

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE BLUMENAU  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E EDUCAÇÃO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Camila Vitória Ineichen

**Imunossensor eletroquímico para detecção de câncer de mama usando nanopartículas de ouro e um filme eletropolimerizado de poli(fenazina-salen)**

Blumenau

2023

Camila Vitória Ineichen

**Imunossensor eletroquímico para detecção de câncer de mama usando nanopartículas de ouro e um filme eletropolimerizado de poli(fenazina-salen)**

Trabalho de Conclusão de Curso do Curso de Graduação em Bacharelado em Química do Campus de Blumenau da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Zapp

Coorientador: Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini

Blumenau

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ineichen, Camila Vitória

Imunossensor eletroquímico para detecção de câncer de mama usando nanopartículas de ouro e um filme eletropolimerizado de poli(fenazina-salen) / Camila Vitória Ineichen ; orientador, Eduardo Zapp, coorientador, Ismael Casagrande Bellettini , 2023.

68 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau,  
Graduação em Química - Bacharelado, Blumenau, 2023.

Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. Eletropolimerização. 3. Nanotubos de Carbono. 4. Imunossensor eletroquímico. 5. Câncer de mama. I. Zapp, Eduardo . II. Bellettini , Ismael Casagrande . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

Camila Vitória Ineichen

**Imunossensor eletroquímico para detecção de câncer de mama usando nanopartículas de ouro e um filme eletropolimerizado de poli(fenazina-salen)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Bacharelado em Química.

Blumenau, 29 de novembro de 2023.

Coordenação do Curso

**Banca examinadora**

Prof. Eduardo Zapp, Dr.

Orientador

Prof. José Wilmo da Cruz Junior, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Blumenau

Profa. Patrícia Bulegon Brondani, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Blumenau

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido e guiado meus caminhos com fé, saúde e perseverança até o final da graduação. Aos meus familiares, por todo apoio e incentivos prestados até aqui, vocês são meus maiores exemplos e os pilares de cada conquista desta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Zapp e coorientador Prof. Dr. Ismael Bellettini por todo conhecimento compartilhado, pelas disciplinas ministradas com dedicação e também pelo incentivo na pesquisa e estudo até então prestado. Agradeço pela confiança e oportunidade de realização deste projeto de iniciação científica voluntário, que com certeza foi muito importante para a minha compreensão e interesse na área de pesquisa e desenvolvimento em Química.

À banca examinadora Prof. Dr. José Wilmo da Cruz Júnior (UFSC) e Profa. Dr. Patrícia Bulegon Brondani (UFSC), por terem aceito fazer parte da banca avaliadora do presente trabalho e contribuírem com seus conhecimentos. Ao grupo do CReATE pelas trocas de estudo realizadas e também pela convivência com alunos e docentes membros deste excelente grupo de pesquisa da UFSC Blumenau.

Um agradecimento especial aos meus amigos que a graduação me proporcionou ter, Heloísa e Luciano, com certeza com vocês ao lado toda dificuldade e esforço valeram a pena. Também agradeço a todos os professores do curso de Bacharelado em Química da UFSC Blumenau pelas aulas ministradas e estímulo ao conhecimento até a finalização do curso e também no decorrer da vida profissional.

## RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo que em mulheres o câncer de mama é o mais incidente totalizando 2,3 milhões de casos novos a nível mundial em 2020, principalmente em mulheres entre 50 e 69 anos. Desta forma, estratégias de detecção precoce se fazem cada vez mais necessárias, como por exemplo o desenvolvimento de métodos de detecção do biomarcador HER2 (do inglês - *Human epidermal growth factor receptor 2*). Valores do antígeno HER2 acima de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  são considerados acima da normalidade, e o aumento do mesmo pode resultar em um pior prognóstico da paciente portadora. Diante do exposto, o desenvolvimento de dispositivos analíticos como biossensores, que agregam uma biomolécula com alta sensibilidade e especificidade a sua estrutura, conjuntamente a transdutores físico-químicos, podem fornecer medições bioanalíticas de maneira mais rápida e simplificada. Os imunossensores eletroquímicos são uma classe de biossensores comumente estudados para o diagnóstico de câncer de mama, nos quais a transdução realizada por um eletrodo, que emprega como bioreceptor anticorpos específicos, que são imobilizados com auxílio de diferentes materiais, como as nanopartículas metálicas. Por sua vez, o sinal de incubação do analito é obtido por um transdutor eletroquímico, através de medidas de inibição de corrente voltamétrica associada a uma sonda redox por voltametria de onda quadrada ou através da resistência do filme por espectroscopia de impedância eletroquímica. Visto que polímeros condutores podem modificar a superfície do eletrodo a partir da formação de filmes eletropolimerizados e nanocompósitos, neste trabalho realizou-se o estudo da eletropolimerização de um monômero derivado de uma base de Schiff à base de fenazina-salen ( $\text{NH}_2\text{-01}$ ), em que o centro fenazina é obtido a partir da formação de cátions radicais no processo de oxidação do monômero em potenciais próximos de  $0,9 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  na superfície de um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de nanotubos de carbono, resultando na formação do nanocompósito. A partir disto, essa superfície modificada foi empregada no desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para detecção do biomarcador associado ao câncer da mama, o HER2. Após formação do nanocompósito uma mistura de nanopartículas de ouro e anticorpos para HER2 foram imobilizadas sobre o eletrodo modificado, os sítios de ligação não específicos foram bloqueados com glicina. Sendo assim foi possível a construção de uma curva de calibração para HER2 nas concentrações de  $0,01$  a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , com um limite de detecção igual a  $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$ , considerando essa faixa suficiente para o diagnóstico de câncer de mama.

**Palavras-chave:** eletropolimerização, nanotubos de carbono, nanocompósito, nanopartículas metálicas, imunossensor eletroquímico, câncer de mama.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the second leading cause of death worldwide. In women, breast cancer is the most incident, totaling 2.3 million new cases globally in 2020, primarily in women aged 50 to 69. Consequently, early detection strategies become increasingly necessary. For example, the development of methods to detect the HER2 biomarker (Human epidermal growth factor receptor 2) is essential. HER2 antigen values above  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  are considered abnormal, and an increase in these values may result in a poorer prognosis for the patient. That said, the development of analytical devices such as biosensors, combining a biological element with high sensitivity and specificity with physical-chemical transducers, can provide bioanalytical measurements more quickly and simply. Electrochemical immunosensors, a class of biosensors commonly studied for breast cancer diagnosis, using a modified electrode as the transduction element. This electrode employs specific antibodies immobilized with the help of different materials, such as metallic nanoparticles. The analyte's incubation signal is obtained by an electrochemical transducer through measurements of voltammetric current inhibition associated with a redox probe by square wave voltammetry or through film resistance by electrochemical impedance spectroscopy. Conductive polymers can modify the electrode surface through electropolymerized film formation. In this study, electropolymerization of a Schiff base derived monomer based on phenazine-salen ( $\text{NH}_2\text{-01}$ ) was conducted. The phenazine center is obtained through the formation of radical cations in the monomer oxidation process at potentials near  $0.9 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  on the surface of a glassy carbon electrode modified with a carbon nanotube film, resulting in the formation of the nanocomposite. Subsequently, this modified surface was used in the development of an electrochemical immunosensor for the detection of the breast cancer-associated biomarker, HER2. After nanocomposite formation, a mixture of gold nanoparticles and HER2 antibodies was immobilized on the modified electrode, and non-specific binding sites were blocked with glycine. This allowed the construction of a calibration curve for HER2 in concentrations ranging from  $0.01$  to  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , with a limit of detection equal to  $0.25 \text{ ng mL}^{-1}$ . This range is considered sufficient for breast cancer diagnosis.

