folhas de grafite oxidadas emparelhadas com um espaçamento de 6 a 12 Å entre as lamelas. Estas folhas são fortemente hidrofílicas devido à presença de moléculas de água entre elas. O óxido de grafeno pode ser visto como sendo uma folha de grafeno com vários grupos funcionais oxigenados ligados covalentemente na sua superfície, os quais são os responsáveis pela hidrofiliabilidade do material¹²⁶. Os primeiros estudos relacionados ao GO datam dos anos de 1840, com os trabalhos do cientista alemão Schafhaeutl, que estudou a intercalação e exfoliação das camadas de grafite com moléculas de ácido sulfúrico e nítrico¹²⁷. Em 1859, quando Brodie estudava as propriedades do grafite, a partir da mistura deste com HNO₃ fumegante e KClO₃^{124, 128, 129} ele conseguiu fazer a exfoliação do grafite e também a oxidação química das superfícies, resultando no óxido de grafite e bem provavelmente no óxido de grafeno (o qual não foi caracterizado)¹³⁰.

O GO possui uma estrutura que não é totalmente planar uma vez que a rede de carbono sp² tende a possuir defeitos, contendo quantidades de grupos oxigenados, o que pode ser benéfico para a funcionalização por meio da imobilização de biomoléculas¹³¹. A superfície de GO possui diferentes grupos funcionais oxigenados, tal como carbonilas, carboxilas, hidroxilas e epoxilas que são suscetíveis a ataques de substituição nucleofílica por grupos aminas (-NH₂), podendo assim, ser uma via interessante para imobilizar covalentemente pequenas moléculas orgânicas, polímeros e até biomoléculas que possuem esse grupo funcional¹³².

iv) Nanopartículas de ouro

Nanopartículas metálicas (NP) são compostos com propriedades físicas e químicas significativamente alteradas quando comparados com os materiais

convencionais devido a seu tamanho reduzido (< 100 nm). Sua elevada área superficial e alta condutividade elétrica seu uso tende a facilitar a transferência de elétrons e o ancoramento de materiais biológicos^{133, 134}.

Dentre as NPs mais utilizadas pode-se destacar as nanopartículas de ouro (AuNP) que vêm sendo especialmente empregadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos devido a sua ótima compatibilidade com materiais biológicos¹³⁵. As AuNPs podem ser utilizadas para modificar a superfície de eletrodos com intuito de aumentar a área tanto geométrica como a eletroativa, permitindo a imobilização de um grande número de biomoléculas ou mesmo serem utilizadas como marcadores para gerar sinais eletroquímicos e, assim, aumentar a intensidade dos sinais.

Estudos demonstraram que as nanopartículas são sistemas ideais capazes de formar arranjos tridimensionais com propriedades diferentes das nanopartículas isoladas e de eletrodos convencionais. Enzimas possuem dimensões semelhantes às AuNPs de modo que têm sido combinado com uso de biocompostos¹³⁶.

2.5.3 - Partículas magnéticas (PMs) e amplificação de sinal

Biomarcadores para o diagnóstico de doenças como cânceres, em geral, encontram-se em baixos níveis, principalmente durante os estágios iniciais, o que pode comprometer a sua detecção por métodos consagrados como o ELISA. Desta forma, o desenvolvimento de métodos altamente sensíveis para detecção destes biomarcadores é altamente desejável.

As PMs ganharam popularidade no desenvolvimento de imunossensores devido à sua boa estabilidade, tamanho pequeno e geometria esférica com uma grande quantidade de elementos de reconhecimento, cinética de reação rápida e facilidade de modificação de superfície com grupos funcionais, DNA, enzimas, estreptavidina, proteína A ou G, etc¹³⁷. As PMs são formadas basicamente por óxidos de ferro como a magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

e hematita (Fe_2O_3)¹³⁸. Os métodos para sintetizar nanopartículas de magnetita incluem método amplamente utilizado como irradiação ultrassônica, sol gel, decomposição térmica e coprecipitação¹³⁹. São de grande interesse na área da biomedicina devido aos diferentes tamanhos que podem ser menores ou semelhantes a uma célula (10-100 μm). As partículas podem ser utilizadas para separação magnética de biocompostos de interesse em matrizes biológicas como na liberação de fármacos entre muitas outras aplicações¹⁴⁰.

Em imunossensores, as PMs têm sido amplamente exploradas como material para imobilização de anticorpos, antígenos e enzimas. Essa estratégia implica na utilização de nano/micropartículas como meio de imobilização de marcadores e, conseqüentemente, amplificação de sinal analítico. Além disso atua principalmente para a captura e separação do analito, devido suas propriedades magnéticas, permitindo tanto a preconcentração quanto a eliminação de possíveis interferentes, minimizando o efeito de matriz^{80, 97}.

A possibilidade de funcionalização das PMs com grupos aminos e carboxílicos permitem a sua modificação de forma simples com anticorpos e enzimas. Imunoensaios do tipo sanduíche usando partículas magnéticas apresentam vantagens sobre os ensaios sanduíche convencionais, como o método ELISA devido à possibilidade da amplificação do sinal, uma vez que uma quantidade massiva de enzimas e anticorpos são imobilizados sobre o suporte sólido que tem sua grande área de superfície fornecendo amplificação útil do sinal, melhorando o desempenho dos imunoensaios analíticos¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Nos imunossensores eletroquímicos convencionais, a relação entre o anticorpo e enzima é de 1:1. Com o uso das partículas magnéticas, a relação é amplificada para milhares de anticorpos e milhares de enzimas para um antígeno, conforme reportado nos trabalhos de Otieno *et al*¹⁴⁵.

Além disso, trabalhos na literatura utilizaram partículas ferromagnéticas a fim de biomimetizar¹⁴⁶ a enzima peroxidase e suas atividades catalíticas. O grupo heme encontrado nas enzimas peroxidase atuam na catálise

da redução de peróxido de hidrogênio que pode ser utilizado no monitoramento da oxidação de substratos como 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB), Hidroquinona (HQ) e o-fenilendiamina (OPD).

Sharafeldin¹⁴⁷ *et. al.* imobilizaram anticorpos sobre nanopartículas de óxido de ferro decoradas com óxido de grafeno ($Ab_2@Fe_3O_4@GO$) onde sobre um arranjo de eletrodos de carbono foi depositado eletroquimicamente grafeno reduzido para imobilização de anticorpos primários via agente de reticulação EDC/NHS. Os biomarcadores PSA e PSMA foram capturados pelo complexo $Ab_2@Fe_3O_4@GO$ e posteriormente incubados no imunossensor contendo anticorpo formando uma estrutura tipo sanduíche. A detecção dos biomarcadores foi medida por amperometria pela atividade biomimética das ferritas frente à redução de peróxido de hidrogênio aplicando um potencial fixo de - 0,3 V vs. Ag|AgCl. O limite de detecção obtido para o PSA foi de 15 fg mL^{-1} . Já no trabalho de Chikkaveeraiah *et al.*¹⁴⁸ foi reportado micropartículas magnéticas decoradas com anticorpos e HRP como marcador enzimático. Para o biomarcador PSA foi encontrado um LoD de $0,23 \text{ pg mL}^{-1}$, demonstrando a viabilidade do uso das PMs, não só para captura e separação do analito, mas também como marcador biomimético.

Capítulo 3 – Objetivos

3 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistiram em desenvolver métodos analíticos para a detecção de biomarcadores proteicos em amostras de soro humano, utilizando partículas magnéticas massivamente decoradas com anticorpos e/ou marcadores enzimáticos para captura e separação dos analitos e arranjo de imunossensores, construídos em dispositivo microfluídico descartável para a detecção eletroquímica dos biocompostos, visando o diagnóstico de câncer de próstata.

**Capítulo 4 – Desenvolvimento
de imunoensaio eletroquímico
descartável aplicado na detecção do
biomarcador p16 utilizando
partículas magnéticas comerciais**

4 - DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL APLICADO NA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR p16 UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMERCIAIS

Neste capítulo foi explorado a construção de um sistema microfluídico contendo 8 eletrodos de trabalho de carbono para obtenção de medidas simultâneas visando a quantificação do biomarcador p16 em amostra de soro de pacientes controle negativos e acometidos com o câncer de próstata. O imunoensaio desenvolvido contou ainda com o uso de partículas magnéticas comerciais massivamente decoradas com enzimas e anticorpos com o objetivo de obter baixos limites de detecção e elevada seletividade.

4.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver imunoensaio eletroquímico para a detecção do biomarcador p16. Para isso, foram necessários:

- ✓ Fabricar arranjos de eletrodos de carbono pela técnica *screen printing*;
- ✓ Obter nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona;
- ✓ Modificar os arranjos de eletrodos com anticorpos específicos monoclonais (anti-p16);
- ✓ Caracterizar eletroquimicamente a superfície dos eletrodos;
- ✓ Preparar os bioconjugados HRP-PM-anti-p16 utilizando anticorpos policlonais e enzima HRP;
- ✓ Otimizar parâmetros experimentais tempo de incubação e vazão do sistema microfluídico;
- ✓ Obter curva de calibração;
- ✓ Aplicar os imunossensores em amostras de pacientes cedidas pelo Hospital de amor da cidade de Barretos/SP;

- ✓ Realizar a quantificação do biomarcador via ELISA como método comparativo.

4.2 - PARTE EXPERIMENTAL

O imunoenensaio microfluídico desenvolvido envolve seis etapas: **1-** Construção do arranjo de eletrodos pela técnica *screen printing*; **2-** Modificação da superfície dos eletrodos de trabalho utilizando, PDDA, AuNP-GSH e anticorpos monoclonais (Ab1); **3-** Modificação das PMs utilizando anticorpos secundários (Ab2) e enzima HRP (Ab2-PM-HRP); **4-** Captura e separação do biomarcador das soluções das amostras utilizando o bioconjugado Ab2-PM-HRP; **5-** Injeção e incubação do bioconjugado contendo o analito capturado (p16-Ab2-PM-HRP) no sistema microfluídico para a detecção via imunoenensaio tipo sanduíche e **6-** Detecção amperométrica em fluxo. As etapas estão sumarizadas na Figura 4.1 a seguir:

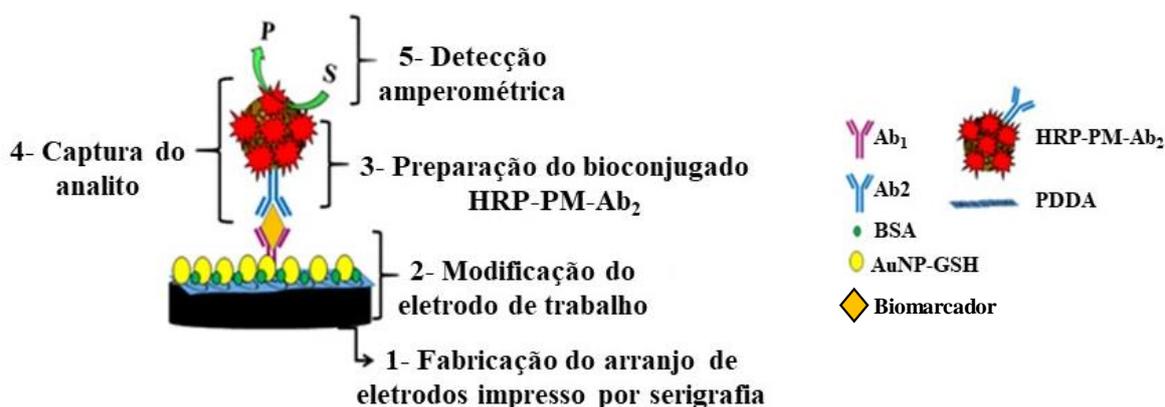


FIGURA 4.1 – Representação esquemática das etapas de formação do imunossensor com formato sanduíche.

4.2.1 - Reagentes e Preparo de Soluções

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Poli (cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), ácido ((N-(2-hidroxi)etil)piperazina-N'-(2- etanosulfônico))

(HEPES), albumina de soro bovino (BSA), L-glutationa (GSH), hidroquinona (HQ), KCl, fosfato de sódio monobásico e dibásico, glicina, ácido tetracloroáurico(III) (HAuCl_4), N-hidroxisuccinimida (NHS), peroxidase de raiz forte (HRP), boridreto de Sódio (NaBH_4) Tween-20 (TW-20), soro de vitelo bovino e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido acético glacial, metanol, hidróxido de sódio (NaOH , 97%) da marca Synth. Anticorpos primários e secundário Anti-p16 e o peptídeo p16 foram adquiridos da empresa IMUNY. As partículas magnéticas comerciais (PM) foram adquiridas da marca *ThermoFisher* com diâmetro aproximado de 1,0 μm . Para fabricação dos eletrodos descartáveis foram utilizadas folhas de poliéster da marca USA *Folien ultra-clear* para impressão a laser e papel adesivo de vinil obtido do comércio local da cidade de São Carlos/SP. Papel cartão adesivo dupla face com as dimensões 3 mm de espessura e tamanho 24×25 cm foi obtido do comércio local. A tinta de grafite utilizada foi da marca HENKEL (código 423SS) e a de $\text{Ag}|\text{AgCl}$ foi obtida da GWENT código (C2130905D3).

A solução de PDDA foi preparada considerando os valores de densidade (1,04 g mL^{-1} a 25 °C) e título do polycation. À solução foram adicionados NaCl (0,1 mol L^{-1}) e água Milli-Q.

A síntese das AuNPs modificadas com L-glutationa (GSH), utilizada para o fornecimento de grupos carboxílicos para o ancoramento dos anticorpos, foi realizada pela solubilização de 0,079 g de HAuCl_4 e 0,038 g de GSH em 2,0 mL de ácido acético e 12,0 mL de metanol, resultando numa solução com coloração amarelo. À solução foram adicionados 6,0 mL de NaBH_4 e mantidos sob agitação constante por 2 h. Em seguida, a solução foi filtrada com o auxílio de uma membrana molecular de 50 kDa (lavada previamente com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1}) em centrífuga com rotação de 3500 rpm e lavadas quatro vezes com água. O sobrenadante foi descartado e as AuNP-GSH foram ressuspensas em 15 mL de tampão HEPES (20 mmol L^{-1} , pH 8) com uma concentração final de 46,68 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.2 -Equipamentos e aparatos

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um equipamento *DropSens* μ Stat 8000 Multi-Potentiostat/Galvanostat interfaceado a um computador contendo o software *Dropview 8400*. As caracterizações dos eletrodos foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento da ZEISS modelo EVO LS15.

Os valores de pH foram ajustados com auxílio de pHmetro Hanna, modelo pH 21. As pesagens foram feitas utilizando-se balança analítica SHIMADZU modelo AUW 220D com precisão de 0,01 mg. A técnica de comparação utilizada foi a *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA) realizada com leitor de placa da marca Labtech, modelo LT-4000MS.

O sistema microfluídico foi montado com uma bomba de seringa simples programável da *New Era Pump System* modelo NE-1000, (Farmingdale, EUA) e uma válvula manual de injeção cromatográfica (Rheodyne, 7725i) conectada à bomba de seringa usando tubos de polietileno-cetona (PEEK). A válvula foi acoplada ao dispositivo microfluídico e uma alça de amostragem de 100 μ L de tubo PEEK foi utilizada. Conectores PEEK foram utilizados para conectar a entrada e saída do sistema microfluídico utilizando adesivo de comando 3 M adquirido no comércio local.

As medidas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas utilizando espectrômetro Jasco modelo FTIR-4100 (Reino Unido). As imagens de microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (MEV) e espectroscopia de dispersão de energia (EDX) foram realizadas usando um modelo Hitachi S-4800. O EDX foi realizado utilizando uma radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, 40 Kv e 30 mA) na faixa angular $2 \leq 2\theta \leq 80$ com passos de $0,05^\circ$ a uma taxa de $0,25^\circ \text{ min}^{-1}$. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas utilizando JEM 200 CX, operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. Utilizou-se uma placa de aquecimento

IKA C-MAG modelo HS 7 (IKA Works, Inc), conectada a um controle de temperatura integrado e uma sonda de temperatura Pt1000.

4.2.3 - Construção do arranjo de eletrodos descartável pela técnica de screen printing

O sistema microfluídico descartável proposto foi constituído por um arranjo de 8 eletrodos de carbono como eletrodo de trabalho (2 mm de diâmetro cada), um contra eletrodo de carbono e um pseudo-eletrodo de referência de Ag|AgCl, ambos comuns aos 8 eletrodos de trabalho. As etapas para a construção do dispositivo estão representadas na Figura 4.2. O *design* do eletrodo foi previamente selecionado e elaborado utilizando o software *Silhouette Studio*. O método de fabricação do dispositivo microfluídico foi patenteado por Faria *et al.* via Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160109841, data de depósito: 13/05/2016.

Uma impressora de recorte foi utilizada para recortar folhas de adesivo de vinil com o *design* dos eletrodos, conforme **etapa 1** da Figura 4.2. Das folhas de vinil recortadas foram retiradas as partes indesejadas (Figura 4.2 **etapa 2**) com o uso de uma pinça. A folha de vinil adesivo contendo o *design* dos eletrodos foi então transferida com ajuda de um adesivo de transferência (adesivo *contact* transparente) para uma folha de poliéster (Figura 4.2 **etapa 3**) a qual é comumente utilizada como transparência para impressão à laser. Após esta etapa, uma pequena quantidade de tinta de carbono foi depositada na parte superior da transparência com auxílio de um rodo foi distribuída ao longo da folha passando entre as áreas dos eletrodos (Figura 4.2 **etapa 3**). Nessa etapa, os eletrodos de trabalho e contra eletrodo foram serigrafados juntos em uma única folha. Em seguida, a folha foi colocada na estufa à 90 °C durante 30 minutos para a cura da tinta (Figura 4.2 **etapa 4**). Após essa etapa, os adesivos de vinil foram removidos e os eletrodos estão prontos para uso (Figura 4.2 **etapa 5**).

O eletrodo de referência foi serigrafado de maneira similar aos eletrodos de trabalho e contra eletrodo (Figura 4.2 **etapas de 1' a 7'**), com uma etapa adicional de aplicação de tinta de Ag|AgCl após a etapa de cura da tinta de carbono, seguida de uma nova etapa de cura em estufa por 30 min à 60 °C sendo então o adesivo de vinil retirado conforme Figura 4.2 (**etapas 5', 6'e 7'**).

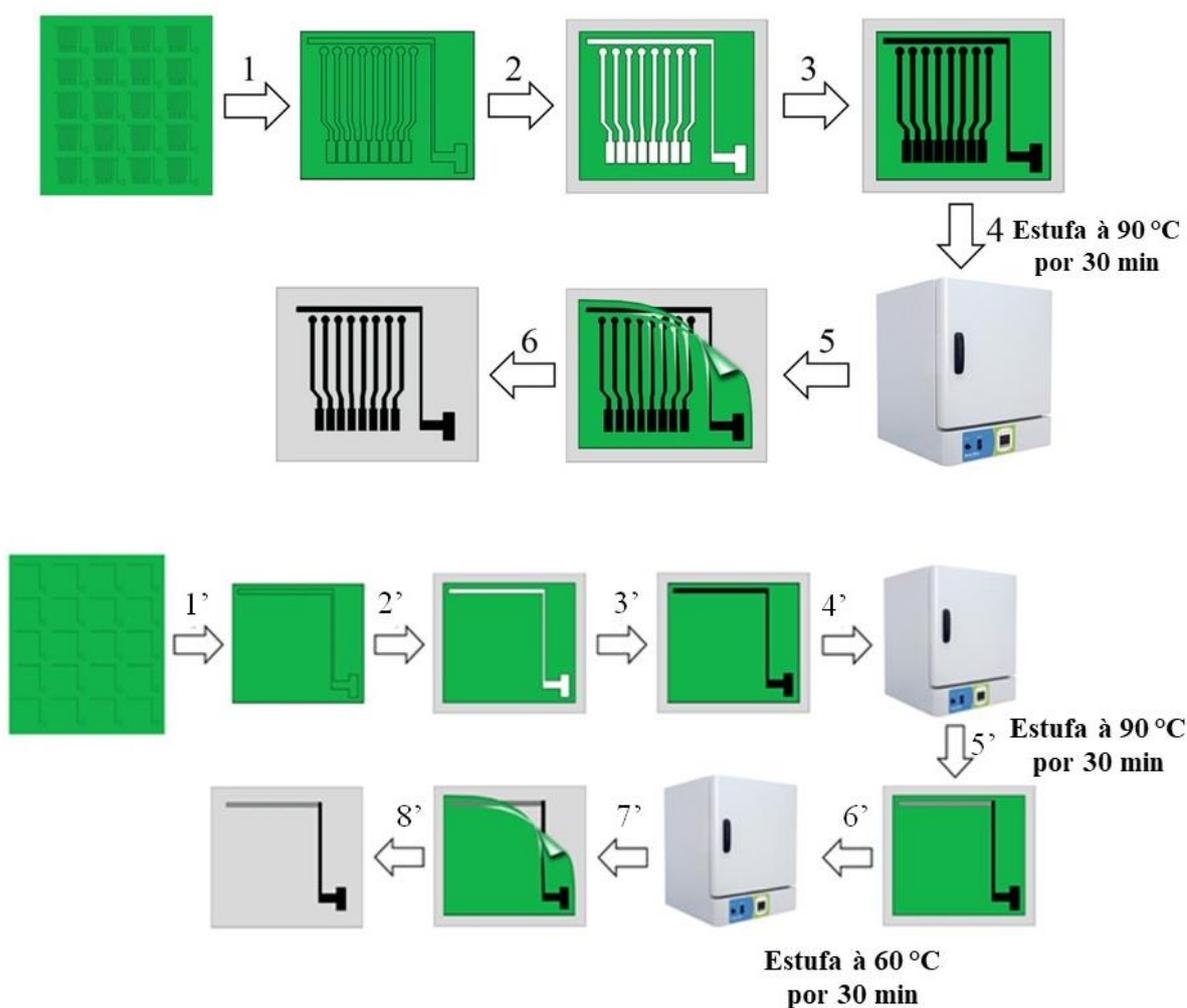


FIGURA 4.2- Representação da fabricação do arranjo de eletrodo de trabalho e contra eletrodo e pela técnica *screen printing*.

Na Figura 4.3 são apresentadas as imagens dos eletrodos de trabalho e contra-eletrodo em **A** e do eletrodo de referência em **B**.

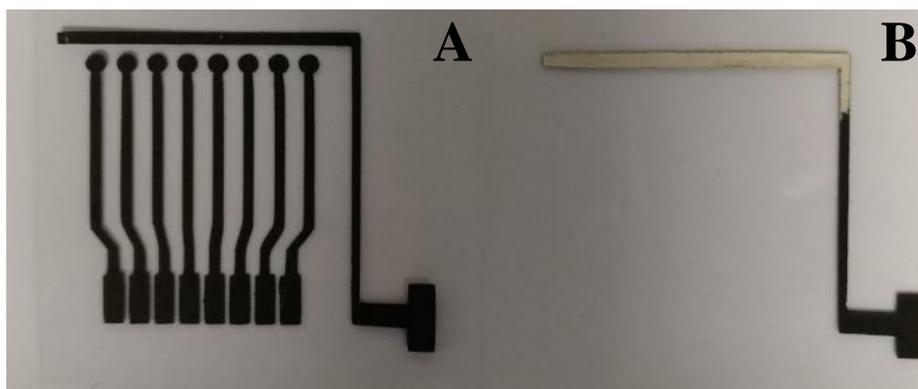


FIGURA 4.3 - Fotografias do arranjo de eletrodo de trabalho e contra eletrodo em (A) e eletrodo de pseudo-referência em (B) obtidos pela técnica de *screen printing* patenteado por Faria *et al.* via Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020160109841, data de depósito: 13/05/2016.

4.2.4 - Modificação da superfície eletródica

A modificação dos eletrodos foi realizada por meio da formação de bicamadas de PDDA e AuNP-GSH por interação eletrostática, conforme representado na Figura. 4.4.

A modificação consistiu primeiramente em adicionar 5 μL do polícatión PDDA (2 mg mL^{-1}) contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl sobre a superfície eletródica mantendo a solução por 20 min (Figura 4.4. **etapa 1**). O excesso do polícatión foi lavado com água e em seguida, 5 μL de uma dispersão de AuNP-GSH foi adicionada sobre os eletrodos e mantida por 20 min (Figura. 4.4. **etapa 2**). Em seguida, o eletrodo foi lavado retirando o excesso de nanopartículas.

Antecedendo a adição do anticorpo, foram adicionados 5 μL da solução mista de EDC/NHS ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS) para a ativação dos grupos carboxílicos presentes nas AuNPs. A solução foi mantida sobre o eletrodo por 10 min sendo em seguida lavado com água. O excesso de EDC/NHS foi retirado e 5 μL de anticorpo primário (Ab1, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado e mantido por 18 h para formação de ligação amida entre os grupos

amino e carboxílicos provenientes do anticorpo e AuNP-GSH, respectivamente (Figura 4.4. **etapa 3**).

Por fim, os eletrodos foram lavados e, em seguida, foi realizada a etapa de bloqueio dos sítios ativos remanescentes, adicionando 5 μL de albumina de soro bovino (BSA 2% m/m) preparado em PBS 7,4 (Figura 4.4. **etapa 4**). A etapa de bloqueio foi mantida por 1 h e os eletrodos foram lavados com uma pequena quantidade de tampão fosfato salino (PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4) e mantidos sob refrigeração para posterior uso.

A atuação do EDC/NHS para a imobilização covalente do Ab1 está representada na Figura 4.5. Neste processo, o grupo carboxílico presente no eletrodo reage com EDC formando um intermediário o-acilurea (intermediário não estável). O intermediário formado reage com o NHS formando um éster estável (Figura 4.5 **etapa 1**). Em seguida, a reação de acoplamento com anticorpo monoclonal foi realizada pela adição de Ab1 (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre a superfície dos eletrodos (Figura 4.5 **etapa 2**). As etapas resumidas estão ilustradas nas Figuras 4.4 e 4.5.

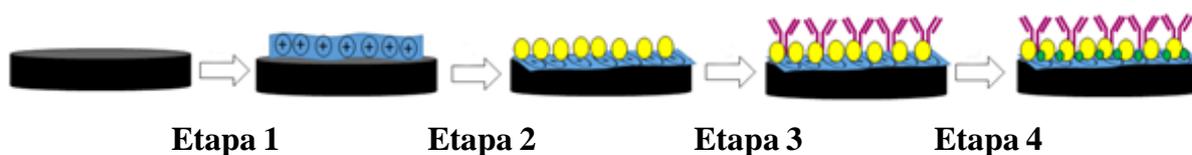


FIGURA 4.4 - Representação esquemática das etapas de modificação dos eletrodos.