**Keywords:** electropolymerization, Carbon Nanotubes, nanocomposite, metallic nanoparticles, electrochemical immunosensor, Breast Cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Método diagnóstico para o câncer de mama.....	18
<b>Figura 2</b> – Estrutura do anticorpo representando a cadeia pesada (sítio de imobilização) e as cadeias leves (sítios de ligação ao antígeno).....	21
<b>Figura 3</b> – Representação de impedância no plano complexo de um sistema eletroquímico....	23
<b>Figura 4</b> – Estrutura da Base de Schiff do tipo salen.....	24
<b>Figura 5</b> – Ilustração esquemática da construção do imunossensor.....	32
<b>Figura 6</b> – Representação esquemática da obtenção do composto (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -salen.....	34
<b>Figura 7</b> – Espectro FT-IR para caracterização do monômero NH <sub>2</sub> -01.....	34
<b>Figura 8</b> – Voltamogramas para o 1º até 25º ciclo de varredura para a etapa de eletropolimerização de 0,5 mmol L <sup>-1</sup> do monômero (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -salen dissolvido em DMSO contendo 0,05 mol L <sup>-1</sup> de TBAPF <sub>6</sub> e 10% (v;v) de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Em um intervalo de potencial de -0,15 a 1,15 V vs. Ag/Ag <sup>+</sup> na velocidade de 100 mV s <sup>-1</sup> .....	36
<b>Figura 9</b> – Voltamograma cíclico do poli-NH <sub>2</sub> -01 em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de solução KCl (pH 2,0) a 100 mV s <sup>-1</sup> . Eletropolimerização: 25 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> sob atmosfera de argônio.....	37
<b>Figura 10</b> – Representação do processo redox atribuído ao par redox R <sup>1</sup> -NH-CR <sup>2</sup> /R <sup>1</sup> -N=C-R <sup>2</sup> ....	37
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática da formação do polímero a partir do monômero NH <sub>2</sub> -01 através do acoplamento nitrogênio – carbono formando filme de fenazina-salen.....	38
<b>Figura 12</b> – Espectros de impedância de poli(fenazina-salen) registrados em diferentes potenciais aplicados em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,00): -0,15 , +0,40 e 0,90 V vs. Ag/AgCl.....	39
<b>Figura 13</b> – Modelo de circuito equivalente proposto para os espectros de Nyquist dos filmes de poli(fenazina-salen) em potencial de -0,15 V, +0,40 V e 0,90 V (vs. Ag/AgCl).....	39
<b>Figura 14</b> – Voltamogramas cíclicos em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,0), com velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> , para o eletrodo modificado por eletropolimerização em concentração de 0,005, 0,05, 0,1 e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> do monômero (NH <sub>2</sub> )-01.....	41
<b>Figura 15</b> – Voltamogramas em solução de KCl 0,10 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,0) e atmosfera de argônio para os filmes formados com 25 ciclos de potenciais em velocidades de 25, 50 e 100 mV s <sup>-1</sup> em 5×10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de NH <sub>2</sub> -01.....	42
<b>Figura 16</b> – Voltamogramas para o 1º até 25º ciclo de potencial para a etapa de eletropolimerização de 0,5 mmol L <sup>-1</sup> do monômero (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -salen sob superfície de NTC/GCE para formação do nanocompósito. Em um intervalo de potencial de -0,15 a 1,15 V vs. Ag/Ag <sup>+</sup> na velocidade de 100 mV s <sup>-1</sup> .....	44

<b>Figura 17</b> – Voltamograma cíclico do NTC-poli-NH <sub>2</sub> -01 (0,5 mmol L <sup>-1</sup> ) em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de solução KCl (pH 2,0) a 100 mV s <sup>-1</sup> . Eletropolimerizado com 25 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> e atmosfera de argônio.....	45
<b>Figura 18</b> – Espectros de Nyquist do nanocompósito registrados em diferentes potenciais aplicados em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 2,00): -0,15, +0,40, e 0,90 V vs. Ag/AgCl.....	46
<b>Figura 19</b> – Modelo de circuito equivalente proposto para os espectros de Nyquist dos filmes de nanocompósito em potencial de -0,15, +0,40 e 0,90 V vs. Ag/AgCl.....	46
<b>Figura 20</b> – Coloração das AuNPs dispersas (A) e Mistura das AuNPs com abHER2 (B).....	48
<b>Figura 21</b> – Espectros de absorção das suspensões de AuNPs antes e após a imobilização de abHER2.....	48
<b>Figura 22</b> – (A) Representação esquemática do princípio de funcionamento do imunossensor. (B) Perfis voltamétricos de onda quadrada na ausência (pico base) e presença de HER2 0,1 ng mL <sup>-1</sup> .....	50
<b>Figura 23</b> – Voltamogramas de onda quadrada em solução de tampão PBS contendo K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ](5 mmol L <sup>-1</sup> ) após cada etapa de modificação do eletrodo: (a) GCE, (b) NTC/GCE,(c) poli-(NH <sub>2</sub> -01):NTC/GCE, (d) abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE, (e)glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE,(f) HER2/Glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01) NTC/GCE.....	51
<b>Figura 24</b> – Voltamogramas cíclicos em solução de tampão PBS contendo K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (5 mmol L <sup>-1</sup> ) após cada etapa de modificação do eletrodo: (a) GCE, (b) NTC/GCE, (c) poli-(NH <sub>2</sub> -01):NTC/GCE, (d) abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE, (e) glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE, (f) HER2/Glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE.....	52
<b>Figura 25</b> – Espectro de impedância eletroquímica em solução de tampão PBS contendo K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] (5 mmol L <sup>-1</sup> ) após cada etapa de modificação do eletrodo: (a) GCE, (b) NTC/GCE, (c) poli-(NH <sub>2</sub> -01):NTC/GCE, (d) abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE, (e) glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE, (f) HER2/Glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)-NTC/GCE.....	53
<b>Figura 26</b> – Modelo de circuito equivalente proposto para os espectros de Nyquist na construção do imunossensor em potencial de circuito aberto (OCP).....	53
<b>Figura 27</b> – Parâmetros de otimização das medidas de SWV em Frequência (a), Incremento (b) e Amplitude (c).....	55
<b>Figura 28</b> – Efeito da concentração de anticorpo para formação do imunocomplexo.....	56

<b>Figura 29</b> – Efeito do tempo de incubação de HER2 ( $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) na resposta analítica do imunossensor.....	57
<b>Figura 30</b> – Análise dos possíveis compostos interferentes ao imunossensor.....	58
<b>Figura 31</b> – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em: (a) PBS (pico base) contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e após incubação do imunossensor com: (b) $0,01$ , (c) $0,1$ , (d) $1,0$ , (e) $10,0$ e (f) $100,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de HER2. (B) Curva de calibração para o imunossensor proposto na faixa de $0,01$ a $100 \text{ ng mL}^{-1}$ de HER2 ( $n = 3$ ).....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de resistência total ( $R_t$ ) para o filme formado de poli(fenazina-salen).....	40
<b>Tabela 2</b> – Comportamento eletroquímico em solução aquosa para os filmes poliméricos obtidos em diferentes concentrações do monômero.....	41
<b>Tabela 3</b> – Comportamento eletroquímico em solução aquosa para os filmes poliméricos obtidos em diferentes velocidades de deposição do monômero.....	43
<b>Tabela 4</b> – Valores de resistência total ( $R_t$ ) e da capacitância ( $CPE_{\text{filme}}$ ) para o filme formado de nanocompósito.....	47
<b>Tabela 5</b> – Valores de resistência total ( $R_t$ ) e do OCP para cada filme modificado na superfície do GCE.....	54
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros analíticos de desempenho do imunossensor proposto para a análise de HER2.....	60
<b>Tabela 7</b> – Valores de HER2 obtidos na determinação de soluções em soro sanguíneo simulado.....	60
<b>Tabela 8</b> – Comparação com outros Imunossensores eletroquímicos propostos para detecção de HER2. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

abHER2 – anticorpo HER2

Ag/AgCl - eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

AuNPs - Nanopartículas de Ouro

BSA - Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumin)

$CPE_{dl}$  – Capacitância de dupla camada elétrica

CV – Voltametria Cíclica, do inglês *Cyclic Voltammetry*

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EIS - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