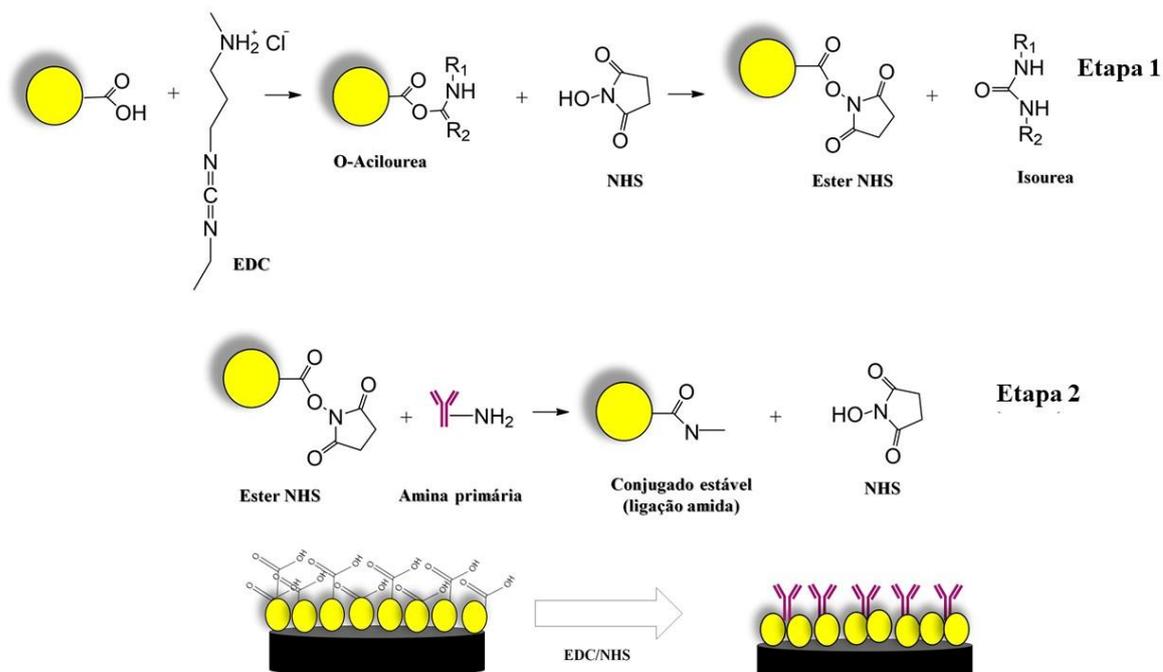


FIGURA 4.5 - Ilustração da reação covalente entre AuNP e anticorpo por meio da solução mista de EDC/NHS.

Após modificação do arranjo de eletrodos, o sistema microfluídico foi finalizado unindo-se a folha de poliéster contendo os eletrodos de trabalho e contra-eletrodo e outra folha contendo o eletrodo de referência utilizando um cartão de polietileno de 3 mm de espessura com adesivo dupla face contendo o canal microfluídico. Para isso, o cartão com adesivo dupla face foi recortado com uma impressora de recorte de forma a obter um canal microfluídico com as dimensões de 24×25 cm perfazendo um volume de aproximadamente 70 μ L. O canal foi utilizado para a delimitação da área eletroativa dos eletrodos trabalho bem como para estabelecer o canal microfluídico.

Um furo para injeção de solução e outro para saída foram realizados na folha de transparência contendo os eletrodos de trabalho e referência com auxílio de uma agulha. O eletrodo de trabalho e contra eletrodo foram primeiramente posicionados em um dos lados do cartão adesivo e em seguida o de referência foi adicionado para fechar o sistema. A Figura 4.6 apresenta a construção do sistema microfluídico utilizando cartão adesivo dupla face.

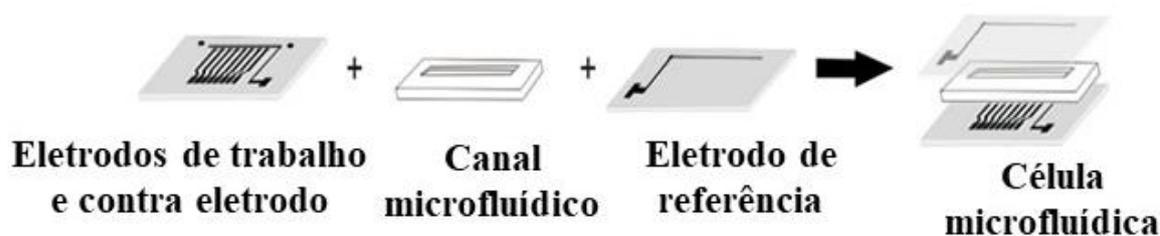


FIGURA 4.6 - Representação das etapas de montagem do dispositivo microfluídico descartável desenvolvido, o qual contém o arranjo de eletrodos de trabalho e contra-eletrodo, o cartão adesivo contendo o canal microfluídico e o eletrodo de referência.

4.2.5 -Etapas de modificação das PMs para o preparo do bioconjugado Ab₂-PM-HRP.

As partículas magnéticas comerciais (10 mg mL^{-1} , diâmetro de $1,0 \text{ }\mu\text{m}$) foram utilizadas para detecção do biomarcador p16. A Figura 4.7 apresenta o procedimento ilustrativo para o preparo do bioconjugado Ab₂-PM-HRP, Para a preparação do bioconjugado Ab₂-PM-HRP, $200 \text{ }\mu\text{L}$ da dispersão de PM foram adicionadas em microtubo de $2,0 \text{ mL}$. As PMs foram manipuladas com auxílio de separação magnética, utilizando uma estante magnética, e uma micropipeta. Assim, as PMs foram lavadas utilizando $200 \text{ }\mu\text{L}$ do tampão ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,2), agitadas em um vórtex e separadas magneticamente. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida por mais duas vezes.

Às PMs lavadas foi adicionada uma solução de EDC/NHS (3 mg mL^{-1}) preparada em tampão MES $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,2). Em seguida, a solução foi agitada em vórtex e posteriormente agitada vagarosamente por 30 min em agitador rotatório. As partículas foram separadas magneticamente e lavadas duas vezes com tampão MES. Após esta etapa foi adicionado $5 \text{ }\mu\text{L}$ de Ab₂ ($10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) o qual foi preparado em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) (Figura 4.7 **etapa 1**). A solução foi mantida sob agitação lenta por 24 horas à temperatura ambiente.

Seguido o tempo de conjugação do Ab2, as PMs foram separadas magneticamente e lavadas com 400 μL tampão MES, seguido do descarte do sobrenadante.

A próxima etapa consistiu na conjugação da enzima HRP ao complexo Ab2-PM previamente obtido. 250 μL de solução de HRP (1,2 mg mL^{-1}) foi adicionado à dispersão de PM-Ab2 e mantido por 18 horas em agitador rotatório em temperatura ambiente (Figura 4.7 **etapa 2**). A solução da enzima foi preparada em 0,5% m/m de BSA em PBS (pH 7). O sobrenadante foi descartado com o excesso de HRP em solução. Ao biconjugado foi adicionado 1,0 mL de glicina 1 mol L^{-1} (pH 8) a fim de bloquear os sítios ativos remanescentes e evitar ligações não específicas (Figura 4.7 **etapa 3**). A solução foi colocada sob agitação em vortéx e em seguida em agitador rotatório por 30 min (temperatura ambiente). Por fim, o bioconjugado foi lavado utilizando PBS com Tween-20 0,05% (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20) e 0,1% BSA por 3 vezes e por fim ressuspenso em 400 μL tampão PBS e TW-20 e colocado em geladeira para posterior uso. A Figura 4.7 mostra as etapas de preparo do bioconjugado Ab2-PM-HRP.

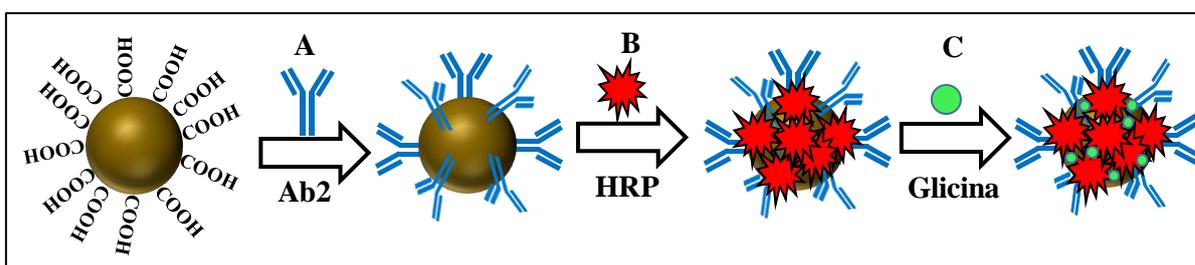


FIGURA 4.7 - Etapas para a preparação do bioconjugado Ab2-PM-HRP.

4.2.6- Etapas de imuno-captura e magneto-separação dos biomarcadores da solução da amostra utilizando o bioconjugado Ab2-PM-HRP e construção da curva analítica

Para este estudo, soluções de soro de vitelo comercial foram fortificadas com quantidades conhecidas dos biomarcadores e utilizadas como

soluções padrões. O soro de bezerro foi utilizado como alternativa ao sangue humano no desenvolvimento do imunoenensaio uma vez que ele simula uma matriz complexa como o soro humano. O soro de bezerro contém um total de 5,5-8,0% de proteína total, enquanto o soro humano apresenta de 4,0 a 9,0%.

Assim, 20 μL do complexo Ab2-PM-HRP foi adicionado a 320 μL de tampão (pH 7,4) e 20 μL da proteína diluída em soro de vitelo de acordo com a concentração de interesse para obter a curva de calibração padrão. A solução foi agitada em vórtex e colocada em agitador rotatório à 37°C por 30 min.

Após a captura do biomarcador e formação do bioconjugado HRP-PM-Ab2-proteína, o sobrenadante contendo a amostra foi descartado e realizou-se a lavagem com PBS pH 7,4 contendo BSA 2%. A etapa de lavagem foi repetida três vezes e o sobrenadante foi descartado. Por fim, o complexo HRP-PM-Ab2-proteína foi ressuspensionado em 125 μL de PBS-TW-20 e BSA 2% (pH 7,4). A representação esquemática do processo de incubação utilizado durante a detecção dos biomarcadores é apresentada na Figura 4.8.



FIGURA 4.8 – Representação esquemática do processo de incubação utilizado para a detecção dos biomarcadores.

Após a captura e separação magnética dos biomarcadores estes foram injetados no dispositivo microfluídico visando a detecção via imunoenensaio do tipo sanduíche via anticorpo monoclonal específico imobilizado sobre a superfície do

eletrodo. Para isto, o sistema microfluídico foi montado conforme imagens apresentadas na Figura 4.9.

O sistema é composto por uma bomba de seringa, válvula de injeção manual com alça de amostragem de 100 μL e o dispositivo microfluídico descartável desenvolvido. Os diferentes componentes foram conectados utilizando tubos conectores tipo PEEK.

Uma vez formado o bioconjugado HRP-PM-Ab2-biomarcador, durante a etapa de captura e separação, 125 μL da dispersão obtida foi imediatamente injetada no dispositivo microfluídico via válvula de injeção com auxílio de uma microsseringa. Após o preenchimento da alça de amostragem, a válvula manual é acionada e a dispersão do imunocombinado é injetada no dispositivo microfluídico. Após o preenchimento do canal microfluídico o fluxo foi parado para a etapa de incubação. Após este tempo, o fluxo foi religado e o canal microfluídico foi lavado com tampão salino PBS-TW 20 pH 6,5. O tempo de incubação assim como a vazão no sistema microfluídico foram avaliados.

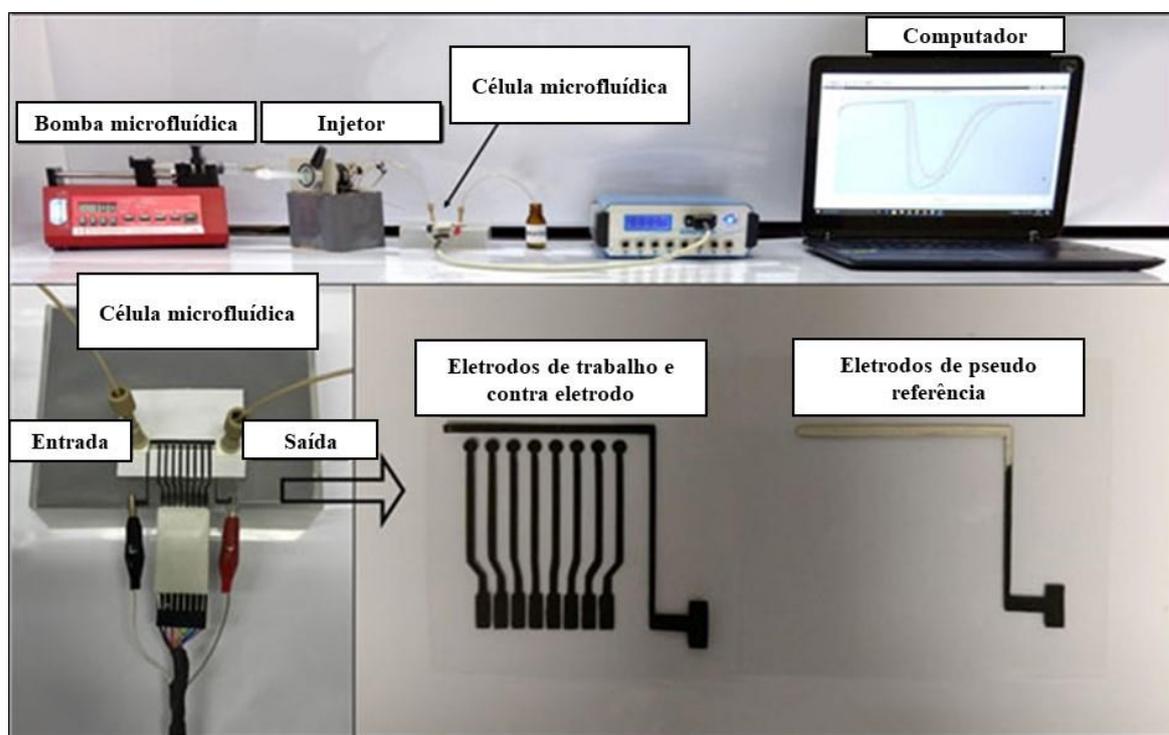


FIGURA 4.9 - Representação esquemática do sistema microfluídico.

Na etapa de detecção por amperometria, a resposta de corrente foi monitorada durante o processo de injeção de uma solução contendo H_2O_2 $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e hidroquinona (HQ) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ no sistema microfluídico e o potencial aplicado fixado em -200 mV . O fluxo foi ligado para a passagem do eletrólito suporte (PBS-TW20 pH 6,5) e após a estabilização do sinal de corrente uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ da solução desaerada de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$, previamente inserida na alça de amostra, foi injetada no sistema e o sinal corrente foi registrado.

4.3 – RESULTADOS

4.3.1 - Caracterização das AuNPs, PMs e do eletrodo de trabalho

A Figura 4.10A-C apresenta as imagens de Microscopia eletrônica de transmissão (MET) em alta resolução e MET bem como o histograma (inserido) das AuNPs decoradas com GSH. Observa-se que as nanopartículas apresentaram um aspecto semi-esférico com diâmetro médio de partícula de $5,9 \text{ nm}$, indicando que a síntese das AuNPs proposta foi bem-sucedida.

Na Figura 4.10D e E são apresentadas as MEVs da superfície do eletrodo SPE antes e após a modificação. O eletrodo preparado mostrou a presença de materiais de carbono dispostos em blocos com aspecto semi-esféricos (Figura 4.10D), que é esperado para eletrodos serigrafados. Na Figura 4.10E é apresentado o SPE modificado com AuNP-GSH no qual pode ser observada a presença de partículas agregadas menores (círculo vermelho).

A análise química do SPE modificado revelou a presença de ouro e enxofre sobre a superfície, comprovando a presença de AuNP-GSH (Figura 4.10F). A Figura 4G-I apresenta os gráficos e histograma das PMs comerciais, as quais possuem aspectos esféricos e rugosos com diâmetro médio de 900 nm , valor próximo ao indicado pelo fornecedor ($1,0 \mu\text{m}$)¹⁴⁹.

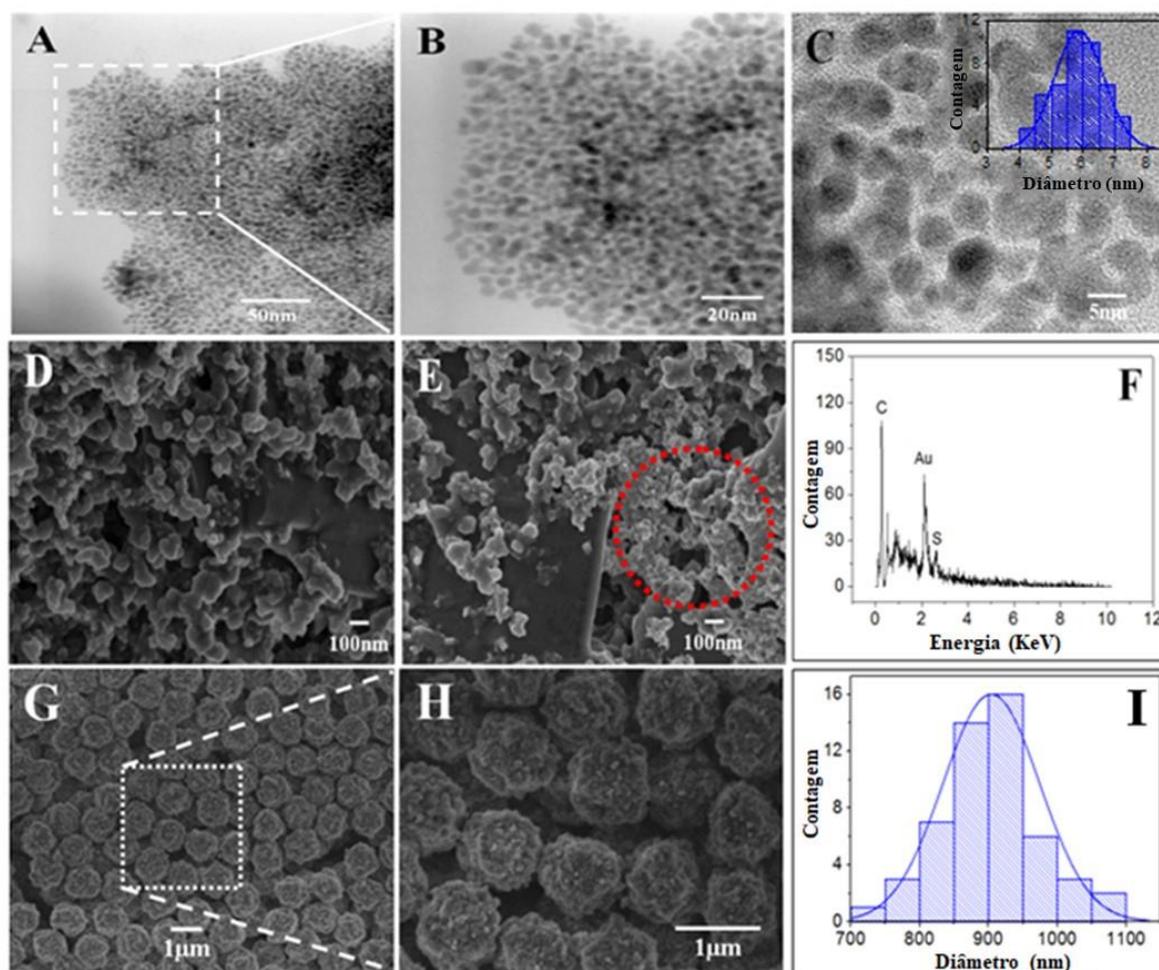


FIGURA 4. 10 - Imagens de HRMET (A) e MET e B) e histograma (inserção) da AuNP-GSH (C), imagem de MEV da superfície do SPCE sem modificação (D), e com AuNP-GSH depositado (E) e análise EDS (F), MEV das PMs e histograma (G-I).

4.3.2 - Caracterização eletroquímica do arranjo de eletrodos descartável desenvolvido

As propriedades eletroquímicas dos eletrodos fabricados pela técnica de *screen printing* foram determinadas utilizando a voltametria cíclica. As etapas para imobilização de anticorpos sobre o eletrodo de trabalho envolveu a modificação prévia da superfície com PDDA e AuNP-GSH formando uma bicamada estabilizada por interação eletrostática.

As diferentes etapas de modificação foram acompanhadas em comparação ao eletrodo sem modificação. Os experimentos foram realizados utilizando o ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica.

O dispositivo foi conectado a uma válvula de injeção com uso de conectores de PEEK aderidos com fita dupla face adesiva comercial modelo Comand 3M. A válvula de injeção foi conectada a bomba de seringa utilizando tubos de PEEK. A bomba foi ligada e a célula microfluídica foi preenchida com a solução contendo a sonda eletroquímica. Os estudos de voltametria cíclica foram realizados na faixa de potencial de 0 a $1,0 \text{ V}$ com diferentes velocidades de varredura.

Os picos típicos anódicos e catódicos observados nos voltamogramas cíclicos para os eletrodos modificados e sem modificação em $0,32$ e $0,22 \text{ mV vs. Ag|AgCl}$ para o ácido ferroceno monocarboxílico podem ser observados na Figura 4.11. Como pode ser observado não houve diferença significativa no perfil dos voltamogramas antes e após a modificação, o que era de se esperar uma vez que ambos possuem carga superficial negativa.

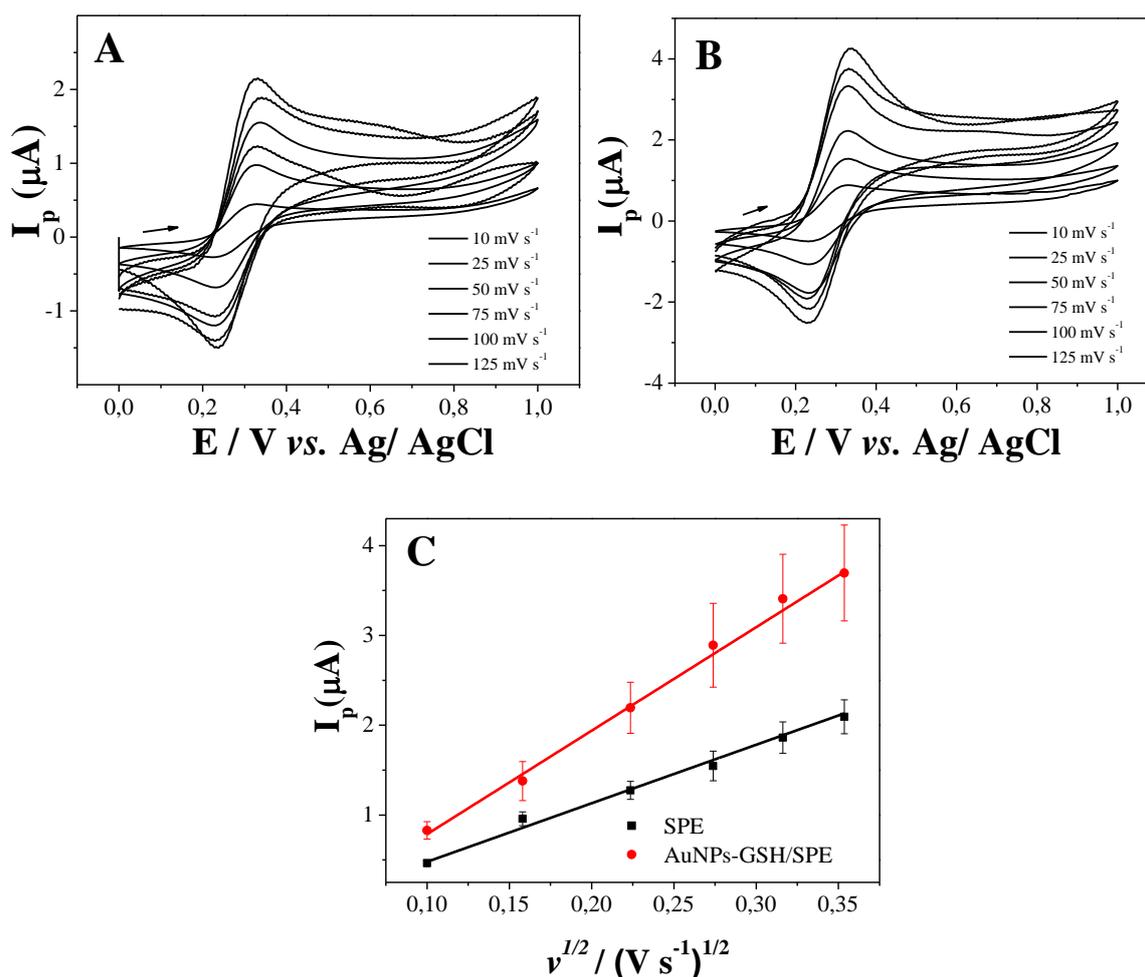


FIGURA 4. 11 -Voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura (10-125 mV s⁻¹) para (A) SPE e (B) AuNP-GSH/SPE modificados previamente com PDDA e AuNP-GSH utilizando ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol mL⁻¹ preparados em KCl 0,5 mol L⁻¹ e (C) gráfico da corrente de pico anódico vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura para SPE sem modificação (linha preta) e AuNP-GSH/SPE (linha vermelha).

A presença das AuNP decoradas com GSH levou a um aumento na resposta de corrente, indicando que ocorreu a modificação na superfície do eletrodo quando comparado com a SPE sem modificação (Figura 4.12). O aumento de área está relacionado com o aumento da área superficial causada pelo material nanoestruturado. A área eletroativa dos eletrodos antes e após modificação foram estimados utilizando a equação Randle-Sevcik. Um aumento

da ordem de 97% foi observado para o eletrodo de AuNP-GSH/SPCE quando comparado com o eletrodo sem modificação.