$E_{pa}$  – Potencial de pico anódico

$E_{pc}$  – Potencial de pico catódico

FTIR - Espectroscopia de infravermelho

GCE – eletrodo de Carbono Vítreo, do inglês *Glassy carbon electrode*

INCA - Instituto Nacional de Câncer

$I_{pa}$  – Corrente de pico anódico

$I_{pc}$  – Corrente de pico catódico

$K_3[Fe(CN)_6]$  - Hexacianoferrato (III) de potássio

LOD – Limite de Detecção

NTC – Nanotubo de Carbono

PBS – tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

$R_{\Omega}$  – resistência da solução

$R_{filme}$  – resistência do filme

$R_t$  – resistência total

SWV – voltametria de onda quadrada, do inglês *Square Wave Voltammetry*

TBAPF<sub>6</sub> - Hexafluorofosfato de tetrabutilamônio

$-Z''$  - impedância imaginária

$Z'$  - impedância real

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1. CÂNCER DE MAMA.....	16
2.2. BIOMARCADORES.....	18
2.3. BIOSSENSORES.....	19
2.4. MATERIAIS APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES.....	23
<b>2.4.1. Utilização de polímeros condutores em biossensores.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2. Aplicação de nanomateriais em biossensores.....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	27
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	27
<b>4.1.1. Reagentes e amostras biológicas.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1.2. Síntese e caracterização do composto poli-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(fenazina-salen).....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.3 Nanotubo de carbono (NTC).....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.4. Síntese e caracterização das Nanopartículas de Ouro (AuNPs).....</b>	<b>29</b>
4.2. EQUIPAMENTOS E MEDIDAS.....	29
<b>4.2.1 Eletropolimerização do filme de poli-(NH<sub>2</sub>-01).....</b>	<b>29</b>
4.3. DESENVOLVIMENTO DO IMUNOSSENSOR.....	30
<b>4.3.1 Construção e aplicação do imunossensor.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3.2 Otimização do funcionamento do sensor.....</b>	<b>32</b>
4.3.2.1 Quantidade de anticorpo.....	32
4.3.2.2 Tempo de incubação do antígeno.....	32
4.3.2.3 Interferentes.....	33
4.3.2.4 Reprodutibilidade.....	33
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
5.1 PROPRIEDADES DO COMPOSTO DE POLI FENAZINA-SALEN (NH <sub>2</sub> -01).....	33
<b>5.1.1. Síntese e caracterização do monômero.....</b>	<b>33</b>
5.2. ENSAIOS ELETROQUÍMICOS REFERENTES A FUNCIONALIZAÇÃO DO GCE COM POLI-NH <sub>2</sub> 01.....	35
<b>5.2.1. Eletropolimerização do NH<sub>2</sub>-01.....</b>	<b>35</b>

<b>5.2.2. Otimização da formação do filme de poli-(NH<sub>2</sub>-01).....</b>	<b>40</b>
5.2.2.1 Estudo da concentração do monômero.....	40
5.2.2.2 Velocidade de eletropolimerização do monômero.....	41
5.3. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO COM NANOTUBO DE CARBONO..	43
5.4. ESTRUTURAÇÃO DOS ELETRODOS E CONSTRUÇÃO DA FASE BIOSSENSORA.....	47
<b>5.4.1. Caracterização das Nanopartículas de Ouro.....</b>	<b>47</b>
5.5. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO IMUNOSENSOR.....	49
<b>5.5.1 Caracterização por CV, SWV e EIS das superfícies modificadas.....</b>	<b>50</b>
5.6. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CONSTRUÇÃO E OPERAÇÃO DO IMUNOSENSOR.....	54
<b>5.6.1. Otimização dos parâmetros da SWV.....</b>	<b>55</b>
<b>5.6.2. Imobilização e otimização da concentração do anticorpo.....</b>	<b>55</b>
<b>5.6.3. Otimização do tempo de incubação do antígeno.....</b>	<b>56</b>
<b>5.6.4. Análise de possíveis interferentes.....</b>	<b>57</b>
<b>5.6.5. Estudo da repetibilidade do imunossensor.....</b>	<b>58</b>
5.7. CURVA DE CALIBRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE HER2.....	58
<b>5.7.1. Curva de Calibração.....</b>	<b>58</b>
<b>5.7.2 Determinação de HER2.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>7. ESTUDOS FUTUROS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama se caracteriza por uma divisão celular desordenada em tecidos do organismo que resultam em células tumorais, por exemplo no tecido mamário. O número de mulheres diagnosticadas com câncer está cada vez maior, no Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que no Brasil entre os anos de 2023 a 2025 sejam diagnosticados 73.610 novos casos de câncer de mama, sendo estimados 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres, sendo na região Sudeste e Sul as regiões com maior estimativa de incidência (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

Ademais, a detecção precoce do câncer de mama é de suma importância para o tratamento eficaz, pois aumenta a possibilidade de tratamentos menos invasivos e agressivos. Os atuais diagnósticos proeminentes são o exame clínico, exame de imagem e análise histopatológica. No entanto, sabe-se que a detecção de biomarcadores, estão relacionados aos parâmetros de desregulação em fluidos biológicos como plasma, urina ou até mesmo tecidos invasivos no corpo humano, como células tumorais (Amorim, 2003). Um biomarcador relacionado aos tecidos mamários tumorais é o HER2 cujo o *cutoff* (valor limite) estabelecido é de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  (Shamshirian *et al.*, 2020). Para detecção de mulheres portadoras do mesmo um dos métodos é a presença da proteína HER-2 no soro que pode ser quantificada pelo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Nelson; Cox, 2014).

Com isso, atualmente estuda-se como alternativa clínica, o uso de biossensores como método correto e rápido, como por exemplo os biossensores eletroquímicos, que tem respostas analíticas obtidas por meio do bioreconhecimento de um analito, que é a substância de interesse (Ex.: proteína) da amostra em questão, tal processo ocorre por intermédio de uma superfície de um transdutor, que identifica e transforma essa interação em um sinal mensurável, que é enviado ao transdutor eletroquímico (Bezerra *et al.*, 2019). Quando deseja-se um imunodiagnóstico, os mesmos são classificados como imunossensores, e são compostos por um sistema imunocomplexo (anticorpo/antígeno) como biorreceptor (PerumaL; Hashim, 2014). O imunocomplexo utiliza a capacidade do anticorpo de se ligar especificamente ao antígeno, por meio de efeitos cumulativos de interações fracas, como forças de van der Waals, ligação de hidrogênio ou até mesmo atração eletrostática.

Imunossensores eletroquímicos baseiam-se na medida de corrente gerada pelas reações de oxidação e redução nas superfícies modificadas de eletrodos, estando as mesmas correlacionadas com a concentração de espécies eletroativas já presentes ou com sua taxa de produção, interligando com o reconhecimento do alvo e analito proporcionalmente à sua concentração (Goud *et al.*, 2019). Isso posto, objetivou-se desenvolver um imunossensor eletroquímico para detecção do biomarcador associado ao câncer da mama, o HER2, a partir de um elemento de transdução eletroquímico que será modificado com um nanocompósito à base de nanotubos de carbono e o polímero eletrosintetizado de fenazina-salen, capaz de amplificar a resposta voltamétrica da sonda redox. Essa superfície modificada foi empregada na imobilização do anticorpo (abHER2), visando a obtenção de medidas eletroanalíticas proporcionais à quantidade do antígeno, a partir da exposição do imunossensor a uma amostra contendo HER2.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CÂNCER DE MAMA

O Câncer manifesta-se em organismos humanos devido a divisão celular desordenada, podendo ser gerada por agentes externos e também fatores hereditários, que sempre requer uma sequência organizada de eventos bioquímicos. Caracteriza-se por um defeito genético causado pela perturbação no equilíbrio de formação e destruição celular, dessa forma intercorrências nas proteínas de regulação podem gerar um tumor, e quando o mesmo interfere no funcionamento dos tecidos do organismo humano pode-se diagnosticar o câncer (Nelson; Cox, 2014).

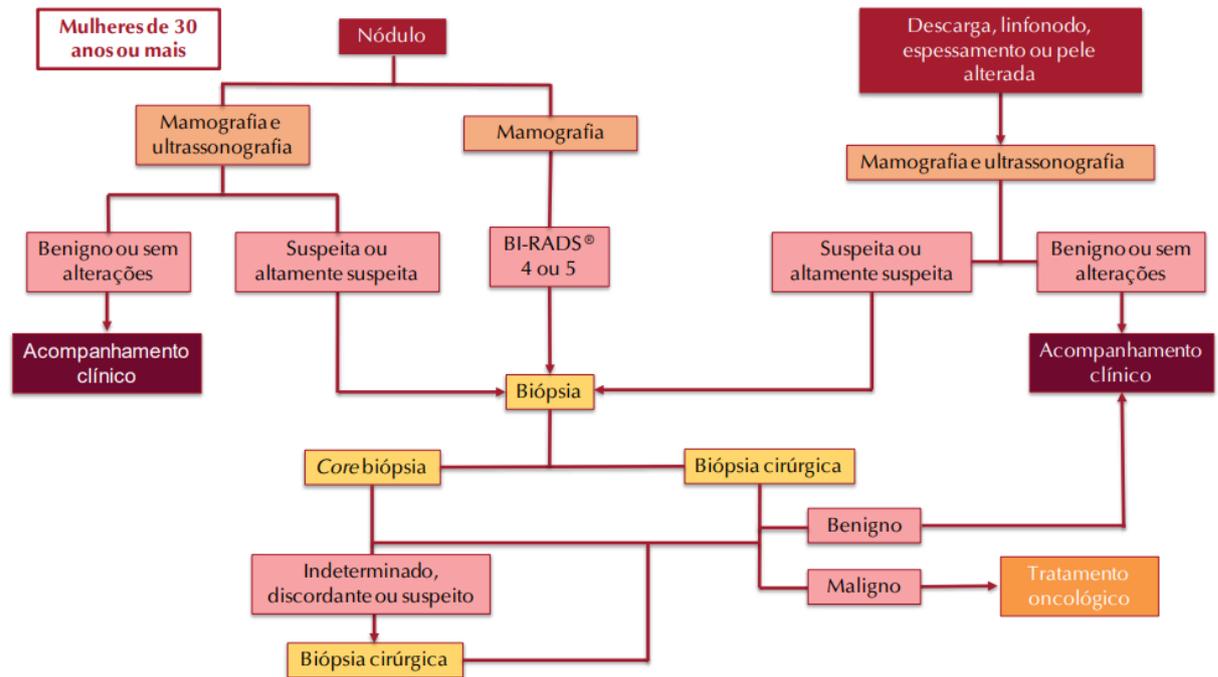
A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o câncer como a segunda principal causa de morte no mundo, tendo ocasionado 9,6 milhões de mortes em 2018. Além disso, dados mais recentes obtidos pelo Observatório Global do Câncer (Globocan - *Global Cancer Observatory*), elaborados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*Iarc - International Agency for Research on Cancer*), revelam que em 2020 houve 19,3 milhões de casos novos de câncer, sendo o câncer de mama com 2,3 milhões (11,7%), tornando o mesmo o mais comum entre as mulheres e o mais incidente (International Agency for Research on Cancer, 2020).