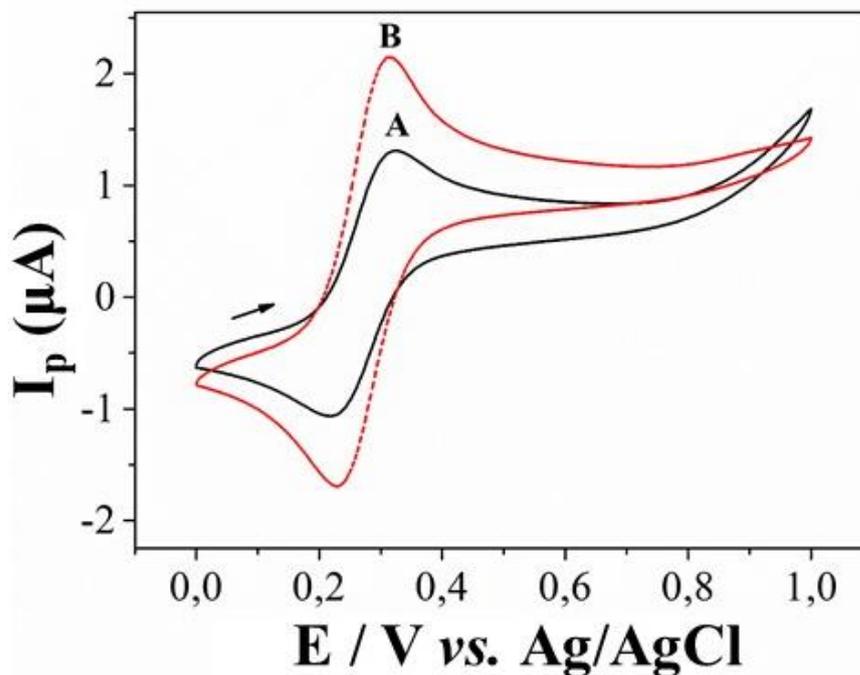


FIGURA 4.12 – Voltamogramas cíclicos de (A) SPE e (B) AuNP-GSH/SPE (3° ciclo) a 50 mV s^{-1} em meio de ácido ferroceno monocarboxílico em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A repetibilidade para os oito eletrodos de um mesmo dispositivo foi avaliada tanto para o eletrodo não modificado (Figura 4.13A) quanto para o eletrodo modificado com AuNP-GSH (Figura 4.13B) utilizando ácido ferroceno monocarboxílico. Os resultados mostraram valores de desvio padrão relativo (RSD) de 1,7% para o SPE sem modificação e 4,6% para a AuNP-GSH/SPE ($n = 8$). Os resultados indicam que o método proposto para construção de eletrodos descartáveis além de simples e de baixo custo mostrou-se eficaz em termos de repetibilidade, bem como o método para a modificação dos eletrodos utilizando PDDA/AuNP-GSH.

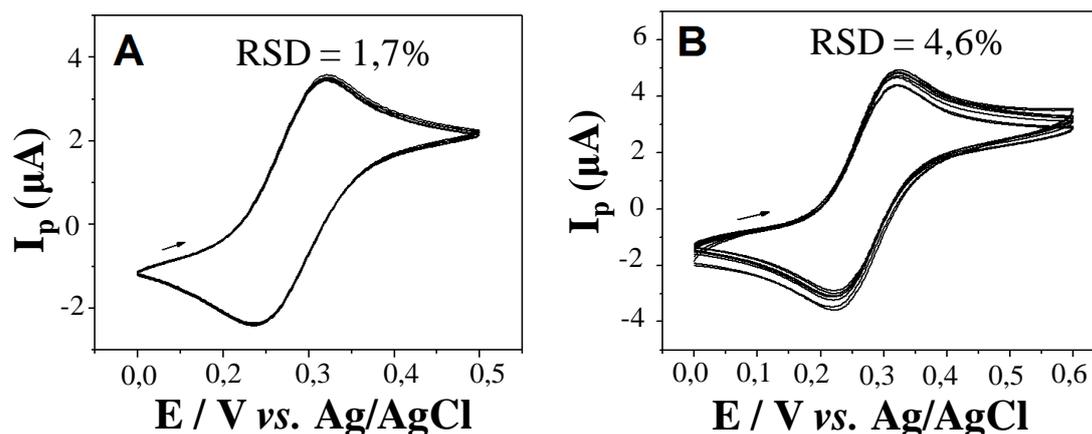


FIGURA 4. 13 – Voltamogramas cíclicos do (A) SPE e (B) AuNP-GSH/SPE (3^o ciclo) em meio de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,5 mol L⁻¹ e velocidade de varredura igual a 50 mV s⁻¹.

4.3.3 - Otimização das variáveis experimentais para o imunoenensaio imunomagnético desenvolvido

O procedimento utilizado para imobilizar anticorpos monoclonais e policlonais na superfície de carbono SPE e das PMs envolveu o uso de EDC/NHS que é largamente utilizado para imobilização de biocompostos^{97, 110, 150}. No entanto, alguns parâmetros considerados importantes são específicos para cada sistema. Desta forma, levando em conta as características individuais dos biomarcadores, as condições ideais para o biomarcador p16 foram estudadas¹⁵¹.

Os parâmetros avaliados para o arranjo microfluídico construído para detecção do p16 foram: tempo de incubação e vazão utilizada para a detecção amperométrica. Todos os estudos foram realizados em soro de bezerro fortificado com o biomarcador e as concentrações para imobilização dos anticorpos sobre o eletrodo de trabalho e sobre as PMs foram mantidas constantes em 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para esse estudo, os eletrodos de trabalho foram previamente modificados com anticorpos monoclonais p16. Em seguida, 20 μL do biomarcador preparado em soro de bezerro foi adicionado à 20 μL do bioconjugado HRP-PM-Ab2(p16) e 320 μL de PBS mantidos sob agitação lenta

por 30 min. O bioconjugado foi separado magneticamente e lavado 3 vezes com PBS contendo 2% BSA a (pH 7,4) e ressuspenso em 200 μL de PBS-Tween-20 contendo 2% BSA.

O tempo de incubação para a captura do biomarcador com os anticorpos policlonais presentes nas PMs para formar o complexo p16-Ab2-PM-HRP é de suma importância, pois este parâmetro pode tanto levar a menores limites de detecção, por assegurar a máxima formação do imunocomplexo do tipo sanduíche, quanto a tempos menores para o imunoensaios. Esses parâmetros afetam diretamente o desempenho analítico dos imunoensaios e, geralmente, dependem das características cinéticas da imunorreação e da transferência de massa de imunorreagentes. Os intervalos de tempo de incubação investigados foram de 10, 20, 30, 40 e 60 min, mantendo a concentração do peptídeo em 50 pg mL^{-1} .

A variação da intensidade de correntes de pico catódico, correspondente à redução eletroquímica, foi avaliada aplicando um potencial constante de $-200\text{ mV vs. Ag|AgCl}$ e utilizando vazão de $100\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ para a injeção da solução de detecção composta de HQ e H_2O_2 .

O mecanismo de resposta do dispositivo é baseado no ciclo catalítico de HRP. O complexo biomarcador-Ab2-PM-HRP foi conduzido a superfície do eletrodo onde o anticorpo específico (Ab1) estava previamente ligado. Durante a detecção eletroquímica, a enzima peroxidase (HRP) é ativada pelo seu substrato (H_2O_2) (etapa 1). Em seguida, a enzima é oxidada de HRP-Fe^{3+} para HRP-Fe^{4+} e promove a redução da molécula H_2O_2 para H_2O . Posteriormente, a espécie HRP-Fe(IV) reage com o mediador redox HQ, reduzindo a enzima para HRP-Fe(III) e oxidando HQ para benzoquinona (BQ) (etapa química). Finalmente, na etapa eletroquímica, a molécula de BQ é reduzida na superfície do eletrodo, gerando moléculas de HQ e a HRP retornando à sua forma nativa (etapa 2) (Figura 4.14).

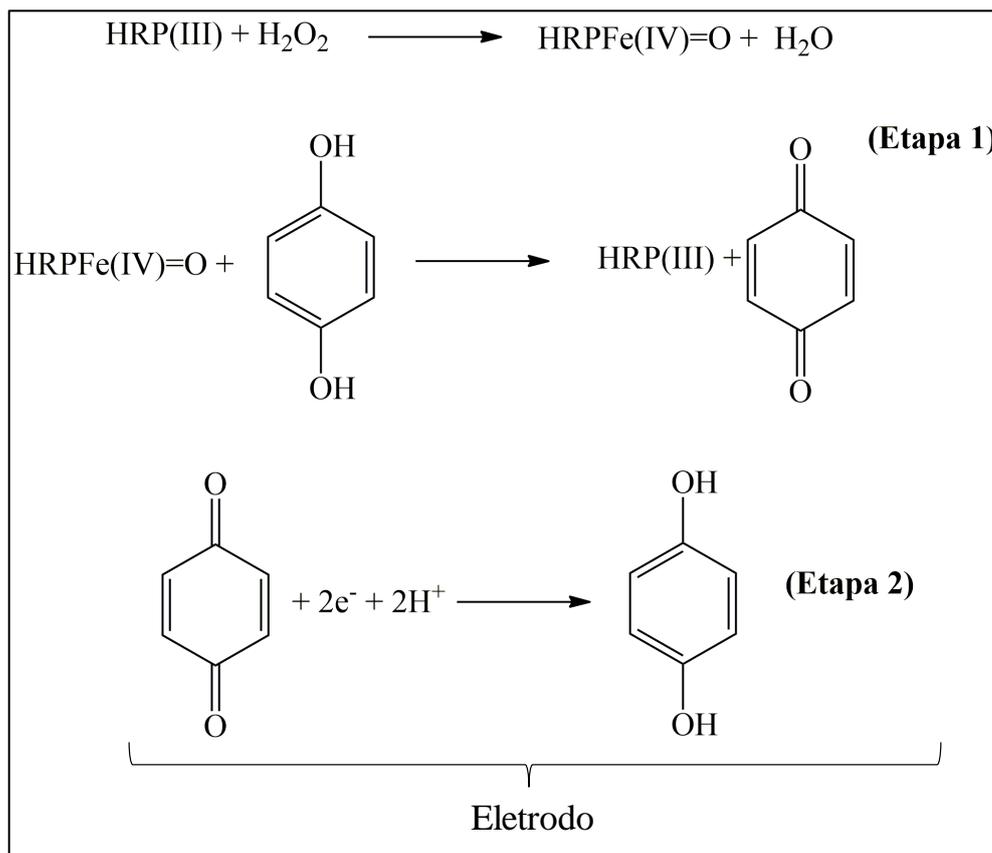


FIGURA 4. 14 – Mecanismo Catalítico da enzima HRP.

Os valores de picos referentes as respostas transientes de corrente obtida nas medidas em função do tempo de incubação são apresentadas na Figura 4.14. Observa-se que o aumento no tempo de incubação proporcionou um incremento na intensidade das correntes de pico catódico. O aumento foi significativo até o tempo de 30 min, com saturação para tempos de incubação posteriores. Isso pode estar associada a saturação dos sítios de ligação de anti-p16 presentes na superfície das partículas magnéticas. Portanto, o tempo de 30 minutos foi escolhido para a incubação na etapa de captura do p16 nas amostras e soro sendo este um tempo adequado para a realização do imunoenensaio.

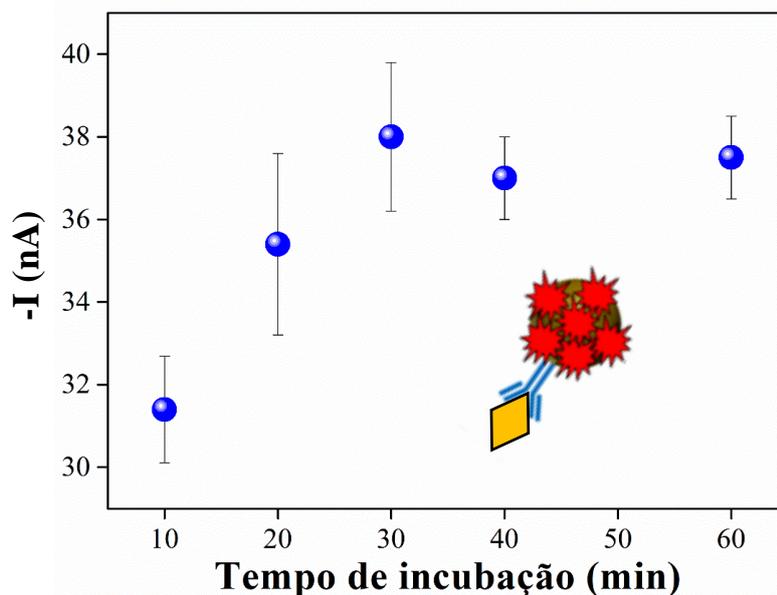


FIGURA 4. 14 - Otimização do tempo de incubação para a imuno-captura do biomarcador p16 e detecção utilizando o dispositivo microfluídico. Concentração de p16 de 50 pg mL^{-1} em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($n \geq 4$).

O estudo da influência da vazão utilizada no sistema microfluídico para a detecção de p16 foi realizada considerando as vazões de 50 , 100 e $200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Para isso, foram utilizados tempo de incubação e tempo de captura de 30 min e concentração de p16 de 50 pg mL^{-1} , sendo o padrão preparado em soro de bezerro.

Como pode ser verificado na Figura 4.15, a vazão de $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ apresentou maiores correntes de pico catódico que as vazões de 50 e $200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. Para a menor vazão da solução de detecção ($50 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$), observou-se um alargamento do pico em relação aos valores superiores de vazões, devido à geração mais lenta da espécie benzoquinona e redução da mesma no eletrodo. Para a mais alta vazão estudada ($200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$), obteve-se um pico mais estreito, porém de menor intensidade de sinal em relação a vazão de $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. O estreitamento do pico na vazão de $200 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ se deve ao fato de não de haver tempo suficiente para formação efetiva da espécie benzoquinona. Dentro do domínio experimental estudado, a vazão de $100 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ forneceu a melhor

relação entre intensidade e definição de pico, ou seja, nesta condição de trabalho a redução eletroquímica de BQ na superfície do eletrodo foi mais efetiva. Portanto, a vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ foi utilizado nos estudos posteriores.

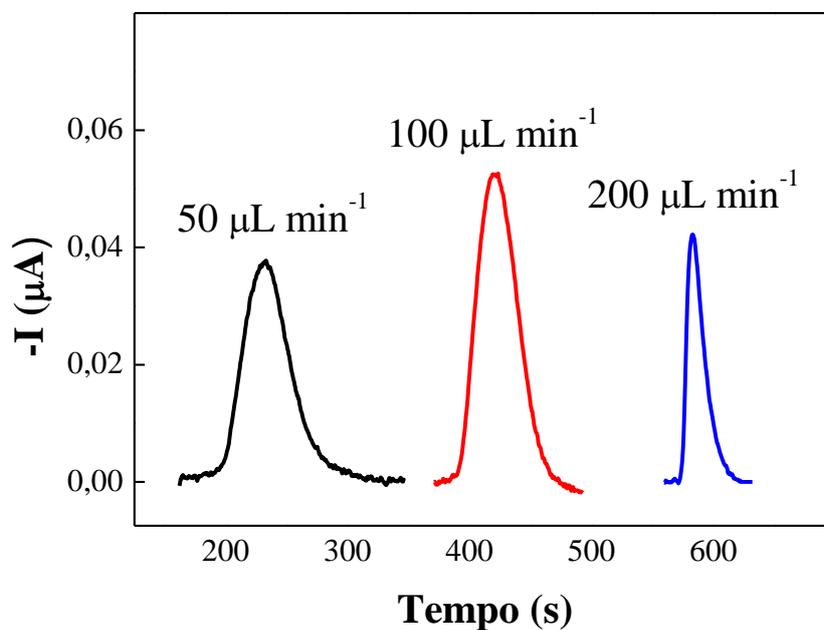


FIGURA 4. 15 - Resposta transiente de corrente em função da vazão para a detecção de p16 utilizando o imunoenensaio proposto. Concentração de p16 de 50 pg mL^{-1} preparada em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10 mmol L^{-1} e H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.3.4 - Curva de calibração para determinação do biomarcador p16

Os estudos para obter a curva de calibração para p16 foram realizados após a otimização dos parâmetros como tempo de captura e vazão do sistema microfluídico. Para isto foram utilizadas soluções padrão de p16 preparadas em soro de bezerro fortificadas nas concentrações de $0,00$; $1,38$; $2,77$; $6,90$; $13,8$; e $27,7 \text{ fg mL}^{-1}$.

A Figura 4.16(A) apresenta a variação de resposta de corrente obtidas em função da variação de concentração de p16 aplicando o imunoenensaio desenvolvido. Pode-se observar na Figura 4.16(B) que a corrente catódica aumentou linearmente com o logaritmo da concentração de p16. A equação da

reta obtida foi de $I(A) = 1,93 \times 10^{-7} + 1,16 \times 10^{-8} \log[p16]$ com coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,997, limite de detecção de $0,04 \text{ fg mL}^{-1}$ e sensibilidade de $11,6 \text{ nA}(\text{fg/mL})^{-1}$ (Figura 4.16(B)). O limite de detecção foi determinado como três vezes o desvio padrão das correntes obtidas da análise de 10 brancos dividido pela sensibilidade, dadas pelo coeficiente angular da equação da reta. O alto valor do branco observado na Figura 4.16(A) pode estar associado com a tendência de as PM adsorverem sobre o eletrodo, conduzindo assim altas correntes de fundo.

A repetibilidade para o arranjo de imunossensores desenvolvidos foi avaliada por medidas de detecção de p16 em solução padrão preparada em meio de soro de bezerro. As medidas foram realizadas com os imunossensores de um mesmo dispositivo microfluídico descartável e entre diferentes dispositivos. As medidas realizadas em triplicatas utilizando diferentes dispositivos microfluídicos apresentaram RSD de 4,6 e 4,5% entre eletrodos de um mesmo arranjo.

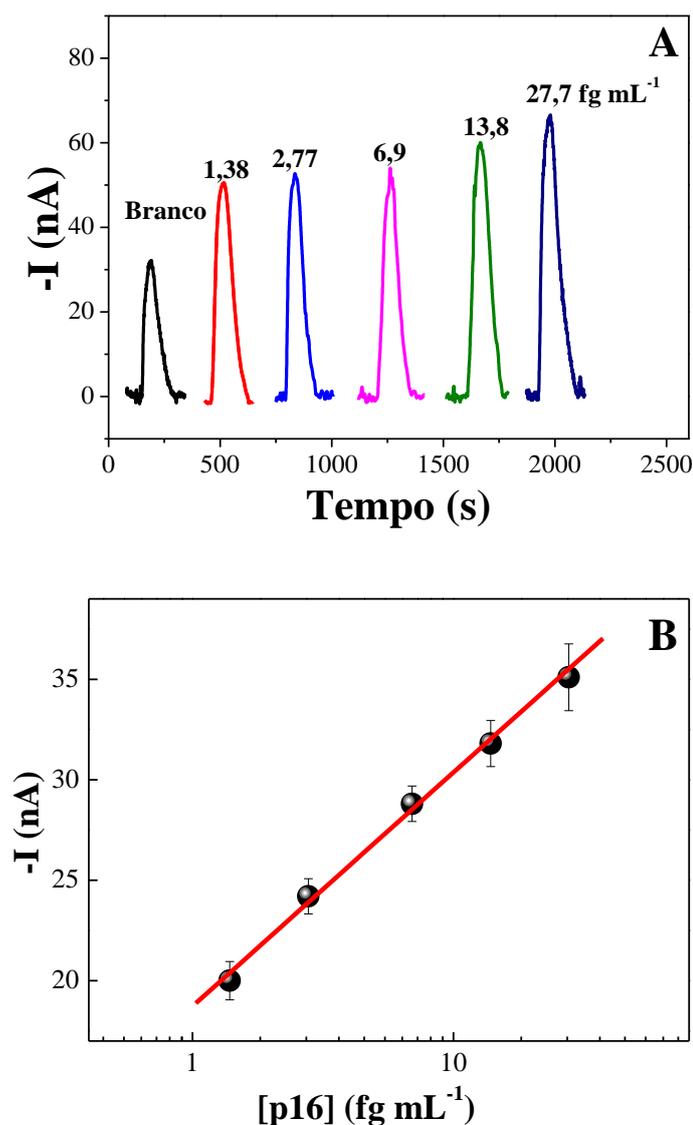


FIGURA 4. 16- (A) Respostas amperométricas obtidas na detecção de p16 em soro de bezerro a $-0,2$ V vs. Ag|AgCl desenvolvido pela injeção de uma mistura de $10,0$ mmol L⁻¹ HQ e $1,0$ mmol L⁻¹ H₂O₂ e (B) curva de calibração para o p16.

O desempenho do dispositivo descartável desenvolvido foi comparado com métodos previamente relatados para a detecção de p16, como pode ser visto na Tabela 4.1.

A grande maioria dos imunossensores desenvolvidos encontrados na literatura utilizando o biomarcador p16 em sua forma proteica ou peptídica são associados ao diagnóstico do câncer cervical.

Duangkaew *et al.*¹⁵² relataram um imunossensor eletroquímico sensível para detecção específica de p16 utilizando imunorreações na configuração sanduíche com estratégia dupla de amplificação de sinal (AuNP e AgNP, 15 nm de diâmetro) conjugadas com anticorpos de detecção (Ab₂). Além disso, SPEs foram modificados com anticorpos de captura (Ab₁) o que forneceu uma sensibilidade de $1,78 \mu\text{A mL} (\text{ng GST-p16})^{-1} \text{ cm}^{-2}$ e limite de detecção de 1,3 ng mL⁻¹ para proteína GST-p16. O alto limite de detecção pode estar associado na incapacidade das NPs com diâmetro de 15 nm de carregar abundância de Ab₂, o que leva à diminuição da atividade catalítica em direção a redução de H₂O₂. Além disso, o imunossensor foi aplicado em *swab* assim como o Papanicolau o que o torna mais invasivo quando comparado ao nosso método que utiliza um pequeno volume de sangue como amostra (1 μL).

Wang *et al.*¹⁵³ reportaram um biossensor ECL baseado em nanofibras funcionais que foi desenvolvida para a detecção de anti-oncogene CdkN2A/p16 através de nanopartículas luminescentes para amplificação de sinal. O eletrodo PA6-MWCNTs-SiO₂ com nanoestrutura 3D, grande área superficial específica e boa biocompatibilidade (amino-funcionalizado) com a combinação de nanofibras funcionais e nanopartículas compostas de material luminescentes core-shell pode resultar em uma enorme amplificação do sinal e, assim, fez com que o biossensor ECL alcançasse uma sensibilidade elevada. O biossensor exibiu ampla faixa linear, alta sensibilidade e boa estabilidade. O ensaio permite um limite de detecção tão baixo quanto 0,5 fmol L⁻¹ de anti-oncogene CdkN2A/p16, que é comparável ou melhor do que nos ensaios anti-oncogene relatados. Como desvantagem frente ao imunossensor desenvolvido nesta tese, temos a utilização etapas de hibridização adicional que são altamente dependentes da temperatura o

Um imunossensor para a detecção de p16INK4a utilizando um sistema de microbalança de *quartzo* foi desenvolvido por Yang *et al.*¹⁵⁴ Um anticorpo policlonal contra p16INK4a foi ligado na superfície do cristal piezoelétrico em uma orientação ordenada utilizando proteína A. Os

sobrenadantes de diferentes amostras clínicas, incluindo várias lesões cervicais, contendo diferentes concentrações de p16INK4a foram usadas para teste. Sob as condições otimizadas, os desvios de frequência foram linearmente dependentes da concentração de antígeno na faixa de 50-1200 ng mL⁻¹. O dispositivo mostrou um tempo de análise curto semelhante ao imunossensor proposto nesta tese para p16 (menos de 30 min). Como vantagem, os sensores podem ser reutilizados seis vezes sem perda detectável de atividade.

TABELA 4. 2 - Parâmetros analíticos para detecção de p16 por diferentes metodologias.

Eletrodo	Técnica	Faixa Linear	LoD	Ref.
SPE/NTC/quitosana AuNP/AgNP	LSV	0,016 a 0,25 µg mL ⁻¹	1,3 ng mL ⁻¹	Duangkaew <i>et al.</i> ¹⁵²
GCE/ PA6-MWCNTs- SiO ₂	ECL	1,0 a 1000,0 fmol L ⁻¹	0,5 fmol L ⁻¹	Wang <i>et al.</i> ¹⁵³ .
Cristal piezoelétrico	QCM	50-1200 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	Yang <i>et al.</i> ¹⁵⁴
SPE/AuNP	AMP	1,38 a 27,7 fg mL ⁻¹	0,04 fg mL ⁻¹	Este Trabalho

QCM: Quartz crystal microbalance (Microbalanço de cristal de quartzo); LSV: *Linear Sweep Voltametry* (Voltametria de Varredura Linear); AMP: Amperometria, ECL: Eletroquimioluminescência.

4.3.5 - Aplicação do imunossensor em amostras de pacientes

O imunossensor desenvolvido foi aplicado em amostras reais fornecidas pelo Hospital de Amor da cidade de Barretos, contendo amostras de pacientes com câncer de próstata e pacientes considerados controles negativos (ausência de câncer de próstata) e comparados com o método ELISA.

O teste *t-student* pareado foi aplicado e o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o $t_{\text{critico}(6;95\%)}(2,44)$, demonstrando que os métodos não apresentaram diferença estatística significativa ao nível de confiança de 95%. Portanto, os valores de concentrações obtidos para o imunossensor apresentaram boa concordância com os valores de concentração obtidos pelo método ELISA.

As concentrações das amostras variaram de $0,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os controles negativos a $2,17 \mu\text{g mL}^{-1}$ para indivíduos doentes (Figura 4.17).

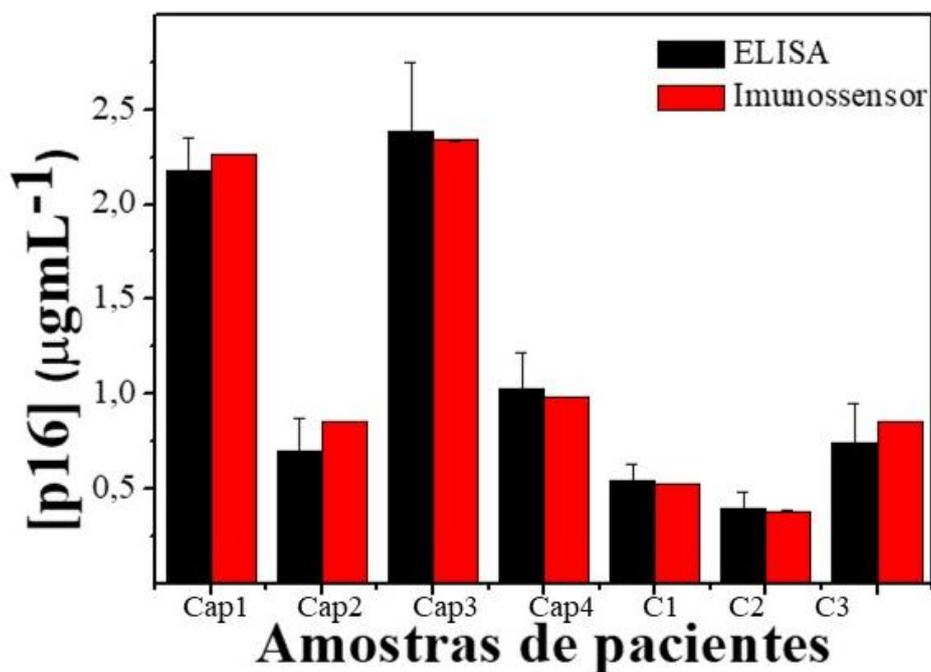


FIGURA 4.17 - Determinação de p16 em pacientes com câncer de próstata usando os imunossensores propostos e o método ELISA.

4.4 – CONCLUSÕES

Nós desenvolvemos com sucesso um imunossensor amperométrico microfluídico para a detecção de p16 usando uma base de matriz imunológica descartável com uso de partículas magnéticas massivamente decoradas que permitiram amplificar o sinal eletroquímico. A aplicação destas PM na captura e separação de p16 e a detecção empregando imunoensaio eletroquímico em dispositivos microfluídicos descartáveis apresentaram excelente linearidade, repetibilidade e baixo limite de detecção em excelente concordância com processamento de dados e método padrão ELISA. O método proposto envolveu o uso de material de baixo custo permitindo a detecção do biomarcador de forma simples apresentando-se como uma alternativa rápida e de baixo custo para auxiliar no diagnóstico do câncer de próstata. Além disso, o imunossensor proposto pode ser facilmente construído na configuração multiplexada com o PSA e/ou combinado com outras proteínas, a fim de melhorar a precisão dos resultados.

**Capítulo 5 - Detecção eletroquímica
multiplexada da Glutathiona-S-
Transferase p1 (GSTP1) e
antígeno específico da próstata
(PSA) em amostras de paciente
com câncer de próstata**

5 - DETECÇÃO ELETROQUÍMICA MULTIPLEXADA DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE P1 (GSTP1) E ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) EM AMOSTRAS DE PACIENTE COM CÂNCER DE PRÓSTATA

Neste capítulo será descrito o desenvolvimento de imunoenaios utilizando o arranjo de 8 eletrodos de trabalho de carbono para a detecção multiplexada dos biomarcadores GSTP1 e PSA. A GSTP1 apresenta sensibilidade de 42,3% e sua especificidade é de 92,9% para o diagnóstico de câncer de próstata, em comparação com PSA que possui parâmetros iguais a, respectivamente, 89,9% e 35,7%⁴⁸. Logo, a alta especificidade da GSTP1 em comparação com o PSA pode ser uma vantagem interessante para o diagnóstico do câncer de próstata, aumentando a chance de diagnóstico precoce, e de diminuição no número de falsos positivos e falsos negativos, o que pode levar a um aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes.

5.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver imunoenensaio eletroquímico para a detecção multiplexada dos biomarcadores GSTP1 e PSA. Para isso, foram necessários:

- ✓ Modificar o arranjo de eletrodos com anticorpos específicos monoclonais (anti-PSA e anti-GSTP1);
- ✓ Preparar bioconjugados com PMs utilizando anticorpos policlonais e enzima HRP (HRP-PM-anti-PSA e HRP-PM-anti-GSTP1);
- ✓ Otimizar parâmetros experimentais como tempo de incubação e vazão do sistema microfluídico para os imunoenaios desenvolvidos;
- ✓ Obter as curvas de calibração para os biomarcadores;
- ✓ Aplicar os imunossensores em amostras de pacientes cedidas pelo Hospital de Amor da cidade de Barretos/SP;
- ✓ Realizar a quantificação do biomarcador via ELISA como método comparativo.

5.2 - PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1- Reagentes

Anticorpos primários e secundário Anti-PSA e anti-GSTP1 e suas respectivas proteínas foram comprados da empresa Abcam e o kit ELISA GSTP1 (Sandwich ELISA) (Custom) foi adquirido da Sellex. Os demais reagentes utilizados foram citados na seção 4.2.1 no **CAPÍTULO 4**.

5.2.2 - *Fabricação e modificação química do arranjo de eletrodos SPE e avaliação da resposta do imunoenensaio para a detecção dos biomarcadores proposto*

Os eletrodos de trabalho foram fabricados e modificados como supracitado no **CAPÍTULO 3** (item 4.2.5) com algumas modificações. Para a

detecção multiplexada dos biomarcadores os quatro primeiros eletrodos foram imobilizados com anticorpo anti-PSA (Ab1-PSA) e os demais com anticorpo anti-PSA (Ab1-GSTP1) (Figura 5.1).

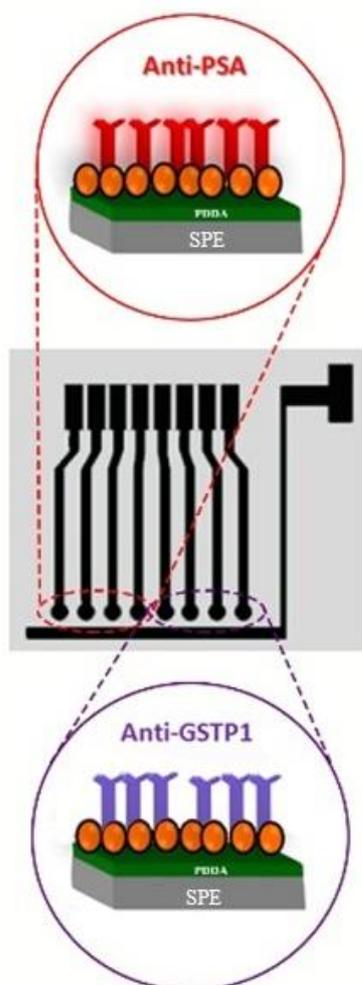


FIGURA 5.1 - Modificação dos eletrodos de trabalho para a detecção multiplexada dos biomarcadores PSA e GSTP1.

Para a realização das etapas de imuno-captura e magneto-separação dos biomarcadores na solução da amostra foram utilizados dois bioconjugados baseados em Ab2-PM-HRP, sendo utilizados anticorpos anti-PSA para a captura de PSA (Ab2-PSA) e anticorpos anti-GSTP1 para a captura de GSTP1 (Ab2-GSTP1). Uma solução de soro de vitelo comercial foi fortificada com quantidades conhecidas dos biomarcadores e utilizadas como soluções padrão. Assim, 10 μ L do complexo Ab2-PSA-PM-HRP e 10 μ L de Ab2-GSTP1-PM-HRP foram

adicionados em um microtubo de 2,5 mL e, em seguida, foram adicionados 320 μ L de tampão (pH 7,4) e 20 μ L da solução padrão contendo o biomarcador de acordo com a concentração de interesse a fim de obter a curva de calibração. A solução foi agitada em vórtex e colocada em agitador rotatório à 37°C durante 30 min.

Após a captura dos biomarcadores e formação dos bioconjugados HRP-PM-Ab2-biomarcador, o sobrenadante contendo a amostra foi descartado e realizou-se a lavagem com PBS contendo 2% de BSA, pH 7,4. A etapa de lavagem foi repetida três vezes. O sobrenadante foi descartado e o complexo HRP-PM-Ab2-biomarcador foi ressuspensionado em 125 μ L de PBS-TW-20 e BSA 2% (pH 7,4).

5.3 – RESULTADOS

5.3.1- Otimização das variáveis experimentais para o desenvolvimento do imunossensor para detecção do GSTP1

Os parâmetros avaliados para o arranjo microfluídico para GSTP1 foram tempo de incubação da proteína GSTP1 e vazão. Para esse estudo, os eletrodos de trabalho foram previamente modificados com anticorpos monoclonais GSTP1. Em seguida, 20 μ L do biomarcador preparado em soro de bezerro foi adicionado à 20 μ L do bioconjugado HRP-PM-Ab2(GSTP1) e 320 μ L de PBS mantidos sob agitação lenta por 30 min. O bioconjugado foi separado magneticamente e lavado 3 vezes com PBS contendo 2% BSA a (pH 7,4) e ressuspensão em 200 μ L de PBS-Tween-20 contendo 2% BSA.

O tempo de incubação da proteína alvo com anticorpos de captura para formar o complexo GSTP1-Ab2-PM-HRP é de suma importância, pois esse parâmetro pode impactar diretamente no tempo do imunoenensaio e na máxima formação desses imunocomplexos. Os intervalos de tempo investigados foram de 10, 20, 30, 40 e 60 min, mantendo a concentração da proteína em 50 μ g mL⁻¹. A

resposta de corrente foi monitorada durante o processo de injeção de uma solução contendo H_2O_2 10 mmol L^{-1} e HQ 1 mmol L^{-1} no sistema microfluídico preparado em PBS-TW20 pH 6,5. Após a estabilização do sinal de corrente, uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ da solução desaerada de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$, os valores de corrente obtidos nas medidas foram registrados em função do tempo de incubação e são apresentados na Figura 5.2.

Conforme observado na Figura 5.2, o aumento no tempo de incubação proporcionou um aumento na intensidade das correntes de pico catódico. O aumento foi significativo até 30 minutos e houve saturação para tempos de incubação superiores. Isto implica que a saturação dos sítios de ligação de anti-GSTP1 presentes na superfície das partículas magnéticas foi quase que plenamente alcançado com tempo de 30 minutos, sendo este o tempo escolhido para a captura da proteína.

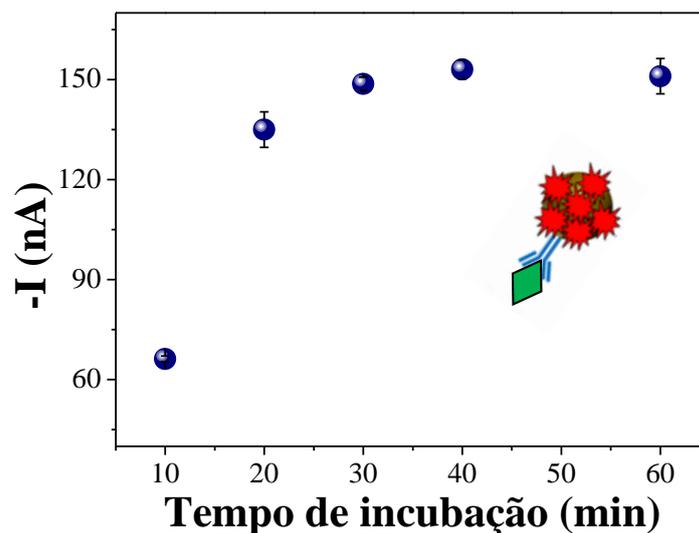


FIGURA 5.2 - Otimização do tempo de incubação para a detecção de GSTP1 utilizando o imunensaio desenvolvido. Concentração de GSTP1 de 50 pg mL^{-1} ($n \geq 4$).

Outro parâmetro investigado para o desenvolvimento do imunensaio foi a influência da vazão na resposta de corrente amperométrica no

sistema microfluídico. As vazões estudadas foram de 50, 100 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ e os resultados foram apresentados na Figura 5.3. A resposta de corrente foi monitorada durante o processo de injeção de uma solução contendo H_2O_2 10 mmol L^{-1} e HQ 1 mmol L^{-1} no sistema microfluídico preparado em PBS-TW20 pH 6,5.

Como pode-se observar, o GSTP1 apresentou um comportamento semelhante ao obtido no estudo de vazão realizado para o biomarcador p16. Desta forma, utilizando a vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ foram obtidas correntes de maior intensidade, cerca de 25% e 16% maiores que as vazões de 50 e 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ respectivamente. Além disso, o perfil do pico de corrente obtido para cada vazão também foi avaliado neste estudo. Em menor vazão da solução de detecção (50 $\mu\text{L min}^{-1}$) ocorreu um alargamento do pico devido à geração mais lenta da espécie benzoquinona. Para a vazão de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ obteve-se um pico estreito e de menor intensidade em relação a vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. A maior vazão da solução de detecção fez com que não houvesse tempo suficiente para a conversão de espécies de hidroquinona em benzoquinona em larga escala sobre o eletrodo. Dentre os valores de vazões estudados, 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ forneceu a melhor relação entre intensidade e definição de pico, sendo está, portanto, selecionada para ser utilizada nos estudos posteriores.

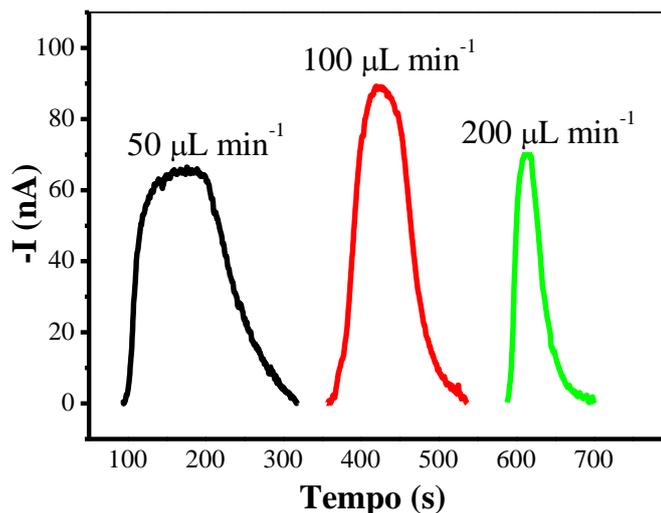


FIGURA 5.3- Resposta transiente de corrente em função da vazão para a detecção de GSTP1 utilizando o imunoensaio proposto. Concentração GSTP1 de 50 pg mL^{-1} preparada em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10 mmol L^{-1} e H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Na inserção encontra-se o gráfico de barras referente a média das correntes de pico obtida para cada vazão estudada ($n \geq 4$).

5.3.2 - Detecção multiplexada de PSA e GSTP1 em soro de bezerro fortificado utilizando o imunoensaios desenvolvido

As curvas de calibração multiplexada para os biomarcadores GSTP1 e PSA foram construídas usando o imunoensaio do tipo sanduíche desenvolvido e soluções padrão com ambos biomarcadores preparadas em soro de bezerro. Para a detecção multiplexada, após as etapas de captura e separação realizadas utilizando ambas PMs modificadas para os dois bioconjugados, estas foram injetadas no canal microfluídico, seguido da etapa de detecção amperométrica. A resposta de corrente foi monitorada durante o processo de injeção de uma solução contendo H_2O_2 10 mmol L^{-1} e HQ 1 mmol L^{-1} no sistema microfluídico preparado em PBS-TW20 pH 6,5. Os sinais transientes obtidos estão apresentados na Figura 5.4A e B). Como pode ser observado, as correntes de pico aumentaram linearmente com a concentração de GSTP1 de $0,7$ a $41,7 \text{ fg mL}^{-1}$ ($I(A) = 3,49 \times 10^{-7} + 2,24 \times 10^{-8} \log[\text{GSTP1}]$), e a concentração de PSA de $1,7$ a 277 fg mL^{-1} ($I(A) =$

$3,45 \times 10^{-7} + 2,24 \times 10^{-8} \log([\text{PSA}])$. O coeficiente de correlação foi de 0,974 para o GSTP1 e de 0,986 para o PSA. As sensibilidades alcançadas para GSTP1 e PSA foram obtidas por meio das inclinações das curvas de calibração (Figura 5.4B e D), sendo de $22,4 \text{ nA}(\text{fg/mL})^{-1}$ para ambos biomarcadores. O LoD foi determinado como três vezes o desvio padrão das correntes obtidas da análise de 10 brancos dividido pela sensibilidade (coeficiente angular da equação da reta) foi de $0,15 \text{ fg mL}^{-1}$ para o GSTP1 e $0,16 \text{ fg mL}^{-1}$ para o PSA.

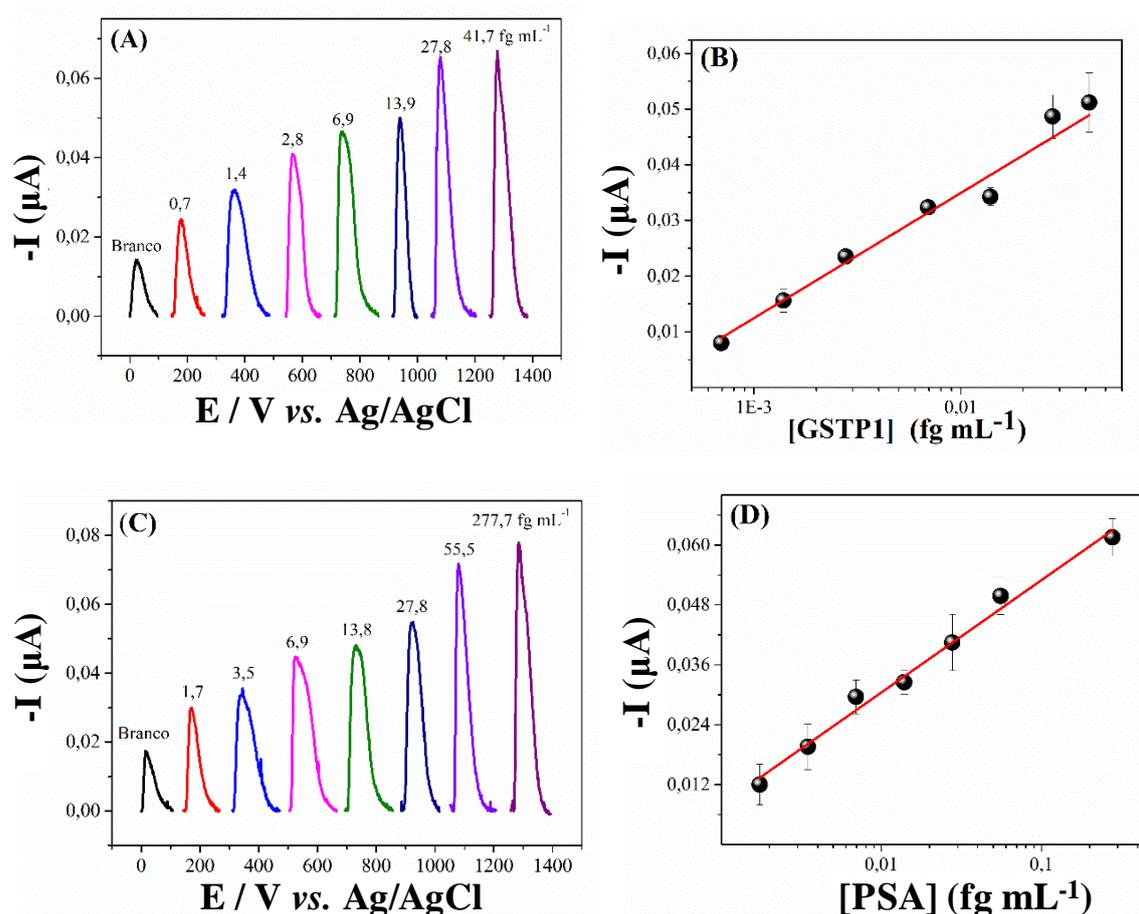


FIGURA 5.4 - Resposta transiente de corrente em função da vazão para a detecção de GSTP1 utilizando o imunoenensaio proposto. Concentração GSTP1 de 50 pg mL^{-1} preparada em soro de bezerro. Solução de detecção: hidroquinona 10 mmol L^{-1} e H_2O_2 $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Na inserção encontra-se o gráfico de barras referente a média das correntes de pico obtida para cada vazão estudada ($n \geq 4$).

Os LoDs obtidos são menores do os reportados na literatura para estes biomarcadores. Porém, poucos trabalhos são relatados na literatura referentes a detecção de GSTP1 na sua forma proteica. Topkaya *et al.*¹⁵⁵ desenvolveram um genossensor eletroquímico livre de marcadores para a detecção da hipermetilação do DNA referente ao gene de GSTP1 em amostras contendo DNA amplificado via cadeia da polimerase via transcriptase reversa (PCR) e usando eletrodos de grafite. Os autores obtiveram um limite de detecção de 2,92 pmol em 100 mL de volume de reação. Neste caso, além da necessidade de promover a separação e amplificação do DNA via PCR são necessárias etapas de aquecimento para a desnaturação das fitas de DNA o que requer maior complexidade na detecção.

Para o PSA, muitos trabalhos foram desenvolvidos na literatura vinculados ao desenvolvimento de dispositivos sensíveis para essa proteína^{141, 156-161}. O desempenho do dispositivo descartável desenvolvido foi comparado com métodos previamente relatados para a detecção de PSA, como pode ser visto na Tabela 5.1.

Mani *et al.*¹⁴⁴ desenvolveram uma plataforma de nanopartículas de ouro densamente compactada combinada com uma detecção por meio de bioconjugado de partículas magnéticas e múltiplas enzimas para detectar o PSA em soro. O procedimento utilizado para fabricação dos imunossensores foram semelhantes com exceção a utilização de grafite pirolítico como substrato que foram modificados com bicamadas de PDDA e AuNPs. A sensibilidade foi amplificada pelo bioconjugados magnéticos contendo 7500 HRP juntamente com anticorpos de detecção (Ab₂) ligados. Esses sensores apresentaram sensibilidade de 31,5 $\mu\text{A mL ng}^{-1}$ e limite de detecção de 0,5 pg mL^{-1} para o PSA.

Outra abordagem interessante foi apresentada por Koukouvinos¹⁶⁰ e colaboradores. Os autores fabricaram um imunossensor livre de marcação com folhas de grafeno decoradas com AuNPs preparados por pirólise. Um LoD de 0,59 ng mL^{-1} e uma faixa linear de 0-10 ng mL^{-1} foram alcançados. O bom desempenho

do imunossensor foi associado ao efeito sinérgico de grafeno e Au que favoreceram uma rápida transferência de elétrons. Estudo de seletividade foram realizados provaram ser seletivos para interferentes como alfa-fetoproteína, glicose, ácido úrico, albumina de soro bovino e vitamina C.

Kavosi¹⁵⁸ e colaboradores relataram o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímicos baseados em nanocompósitos para a detecção de PSA. Anticorpo PSA, HRP e tionina foram ligados covalentemente com AuNPs/PAMAM e a superfície do eletrodo de carbono foram modificadas com MWCNTs/IL/Quitosana como uma promissora plataforma de transdução. O imunoensaio foi estabelecido colocando-se o antígeno entre o anti-PSA e o secundário anticorpo (anti-PSA marcado com HRP) e corrente de pico catalítico de tionina para H₂O₂ na presença de HRP foi usado como sinal analítico. Sob condições otimizadas, o limite de detecção foi de 1 pg mL⁻¹ na faixa de concentração de até 80 ng mL⁻¹, usando DPV como técnica de medição. Além disso, devido ao aumento da capacidade de imobilização de anti-PSA na presença de AuNPs-PAMAM, a técnica de impedância foi utilizada como método analítico com limite de detecção de 0,5 ng mL⁻¹ na faixa de concentração acima a 25 ng mL⁻¹. A melhora da sensibilidade do imunoensaio foi devido ao aumento de moléculas anti-PSA ligadas covalentemente e aumento da atividade eletrocatalítica de sistema de tionina/HRP para o sinal de redução de H₂O₂ na presença de AuNPs.

TABELA 5. 1 - Parâmetros analíticos para detecção de PSA por diferentes metodologias.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear	LoD	Ref.
G/AuNPs	AMP	4,0 – 5,0 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹	Mani <i>et al.</i> ¹⁴⁴
GO/AuNPs	DPV	1,0 – 20,0 ng mL ⁻¹	0,24 fg mL ⁻¹	Pal <i>et al.</i> ¹¹³
Grafeno/GC	ECL	1,0×10 ⁻² – 8,0 ng mL ⁻¹	80 ng mL ⁻¹	Shoujiang <i>et al.</i> ¹⁶²
CV/MWCNT/ Chit/ AuNP– PAMAM	DPV	1,0×10 ⁻³ – 80 ng mL ⁻¹	10 fg mL ⁻¹	Kavosi <i>et al.</i> ¹⁵⁸
PSA/AuNP/ SPE	AMP	1,73 – 277 fg mL ⁻¹	0,12 fg mL ⁻¹	Este trabalho

DPV: *Differential pulse Voltametry* (Voltametria de pulso diferencial); ECL: Eletroquimioluminescência; AMP: Amperometria.

5.3.3 - Aplicação do imunoensaio desenvolvido em amostras reais de soro de pacientes

Para avaliar a aplicabilidade do magneto-imunoensaio proposto foram avaliadas cinco amostras de pacientes fornecidas pelo Hospital de Amor de Barretos/SP. As amostras foram avaliadas tanto pelo método proposto quanto por ELISA para o GSTP1. Já o PSA foi analisado pelo método proposto e pela técnica de eletroquimioluminescência (ECL), a qual foi realizada pelo Hospital de Amor utilizando o equipamento de grande porte COBAS da Roche. Na Figura 5.5 são apresentados os resultados obtidos com os diferentes métodos.

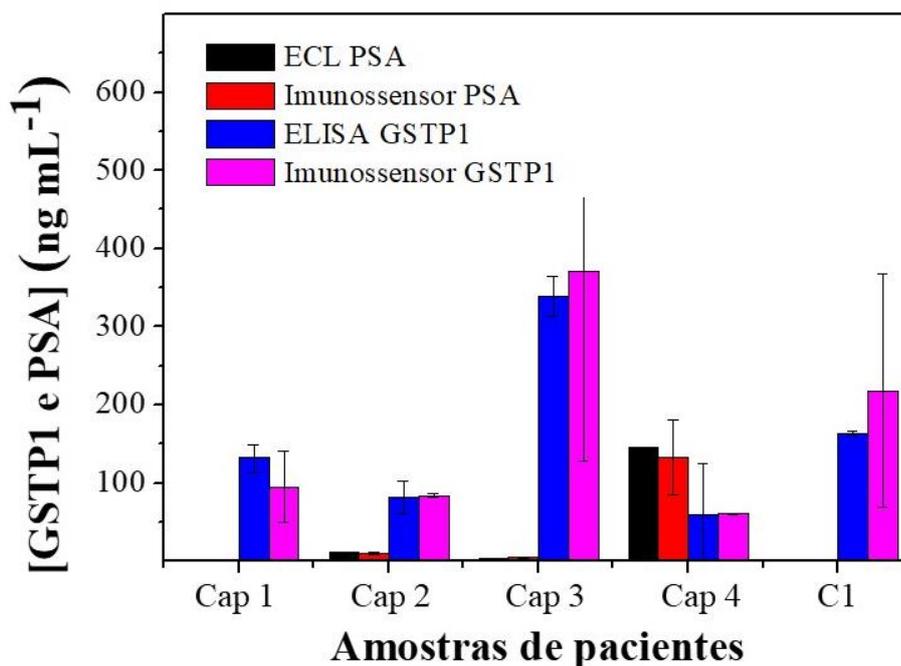


FIGURA 5.5 - Comparação dos resultados obtidos para detecção dos biomarcadores PSA e GSTP1 em soro de paciente utilizando o imunoenensaio desenvolvido, ELISA para GSTP1 e o ensaio de ECL para o PSA ($n \geq 4$).