Por sua vez, em âmbito nacional o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que no Brasil entre os anos de 2023 a 2025 sejam diagnosticados 73.610 novos casos de câncer de

mama, sendo estimados 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres, sendo Sudeste e Sul as regiões com maior estimativa de incidência. Em termos de mortalidade, o câncer de mama é a primeira causa de morte por câncer, em todas as regiões brasileiras, exceto a região Norte. No ano de 2020 foram registrados 17.825 óbitos por câncer de mama, índice crescente desde o ano de 1979, sendo as mais elevadas taxas de mortalidade entre mulheres de 50 a 69 anos (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

O agravamento do câncer pode ser evitado com a detecção precoce, que aumenta a possibilidade de tratamentos menos invasivos e agressivos. As alternativas de diagnóstico utilizadas atualmente são o exame clínico, exame de imagem e análise histopatológica como representado na Figura 1. O exame clínico consiste na avaliação da possível presença de nódulos ou suspeita alteração física nas mamas, de modo que um diagnóstico por imagem (ultrassonografia, mamografia ou ressonância magnética) auxilia na confirmação da presença de células tumorais e confirma a necessidade de dar sequência a investigação. Por fim, a biópsia é um método invasivo que visa analisar as características histopatológicas e imuno-histoquímicas do suposto tumor, possibilitando o planejamento e o tipo de tratamento ao paciente, podendo confirmar casos malignos ou benignos que relacionam-se com a gravidade e a possível presença do processo de metástase celular (Instituto Nacional de Câncer, 2022).

Figura 1 – Método diagnóstico para o câncer de mama.



Fonte: INCA (2022).

## 2.2. BIOMARCADORES

As mudanças ocorrentes no organismo, tal como desenvolvimentos patogênicos ou qualquer outra alteração bioquímica e biológica está correlacionada com os biomarcadores, os quais relacionam e determinam os parâmetros desregulados em fluidos biológicos como plasma, urina ou até mesmo tecidos invasivos no corpo humano, como células tumorais (Amorim, 2003). Os biomarcadores também podem ser um tipo de indicador de respostas a processos farmacológicos e terapêuticos a uma condição de doença (Cervantes-Díaz; Piña-Sánchez; Leal-Herrera, 2020).

Relacionados à aplicação em câncer, os biomarcadores tumorais podem ser utilizados na prevenção, de modo que o diagnóstico possa estabelecer a gravidade do tumor presente, bem como monitorar o estado da doença em pacientes já portadores de câncer, e assim detectar recorrências. O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 - do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*) é um biomarcador localizado na membrana das células epiteliais, sendo essa proteína responsável por controlar o crescimento e desenvolvimento de várias células epiteliais, dessa forma a superexpressão da proteína, que pode ser determinada por imuno-histoquímica, pode influenciar o desenvolvimento do câncer de mama (Cervantes-Díaz; Piña-Sánchez; Leal-Herrera, 2020). Para Page e colaboradores (2017) mesmo em uma proporção relativamente pequena em estágio inicial de HER2 exibe um

aumento no número de cópias de gene HER2, e o desfalque em cópias de cromossomo 17, uma vez que o gene está localizado no braço longo do cromossomo 17.

Tendo em vista que o domínio extracelular do receptor de HER2 pode sofrer clivagem proteolítica e ser liberado como HER2 circulante na corrente sanguínea, a presença da proteína HER-2 no soro pode ser notada e quantificada por métodos imunoenzimáticos, sendo um deles o ensaio imunossorvente ligado à enzima ELISA, o qual realiza triagem rápida da quantidade de um antígeno em uma amostra específica, sendo as mesmas adsorvidas em uma superfície inerte. O sistema é baseado na aplicação então de um anticorpo primário (contra proteína de interesse) e de um anticorpo secundário interligado com uma enzima catalisadora, que catalisa uma reação de produto monitorado pela intensidade da cor proporcional a amostra da proteína de interesse (Nelson; Cox, 2014). Segundo Couto e colaboradores (2011), o nível sérico acima do superior desta proteína ( $15 \text{ ng mL}^{-1}$ ) são considerados acima da normalidade e com aumento do mesmo pode haver um pior prognóstico da paciente portadora, esta concentração encontrada em torno de 50-60% de portadores de câncer de mama com metástase.

Para detecção de mulheres portadoras do biomarcador HER2 em concentração acima de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  há a imunohistoquímica da expressão do receptor HER2 e demonstração da amplificação do respectivo gene por hibridização *in situ* por medidas de fluorescência (FISH) sendo os mesmos invasivos a nível do tecido tumoral (Carney, 2007). Além destes, podem ser utilizados como alternativa clínica, imunossensores não invasivos, como por exemplo os imunossensores eletroquímicos, que tem respostas analíticas obtidas por meio do bioreconhecimento de um analito (A), que é a substância de interesse (Ex.: proteína) da amostra em questão, tal processo ocorre por intermédio de uma superfície de um transdutor, que identifica e transforma essa interação em um sinal mensurável, o qual é enviado ao detector eletroquímico (Bezerra *et al.*, 2019).

### 2.3. BIOSSENSORES

Os biossensores podem ser amplamente utilizados em diversas áreas tais como médica, bioquímica e alimentícia (Turner, 2013). Eles são instrumentos analíticos que agregam uma biomolécula a sua estrutura, de tal forma que sua sensibilidade e especificidade são extensões das propriedades das mesmas, que conjuntamente com transdutores físico-químicos fornecem medições bioanalíticas de maneira simplificada e de fácil utilização. Leyland C. Clark em 1962 desenvolveu a ideia de que uma detecção eletroquímica de oxigênio poderia ser utilizada em

dispositivos bioanalíticos, através da imobilização de enzimas apropriadas, por exemplo pela glicose oxidase em um eletrodo de platina como detector de glicose em pessoas diabéticas.

De acordo com Perumal e Hashim (2014), os componentes principais de um biossensor são o biorreceptor e o transdutor. Um biorreceptor específico ou fator de bioreconhecimento é o que classifica o sensor como biossensor podendo ser enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos entre outros. Os biorreceptores geralmente são incorporados ao sistema através de um método de imobilização, com auxílio de diferentes materiais, como nanopartículas metálicas (Ex.: ouro, prata, platina), nanomateriais a base de carbono (Ex.: grafeno, nanotubos), polímeros e biopolímeros (Ex.: celulose, quitosana) entre outros. Por outro lado, o transdutor é considerado um conversor de sinal, onde o sinal bioquímico é convertido em um sinal elétrico mensurável, o sinal bioquímico por sua vez é resultante de mudanças químicas ocorridas entre a reação do analito com o biorreceptor. Com isso, considera-se essencial a seletividade e sensibilidade do biorreceptor em relação ao analito alvo específico (Goud *et al.*, 2019).