Como podemos observar, o magneto-imunoenensaio desenvolvido apresentou excelente concordância com os métodos ELISA e de ECL para o GSTP1 e o PSA, respectivamente. O teste *t-student* pareado foi aplicado e o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o $t_{\text{crítico}(4;95\%)}$ (2,77), demonstrando que os resultados não apresentaram diferença estatística significativa entre o método desenvolvido e os métodos ECL e ELISA ao nível de confiança de 95%. Os resultados também indicam que não houve reação intercruzada entre os biomarcadores indicando a viabilidade do método desenvolvido para a detecção simultânea de mais do que um biomarcador de forma simples com baixo custo e com pequeno consumo de amostra.

A repetibilidade para o arranjo de imunossensores desenvolvidos foi avaliada por medidas de detecção de PSA e GSTP1 em solução padrão preparada em meio de soro de bezerro. As medidas foram realizadas com os imunossensores de um mesmo dispositivo microfluídico descartável e entre diferentes

dispositivos. As medidas realizadas em triplicatas utilizando diferentes dispositivos microfluídicos apresentaram RSD de 9% para o biomarcador GSTP1 e 8% para o biomarcador PSA. As medidas para um mesmo dispositivo apresentaram RSD de 5% para o biomarcador GSTP1 e 6% para o biomarcador PSA.

5.4 - CONCLUSÕES

Neste estudo, o imunoensaio multiplexado desenvolvido permitiu a detecção simultaneamente dos biomarcadores GSTP1 e PSA em soro de paciente com boa precisão, a qual pode ser confirmada pela comparação com métodos estabelecidos como ELISA e ECL. Sob condições otimizadas foram obtidas respostas lineares entre 0,7 a 41,7 fg mL⁻¹ e entre 1,7 a 277 fg mL⁻¹ para GSTP1 e PSA, respectivamente, com excelentes limites de detecção de 0,15 fg mL⁻¹ para o GSTP1 e 0,16 fg mL⁻¹ para o PSA. O método proposto por requerer um pequeno volume de amostra, 1,0 µL, apresenta-se como uma alternativa pouco invasiva uma vez que pode ser realizada em uma gota de sangue. O magneto-imunoensaio desenvolvido apresenta-se como uma alternativa simples e de baixo custo para a detecção de um painel de proteínas, que podem vir a melhorar significativamente a precisão do diagnóstico do câncer.

**CAPÍTULO 6 – Imunoensaio
para a detecção de CYFRA 21-1
utilizando nanopartículas sintetizadas
de $\text{Co}_{0,25}\text{Zn}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e Fe_3O_4 sem a
utilização de enzimas para aplicação
em amostra de paciente com câncer de
próstata**

6 - IMUNOENSAIO PARA A DETECÇÃO DE CYFRA 21-1 UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS DE $\text{Co}_{0,25}\text{Zn}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e Fe_3O_4 SEM A UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA APLICAÇÃO EM AMOSTRA DE PACIENTE COM CÂNCER DE PRÓSTATA

Neste capítulo será apresentado o desenvolvimento de um imunoenensaio para detecção do biomarcador CYFRA-21-1 utilizando nanopartículas magnéticas sintetizadas de $\text{Co}_{0,25}\text{Zn}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e Fe_3O_4 tanto para a captura e separação do analito quanto para a determinação eletroquímica atuando como potencial mimetizadores de enzimas tipo peroxidase.

6.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um novo imunossensor eletroquímico livre de enzimas para a detecção de CYFRA 21-1 em pacientes com câncer de próstata. Para isso foram necessários:

- ✓ Sintetizar nanopartículas magnéticas (MNP) de $\text{Co}_{0,25}\text{Zn}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (CoZnFeNP) e Fe_3O_4 (FeONP) pelo método de co-precipitação;
- ✓ Preparar os bioconjugados de MNPs contendo anticorpos anti-CYFRA-21-1 (MNP-anti-CYFRA-21) utilizando anticorpos policlonais;
- ✓ Sintetizar óxido de grafeno para a imobilização de anticorpos anti-CYFRA-21 sobre a superfície dos eletrodos por ligação covalente via EDC/NHS;
- ✓ Caracterizar as MNPs, o grafeno oxidado e eletrodos com e sem modificação;
- ✓ Calcular o valor das constantes de Michaelis-Menten aparentes para os sistemas com CoZnFeNP e FeONP;
- ✓ Aplicar os imunoenaios em amostras de pacientes cedidas pelo Hospital de Amor de Barretos/SP e comparação entre as MNPs;
- ✓ Realizar a quantificação do biomarcador via ELISA como método comparativo.

6.2 - PARTE EXPERIMENTAL

6.2.1 - Reagentes

O grafeno foi adquirido da Graphene Supermarket (Nova Iorque, EUA) (Tamanho: 2–8 μm e espessura: 3 nm). Proteína Recombinante (His + T7) Humana CYFRA 21-1, Anticorpo Anti-CYFRA 21-1 (Ab_2 -CYFRA 21-1), Anticorpo Anti-KRT19/ CK19/Citoqueratina 19 (Ab_1 CYFRA 21-1) foram adquiridos da Selex. O kit ELISA CYFRA 21-1 humano (Sandwich ELISA) (Custom) foi adquirido da Sellex, Inc. Amostras de soro de pacientes foram fornecidas pelo Hospital de Amor de Barretos sob aprovação do Comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos/SP.

6.2.2- Instrumentação

Medidas de voltametria cíclica e amperometria em fluxo foram realizadas utilizando um multipotenciostato/galvanostato Dropsens Modelo μ StatT8000 (Llnera, Spain). As caracterizações morfológicas foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão usando um microscópio JEM 200cx (JEOL). O método ELISA foi realizado como método comparativo para a determinação de CYFRA-21-1 em amostras de pacientes utilizando um leitor de microplaca de ELISA (Modelo LT4000, Labtec). Medidas de espessura e rugosidade da superfície do eletrodo de trabalho com e sem óxido de grafeno foram realizadas utilizando um microscópio confocal de varredura a *laser*.

6.2.3 - Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas CoZnFeONPs

As nanopartículas de CoZnFeONPs foram sintetizadas utilizando o método de co-precipitação descrito por López *et al.*¹³⁸. A síntese foi realizada na Universidad del Valle em Cali na Colômbia e contou com duas etapas envolvendo a preparação da nanopartículas seguida da estabilização da dispersão utilizando ácido oléico. Na primeira etapa, preparou-se uma solução de hidróxido de sódio 3,0 mol L⁻¹ como co-precipitante e adicionou-a a uma solução contendo 75 mL de cloreto de ferro(III) 0,4 mol L⁻¹, 75 mL de cloreto de cobalto 0,05 mol L⁻¹ e 75 mL de sulfato de zinco 0,1 mol L⁻¹. O hidróxido de sódio foi adicionado gota a gota sob agitação magnética constante até a formação de uma solução castanha escura. Após isso, a dispersão foi aquecida a 80°C e mantida nesta temperatura por 1 h. Em seguida, a solução foi resfriada até à temperatura ambiente e as CoZnFeONPs obtidas foram lavadas com água. A reação relacionada à formação das nanopartículas pode ser descrita como:



Na segunda etapa, para estabilizar a dispersão de CoZnFeONPs, 5 mL de $3,15 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido oléico foi adicionado as MNPs e mantido por 2 h sob aquecimento a 80°C com o pH ajustado para 11. Logo após, as nanopartículas foram lavadas duas vezes com água, etanol e acetona, para remover o excesso de surfactante. A solução foi centrifugada durante 15 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi seco a 100°C por 10 h. Por fim, as CoZnFeONPs foram dispersas em tolueno.

6.2.4 - Síntese de Nanopartículas magnéticas FeONP

As nanopartículas FeONPs foram preparadas seguindo o método de co-precipitação baseado no procedimento descrito por Ferreira *et al.*¹⁶³ com modificações. Resumidamente, uma solução de cloreto de ferro(III) $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ e cloreto de ferro(II) $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada contendo 62,5 mL de água e 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado. Esta foi aquecida e mantida a 60°C durante 30 min. Em seguida, os sais de ferro foram adicionados rapidamente na solução de hidróxido de sódio $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ a qual foi mantida durante 30 min a 60°C sob atmosfera de N_2 . As FeONPs obtidas foram lavadas várias vezes com água para remover o excesso de reagentes. A modificação superficial das FeONPs foi realizada pela adição de citrato de sódio. Para isso, à suspensão de FeONPs foi aquecida a 85°C e adicionou-se citrato de sódio sob agitação constante e mantida por 30 min. As FeONPs modificadas foram lavadas várias vezes com água até atingir pH igual a 7,0. As FeONPs funcionalizadas resultantes foram suspensas em água, mantidas sob atmosfera de N_2 por 30 min e armazenadas a temperatura de 4°C . Antecedendo o uso das mesmas, as MNPs funcionalizadas foram deixadas à temperatura ambiente e sonicadas durante 1 hora.

6.2.5 - Síntese de óxido de grafeno (GO)

Para a preparação do grafeno oxidado, 10 mg de grafeno foram dispersos em 100 mL de uma solução de ácido sulfúrico concentrado: ácido

nítrico (1:1, v/v). Em seguida, a solução reacional foi mantida sob agitação durante 12 h, à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi filtrada e lavada com água até o pH atingir valores em torno de 6,5-7,0. O óxido de grafeno obtido foi seco a 100 °C por 12 h, armazenado em frascos e mantidos em dessecador.

6.2.6 - Imobilização de anticorpo monoclonal anti-CYFRA-21-1 sobre a superfície dos eletrodos de trabalho

A superfície dos eletrodos de trabalho foi modificada com uma bicamada formada pelo polycation PDDA e óxido de grafeno a fim de fornecer grupos carboxílicos à superfície para posterior imobilização covalente com anticorpo anti-CYFRA-21-1. Para isso, 3,0 μL de PDDA 2,0 mg mL^{-1} foram adicionados a cada eletrodo de trabalho do arranjo e mantidos por 20 min. O excesso de PDDA foi removido e 3,0 μL da dispersão de GO (2 mg mL^{-1}), preparado em meio aquoso, foi adicionado e mantido durante a noite à temperatura ambiente. Em seguida, 3 μL de uma solução mista de EDC 0,1 mol L^{-1} e NHS 0,4 mol L^{-1} recém preparada foi adicionada sobre os eletrodos e mantida por 10 min para ativação dos grupos carboxílicos presentes no GO.

Em seguida, 5 μL do anticorpo primário de concentração igual a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi covalentemente imobilizado sobre o eletrodo e mantidos durante a noite (16-18 h). O eletrodo foi lavado com PBS pH 7,4 para remover os anticorpos não ligados. Os eletrodos de trabalho foram incubados com albumina de soro bovino 2% preparadas em PBS e mantidos durante 1 h à temperatura ambiente para bloquear os sítios ativos não reativos e evitar ligações não específicas. Por final, os eletrodos foram armazenados em temperatura igual a 4 °C.

6.2.7 - Bioconjugação das nanopartículas magnéticas com anticorpo policlonal contra CYFRA 21-1

As nanopartículas FeONPs e CoZnFeONPs sintetizadas foram decoradas com anticorpo policlonal por meio da reação covalente entre o grupo

carboxílico proveniente das MNPs e o grupo amina do anticorpo secundário CYFRA 21-1 (Ab2) utilizando a solução mista de EDC/NHS (preparada no momento do uso). Para isso, um volume da dispersão das nanopartículas magnéticas com uma concentração 10 mg mL^{-1} foi transferido para microtubos de 2,0 mL e lavadas três vezes pela adição de hidróxido de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, as nanopartículas foram mantidas sob agitação suave por 10 min utilizando um agitador rotatório. Após isso, as nanopartículas foram separadas utilizando suporte magnético e lavadas utilizando tampão PBS pH 7,4. Posteriormente, os grupos carboxílicos das nanopartículas foram ativados pela adição de 1,0 mL da solução de EDC/NHS $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e mantidos sob agitação lenta por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a lavagem e separação magnética, $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo policlonal CYFRA 21-1 diluído em PBS foi adicionado à dispersão de nanopartículas magnéticas e mantido por 24 h, sob agitação a 6 rpm. Os bioconjugados formados foram separados e lavados três vezes com albumina de soro bovino a 0,1% preparados em PBS (pH 7,4) e 0,05% de monolaurato de polietileno glicol sorbitano (PBS-TW). Em seguida, uma solução de 1,0 mL de glicina ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0) foi adicionada e mantida por 30 min à temperatura ambiente, sob agitação suave. A glicina foi usada para bloquear sítios de ligação livre. Finalmente, após lavagem, o bioconjugado formado pelas nanopartículas magnéticas ligadas ao anticorpo (Ab2-MNP) foram ressuspensas em 250 μL de PBS-TW e mantidos a 4°C até o uso.

6.2.8 -Detecção de CYFRA 21-1 usando o dispositivo de imunoensaio microfluídico descartável

Primeiramente, adicionou-se um volume dos padrões de CYFRA 21-1 preparados em PBS a um microtubo contendo 20 μL de Ab2-MNP o qual foi mantido sob agitação suave durante 30 min a 37°C .

O biomarcador capturado (CYFRA-Ab2-MNP) foi separado magneticamente, lavado três vezes com 400 μL de PBS e BSA a 2% e ressuspensão em 200 μL de PBS-TW+BSA 2%. O complexo CYFRA-Ab2-MNP foi então injetado no dispositivo microfluídico utilizando a válvula de injeção com um loop de amostra de 100 μL . Depois de preenchido o canal microfluídico com a amostra, o fluxo foi interrompido por 30 min. Posteriormente, o fluxo foi reiniciado para a lavagem do dispositivo utilizando PBS, seguido da injeção da solução de detecção composta por 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio preparado em PBS.

A detecção eletroquímica foi realizada por amperometria, aplicando potencial de -0,3 V vs. Ag|AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}) e pela injeção de 100 μL da solução de detecção a uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. Uma curva de calibração foi construída com diferentes concentrações de padrões de CYFRA 21-1.

6.3- RESULTADOS

6.3.1 - Caracterização morfológica e topográfica de Fe_3O_4 (FeONP) e $\text{Co}_{0,25}\text{Zn}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (CoZnFeONP) e superfície do eletrodo

A Figura 6.1 apresenta as imagens obtidas com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da superfície dos eletrodos à base de carbono (Figura 6.1A) e modificado com óxido de grafeno em diferentes ampliações. Como pode ser visto na Figura 6.1B-C, o eletrodo de carbono apresenta estruturas de rugosidade que são tipicamente observadas em eletrodos impressos pela técnica de *screen printing*. Após a modificação com óxido de grafeno (GO), o eletrodo de carbono ficou completamente coberto, apresentando uma estrutura superficial diferente da inicial.

A análise de espectroscopia de dispersão de energia de Raios X (Figura 6.1D) demonstrou a presença de carbono, como esperado em ambos os eletrodos de carbono não modificados (i) e modificados (ii). Já no eletrodo de

carbono modificado com GO, uma grande quantidade de oxigênio pode ser observada, demonstrando a funcionalização bem-sucedida com GO.

As imagens do microscópio eletrônico de transmissão (MET) das FeONPs (Figura 6.1E) e CoZnFeONPs (Figura 6.1F) revelaram que ambos os compostos formam aglomerados com tamanhos no intervalo de 6-12 e 8-20 nm, respectivamente. Os diâmetros médios dos aglomerados (inserções na Figura 6.1 E e F) são 9,0 nm para FeONPs e 14,5 nm para CoZnFeONPs, que foram muito semelhantes aos valores relatados em outros trabalhos na literatura¹⁶⁴.

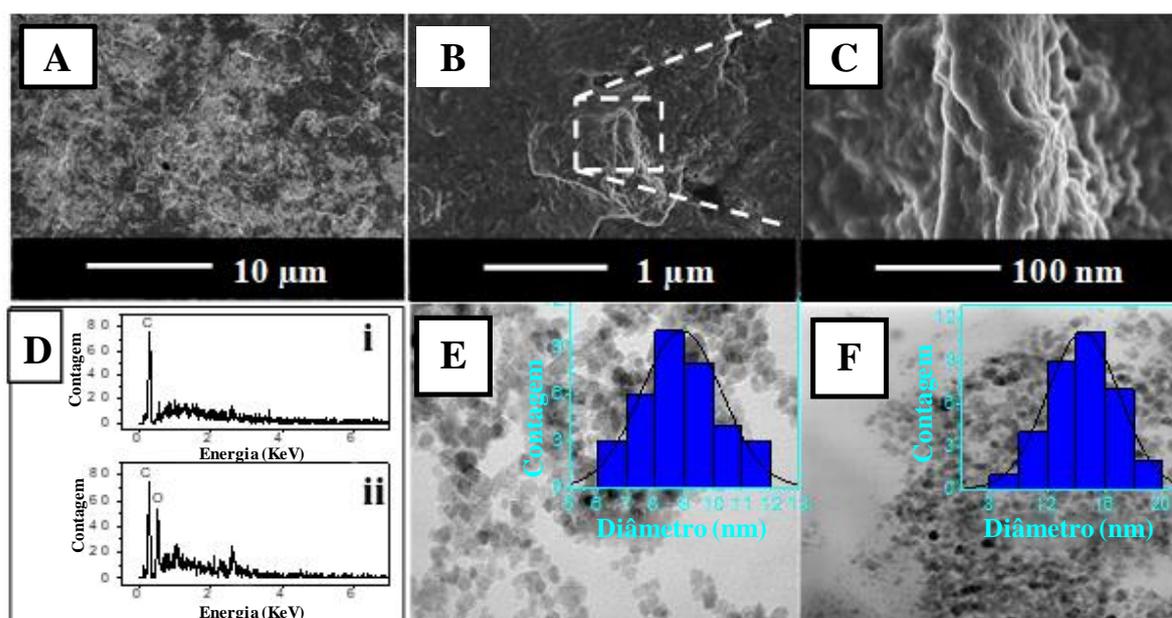


FIGURA 6.1- Imagem MEV da superfície de carbono (A), superfície de carbono modificada GO (BC), análise EDX de SPE (i) e SPE/GO (ii) (D), imagens MET obtidas para Fe₃O₄ (E), Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄ (F) com histogramas (inseridos).

Um microscópio confocal foi utilizado para adquirir imagens topográficas do dispositivo. As estruturas tridimensionais das superfícies do eletrodo na ausência e na presença de GO são mostradas na Figura 6.2. Como pode ser visto, os eletrodos modificados com GO mostraram um aumento na rugosidade da superfície do eletrodo em cerca de duas vezes em comparação com o eletrodo não modificado. A partir dos gráficos de rugosidade valores médios de

rugosidade de $0,24 \mu\text{m}$ para o eletrodo de carbono e $0,47 \mu\text{m}$ para o eletrodo modificado com GO foram calculados. As espessuras dos filmes estimadas para o eletrodo de carbono e carbono modificado com GO foram, respectivamente, de $18,3$ e $23,4 \mu\text{m}$.

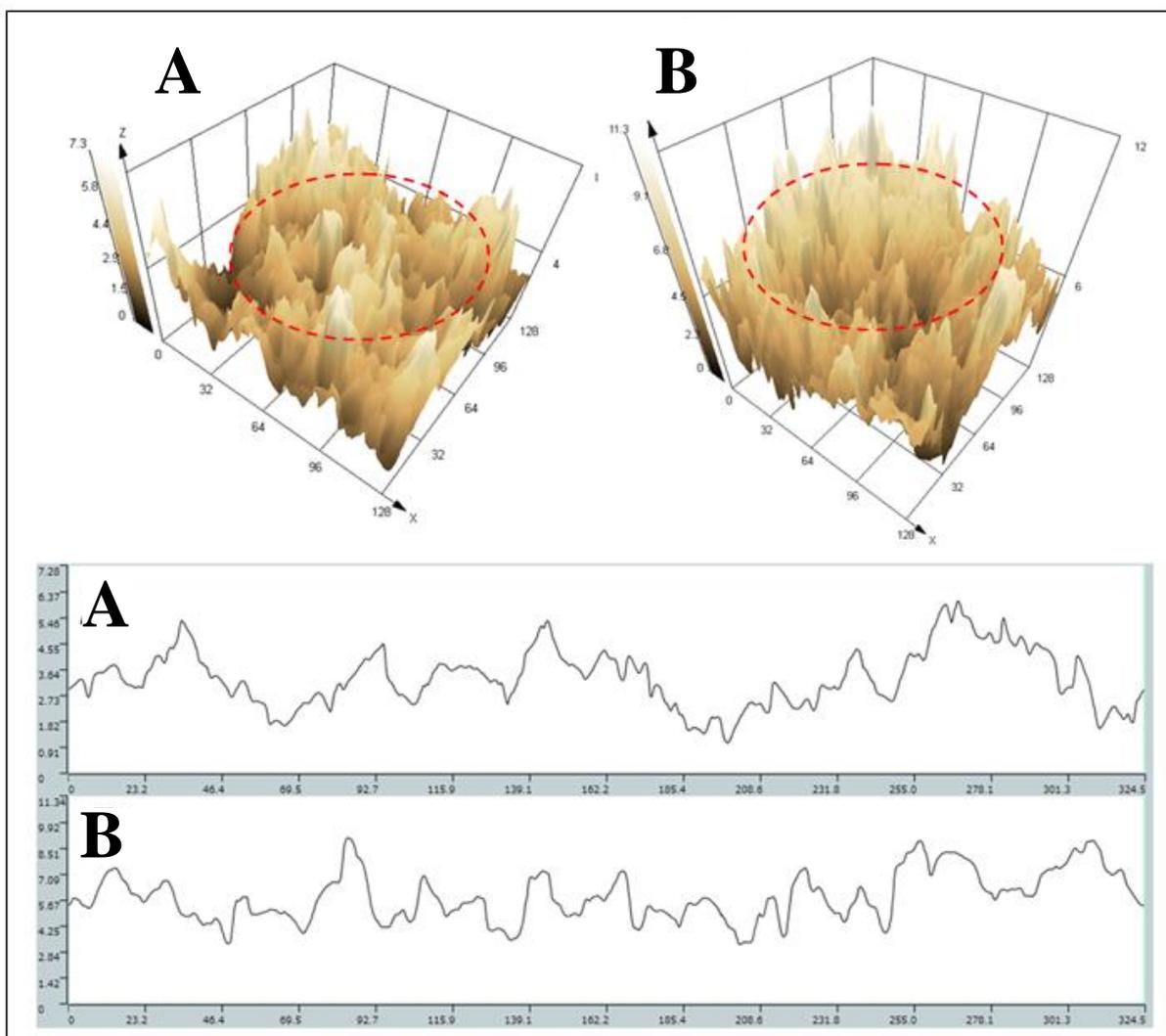


FIGURA 6. 2 - Rugosidade dos eletrodos SPE sem modificação (A) e modificado com GO (B).

6.3.2 - Desempenho eletroquímico dos eletrodos modificados com GO

O efeito da concentração de GO utilizado na modificação do eletrodo descartável de carbono foi investigado utilizando voltametria cíclica. Para isso, os eletrodos foram modificados com dispersões contendo diferentes concentrações

de GO (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg mL⁻¹) preparados em água. Inicialmente, a superfície de carbono negativamente carregada do eletrodo foi modificada com PDDA, a qual foi então seguida pela deposição de 3 µL da dispersão de GO e mantida por 16 h. Após a secagem, o dispositivo microfluídico foi montado como nos trabalhos supracitados (item 4.2.5).

A resposta eletroquímica do eletrodo de carbono modificado com GO foi avaliada em solução contendo 1,0 mmol L⁻¹ de ferroceno monocarboxílico em cloreto de potássio a 0,5 mol L⁻¹, com velocidade de varredura igual a 50 mV s⁻¹. A corrente de pico catódica foi então monitorada em função da concentração do GO. Conforme observado na Figura 6.3, a corrente de pico (I_p) aumentou com o aumento da concentração de GO até 1,5 mg mL⁻¹. Embora, foi observada uma tendência a estabilização. O aumento da concentração de GO ocasionou um incremento do sinal analítico. Porém, para concentrações acima de 1,5 mg mL⁻¹ ocorreu a saturação da corrente. Este comportamento de saturação do sinal pode estar relacionado com o pleno recobrimento da superfície eletródica atingida a partir da concentração de 1,5 mg mL⁻¹. Embora, com a concentração de 2,0 mg mL⁻¹ de GO o eletrodo apresentou valores de corrente similares aos obtidos com 1,5 mg mL⁻¹, mas com um menor desvio padrão. Logo, a concentração de GO igual a 2,0 mg mL⁻¹ foi selecionada para estudos posteriores.

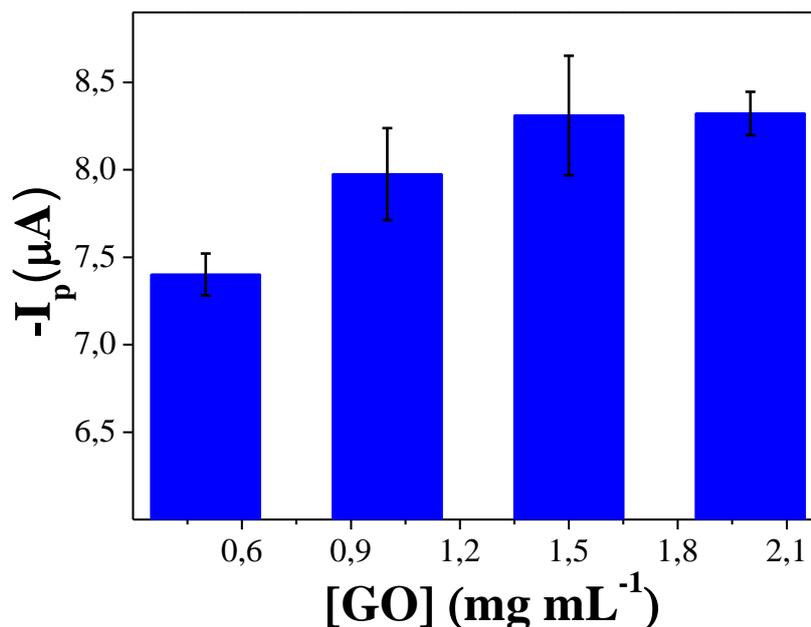


FIGURA 6.3 - Otimização da quantidade de GO utilizado na modificação de eletrodos de carbono (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg mL⁻¹) via técnica de CV em solução contendo ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L⁻¹ em cloreto de potássio 0,5 mol L⁻¹ a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

A área eletroativa dos eletrodos também foi avaliada pelos experimentos de voltametria cíclica em 1,0 mmol L⁻¹ de ácido ferroceno monocarboxílico com 0,5 mmol L⁻¹ de KCl. A Figura 6.4 apresenta os CVs registrados, bem como a variação da densidade de corrente de pico catódico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura (j vs. $v^{1/2}$), obtidos para os eletrodos sem modificação e com GO. A inclinação da curva foi utilizada para estimar a área eletroativa, empregando a equação de Randles-Sevcik¹⁶⁵. As áreas de superfície eletroativas obtidas foram de $(9,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ cm² para o eletrodo de carbono sem modificação e $(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ cm² para o eletrodo modificado com GO. A modificação com GO resultou em um aumento de 2,1 vezes na área eletroativa, o que pode ser explicado tanto pelo aumento de área superficial do eletrodo modificado com GO quanto pela maior presença de material.

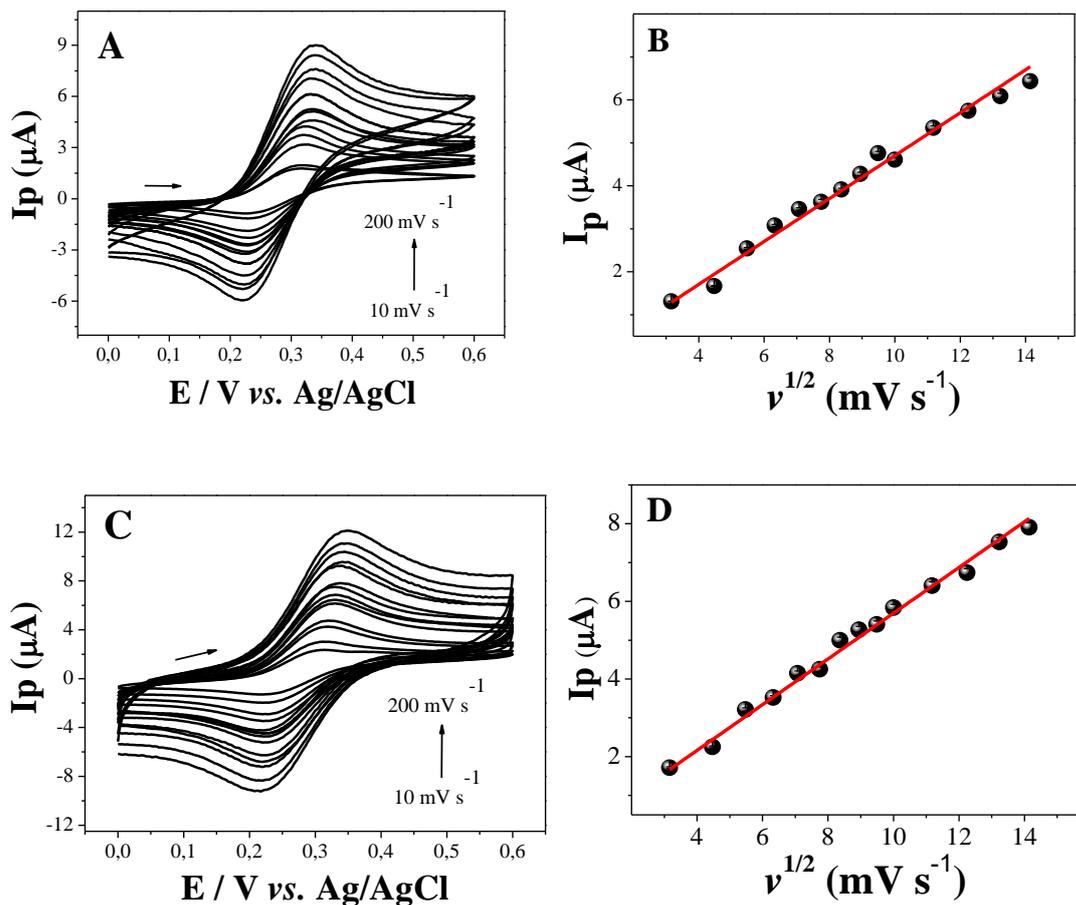


FIGURA 6.4 - Voltamogramas cíclicos realizados com os eletrodos de carbono (A) não modificados e (C) modificados com GO (3^o ciclo), em diferentes velocidades de varredura, na presença de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Variação de j vs. $v^{1/2}$ dos eletrodos (B) não modificados e (D) modificados com GO.

6.3.3 - Comportamento biomimético das FeONPs e CoZnFeONPs

Para avaliar a capacidade das nanopartículas sintetizadas de FeONPs e CoZnFeONPs de mimetizar enzimas semelhantes à peroxidase, foram realizados experimentos de voltametria cíclica na presença de H_2O_2 . Neste caso, as MNPs foram depositadas na superfície do eletrodo não modificado utilizando um ímã posicionado externamente sob o eletrodo de trabalho. Quantidades iguais de cada MNPs foram adicionadas a diferentes eletrodos ($10 \mu\text{L}$ de FeONPs e CoZnFeONPs, em uma concentração de 10 mg mL^{-1}). Em seguida, os eletrodos

foram lavados e adicionou-se uma alíquota de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 preparada em PBS. Os voltamogramas foram obtidos com intervalo de potencial de 0,2 a -1,0 V e velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} . A Figura 6.5 apresenta os voltamogramas obtidos para o eletrodo sem MNPs e com MNPs na superfície dos eletrodos.

Os eletrodos com MNPs exibiram um grande aumento na densidade de corrente obtida com o H_2O_2 em comparação com o eletrodo de carbono sem MNPs. O eletrodo com CoZnFeONPs apresentou maior intensidade de corrente, representando incremento de 51% em comparação ao eletrodo com FeONPs.

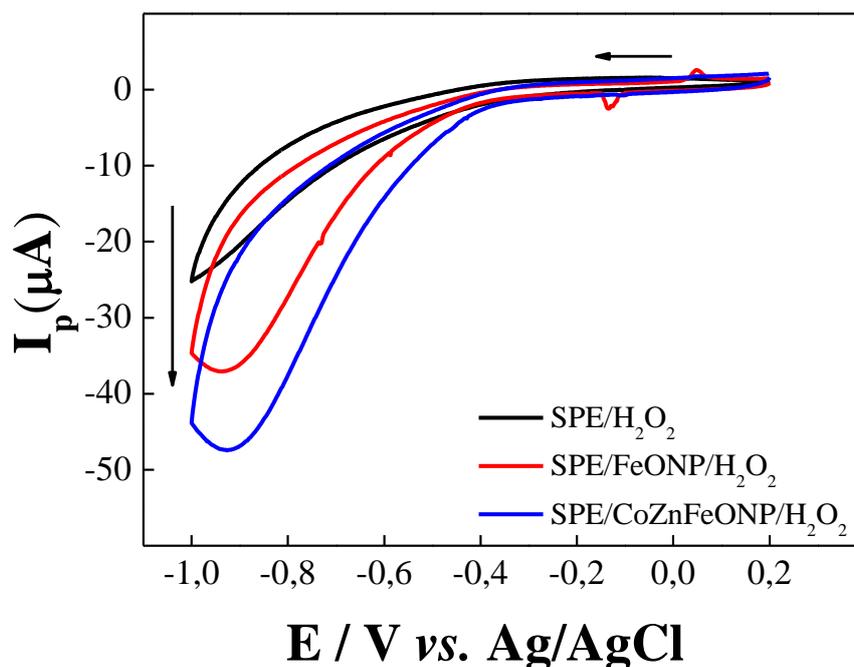


FIGURA 6.5 - Voltamogramas obtidos com os eletrodos: sem modificação (linha preta) e com FeONPs (linha vermelha) e CoZnFeONPs (linha azul) (3^o ciclo), na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 em PBS. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A capacidade de FeONPs e CoZnFeONPs para mimetizar a atividade semelhante à peroxidase foi avaliada por meio de medidas de VCs realizada em diferentes concentrações de H_2O_2 . Neste caso, as MNPs foram capturadas magneticamente na superfície do eletrodo não modificada, como descrito anteriormente, e diferentes concentrações de H_2O_2 preparados em PBS $0,01 \text{ mol}$

L⁻¹ foram adicionados sobre o eletrodo. Como pode ser observado na Figura 6.6, ambas as MNPs apresentaram boas correlações lineares dos valores correntes de pico catódico com o aumento da concentração de H₂O₂, com sensibilidades de 6,9 e 8,0 μA L μmol⁻¹ para FeONPs e CoZnFeONPs, respectivamente. Os LoDs calculados foram de 0,60 e 1,05 μmol L⁻¹ para FeONPs e CoZnFeONPs, respectivamente.

Os resultados indicaram que ambas MNPs apresentaram atividade catalítica para redução de H₂O₂ indicando o potencial para serem utilizadas como marcadores biomimético nos imunoenaios eletroquímicos. No entanto, deve-se notar que a presença de Co(II) e Zn(II) em MNPs não levaram a uma melhora significativa nos parâmetros eletroanalíticos para a detecção de H₂O₂, utilizando quantidades similares de MNPs depositadas na superfície do eletrodo. Isso indica a ausência de uma contribuição relevante desses metais no comportamento eletrocatalítico para redução de H₂O₂.

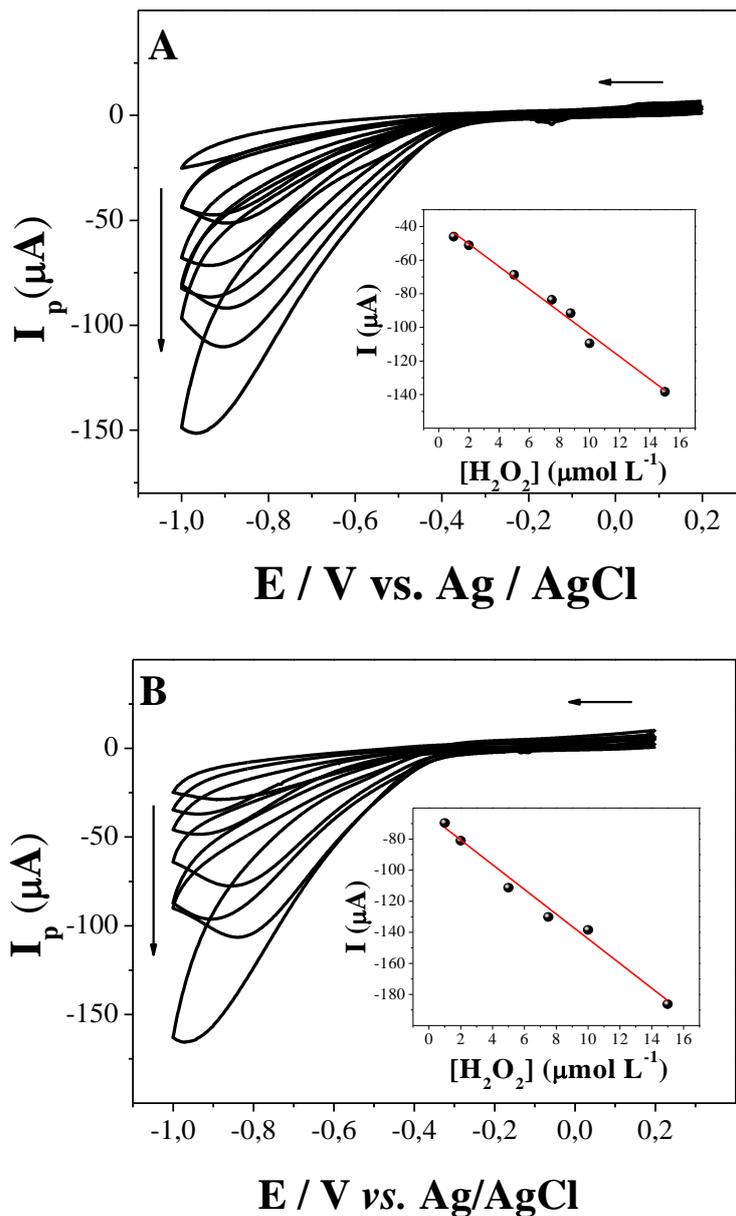


FIGURA 6.6 - Voltamogramas dos eletrodos modificados com FeONPs (A) e CoZnFeONPs (B) (3^o ciclo) na presença de diferentes concentrações de H₂O₂ (0-15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) preparados em 0,01 mol L⁻¹ de PBS. $v=50 \text{ mV s}^{-1}$. Inserções mostram as variações de corrente em função da concentração de H₂O₂.

A influência da presença de oxigênio na atividade catalítica das MNPs foi avaliada em soluções saturadas de N₂. Como observado na Figura 6.7 e Tabela 6.1, os resultados demonstraram que não houve interferência do oxigênio

dissolvido nas respostas eletroquímicas em ambas as MNPs durante o processo de redução do H_2O_2 .

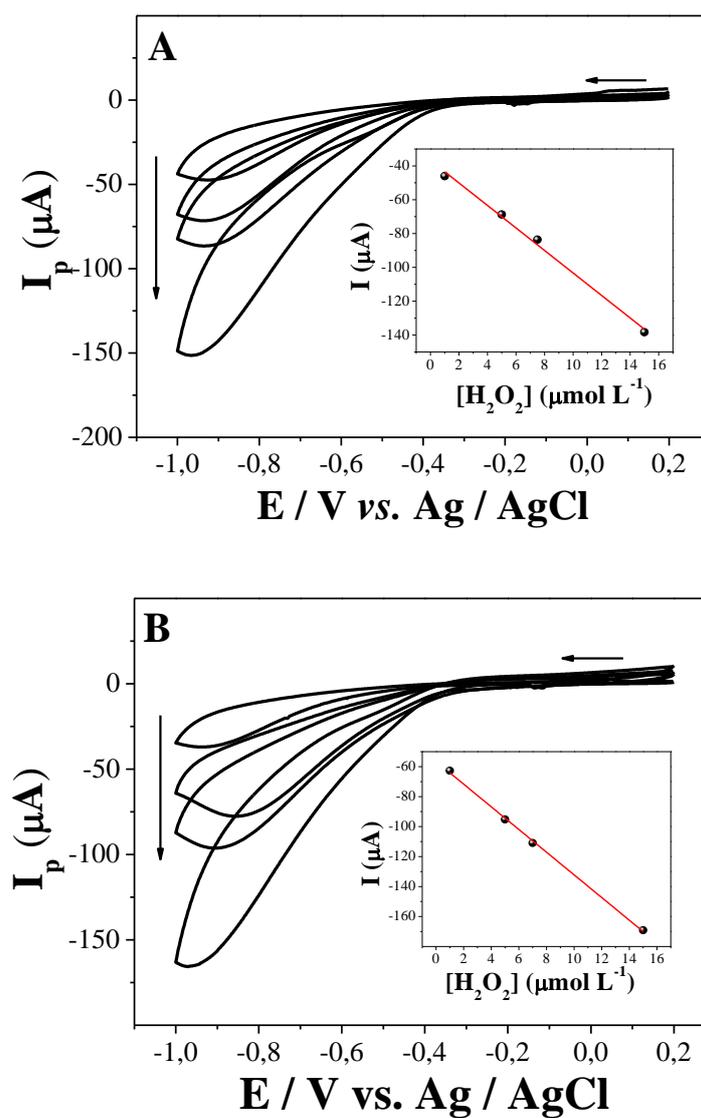


FIGURA 6.7 - Influência da purga de N_2 na (A) voltametria cíclica de FeONPs e (B) CoZnFeONPs (3° ciclo) na superfície de eletrodos de SPE na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS.

TABELA 6. 2 - Sensibilidade e Limite de detecção para FeONPs e CoZnFeONPs.

MNP	Sensibilidade ($\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$)	Limite de Detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
FeONPs	6,90	0,60
CoZnFeONPs	7,90	1,05
FeONPs*	6,42	3,74
CoZnFeONPs*	7,60	1,94

*Soluções purgadas com N_2

A atividade catalítica das MNPs foi avaliada por meio de medidas de voltametria cíclica em meio de peróxido de hidrogênio afim de avaliar a constante aparente de Michaelis-Menten e comparar os valores encontrados na literatura para biossensores enzimáticos¹⁶⁶. As medidas foram realizadas em diferentes concentrações de H_2O_2 dissolvido em 100 mmol L^{-1} de PBS a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e em uma janela de potencial de $0,2$ a $-0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. A constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) foi calculada a partir da equação de Lineweaver-Burk de acordo com a Equação 2¹⁶⁷:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\text{max}} \times [S]} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad \text{Eq.(2)}$$

onde, V é a velocidade de reação, K_m é a constante de Michaelis-Menten, V_{max} é a velocidade máxima de reação e $[S]$ é a concentração do substrato. O intervalo adequado de concentrações de H_2O_2 e os gráficos típicos de Lineweaver-Burk foram obtidos para ambas as MNPs, como mostrado na Fig. 6.8 (A) e (B).

Os valores obtidos de K_m foram de $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para FeONPs e CoZnFeONPs, respectivamente. Estes valores são um pouco menores que os relatados na literatura para biossensores com base no uso da enzima peroxidase¹⁶⁶, indicando assim a boa atividade catalítica de FeONPs e CoZnFeONPs para H_2O_2 .

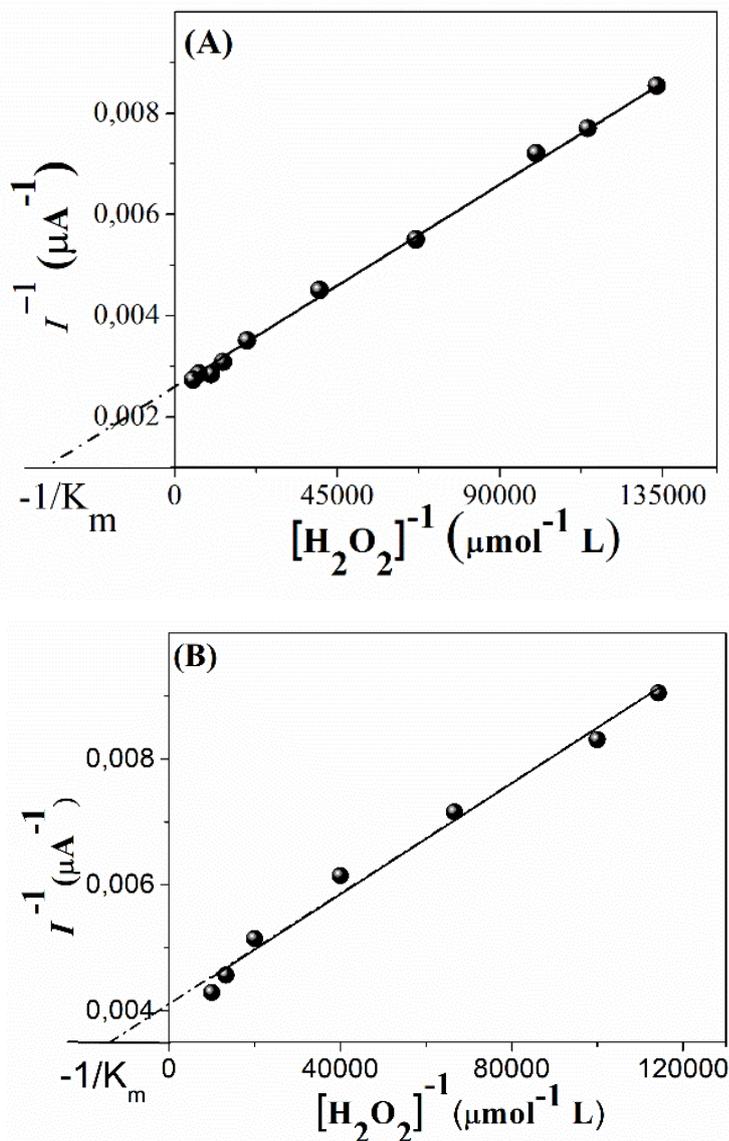


FIGURA 6.8 - Gráfico de Lineweaver-Burk da redução de H_2O_2 catalisada por eletrodos modificados com (A) FeONPs e (B) CoZnFeONPs.

O mecanismo de decomposição de H_2O_2 por ferritas tem sido extensivamente estudado nos últimos anos. Pires *et al.*¹⁶⁸ relataram um estudo das reações envolvidas no processo de decomposição catalítica de H_2O_2 utilizando maguemita e maguemita dopada, sugerindo diferentes rotas de reação com H_2O_2 baseadas em estudos teóricos. Os autores consideraram que as possíveis espécies: HO-M-OH, os grupos de peróxidos M-O-O-M, M- H_2O_2 e M-OOH foram produzidas pela interação entre os átomos de oxigênio de H_2O_2 e o metal na superfície do catalisador. A rota de formação de HO-M-OH provou ser o caminho

mais termodinamicamente favorável que pode ser explicado pela presença da ligação instável O-O, que pode facilmente produzir radicais reativos. Um possível mecanismo para a atuação das MNPs é proposto nas sequências de reações a seguir. I inicialmente ocorre a adsorção de H₂O₂ na superfície catalítica das nanopartículas (**etapa 1**), onde o H₂O₂ é eletroquimicamente reduzido a OH-M-OH mais OH⁻ e OH[•] (**etapa 2**). Em seguida, o OH⁻ formado pode levar à reação em cadeia em contato com mais H₂O₂ (**etapa 3**) gerando outros radicais (HO₂⁻) para formar H₂O mais OH⁻ e O₂ (**etapa 4**).



6.3.4 – Avaliação do imunoensaio, envolvendo o uso de CoZnFeONPs e FeONPs, para detecção de CYFRA 21-1

A eficiência das MNPs para a imunocaptura de CYFRA 21-1 e para a detecção amperométrica pela mimetização da enzima peroxidase foi avaliada em solução de PBS fortificada com CYFRA 21-1 e em amostras reais de soro de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer. Os resultados obtidos com o magneto-imunoensaio para detecção de diferentes concentrações de CYFRA 21-1 foram avaliados utilizando FeONPs e CoZnFeONPs para comparação.

A detecção eletroquímica foi realizada por amperometria, aplicando potencial de -0,3 V vs. Ag|AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e pela injeção de 100 μL da solução de detecção a uma vazão de 100 μL min⁻¹. Uma curva de calibração foi construída com diferentes concentrações de padrões de CYFRA 21-1 e a Figura 6.9 apresenta as correntes transientes obtidas para diferentes concentrações de CYFRA 21-1 e as respectivas curvas de calibração obtidas utilizando cada MNP.

Como pode ser observado, as CoZnFeONPs apresentaram uma diminuição significativa no sinal do branco quando comparado com aquele obtido usando as FeONPs. Os efeitos sinérgicos do uso de eletrodo de carbono modificado com GO e o uso de MNPs permitiram a detecção eletroquímica de CYFRA-21-1 com limites de detecção de $0,30 \text{ fg mL}^{-1}$ e $0,19 \text{ fg mL}^{-1}$, para FeONPs e CoZnFeONPs, respectivamente (Tabela 6.2). As partículas de ferrita, conforme observado nos diferentes estudos, tendem a se adsorver nos eletrodos o que leva a valores de branco elevado, sem comprometer, no entanto, o desempenho analítico dos dispositivos, o que fica evidenciado pelos LoDs obtidos. O uso de BSA e surfactante nas soluções tampões tentem a minimizar este efeito, mas não é suficiente para eliminá-los. No caso das nanopartículas contendo Co e Zn este efeito foi significativamente minimizado indicando serem uma excelente alternativa as partículas contendo somente ferritas.

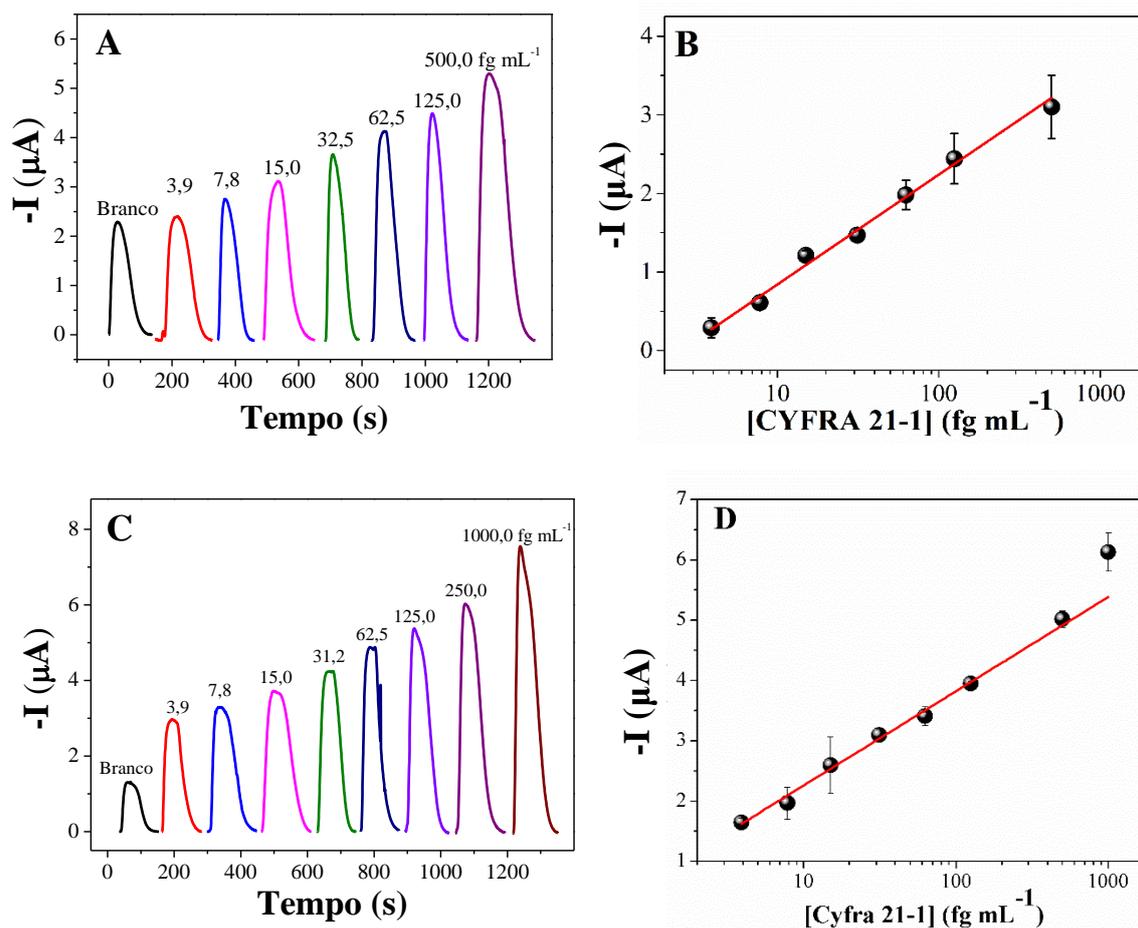


FIGURA 6.9 - Perfis amperométricos para CYFRA 21-1 em um sistema microfluídico utilizando $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS em $-0,3 \text{ V vs. Ag|AgCl}$, após injeção de 50 µmol L^{-1} de H_2O_2 para (A) FeONPs e (C) CoZnFeONPs e correspondentes curvas de calibração para (B) FeONPs e (D) CoZnFeONPs ($n \geq 4$).