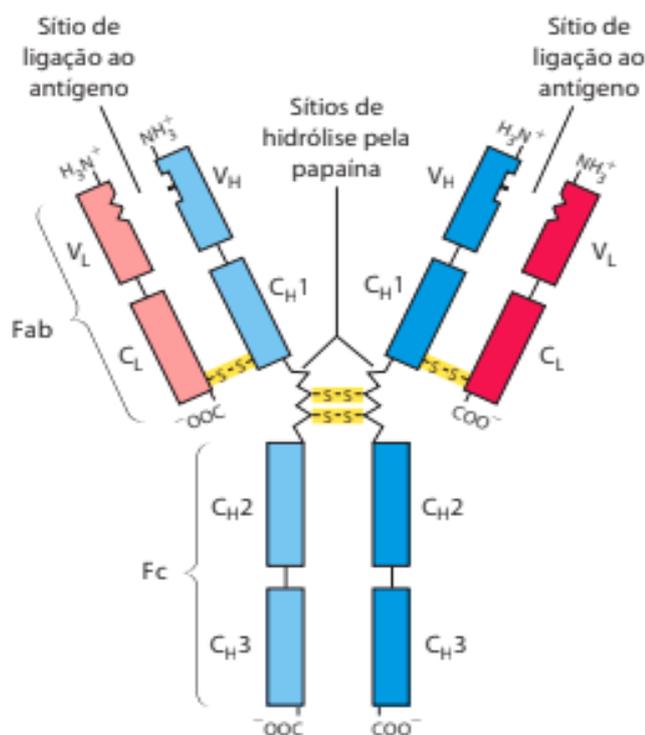
Os biossensores importantes até os dias atuais que possibilitam um imunodiagnóstico, são classificados como imunossensores, os quais são compostos por um sistema imunocomplexo (anticorpo/antígeno) como biorreceptor (Perumal; Hashim, 2014). O imunocomplexo utiliza a capacidade do anticorpo de se ligar ao antígeno, que ocorre por meio de efeitos cumulativos de interações fracas sendo forças de van der Waals, ligação de hidrogênio ou até mesmo atração eletrostática podendo ser então um processo reversível. Dessa forma, os anticorpos se ligam aos antígenos de maneira específica, sendo esta determinada pelos resíduos de aminoácidos presentes nos domínios proteicos do anticorpo (Nelson; Cox, 2014).

O anticorpo é uma proteína especializada encontrada no centro da resposta imune hormonal, a qual gera uma resposta sinalizadora a infecções bacterianas, vírus extracelulares e proteínas distintas e invasoras. A produção de anticorpo no organismo humano é de mais de 108 anticorpos com especificidades diferentes de ligações, por isso a sua grande importância mediante a presença de células prejudiciais à saúde, pois há uma grande chance de reconhecimento e interação das mesmas com os anticorpos (Nelson; Cox, 2014).

A obtenção de uma resposta imune depende de qualquer molécula ou patógeno (antígeno) podendo ser um vírus, uma parede bacteriana ou uma proteína isolada. Abundantemente no soro humano os anticorpos são formados por quatro cadeias polipeptídicas sendo duas pesadas e duas cadeias menores e leves unidas por ligações não covalentes e de ligações dissulfeto, gerando uma molécula de elevada massa molar, sendo os fragmentos

responsáveis pela ligação ao antígeno Fab (do inglês *fragment antigen-bindin*). A molécula em formato de Y é devido às cadeias pesadas interagirem em uma das extremidades e realizarem uma ramificação para a interação separada com as cadeias leves, resultando em dois sítios de ligação ao antígeno, como representado na Figura 2 (Nelson; Cox, 2014).

Figura 2 – Estrutura do anticorpo representando a cadeia pesada (sítio de imobilização) e as cadeias leves (sítios de ligação ao antígeno).



Fonte: Nelson e Cox (2014).

Os métodos de detecção de transdução em imunossensores geralmente podem ser ópticos ou eletroquímicos. O óptico considera diversos tipos de espectroscopia, como de absorção, fluorescência, fosforescência, Raman, refração e dispersão, sendo a fluorescência que é integrada com fibra óptica o método mais utilizado para o biossensoriamento óptico. Estes usam ondas eletromagnéticas para detectar alterações quando o analito sofre interação como elemento de bioreconhecimento, visto que o biossensor induzirá alterações no índice de refração medido (Perumal; Hashim, 2014).

Quando o sensor é eletroquímico há um eletrodo usado como elemento de transdução, sendo classificado como um dispositivo integrado autônomo que fornece informações analíticas quantitativas ao se utilizar um elemento de reconhecimento biológico mantido em contato com o eletrodo. Os mesmos partem de uma medida de corrente gerada pelas reações de oxidação e

redução, podendo a mesma estar correlacionada com a concentração de espécies eletroativas já presentes ou com sua taxa de produção, interligando com o reconhecimento do alvo e analito proporcionalmente à sua concentração (Goud *et al.*, 2019). Os tipos de imunossensores eletroquímicos podem ser: amperométricos, potenciométricos, impedimétricos e condutimétricos (Perumal; Hashim, 2014).

As técnicas de voltametria são amplamente utilizadas podendo ser a voltametria cíclica (CV), em que há o varrimento de potencial com o tempo, conduzindo à ocorrência de reações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas na solução e podendo assim, registrar mudanças nas características da superfície do eletrodo. As voltametrias de pulso, como a voltametria de onda quadrada (SWV) que pode ser utilizada para registrar a resposta do sensor eletroquímico havendo corrente medida em um potencial correspondente à região de corrente limitada por transporte de massa. Assim, um processo que ocorre em um sensor eletroquímico é uma reação heterogênea que acontece apenas na interface eletrodo-eletrólito, de maneira que se considera a transferência de massa que ocorre para o eletrodo e também gera efeitos na superfície do mesmo, havendo taxas de reação descritas pelas espécies eletroativas do analito que são trazidas à superfície ( $v_{mt}$ ), pela Equação 1 (Bard; Faulkner, 2001).

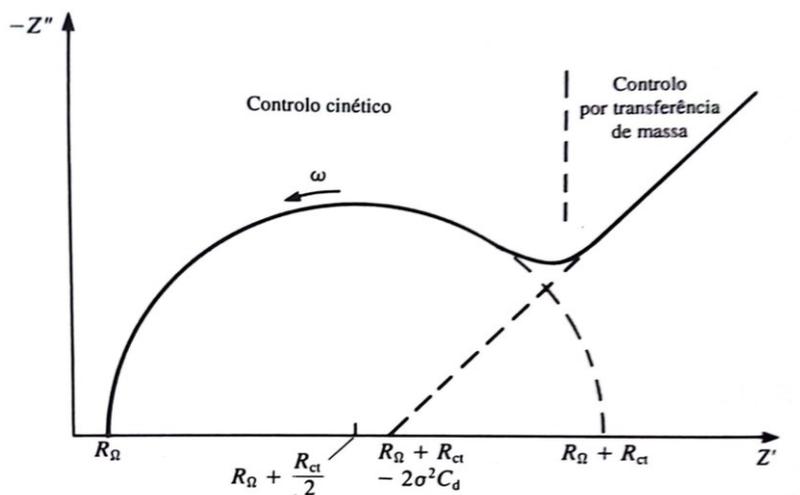
$$I = n \cdot F \cdot A \cdot v_{mt} \quad (1)$$

Sendo a corrente observada (I), o número de elétrons envolvidos no processo, área do eletrodo utilizado (A), constante de Faraday (F) e o fluxo de moléculas de analito ( $v_{mt}$ ).

Os métodos de impedância também são importantes para estudos de modificações superficiais em eletrodos através de uma perturbação aplicada que permite a análise dos processos de difusão, da cinética envolvida, da dupla camada e das reações acopladas. Podendo ser aplicadas em estudos de corrosão, de membranas, de sólidos iônicos, de eletrólitos e também polímeros condutores (Brett; Brett, 1996). A análise da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) envolve um circuito elétrico equivalente que contém as combinações de resistências e capacitâncias, sendo componentes que representam a impedância no processo Faradaico ( $Z_f$ ), a resistência não compensada ( $R_\Omega$ ) que é a resistência da solução entre o eletrodo de trabalho e o de referência, a capacitância da dupla camada ( $C_d$ ) e também pode haver uma impedância que mede a dificuldade de transporte de massa das espécies eletroativas ( $Z_w$ ), a impedância de Warburg.

Os gráficos de impedância (diagrama de “Nyquist”) como demonstrado na Figura 3 são obtidos por uma curva do negativo da impedância imaginária ( $-Z''$ ) em função da impedância real ( $Z'$ ) através da amplitude de um potencial aplicado.

Figura 3 – Representação de impedância no plano complexo de um sistema eletroquímico.



Fonte: Brett e Brett (1996).

O diagrama de “Nyquist” é caracterizado como uma série de pontos com cada um em uma frequência que representam a grandeza e a direção do vetor de impedância, dessa forma o plano complexo é dito como real imaginário em que na abscissa encontra-se a parte real (resistividade) e na parte imaginária (termos capacitivos) (Ribeiro; Souza; Abrantes, 2015).