TABELA 6.3 - Parâmetros analíticos obtidos para detecção de CYFRA 21-1 com base nos imunoenaios realizado utilizando as diferentes MNPs.

MNP	Faixa linear (fg mL^{-1})	R^2	Sensibilidade (µA L fg^{-1})	LoD (fg mL^{-1})
FeONPs	3,9-500	0,991	1,39	0,30
CoZnFeONPs	3,9-1000	0,997	1,56	0,19

O desempenho do imunoenasão desenvolvido foi comparado com métodos relatados na literatura para a detecção de CYFRA 21-1, como pode ser

visto na Tabela 6.3. O limite de detecção extremamente baixo obtido neste trabalho pode ser atribuído às seguintes características: i) a imobilização efetiva de anticorpos primários na superfície do eletrodo; ii) notável atividade catalítica de ambas as MNPs em relação a H_2O_2 , comprovada pelos valores de K_m e, comparação com trabalhos na literatura; iii) uso de MNPs sintetizadas que permitiram a imobilização de Ab_2 para captura e separação do biomarcador, além da detecção eletroquímica amplificada na presença de oxigênio dissolvido. Vale ressaltar que a presença do Co e do Zn nas MNPs não melhorou significativamente a detecção do biomarcador, quando comparados com os FeONPs. Entretanto, as propriedades magnéticas foram significativamente melhoradas devido à presença de cobalto nas nanopartículas, reduzindo os tempos para a captura com uso de ímãs comerciais. As propriedades magnéticas dessas nanopartículas podem desempenhar um papel vital em sistemas em que a captura de biomoléculas é crucial, como em imunoenaios ou dispositivos microfluídicos para aplicações médicas. Além disso, as vantagens que podem ser destacadas para os imunoenaios aqui desenvolvidos incluem a não necessidade do uso de mediador enzimático como a HRP a qual requer uma solução de detecção livre de O_2 para a etapa de detecção com HQ além da descartabilidade e baixo custo.

A repetibilidade do dispositivo descartável foi avaliada e os valores dos desvios-padrão relativos (%RSD) obtidos para oito eletrodos e para arranjos diferentes foram menores que 8%. Estes resultados confirmaram a boa reprodutibilidade do método proposto para a detecção do biomarcador CYFRA 21-1.

Zeng e colaboradores desenvolveram um imunossensor eletroquímico livre de enzimas para detecção sensível e seletiva do marcador tumoral antígeno do fragmento da citoqueratina 19 21-1 (CYFRA21-1). Neste trabalho, grafeno@ nanopartículas de ouro (3D-G@Au) foi utilizado para modificar a superfície de eletrodo de carbono vítreo (GCE) para melhorar a condutividade do imunossensor. O anti-CYFRA21-1 foi capturado e fixado no

GCE modificado utilizando quitosana (CS), glutaraldeído (GA) e anti-CYFRA21-1. Sob condições otimizadas, o imunossensor eletroquímico proposto exibiu uma ampla faixa linear de 0,25 a 800 ng mL⁻¹ e LoD de 100 pg mL⁻¹ (S/N = 3).

Outra abordagem foi apresentada por Kumar *et al.* que reportou um isento de enzima baseado em zircônia nanoestruturada decorado com óxido de grafeno fabricado para detectar o biomarcador CYFRA-21-1 na saliva de pacientes com câncer bucal. funcionalizado com anticorpos anti-CYFRA-21-1 e moléculas de BSA. O imunoeletrodo fabricado (BSA/anti-CYFRA21-1/APTES/ZrO₂-rGO/ITO) apresentou sensibilidade de 0,756 µA mL ng⁻¹, faixa de detecção linear mais ampla 2-22 ng mL⁻¹ e LoD de 0,122 ng mL⁻¹.

Tiwari e colaboradores apresentaram o resultado de estudos relacionados à síntese *in situ* de nanopartículas de hidróxido de lantânio (L-Cys-La(OH)₃NPs) decoradas com aminoácidos (L-Cisteína) para a fabricação de imunossensor eficiente para detecção não invasiva de câncer bucal. Este imunossensor apresentou um amplo intervalo de detecção de 0,001-10,2 ng mL⁻¹, o baixo limite de detecção de 0,001 ng mL⁻¹ e sensibilidade de 12,044 µA (ng mL cm⁻²)⁻¹ com um tempo interessante de resposta de 5 min.

TABELA 6.3 - Parâmetros analíticos para detecção de CYFRA 21-1 com diferentes MNPs e metodologias de detecção.

Dispositivo	Técnica	Faixa linear (fg mL⁻¹)	LoD (fg mL⁻¹)	Ref.
3D grafeno- Au/carbono vítreo	DPV	2,5 × 10 ⁵ a 8,0 × 10 ⁸	1,0 × 10 ⁵	Zeng <i>et al.</i> ¹⁶⁹
ZrO ₂ -RGO/ ITO	DPV	2,0 × 10 ⁶ a 2,2 × 10 ⁷	1,2 × 10 ⁵	Kumar <i>et al.</i> ¹⁷⁰
Cys- La(OH) ₃ /ITO	DPV	1,0 × 10 ³ a 10,2 × 10 ⁶	1,0 × 10 ³	Tiwari <i>et al.</i> ¹⁷¹
FeONPs	Amp	3,9 a 5,0 × 10 ²	0,30	Este trabalho
CoZnFeONPs	Amp	3,9 a 1,0 × 10 ³	0,19	Este trabalho

6.3.5 - Aplicação do dispositivo microfluídico para detecção de CYFRA 21-1 em amostras de soro de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de próstata

Para avaliar a confiabilidade analítica e a viabilidade do método proposto, amostras de soro de pacientes com câncer de próstata e de indivíduos saudáveis foram coletadas e avaliadas utilizando os imunoenaios baseados em ambas MNPs sintetizadas, bem como o método ELISA para fins de comparação.

A Figura 6.9 apresenta a comparação entre os resultados obtidos para a detecção do CYFRA 21-1, utilizando o dispositivo microfluídico desenvolvido com ambas MNPs, e com no método ELISA. A detecção de CYFRA 21-1 em amostras de soro de pacientes com câncer de próstata e saudáveis usando o os dispositivos descartáveis com base no uso de FeONPs e CoZnFeONPs apresentaram boa concordância com método ELISA (**C** para indivíduos saudáveis e **CaP** para pacientes com câncer de próstata). Uma excelente correlação entre os imunoenaios utilizando as MNPs pode ser observada, o que indica o potencial deste método para a detecção do CYFRA 21-1 em concentrações clinicamente relevantes. O teste-t *student* pareado demonstrou não haver diferença estatística significativa ao nível de confiança de 95% para os imunossensores desenvolvidos com as ferritas em relação ao método ELISA.

Além disso, é interessante observar a grande variação nos níveis de CYFRA 21-1 quando se compara o grupo de indivíduos saudáveis e os pacientes com câncer. As concentrações do biomarcador no soro variaram de 0,90 - 5,96 pg mL⁻¹ para indivíduos saudáveis e de 66,6 a 172,50 ng mL⁻¹ para os pacientes com câncer de próstata.

Os métodos desenvolvidos que envolveram a captura, separação e detecção imunomagnética baseadas no uso de propriedades miméticas intrínsecas das FeONPs e CoZnFeONPs mostraram-se simples e de baixo custo para o diagnóstico clínico, com as vantagens da elevada especificidade e possibilidade de miniaturização tendo grande potencial para serem utilizados como dispositivos portáteis para aplicações POC.

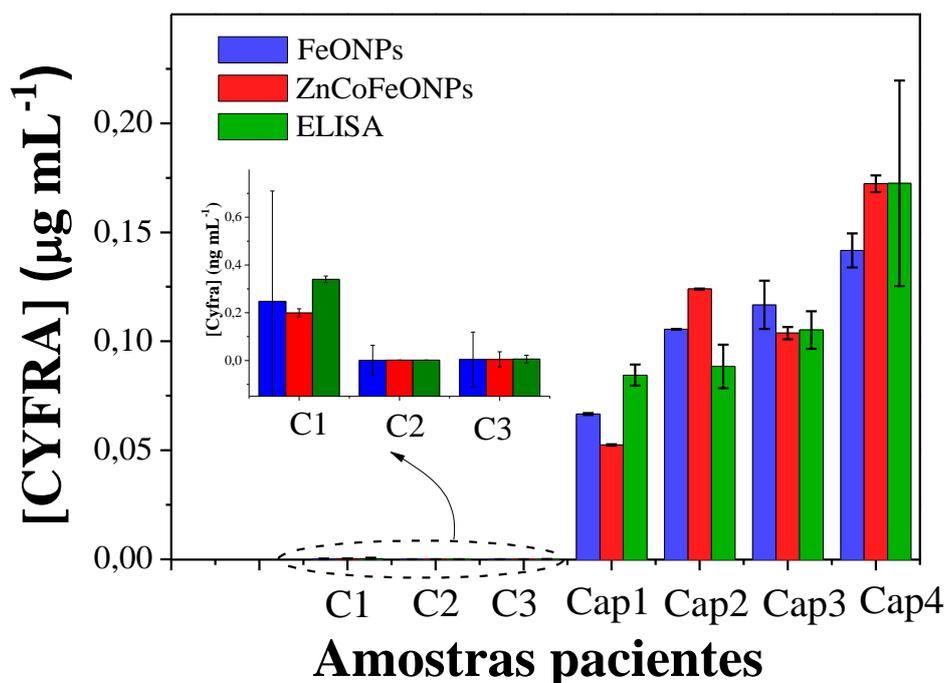


FIGURA 6.10 - Detecção de CYFRA 21-1 em amostras de soro de pacientes com câncer de próstata (PCA) e indivíduos saudáveis (C) utilizando o imunoensaio desenvolvidos e o ELISA.

6.4 - CONCLUSÕES

A detecção de CYFRA 21-1 nas amostras de soro de indivíduos controle e com câncer de próstata foi plenamente alcançada utilizando um novo imunoensaio microfluídico sem enzimas, baseado no uso de nanopartículas de CoZnFeONPs. As MNPs apresentaram boa biocompatibilidade com similaridade de comportamento quando comparados às nanopartículas de FeONP. Além disso, este novo método também se mostrou promissor para análises tipo POC, com vantagens sobre os métodos tradicionais, incluindo baixo limite de detecção, elevada especificidade, boa precisão e reprodutibilidade e baixo custo. Ambas as MNPs utilizadas no método proposto, forneceram LoDs 6 vezes menores do que o ponto de corte clínico de 3,3 ng mL⁻¹ para a detecção de CYFRA 21-1, além de apresentar interessante diferença entre os indivíduos saudáveis e doentes. O uso das MNPs tanto para a captura e separação e, em especial, na etapa de detecção

mimetizando enzimas do tipo peroxidase permitiu um avanço significativo quando comparado com o imunoensaio utilizando HRP uma vez que não requer a prévia etapa de remoção do oxigênio com purga de N₂ necessário quando do uso da HRP e na presença de HQ.

Capítulo 7 – CONCLUSÕES FINAIS

7 - CONCLUSÕES FINAIS

Os magneto-imunoensaios desenvolvidos neste projeto para detecção de biomarcadores mostraram-se promissores para o rastreamento e diagnóstico do câncer com vantagens sobre os métodos tradicionais incluindo análises rápidas, baixo limite de detecção, pequena quantidade de amostras e reagentes, elevada especificidade, boa precisão e repetibilidade e baixo custo.

O arranjo de eletrodos utilizados permitiu a detecção de um biomarcador com um maior número de espaço amostral ($n=8$) corroborando com o aumento da precisão do método, e além disso, por meio do imunoensaio multiplexado desenvolvido foi permitido a detecção simultânea dos biomarcadores GSTP1 e PSA.

As AuNP utilizadas para o ancoramento dos anticorpos monoclonais sobre o eletrodo de trabalho colaboraram também para um maior aumento de área eletroativa quando comparada ao GO. Isso se deve ao maior caráter condutivo das NPs comparado com o GO.

O teste *t-student* pareado aplicado e o valor de $t_{\text{calculado}}$ para os 3 trabalhos foram menores que o t_{critico} , demonstrando que os métodos não apresentaram diferença estatística significativa ao nível de confiança de 95% em relação ao método comparativo ELISA. Entretanto, o baixo número de amostras de pacientes disponíveis analisadas não possibilitou encontrar a associação entre os biomarcadores p16, GSTP1 e CYFRA com o câncer de próstata. Entre os biomarcadores, o CYFRA-21-1, demonstrou uma maior diferença entre os valores de concentração para indivíduos saudáveis e doentes o que o faz promissor no diagnóstico da doença.

Vale a pena mencionar que os dispositivos descartáveis desenvolvidos para a detecção de CYFRA 21-1 apresentaram vantagens frente aos demais, como a não utilização do uso de mediador enzimático, como a HRP, que requer uma solução de detecção livre de O_2 , e conseqüentemente, demorada etapa de remoção

com purga de N_2 , sendo portanto um interessante candidato ao desenvolvimento de dispositivos POC.

Economicamente, os métodos foram desenvolvidos usando não apenas materiais simples que podem ser adquiridos em muitos casos localmente, mas também uma impressora doméstica de baixo custo, o que permite a produção de centenas de dispositivos em poucas horas. O custo médio em material para a construção do dispositivo proposto é de aproximadamente R\$4,00 (com enzima) e 2,40 (sem enzima), incluindo todas as etapas de modificação.

Por fim, a possibilidade de utilizar os imunossensores eletroquímico no direcionamento da terapia contra o câncer de próstata e, até mesmo, de auxiliar no diagnóstico precoce da doença ou em diferentes estágios da doença é uma alternativa aos métodos de rotina atualmente utilizados (ECL (Roche Diagnostics, Mesoscale Discovery) e ELISA), o que pode vir a proporcionar ao paciente um maior acesso e disponibilidade ao rastreamento da doença e conseqüentemente, uma melhora da qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

8 - REFERÊNCIAS

1. Inca, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>, 2018 edn., 2018.
2. Inca, in Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao> acessado em dezembro de 2014, 2014.
3. Beltran, H.; Demichelis, F.; *PROSTATE CANCER Intrapatient heterogeneity in prostate cancer*, *Nat Rev Urol* **2015**, 12, 430.
4. Jahn, J. L.; Giovannucci, E. L.; Stampfer, M. J.; *The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era*, *Int J Cancer* **2015**, 137, 2795.
5. Adams, J.; *The case of scirrhous of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis*, *Lancet* **1853**, 1, 393.
6. Howlader, N.; Noone, A.; Krapcho, M.; Miller, D.; Bishop, K.; Kosary, C.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; Mariotto, A.; *SEER cancer statistics review, 1975–2014*, Bethesda, MD: National Cancer Institute **2017**, 2018.
7. Chan, J. M.; Stampfer, M. J.; Giovannucci, E. L.; *What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology*, *Semin Cancer Biol* **1998**, 8, 263.
8. Nakandi, H.; Kirabo, M.; Semugabo, C.; Kittengo, A.; Kitayimbwa, P.; Kalungi, S.; Maena, J.; *Knowledge, attitudes and practices of Ugandan men regarding prostate cancer*, *African Journal of Urology* **2013**, 19, 165.
9. Stewart, B.; Wild, C. P.; *World cancer report 2014*, **2014**.
10. Inca, Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>, 2018.
11. Harvey, C.; Pilcher, J.; Richenberg, J.; Patel, U.; Frauscher, F.; *Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer*, *The British journal of radiology* **2012**, 85, S3.
12. Aalberts, M.; Stout, T. a. E.; Stoorvogel, W.; *Prostasomes: extracellular vesicles from the prostate*, *Reproduction* **2014**, 147, R1.
13. Alberts, A. R.; Schoots, I. G.; Roobol, M. J.; *Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: Past and future*, *Int J Urol* **2015**, 22, 524.
14. Albertsen, P. C.; *When is active surveillance the appropriate treatment for prostate cancer?*, *Acta Oncol* **2011**, 50, 120.
15. Antenor, J. a. V.; Han, M.; Roehl, K. A.; Nadler, R. B.; Catalona, W. J.; *Relationship between initial prostate specific antigen level and subsequent prostate cancer detection in a longitudinal screening study*, *The Journal of urology* **2004**, 172, 90.

16. Yu, H.; Berkel, H.; *Prostate-specific antigen (PSA) in women, The Journal of the Louisiana State Medical Society: official organ of the Louisiana State Medical Society* **1999**, *151*, 209.
17. Saini, S.; *PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers, Cell Oncol* **2016**, *39*, 97.
18. Vickers, A. J.; Gupta, A.; Savage, C. J.; Pettersson, K.; Dahlin, A.; Bjartell, A.; Manjer, J.; Scardino, P. T.; Ulmert, D.; Lilja, H.; *A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large, population-based cohort followed for 15 years without screening, Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2011**, *20*, 255.
19. Stavropoulou, P.; Gregorakis, A. K.; Plebani, M.; Scorilas, A.; *Expression analysis and prognostic significance of human kallikrein 11 in prostate cancer, Clin Chim Acta* **2005**, *357*, 190.
20. Bismar, T. A.; Demichelis, F.; Riva, A.; Kim, R.; Lnu, S.; Kutok, J.; Aster, J. C.; Tang, J.; Kuefer, R.; Hofer, M. D.; Febbo, P. G.; Chinnaiyan, A. M.; Rubin, M. A.; *Defining prostate cancer progression using a multiplex panel of 13 tissue biomarkers, Modern Pathol* **2005**, *18*, 130a.
21. Crawford, E. D.; Rove, K. O.; Trabulsi, E. J.; Qian, J.; Drewnowska, K. P.; Kaminetsky, J. C.; Huisman, T. K.; Bilowus, M. L.; Freedman, S. J.; Glover, W. L.; *Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases, The Journal of urology* **2012**, *188*, 1726.
22. Attard, G.; Clark, J.; Ambroisine, L.; Fisher, G.; Kovacs, G.; Flohr, P.; Berney, D.; Foster, C.; Fletcher, A.; Gerald, W.; *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer, Oncogene* **2008**, *27*, 253.
23. Prensner, J. R.; Rubin, M. A.; Wei, J. T.; Chinnaiyan, A. M.; *Beyond PSA: The Next Generation of Prostate Cancer Biomarkers, Science Translational Medicine* **2012**, *4*.
24. Kingsmore, S. F.; *Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays, Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 310.
25. Borrebaeck, C. a. K.; *Precision diagnostics: moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer, Nat Rev Cancer* **2017**, *17*, 199.
26. Assikis, V. J.; Do, K. A.; Wen, S. J.; Wang, X. M.; Cho-Vega, J. H.; Brisbay, S.; Lopez, R.; Logothetis, C. J.; Troncoso, P.; Papandreou, C. N.; McDonnell, T. J.; *Clinical and biomarker correlates of androgen-independent, locally aggressive prostate cancer with limited metastatic potential, Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 6770.
27. Ziaran, S.; Novakova, Z. V.; Bohmer, D.; Danisovic, L.; *Biomarkers for determination prostate cancer: implication for diagnosis and prognosis, Neoplasma* **2015**, *62*, 683.

28. Amorim, R. L.; Moura, V. M. B. D.; Di Santis, G. W.; Bandarra, E. P.; Padovani, C.; *Serum and urinary measurements of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic specific antigen (PSA) in dogs*, *Arq Bras Med Vet Zoo* **2004**, *56*, 320.
29. Steuber, T.; Vickers, A. J.; Serio, A. M.; Vaisanen, V.; Haese, A.; Pettersson, K.; Eastham, J. A.; Scardino, P. T.; Huland, H.; Lilja, H.; *Comparison of free and total forms of serum human kallikrein 2 and prostate-specific antigen for prediction of locally advanced and recurrent prostate cancer*, *Clinical chemistry* **2007**, *53*, 233.
30. Finlay, J. A.; Jacinto, J. M.; Sterling, K.; Pollard, S.; Lifsey, D.; Rayford, W.; *Early detection of prostate cancer in African American men through use of multiple biomarkers: Human kallikrein 2 (hK2), prostate specific antigen (PSA) and free PSA (FPSA)*. *Cancer Epidem Biomar* **2002**, *11*, 1197s.
31. Partin, A.; Catalona, W.; Brawer, M.; Klee, G.; Tindall, D.; Young, C.; Chan, D.; Woodrum, D.; Finlay, J.; Saedi, M., *Human glandular kallikrein (hK2) correlates with detection and pathologic features of prostate cancer*, 1998.
32. Partin, A. W.; Catalona, W. J.; Finlay, J. A.; Darte, C.; Tindall, D. J.; Young, C. Y.-F.; Klee, G. G.; Chan, D. W.; Rittenhouse, H. G.; Wolfert, R. L.; *Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: preliminary analysis*, *Urology* **1999**, *54*, 839.
33. Vlaeminck-Guillem, V.; *Urinary PCA3 test: Which perspectives?*, *Med Nucl* **2014**, *38*, 21.
34. Aubin, S. M. J.; Reid, J.; Sarno, M. J.; Blase, A.; Aussie, J.; Rittenhouse, H.; Rittmaster, R.; Andriole, G. L.; Groskopf, J.; *PCA3 Molecular Urine Test for Predicting Repeat Prostate Biopsy Outcome in Populations at Risk: Validation in the Placebo Arm of the Dutasteride REDUCE Trial*, *J Urology* **2010**, *184*, 1947.
35. Birnbaum, J. K.; Feng, Z. D.; Gulati, R.; Fan, J.; Lotan, Y.; Wei, J. T.; Etzioni, R.; *Projecting Benefits and Harms of Novel Cancer Screening Biomarkers: A Study of PCA3 and Prostate Cancer*, *Cancer Epidem Biomar* **2015**, *24*, 677.
36. Tabassum, T.; Imtiaz, A.; Jabeen, R.; *A Study to Evaluate alpha-Methylacyl Co-A Racemase Expression in Hyperplasia and Different Grades of Adenocarcinoma of Prostate*, *Pak J Med Health Sci* **2017**, *11*, 909.
37. Box, A.; Alshalalfa, M.; Hegazy, S. A.; Donnelly, B.; Bismar, T. A.; *High alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) is associated with ERG expression and with adverse clinical outcome in patients with localized prostate cancer*, *Tumor Biol* **2016**, *37*, 12287.
38. Alinezhad, S.; Vaananen, R. M.; Ochoa, N. T.; Vertosick, E. A.; Bjartell, A.; Bostrom, P. J.; Taimen, P.; Pettersson, K.; *Global expression of AMACR transcripts predicts risk for prostate cancer - a systematic*

- comparison of AMACR protein and mRNA expression in cancerous and noncancerous prostate, BMC Urol* **2016**, 16.
39. Xu, Y.; Zhang, L.; Sun, S. K.; Zhang, X.; *CC Chemokine Ligand 18 and IGF-Binding Protein 6 as Potential Serum Biomarkers for Prostate Cancer, Tohoku J Exp Med* **2014**, 233, 25.
 40. Gauchez, A. S.; *Prostate cancer: Biomarkers, Med Nucl* **2011**, 35, 373.
 41. Attard, G.; Clark, J.; Ambrosini, L.; Fisher, G.; Kovacs, G.; Flohr, P.; Berney, D.; Foster, C. S.; Fletcher, A.; Gerald, W. L.; Moller, H.; Reuter, V.; De Bono, J. S.; Scardino, P.; Cuzick, J.; Cooper, C. S.; Transatlantic Prostate, G.; *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer, Oncogene* **2008**, 27, 253.
 42. Yang, Y.; Yan, Q.; Liu, Q.; Li, Y.; Liu, H.; Wang, P.; Chen, L.; Zhang, D.; Li, Y.; Dong, Y.; *An ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on the signal amplification strategy of echinoidea-shaped Au@ Ag-Cu₂O nanoparticles for prostate specific antigen detection, Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 99, 450.
 43. Allay, J. A.; Steiner, M. S.; Zhang, Y.; Reed, C. P.; Cockroft, J.; Lu, Y.; *Adenovirus p16 gene therapy for prostate cancer, World J Urol* **2000**, 18, 111.
 44. Allay, J. A.; Steiner, M. S.; Zhang, Y.; Reed, C. P.; Cockroft, J.; Lu, Y.; *Adenovirus p16 gene therapy for prostate cancer, World J Urol* **2000**, 18, 111.
 45. Gu, K.; Mes-Masson, A. M.; Gauthier, J.; Saad, F.; *Analysis of the p16 tumor suppressor gene in early-stage prostate cancer, Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center* **1998**, 21, 164.
 46. Chung, L. W.; Isaacs, W. B.; Simons, J. W., *Prostate cancer: biology, genetics, and the new therapeutics*, Springer Science & Business Media, 2007.
 47. Feng, W.; Han, Z.; Zhu, R.; Liu, P.; Liu, S.; *Association of p16 gene methylation with prostate cancer risk: a meta-analysis, J. BUON* **2015**, 20, 1074.
 48. Martignano, F.; Gurioli, G.; Salvi, S.; Calistri, D.; Costantini, M.; Gunelli, R.; De Giorgi, U.; Foca, F.; Casadio, V.; *GSTP1 Methylation and Protein Expression in Prostate Cancer: Diagnostic Implications, Dis Markers* **2016**.
 49. Millar, D. S.; Ow, K. K.; Paul, C. L.; Russell, P. J.; Molloy, P. L.; Clark, S. J.; *Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase π (GSTP1) gene in prostate cancer, Oncogene* **1999**, 18, 1313.
 50. Martignano, F.; Gurioli, G.; Salvi, S.; Calistri, D.; Costantini, M.; Gunelli, R.; De Giorgi, U.; Foca, F.; Casadio, V.; *GSTP1 methylation and protein expression in prostate cancer: diagnostic implications, Dis Markers* **2016**, 2016.

51. Lee, W.-H.; Morton, R. A.; Epstein, J. I.; Brooks, J. D.; Campbell, P. A.; Bova, G. S.; Hsieh, W.-S.; Isaacs, W. B.; Nelson, W. G.; *Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 11733.
52. Uenishi, T.; Kubo, S.; Hirohashi, K.; Tanaka, H.; Shuto, T.; Yamamoto, T.; Nishiguchi, S.; *Cytokeratin-19 fragments in serum (CYFRA 21-1) as a marker in primary liver cancer*, *Brit J Cancer* **2003**, *88*, 1894.
53. Jeong, S.; Park, Y.; Cho, Y.; Kim, Y. R.; Kim, H. S.; *Diagnostic values of urine CYFRA21-1, NMP22, UBC, and FDP for the detection of bladder cancer*, *Clin Chim Acta* **2012**, *414*, 93.
54. Chapman, M. H.; Sandanayake, N. S.; Andreola, F.; Dhar, D. K.; Webster, G. J.; Dooley, J. S.; Pereira, S. P.; *Circulating CYFRA 21-1 is a specific diagnostic and prognostic biomarker in biliary tract cancer*, *Journal of clinical and experimental hepatology* **2011**, *1*, 6.
55. Theyer, G.; Dürer, A.; Theyer, U.; Haberl, I.; Ulsperger, E.; Baumgartner, G.; Hamilton, G.; *Measurements of free and total PSA, tissue polypeptide-specific antigen (TPS), and CYFRA 21-1 in prostate cancer patients under intermittent androgen suppression therapy*, *The Prostate* **1999**, *41*, 71.
56. Edelman, M. J.; Hodgson, L.; Rosenblatt, P. Y.; Christenson, R. H.; Vokes, E. E.; Wang, X.; Kratzke, R.; *CYFRA 21-1 as a prognostic and predictive marker in advanced non-small-cell lung cancer in a prospective trial: CALGB 150304*, *J Thorac Oncol* **2012**, *7*, 649.
57. Zhao, W.; Van Den Berg, A.; *Lab on paper*, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1988.
58. Gamagedara, S.; Ma, Y. F.; *Biomarker analysis for prostate cancer diagnosis using LC-MS and CE-MS*, *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2129.
59. Johnson, I. R.; Parkinson-Lawrence, E. J.; Butler, L. M.; Brooks, D. A.; *Prostate Cell Lines as Models for Biomarker Discovery: Performance of Current Markers and The Search for New Biomarkers*, *Prostate* **2014**, *74*, 547.
60. Scherl, A.; *Clinical protein mass spectrometry*, *Methods* **2015**, *81*, 3.
61. Kosari, F.; Asmann, Y. W.; Cheville, J. C.; Vasmatazis, G.; *Cysteine-rich secretory protein-3: a potential biomarker for prostate cancer*, *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* **2002**, *11*, 1419.
62. Wu, J. D.; Dong, M. L.; Santos, S.; Rigatto, C.; Liu, Y.; Lin, F.; *Lab-on-a-Chip Platforms for Detection of Cardiovascular Disease and Cancer Biomarkers*, *Sensors-Basel* **2017**, *17*.
63. Wu, J.; He, Z.; Chen, Q.; Lin, J.-M.; *Biochemical analysis on microfluidic chips*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *80*, 213.
64. Warren, A. D.; Kwong, G. A.; Wood, D. K.; Lin, K. Y.; Bhatia, S. N.; *Point-of-care diagnostics for noncommunicable diseases using synthetic urinary biomarkers and paper microfluidics*, *P Natl Acad Sci USA* **2014**, *111*, 3671.

65. Tang, C. K.; Vaze, A.; Shen, M.; Rusling, J. F.; *High-throughput electrochemical microfluidic immunoarray for multiplexed detection of cancer biomarker proteins*, *Acs Sensors* **2016**, *1*, 1036.
66. Jena, R. K.; Yue, C.; Lam, Y.; *Micro fabrication of cyclic olefin copolymer (COC) based microfluidic devices*, *Microsystem technologies* **2012**, *18*, 159.
67. Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Whitesides, G. M.; Carrilho, E., ACS Publications, 2009.
68. Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S.; *Electrochemical detection for paper-based microfluidics*, *Anal Chem* **2009**, *81*, 5821.
69. Songjaroen, T.; Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S.; Laiwattanapaisal, W.; *Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices*, *Lab Chip* **2012**, *12*, 3392.
70. Wang, S.; Inci, F.; Chaunzwa, T. L.; Ramanujam, A.; Vasudevan, A.; Subramanian, S.; Ip, A. C. F.; Sridharan, B.; Gurkan, U. A.; Demirci, U.; *Portable microfluidic chip for detection of Escherichia coli in produce and blood*, *Int J Nanomed* **2012**, *7*, 2591.
71. Gabardo, C.; Soleymani, L.; *Deposition, patterning, and utility of conductive materials for the rapid prototyping of chemical and bioanalytical devices*, *Analyst* **2016**, *141*, 3511.
72. Bishop, G. W.; Satterwhite, J. E.; Bhakta, S.; Kadimisetty, K.; Gillette, K. M.; Chen, E.; Rusling, J. F.; *3D-printed fluidic devices for nanoparticle preparation and flow-injection amperometry using integrated prussian blue nanoparticle-modified electrodes*, *Anal Chem* **2015**, *87*, 5437.
73. Bartholomeusz, D. A.; Boutté, R. W.; Andrade, J. D.; *Xurography: rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter*, *Journal of Microelectromechanical systems* **2005**, *14*, 1364.
74. Thompson, B. L.; Ouyang, Y.; Duarte, G. R.; Carrilho, E.; Krauss, S. T.; Landers, J. P.; *Inexpensive, rapid prototyping of microfluidic devices using overhead transparencies and a laser print, cut and laminate fabrication method*, *Nat Protoc* **2015**, *10*, 875.
75. Cosson, S.; Aeberli, L. G.; Brandenberg, N.; Lutolf, M. P.; *Ultra-rapid prototyping of flexible, multi-layered microfluidic devices via razor writing*, *Lab Chip* **2015**, *15*, 72.
76. Yuen, P. K.; Goral, V. N.; *Low-cost rapid prototyping of flexible microfluidic devices using a desktop digital craft cutter*, *Lab Chip* **2010**, *10*, 384.
77. Uliana, C. V.; Peverari, C. R.; Afonso, A. S.; Cominetti, M. R.; Faria, R. C.; *Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker*, *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *99*, 156.
78. Santhiago, M.; *Construção e aplicação de dispositivos analíticos 2D e 3D à base de papel com detecção eletroquímica*, **2014**.

79. Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloum-Ardakani, M.; *Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013)*, *Microchim Acta* **2014**, *181*, 865.
80. Afonso, A. S.; Uliana, C. V.; Martucci, D. H.; Faria, R. C.; *Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications*, *Talanta* **2016**, *146*, 381.
81. Clark Jr, L. C.; Lyons, C.; *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*, *Ann Ny Acad Sci* **1962**, *102*, 29.
82. D'orazio, P.; *Biosensors in clinical chemistry-2011 update*, *Clin Chim Acta* **2011**, *412*, 1749.
83. Arugula, M. A.; Simonian, A.; *Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives*, *Meas Sci Technol* **2014**, *25*, 032001.
84. Mello, L. D.; Kubota, L. T.; *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*, *Food chemistry* **2002**, *77*, 237.
85. Bahadır, E. B.; Sezgintürk, M. K.; *Electrochemical biosensors for hormone analyses*, *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *68*, 62.
86. Luong, J. H.; Male, K. B.; Glennon, J. D.; *Biosensor technology: technology push versus market pull*, *Biotechnol Adv* **2008**, *26*, 492.
87. Updike, S.; Hicks, G.; *The enzyme electrode*, *Nature* **1967**, *214*, 986.
88. Nascimento, V. B.; Angnes, L.; *Screen-printed electrodes*, *Química Nova* **1998**, *21*, 614.
89. Chen, Q.; Pamidi, P. V.; Wang, J.; Kutner, W.; *β -Cyclodextrin cation exchange polymer membrane for improved second-generation glucose biosensors*, *Anal Chim Acta* **1995**, *306*, 201.
90. Uliana, C. V.; Riccardi, C. S.; Yamanaka, H.; *Diagnostic tests for hepatitis C: Recent trends in electrochemical immunosensor and genosensor analysis*, *World J Gastroentero* **2014**, *20*, 15476.
91. Topkaya, S. N.; Ozkan-Ariksoysal, D.; Kosova, B.; Ozel, R.; Ozsoz, M.; *Electrochemical DNA biosensor for detecting cancer biomarker related to glutathione S-transferase P1 (GSTP1) hypermethylation in real samples*, *Biosens Bioelectron* **2012**, *31*, 516.
92. Civit, L.; Fragoso, A.; Hölter, S.; Dürst, M.; O'sullivan, C. K.; *Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples*, *Anal Chim Acta* **2012**, *715*, 93.
93. Lv, S. Z.; Lin, Z. Z.; Zhang, K. Y.; Lu, M. H.; Tang, D. P.; *Polyion oligonucleotide-decorated gold nanoparticles with tunable surface charge density for amplified signal output of potentiometric immunosensor*, *Anal Chim Acta* **2017**, *964*, 67.
94. Bhardwaj, S. K.; Sharma, A. L.; Bhardwaj, N.; Kukkar, M.; Gill, A. A.; Kim, K.-H.; Deep, A.; *TCNQ-doped Cu-metal organic framework as a novel conductometric immunosensing platform for the quantification of prostate cancer antigen*, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *240*, 10.

95. Pihikova, D.; Belicky, S.; Kasak, P.; Bertok, T.; Tkac, J.; *Sensitive detection and glycoprofiling of a prostate specific antigen using impedimetric assays*, *Analyst* **2016**, *141*, 1044.
96. Gutierrez-Zuniga, G. G.; Hernandez-Lopez, J. L.; *Sandwich-type ELISA impedimetric immunosensor for early detection of prostate-specific antigen (PSA) in human serum*, *Procedia Chem* **2014**, *12*, 47.
97. Uliana, C. V.; Peverari, C. R.; Afonso, A. S.; Cominetti, M. R.; Faria, R. C.; *Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker*, *Biosens Bioelectron* **2018**, *99*, 156.
98. Aizawa, M.; Morioka, A.; Suzuki, S.; Nagamura, Y.; *Enzyme immunosenser: Ill. Amperometric determination of human chericenic gonadotropin by membrane-bound antibody*, *Anal Biochem* **1979**, *94*, 22.
99. Vural, T.; Yaman, Y. T.; Ozturk, S.; Abaci, S.; Denkbaz, E. B.; *Electrochemical immunoassay for detection of prostate specific antigen based on peptide nanotube-gold nanoparticle-polyaniline immobilized pencil graphite electrode*, *J Colloid Interf Sci* **2018**, *510*, 318.
100. Torrente-Rodriguez, R. M.; Campuzano, S.; Ruiz-Valdepenas-Montiel, V.; Pedrero, M.; Fernandez-Acenero, M. J.; Barderas, R.; Pingarron, J. M.; *Rapid endoglin determination in serum samples using an amperometric magneto-actuated disposable immunosensing platform*, *J Pharmaceut Biomed* **2016**, *129*, 288.
101. Riccardi, C. D. S.; Costa, P. I. D.; Yamanaka, H.; *Amperometric immunosensor*, *Química Nova* **2002**, *25*, 316.
102. Cristea, C.; Florea, A.; Tertiş, M.; Săndulescu, R., Em *Immunosensors*; IntechOpen, 2015.
103. Dunford, H. B.; *Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties*, *Perozidasas in Chemistry and Biology* **1991**, *1*.
104. Aydin, S.; *A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA*, *Peptides* **2015**, *72*, 4.
105. Goyal, R. N.; Chatterjee, S.; Rana, A. R. S.; *A comparison of edge-and basal-plane pyrolytic graphite electrodes towards the sensitive determination of hydrocortisone*, *Talanta* **2010**, *83*, 149.
106. Tehrani, Z.; *Electrochemical Biofunctionalization of Highly Oriented Pyrolytic Graphite for Immunosensor Applications*, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* **2016**, *14*, 193.
107. Alvarez-Icaza, M.; Bilitewski, U.; *Mass production of biosensors*, *Anal Chem* **1993**, *65*, 525A.
108. Methrom/Dropsens, Screen-printed electrodes, 2019.
109. Proença, C. A.; Baldo, T. A.; Freitas, T. A.; Materón, E. M.; Wong, A.; Durán, A. A.; Melendez, M. E.; Zambrano, G.; Faria, R. C.; *Novel enzyme-free immunomagnetic microfluidic device based on Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄ for cancer biomarker detection*, *Anal Chim Acta* **2019**, *1071*, 59.

110. De Oliveira, R. A.; Materon, E. M.; Melendez, M. E.; Carvalho, A. L.; Faria, R. C.; *Disposable Microfluidic Immunoarray Device for Sensitive Breast Cancer Biomarker Detection*, *Acs Appl Mater Inter* **2017**, *9*, 27433.
111. Li, M. D.; Wang, P.; Pei, F. B.; Yu, H. X.; Dong, Y. H.; Li, Y. Y.; Liu, Q.; Chen, P.; *A novel signal amplification system fabricated immunosensor based on Au nanoparticles and mesoporous trimetallic PdPtCu nanospheres for sensitive detection of prostate specific antigen*, *Sensor Actuat B-Chem* **2018**, *261*, 22.
112. Ji, S.; Lee, M.; Kim, D.; *Detection of early stage prostate cancer by using a simple carbon nanotube@paper biosensor*, *Biosens Bioelectron* **2018**, *102*, 345.
113. Pal, M.; Khan, R.; *Graphene oxide layer decorated gold nanoparticles based immunosensor for the detection of prostate cancer risk factor*, *Anal Biochem* **2017**, *536*, 51.
114. Saha, B.; Songe, P.; Evers, T. H.; Prins, M. W.; *The influence of covalent immobilization conditions on antibody accessibility on nanoparticles*, *Analyst* **2017**, *142*, 4247.
115. Janegitz, B. C.; *Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro*, **2012**.
116. Dalla-Vecchia, R.; Da Graça Nascimento, M.; Soldi, V.; *Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros*, *Química Nova* **2004**, *27*, 623.
117. Guilbault, G. G.; Montalvo Jr, J. G.; *Urea-specific enzyme electrode*, *J Am Chem Soc* **1969**, *91*, 2164.
118. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*, *Enzyme Microb Tech* **2007**, *40*, 1451.
119. Grabarek, Z.; Gergely, J.; *Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters*, *Anal Biochem* **1990**, *185*, 131.
120. Staros, J. V.; *N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis (N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers*, *Biochemistry-U S* **1982**, *21*, 3950.
121. Anik, U.; Timur, S.; *Towards the electrochemical diagnosis of cancer: nanomaterial-based immunosensors and cytosensors*, *RSC Advances* **2016**, *6*, 111831.
122. Aydın, M.; Aydın, E. B.; Sezgintürk, M. K.; *A highly selective electrochemical immunosensor based on conductive carbon black and star PGMA polymer composite material for IL-8 biomarker detection in human serum and saliva*, *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *117*, 720.
123. Chikkaveeraiah, B. V.; Bhirde, A.; Malhotra, R.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F.; *Single-Wall Carbon Nanotube Forest Arrays for*

- Immunochemical Measurement of Four Protein Biomarkers for Prostate Cancer, Anal Chem* **2009**, *81*, 9129.
124. Sharafeldin, M.; Bishop, G. W.; Bhakta, S.; El-Sawy, A.; Suib, S. L.; Rusling, J. F.; *Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins, Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*, 359.
125. Hla, S. W.; *Graphene: Conductivity measurements pick up, Nat Nanotechnol* **2012**, *7*, 693.
126. Kim, H.; Abdala, A. A.; Macosko, C. W.; *Graphene/polymer nanocomposites, Macromolecules* **2010**, *43*, 6515.
127. Dreyer, D. R.; Ruoff, R. S.; Bielawski, C. W.; *From conception to realization: an historical account of graphene and some perspectives for its future, Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 9336.
128. Vilela, P.; El-Sagheer, A.; Millar, T. M.; Brown, T.; Muskens, O. L.; Kanaras, A. G.; *Graphene Oxide-Upconversion Nanoparticle Based Optical Sensors for Targeted Detection of mRNA Biomarkers Present in Alzheimer's Disease and Prostate Cancer, Acs Sensors* **2017**, *2*, 52.
129. Brodie, B. C.; *XIII. On the atomic weight of graphite, Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1859**, 249.
130. Almeida, C. G.; Trindade, T. N. D. S.; Silva, M. V. S. D.; Silva, L. A.; *Evaluation of the graphene oxide (GO) role in the photocatalytic generation of hydrogen in binary (GO-CDS) and ternary (Pt-GO-CdS) systems, Química Nova* **2018**, *41*, 748.
131. Wu, D.; Liu, Y. X.; Wang, Y. G.; Hu, L. H.; Ma, H. M.; Wang, G. Q.; Wei, Q.; *Label-free Electrochemiluminescent Immunosensor for Detection of Prostate Specific Antigen based on Aminated Graphene Quantum Dots and Carboxyl Graphene Quantum Dots, Sci Rep-Uk* **2016**, *6*.
132. Chen, D.; Feng, H.; Li, J.; *Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications, Chemical reviews* **2012**, *112*, 6027.
133. Campbell, F. W.; Compton, R. G.; *The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review, Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *396*, 241.
134. Welch, C. M.; Compton, R. G.; *The use of nanoparticles in electroanalysis: a review, Analytical and bioanalytical chemistry* **2006**, *384*, 601.
135. Penn, S. G.; He, L.; Natan, M. J.; *Nanoparticles for bioanalysis, Curr Opin Chem Biol* **2003**, *7*, 609.
136. Pingarrón, J. M.; Yañez-Sedeño, P.; González-Cortés, A.; *Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 5848.
137. Taleat, Z.; Ravalli, A.; Mazloun-Ardakani, M.; Marrazza, G.; *CA 125 Immunosensor Based on Poly-Anthranilic Acid Modified Screen-Printed Electrodes, Electroanal* **2013**, *25*, 269.
138. López, J.; González-Bahamón, L.; Prado, J.; Caicedo, J.; Zambrano, G.; Gómez, M.; Esteve, J.; Prieto, P.; *Study of magnetic and structural*

- properties of ferrofluids based on cobalt–zinc ferrite nanoparticles, Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2012**, 324, 394.
139. Liu, J.; Sun, Z.; Deng, Y.; Zou, Y.; Li, C.; Guo, X.; Xiong, L.; Gao, Y.; Li, F.; Zhao, D.; *Highly water-dispersible biocompatible magnetite particles with low cytotoxicity stabilized by citrate groups, Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48, 5875.
140. Donadel, K.; Felisberto, M. D.; Fávere, V. T.; Rigoni, M.; Batistela, N. J.; Laranjeira, M. C.; *Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer, Materials Science and Engineering: C* **2008**, 28, 509.
141. Biscay, J.; Garcia, M. B. G.; Garcia, A. C.; *Determination of Total PSA Using Magnetic Beads and a Re-usable Screen Printed Carbon Electrode Array, Electroanal* **2015**, 27, 2773.
142. Rashid, Z.; Soleimani, M.; Ghahremanzadeh, R.; Vossoughi, M.; Esmaeili, E.; *Effective surface modification of MnFe₂O₄@SiO₂@PMIDA magnetic nanoparticles for rapid and high-density antibody immobilization, Appl Surf Sci* **2017**, 426, 1023.
143. Otieno, B. A.; Krause, C. E.; Latus, A.; Chikkaveeraiah, B. V.; Faria, R. C.; Rusling, J. F.; *On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers, Biosensors and Bioelectronics* **2014**, 53, 268.
144. Mani, V.; Chikkaveeraiah, B. V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F.; *Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification, Acs Nano* **2009**, 3, 585.
145. Otieno, B. A.; Krause, C. E.; Latus, A.; Chikkaveeraiah, B. V.; Faria, R. C.; Rusting, J. F.; *On-line protein capture on magnetic beads for ultrasensitive microfluidic immunoassays of cancer biomarkers, Biosens Bioelectron* **2014**, 53, 268.
146. Volpe, G.; Draisci, R.; Palleschi, G.; Compagnone, D.; *3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study, Analyst* **1998**, 123, 1303.
147. Sharafeldin, M.; Bishop, G. W.; Bhakta, S.; El-Sawy, A.; Suib, S. L.; Rusling, J. F.; *Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins, Biosens Bioelectron* **2017**, 91, 359.
148. Chikkaveeraiah, B. V.; Mani, V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F.; *Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum, Biosens Bioelectron* **2011**, 26, 4477.
149. Koh, I.; Josephson, L.; *Magnetic nanoparticle sensors, Sensors-Basel* **2009**, 9, 8130.

150. Chikkaveeraiah, B. V.; Bhirde, A. A.; Morgan, N. Y.; Eden, H. S.; Chen, X.; *Electrochemical immunosensors for detection of cancer protein biomarkers, Acs Nano* **2012**, *6*, 6546.
151. Chikkaveeraiah, B. V.; Mani, V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F.; *Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum, Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 4477.
152. Duangkaew, P.; Tapaneeyakorn, S.; Apiwat, C.; Dharakul, T.; Laiwejpithaya, S.; Kanatharana, P.; Laocharoensuk, R.; *Ultrasensitive electrochemical immunosensor based on dual signal amplification process for p16(INK4a) cervical cancer detection in clinical samples, Biosens Bioelectron* **2015**, *74*, 673.
153. Wang, X.; Wang, Y.; Shan, Y.; Jiang, M.; Gong, M.; Jin, X.; Wang, X.; Cheng, J.; *An electrochemiluminescence biosensor for detection of CdkN2A/p16 anti-oncogene based on functional electrospun nanofibers and core-shell luminescent composite nanoparticles, Talanta* **2018**, *187*, 179.
154. Yang, L.; Huang, X.; Sun, L.; Xu, L.; *A piezoelectric immunosensor for the rapid detection of p16INK4a expression in liquid-based cervical cytology specimens, Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *224*, 863.
155. Topkaya, S. N.; Ozkan-Ariksoysal, D.; Kosova, B.; Ozel, R.; Ozsoz, M.; *Electrochemical DNA biosensor for detecting cancer biomarker related to glutathione S-transferase P1 (GSTP1) hypermethylation in real samples, Biosensors and Bioelectronics* **2012**, *31*, 516.
156. Benvidi, A.; Banaei, M.; Tezerjani, M. D.; Molahosseini, H.; Jahanbani, S.; *Impedimetric PSA aptasensor based on the use of a glassy carbon electrode modified with titanium oxide nanoparticles and silk fibroin nanofibers, Microchim Acta* **2018**, *185*.
157. Blel, N.; Fourati, N.; Souiri, M.; Zerrouki, C.; Omezzine, A.; Bouslama, A.; Othman, A.; *Ultrasensitive Electrochemical Sensors for PSA Detection: Related Surface Functionalization Strategies, Curr Top Med Chem* **2017**, *17*, 2913.
158. Kavosi, B.; Salimi, A.; Hallaj, R.; Amani, K.; *A highly sensitive prostate-specific antigen immunosensor based on gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded on MWCNTS/chitosan/ionic liquid nanocomposite, Biosens Bioelectron* **2014**, *52*, 20.
159. Kavosi, B.; Salimi, A.; Hallaj, R.; Moradi, F.; *Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy, Biosens Bioelectron* **2015**, *74*, 915.
160. Koukouvinos, G.; Petrou, P.; Misiakos, K.; Drygiannakis, D.; Raptis, I.; Goustouridis, D.; Kakabakos, S.; *A label-free flow-through immunosensor for determination of total-and free-PSA in human serum samples based on*

- white-light reflectance spectroscopy, Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, 209, 1041.
161. Zani, A.; Laschi, S.; Mascini, M.; Marrazza, G.; *A New Electrochemical Multiplexed Assay for PSA Cancer Marker Detection, Electroanal* **2011**, 23, 91.
 162. Xu, S. J.; Liu, Y.; Wang, T. H.; Li, J. H.; *Positive Potential Operation of a Cathodic Electrogenenerated Chemiluminescence Immunosensor Based on Luminol and Graphene for Cancer Biomarker Detection, Anal Chem* **2011**, 83, 3817.
 163. Ferreira, G. R.; Segura, T.; De Souza Jr, F. G.; Umpierre, A. P.; Machado, F.; *Synthesis of poly (vinyl acetate)-based magnetic polymer microparticles, European Polymer Journal* **2012**, 48, 2050.
 164. Mavani, K.; Shah, M.; *Synthesis of silver nanoparticles by using sodium borohydride as a reducing agent, International Journal of Engineering Research & Technology* **2013**, 2.
 165. Rusling, J. F.; Ito, K.; *Voltammetric determination of electron-transfer rate between an enzyme and a mediator, Anal Chim Acta* **1991**, 252, 23.
 166. Weichi, W.; Stéphanie, N.; Desmadril, M.; Guéguen, J.; Michon, T.; *Kinetic evidence for the formation of a Michaelis–Menten-like complex between horseradish peroxidase compound II and di-(N-acetyl-L-tyrosine), Biochemical Journal* **1999**, 340, 329.
 167. Molinari, J.; Moina, C.; Ybarra, G.; *Electrochemical immunosensor for the determination of β -casein, Journal of Electrochemical Science and Engineering* **2015**, 5, 9.
 168. Dos Santos Pires, M.; Nogueira, F. G.; Torres, J. A.; Lacerda, L. C.; Corrêa, S.; Pereira, M. C.; Ramalho, T. C.; *Experimental and theoretical study on the reactivity of maghemite doped with Cu 2+ in oxidation reactions: structural and thermodynamic properties towards a Fenton catalyst, RSC Advances* **2016**, 6, 80830.
 169. Zeng, Y.; Bao, J.; Zhao, Y.; Huo, D.; Chen, M.; Yang, M.; Fa, H.; Hou, C.; *A sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of cytokeratin 19 fragment antigen 21-1 based on 3D graphene with gold nanoparticle modified electrode, Talanta* **2018**, 178, 122.
 170. Kumar, S.; Sharma, J. G.; Maji, S.; Malhotra, B. D.; *Nanostructured zirconia decorated reduced graphene oxide based efficient biosensing platform for non-invasive oral cancer detection, Biosensors and Bioelectronics* **2016**, 78, 497.
 171. Tiwari, S.; Gupta, P. K.; Bagbi, Y.; Sarkar, T.; Solanki, P. R.; *L-cysteine capped lanthanum hydroxide nanostructures for non-invasive detection of oral cancer biomarker, Biosensors and Bioelectronics* **2017**, 89, 1042.