## 2.4. MATERIAIS APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES

### 2.4.1. Utilização de polímeros condutores em biossensores

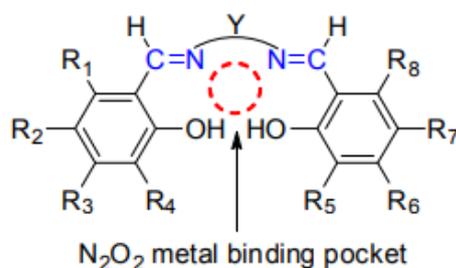
Materiais orgânicos bem como os polímeros condutores possuem características como ligações alternadas simples ( $\sigma$ ) e duplas ( $\pi$ ) e estes sistemas conjugados conferem propriedades ópticas, eletroquímicas e eletrônicas inerentes. Além disso, possuem vantagens como baixa densidade, flexibilidade e resistência à corrosão frente aos materiais inorgânicos (Le; Kim; Yoon, 2017).

A característica condutora de polímeros empregados em biossensores tem vantagens benéficas como formação de uma alta área superficial que aumenta as interações entre os fatores de bioreconhecimento e analitos, levando a maior sensibilidade e pequenas dimensões que facilitam a cinética de adsorção dos analitos ao materiais. Grupos funcionais como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$  podem interagir com os sítios doadores (centros metálicos) com a presença do sistema  $\pi$  conjugado, de forma a apresentar boa condutividade redox e eletrônica sendo aqueles

que contém átomos de Nitrogênio destaques em polímeros condutores, por exemplo o polipirrol (PPy), polianilina (PANI) que contém átomos de nitrogênio nos anéis heterocíclicos, os quais são responsáveis pela inserção de prótons ou ânions para formar cátions radicais e favorecer a eletropolimerização. Estes polímeros condutores podem ser obtidos através de eletropolimerização em eletrodos, a qual envolve uma redução subsequente de íons metálicos depositados, partidos de uma solução polimérica para um substrato eletricamente condutor (Le; Kim; Yoon, 2017).

Ademais, polímeros condutores obtidos por meio de moléculas de fenazina estão intimamente relacionados com o transporte de carga mediadas por centros redox do mesmos, de modo que os mecanismos de eletropolimerização envolvem a interação entre cátions radicais formados pela oxidação do monômero em elevados potenciais acima de 0,9 V. Compostos de Base de Schiff são caracterizadas pela presença de iminas, sendo uma classe de Base de Schiff a do salen (N,N-etilenobissalicilidenoamina) como representada na Figura 4. Complexos a base de Schiff apresentam grande potencialidade para formação de filmes poliméricos condutores, visto que podem apresentar centros metálicos doadores (por exemplo o Níquel) e unidades redox deslocalizadas em um sistema  $\pi$  conjugado baseado no ligante (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020).

Figura 4 – Estrutura da Base de Schiff do tipo salen.



Fonte: Adaptado de Anselmo (2013).

Para Chepurnaya e colaboradores (2020), as vantagens na utilização de polímeros metal-salen por exemplo, é o fato de serem compostos de síntese fácil, apresentam atividade eletroquímica para o fornecimento correspondente entre os potenciais redox do polímero e outros compostos do sistema, além da alta estabilidade e elevada condutividade e taxas de transferência de carga. Dentre isso, o método característico de acoplamentos de bases de Schiff com substituintes NH<sub>2</sub> é que pode haver a formação de polímero com ligação azo ou fenazinas através de acoplamento -C-N-, nos quais os mesmos podem ser responsáveis pela

eletropolimerização ocorrente que inicia com a oxidação do monômero e resulta em um cátion radical, o qual desencadeia a polimerização (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020).

Considera-se também por isso o desenvolvimento de nanocompósitos de polímeros condutores contendo nano espécies de carbono, como grafeno, nanofibras de carbono e nanotubos de carbono (NTC), as quais melhoram a ordem estrutural das cadeias poliméricas condutoras e facilitam a deslocalização dos portadores de carga (Park *et al.*, 2014). Para formação de dispersão de nanotubos de carbono é importante o estudo de estabilidade dos mesmos, de modo que seja evitada a coalescência de NTCs a partículas maiores, causada por interações eletrostáticas e interações  $\pi$ - $\pi$  entre elas, por isso pode-se empregar a técnica de oxidação da superfície das nanopartículas para aumentar a dispersibilidade das mesmas nos solventes polares selecionados e também para atingir um estado de dispersão estável de nanotubo. A desmontagem dos feixes de NTCs necessita uma quantidade de energia externa para diminuir os tamanhos das partículas e aumentar a área superficial, sendo muito utilizada a energia ultrassônica que favorece a aplicação das mesmas (Gao *et al.*, 2023).

#### **2.4.2. Aplicação de nanomateriais em biossensores**

A nanotecnologia aplicada em processos de construção de dispositivos biomédicos consiste no uso de nanomateriais com partículas de menos de 100 nm, os quais podem auxiliar no diagnóstico e monitoramento de doenças, bem como biomarcadores de câncer em baixas concentrações. As nanopartículas (NPs) podem ser tanto orgânicas quanto inorgânicas, metálicas, magnéticas ou até mesmo poliméricas, sendo as características mais favoráveis das mesmas o tamanho, carga, estabilidade e relação com meio aquoso (Perfézou; Turner; Merkoçi, 2012).

Para Perfézou, Turner e Merkoçi (2012), as nanopartículas de ouro (AuNPs) fornecem sinais ópticos favoráveis para biossensores de células tumorais, bem como em imunossensores eletroquímicos, nos quais melhoram a capacidade de ligação e sinalização à proteínas através do revestimento com a conjugação dos anticorpos específicos ao sistema de análise por exemplo. O uso destas nanopartículas conduz ao aumento na sensibilidade do imunossensor e amplificação de medidas analíticas, com maior exatidão e precisão, decorrente do receptor fixado na superfície do transdutor em tamanho nano que permite uma resposta mais eficiente com a distância entre o transporte de massa menor.

As modificações estruturais e químicas em imunossensores como a deposição a superfícies de eletrodo de monocamadas automontadas de nanopartículas de ouro relaciona-se com a imobilização do fator de reconhecimento em questão do complexo anticorpo-antígeno e ao elemento transdutor. A ocorrência da imobilização das proteínas, objetivando manter a conformação e atividade da mesma, é necessária para que haja o funcionamento e construção de um imunossensor, nos quais os transdutores podem ser de metais, materiais semicondutores ou materiais de carbono (pasta de carbono, carbono vítreo ou grafite), para sistemas eletroquímicos utilizam-se eletrodos como os meios transdutores (Dorazio, 2011).

Os tipos de imobilização são física, covalente e orientada. A imobilização física baseia-se na adsorção de proteínas direta na área superficial dos eletrodos utilizados, ocorrendo principalmente interações eletrostáticas e não covalentes resultando em uma orientação pouco específica e instável muitas vezes. Por outro lado, quando há imobilização covalente parte-se do princípio de uma modificação favorável ao eletrodo, com o qual determinados grupos funcionais de proteínas podem se ligar irreversivelmente. A imobilização orientada evita a orientação aleatória e deformação estrutural de um anticorpo, de modo que é específica a disposição dos locais de reconhecimento do mesmo pelo segmento Fab, o que favorece a seguida coordenação do antígeno e formação do complexo (Wan *et al.*, 2013).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um imunossensor eletroquímico para detecção do biomarcador associado ao câncer da mama, o HER2, a partir de eletrodos de carbono vítreo modificados com nanocompósito de nanotubo de carbono (NTC) eletropolimerizado com poli(fenazina-salen) ( $\text{NH}_2$ -01), e nanopartículas de ouro (AuNPs) para imobilização do anticorpo (abHER2).

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estudar a formação de filmes eletropolimerizados a partir do monômero  $(\text{NH}_2)_2$ -salen sobre GCE;
- ❖ Avaliar a interação de anticorpos anti-(HER2) com nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato;
- ❖ Estudar a formação de filme nanocompósito de NTC com poli- $(\text{NH}_2)$ -salen sobre GCE;
- ❖ Funcionalizar a plataforma com o biofilme de abHER2 e AuNPs-citrato sobre (poli- $(\text{NH}_2)$ -salen)-NTC/GCE;
- ❖ Caracterização eletroquímica das plataformas através de medidas de voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e espectroscopia de impedância eletroquímica;
- ❖ Otimização do imunossensor (concentração de anticorpo, tempo de incubação com o antígeno e sensibilidade);
- ❖ Estudo de compostos possivelmente interferentes à resposta do imunossensor;
- ❖ Aplicação do imunossensor na detecção de HER2 em amostras de soro sanguíneo simulado.

### 4. METODOLOGIA

#### 4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

##### 4.1.1. Reagentes e amostras biológicas

As soluções de anticorpo abHER2 partiram da concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e as do biomarcador HER2 (antígeno) da concentração de  $4,4 \text{ mg mL}^{-1}$ , ambos obtidos da Sigma Aldrich. O tampão fosfato salino (PBS)  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,4 foi preparado com  $0,14 \text{ mol L}^{-1}$  de cloreto de sódio (Alphatec),  $0,0027 \text{ mol L}^{-1}$  de cloreto de potássio (99%) (Lafan Química),

0,01 mol L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio dibásico (99%) (Vetec) e 0,0018 mol L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico (99%) (Synth), para diluição utilizou-se água purificada por água osmose reversa. Solução de glicina 0,01 mol L<sup>-1</sup> (99%) da Sigma Aldrich foi preparada em PBS. O soro sanguíneo simulado foi preparado em PBS e foi composto por creatina 10,7 (mg L<sup>-1</sup>), creatinina (4,2 mg L<sup>-1</sup>), glicose (200 mg L<sup>-1</sup>), ácido úrico (10,0 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (10 mg L<sup>-1</sup>) e albumina do soro bovino (10 mg L<sup>-1</sup>). O eletrólito suporte para as análises foi PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup> (PBS; pH 7,4) na presença de 5×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de hexacianoferrato (III) de potássio (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) como sonda redox, da marca Sigma Aldrich.

#### **4.1.2. Síntese e caracterização do composto poli-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(fenazina-salen)**

Os monômeros foram sintetizados e caracterizados em colaboração com a discente Nathalia Biazotto Sá e o Prof. Dr. José Wilmo da Cruz Júnior na UFSC-Campus Blumenau. A caracterização foi obtida no Laboratório de Análises Térmicas e Espectroscopia (LTE) da UFSC.

Primeiramente sintetizou-se o monômero derivado de base de Schiff contendo substituinte nitro (NO<sub>2</sub>-01) a partir da metodologia adaptada de (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020). O composto NO-01 foi obtido pela adição de 4-bromo-1,2-fenilenodiamina (Sigma Aldrich) ao 2-hidroxi-5-nitrobenzaléido (Sigma Aldrich). Para a síntese do monômero contendo amina como substituinte (NH<sub>2</sub>-01), o composto NO<sub>2</sub>-01 foi reduzido com SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Alphatec) em solução etanólica e HCl, a reação deve ficar em agitação magnética à temperatura ambiente por 12 h, e a 40 °C por mais 12 h. O precipitado é filtrado e lavado com solução de amônia pH = 8,0 e água destilada, e o sólido é deixado no dessecador até secagem total. A síntese foi confirmada por Espectroscopia de infravermelho (FTIR) com intervalo espectral de 4000 a 450 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.1.3 Nanotubo de carbono (NTC)**

Os NTC foram sintetizados e caracterizados em colaboração com a Profa. Dra. Daniela Zambelli Mezalira da UFSC - Campus Florianópolis.

A dispersão foi preparada inicialmente com 1 mg de NTC em 1 mL de água com 0,1% de Nafion 5%, sendo seguidamente dispersada com 600 µL da mesma para 300 µL de solvente Dimetilformamida (DMF), o qual garantiu uma dispersão homogênea e estável após a aplicação

em um ultrassom (Hu; Hu, 2009). Para utilização do nanotubo foi utilizado 2 $\mu$ L na deposição no eletrodo de carbono vítreo para cada construção do imunossensor.

#### 4.1.4. Síntese e caracterização das Nanopartículas de Ouro (AuNPs)

As nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas em citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) (Sigma Aldrich - 99%) como agente redutor foram sintetizadas de acordo com Zou e colaboradores (2021). Para a síntese da solução de AuNPs, foi adicionado 1,0 mL de solução de citrato trissódico (38,8 mmol L<sup>-1</sup>) em 25 mL da solução de  $\text{HAuCl}_4$  (1,0 mmol L<sup>-1</sup>) (Sigma Aldrich - 99,9%) sob aquecimento de 100 °C e agitação mecânica. A mistura reacional foi deixada em agitação durante 20 min até que a solução mudasse da cor amarelo para vermelho, indicando formação de AuNPs. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por Espectrofotometria UV-Vis por meio do Espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu), considerando a Lei de Lambert-Beer com absorvância em 525 nm, sendo  $\epsilon = 2,7 \times 10^8 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  obteve-se a concentração de AuNPs igual a 1,27 nmol L<sup>-1</sup>. Em seguida, 1 mL da solução foi centrifugada durante 10 min, e o sobrenadante removido, sendo as AuNPs concentradas utilizadas na construção do imunossensor.

## 4.2. EQUIPAMENTOS E MEDIDAS

Os estudos de formação e caracterização completa do imunossensor eletroquímico com medidas de voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab da Metrohm (modelo PGSTAT 204) com auxílio do software NOVA (versão 2.1.6) à temperatura ambiente, mantidos em atmosfera inerte por meio de um cilindro de argônio, para as eletropolimerizações. Fez-se o uso de eletrodos de trabalho de carbono vítreo (Metrohm - Switzerland) com diâmetro de 2 mm modificados com sistema de NTC-poli-NH<sub>2</sub>-01/AuNPs:abHER2/glicina, sendo o eletrodo de referência aquoso de Ag/AgCl (3,0 mol L<sup>-1</sup> KCl) e um fio de Pt como contra-eletrodo.

### 4.2.1 Eletropolimerização do filme de poli-(NH<sub>2</sub>-01)

O estudo de formação do filme de fenazina-salen foi realizado em uma solução de solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. da marca Anidrol, com a base de Schiff previamente sintetizada, na concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, como eletrólito de suporte

adicionou-se  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF<sub>6</sub>) (Sigma Aldrich) e 10% (v/v) de ácido sulfúrico (P.A.) do fornecedor Isofar.

A eletropolimerização foi realizada em uma célula eletroquímica composta por um eletrodo de referência Ag/Ag<sup>+</sup> (solução  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (AgNO<sub>3</sub>)<sub>ACN</sub>), um eletrodo de trabalho de GCE previamente polido em alumina  $0,05 \mu\text{m}$  em uma almofada plana por 3 min e enxaguados com água deionizada e etanol absoluto, e um fio de Pt como contra-eletrodo. Sendo assim, conectados ao potenciostato foi aplicada a faixa de potencial de  $-0,15$  a  $1,15 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$  a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  com 25 ciclos de potenciais e com solução purgada com argônio por 5 min. A análise do comportamento eletroquímico do eletrodo de trabalho modificado quimicamente, foi analisado empregando a CV uma solução aquosa contendo KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  acidificada com HCl (pH 2,0), usando referência Ag/AgCl e um fio de Pt como eletrodo auxiliar, a faixa de potencial foi de  $-0,15$  a  $1,15 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . O eletrodo também foi analisado por EIS, usando frequência de 1 MHz a 100 mHz com 10 mV de amplitude senoidal e 11 pontos/década, com potencial DC na faixa de  $-0,15$  a  $1,00 \text{ V vs. Ag/Ag}^+$ , conforme o método adaptado de Martin, Olean-Oliveira e Teixeira (2020).

#### 4.3. DESENVOLVIMENTO DO IMUNOSSENSOR

Após a modificação polimérica da superfície do eletrodo de carbono vítreo, realizou-se a nanoestruturação dos eletrodos na qual foi realizada a deposição de  $2 \mu\text{L}$  em cada eletrodo da mistura de  $6 \mu\text{L}$  de AuNPs com  $6 \mu\text{L}$  da solução de anticorpo de captura (abHER2) ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) na superfície do GCE e assim após 15 min sob vácuo e temperatura ambiente, foram colocados  $2 \mu\text{L}$  de solução de Glicina  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  na superfície para evitar adsorções não específicas (Figura 5.1). Após 15 min os eletrodos foram lavados com solução tampão PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 7,4.

##### 4.3.1 Construção e aplicação do imunossensor

Após a limpeza um eletrodo de GCE foi modificado com  $2 \mu\text{L}$  de uma solução dispersa de nanotubo de carbono (NTC) que foi seca sob vácuo à temperatura ambiente durante 10 min e em seguida eletropolimerizada com o composto de fenazina-salen (NH<sub>2</sub>-01). Em uma terceira etapa em um microtubo misturou-se uma alíquota da solução de AuNPs com a solução de anticorpo (abHER2) para imobilização em proporção 1:1 (em volume), assim o eletrodo foi incubado com  $2 \mu\text{L}$  da mistura AuNPs:abHER2 durante 15 min sob vácuo à temperatura

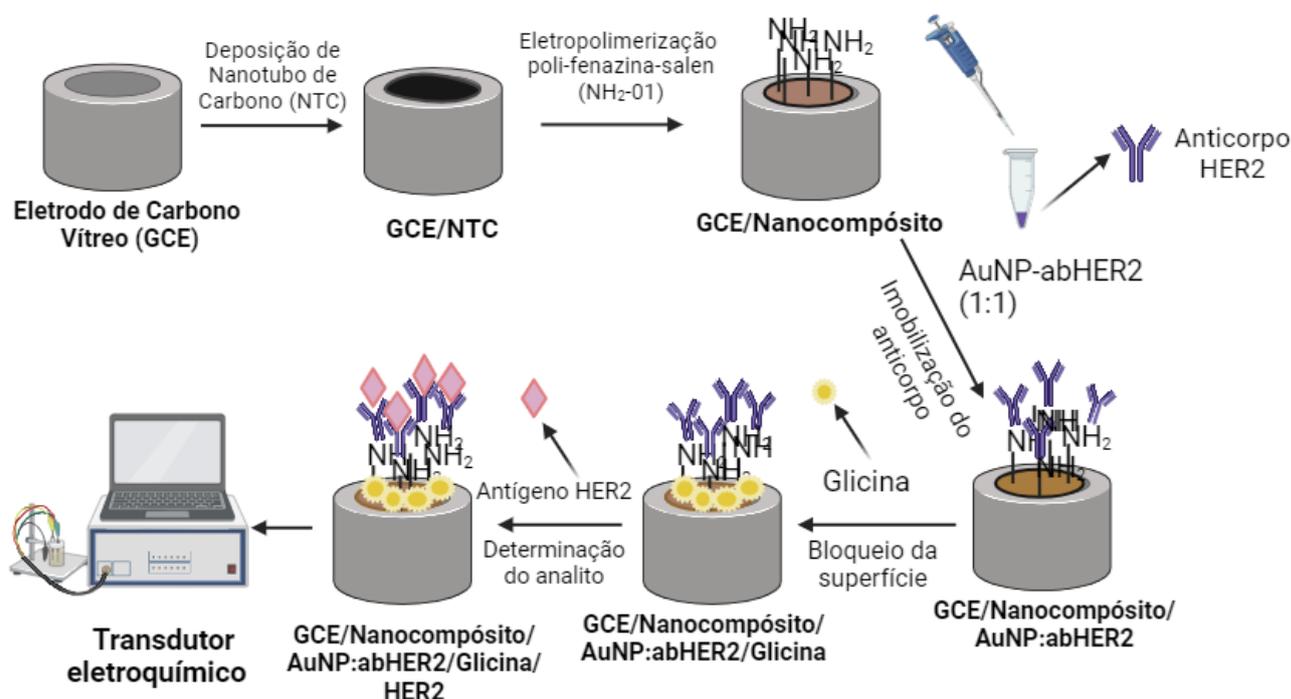
ambiente. Em seguida, a superfície do eletrodo foi lavada com PBS para remover as moléculas de anticorpo não imobilizadas. O imunossensor foi então incubado com 2  $\mu\text{L}$  de glicina ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ) durante 15 min para gerar o bloqueio de sítios não específicos na superfície do sensor, lavado com PBS e seco sob fluxo de argônio. Dessa maneira foi possível realizar a incubação do analito (antígeno) durante tempo pré-determinado e determinar a concentração do mesmo. Medidas de SWV, com amplitude de 100 mV, incremento de 1 mV e Frequência 40 Hz, foram obtidas após cada etapa de construção do imunossensor, sendo considerado o decréscimo da corrente de pico base após a adição de antígeno ao imunossensor e assim podendo-se calcular o percentual de inibição por meio da Equação 2, em que  $i_{\text{pico base}}$  é o pico de corrente medido por SWV para superfície do imunossensor na ausência de HER2, e  $i_{\text{HER2}}$  é o pico de corrente medido por SWV quando a superfície do imunossensor foi incubada com HER2, em solução de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em PBS.

$$\text{Inibição relativa (\%)} = \left( \frac{i_{\text{pico base}} - i_{\text{HER2}}}{i_{\text{pico base}}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

Esta caracterização também foi realizada por CV com faixa de potencial de -0,7 V a 1,15V a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  e EIS com o OCP inicialmente medido no intervalo de tempo de 60 s e as leituras realizadas na faixa de frequência de 10 mHz a 100 kHz, com 11 pontos por década, e amplitude de 10 mV aplicada a partir do OCP médio.

Na Figura 5 encontra-se uma ilustração esquemática das etapas envolvidas na construção do imunossensor proposto.

Figura 5 – Ilustração esquemática da construção do imunossensor.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 4.3.2 Otimização do funcionamento do sensor

#### 4.3.2.1 Quantidade de anticorpo

Com o objetivo de otimizar as concentrações dos anticorpos na detecção do biomarcador HER2, realizaram-se ensaios utilizando as seguintes condições: ab-HER2 a 1000; 500 e 50 ng mL<sup>-1</sup>, sendo as diluições preparadas em tampão PBS. De modo que a melhor concentração aplicada na construção foi 1000 ng mL<sup>-1</sup> com melhor capacidade de bloqueio da superfície condutora presente sob o eletrodo e com melhor resposta ao HER2 (antígeno).

#### 4.3.2.2 Tempo de incubação do antígeno

Visando obter uma detecção de antígeno eficaz foram realizados ensaios de incubação com a quantidade de anticorpo pré-determinada e em diferentes tempos de incubação do antígeno, sendo em 5, 15, 30 e 60 minutos, de maneira que o tempo selecionado de 15 min foi de acordo com o maior valor de inibição relativa por meio da Equação 2.

#### 4.3.2.3 Interferentes

A fim de avaliar possíveis efeitos de interferência sobre as medidas realizadas com o imunossensor para determinação de HER2, testaram-se alguns dos principais compostos presentes em amostras biológicas (especialmente soro). Os compostos avaliados foram: glicose ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatinina ( $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), creatina ( $10,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido úrico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), BSA ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Obteve-se um baixo nível de interferência (inferior a 10%) exceto para o ácido ascórbico ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) e BSA ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) o qual foi realizada diluição para concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , de modo que as medidas em soro sanguíneo simulado pudessem ser efetuadas sem variações significativas no comportamento eletroquímico desejado.

#### 4.3.2.4 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade da resposta do imunossensor para medidas de  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  de HER2 em PBS foi avaliada com base na determinação individual de sete imunossensores construídos sob as mesmas condições.

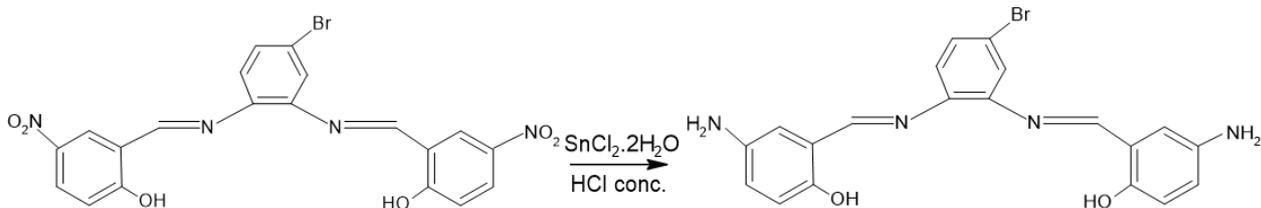
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PROPRIEDADES DO COMPOSTO DE POLI FENAZINA-SALEN ( $\text{NH}_2\text{-01}$ )

#### 5.1.1. Síntese e caracterização do monômero

Para obtenção do composto de poli fenazina-salen ( $\text{NH}_2\text{-01}$ ) foi empregada a metodologia adaptada da Martin e colaboradores (2020). A metodologia descreve primeiramente a obtenção do composto “ $(\text{NO}_2)_2\text{-salen}$ ”, seguida da reação de redução para obtenção do monômero “ $(\text{NH}_2)_2\text{-salen}$ ” contendo o grupo amina na sua estrutura. A presença da amina na estrutura do monômero é importante, pois a obtenção do polímero poli fenazina-salen se dá pela eletropolimerização do monômero a partir da oxidação desse grupo. A redução do grupo nitro ligado inicialmente ao composto foi realizada por um cátion metálico ( $\text{Sn}^{2+}$ ) na presença de ácido concentrado (HCl) em um sistema de refluxo. O mecanismo baseia-se na formação de hidroxilaminas como intermediários, estas quando submetidas a agentes redutores em excesso, podem ser isoladas, resultando em aminas (March; Smith, 2007). A obtenção do composto  $\text{NH}_2\text{-01}$ , que foi o composto empregado no presente trabalho, pode ser visualizado na Figura 6.

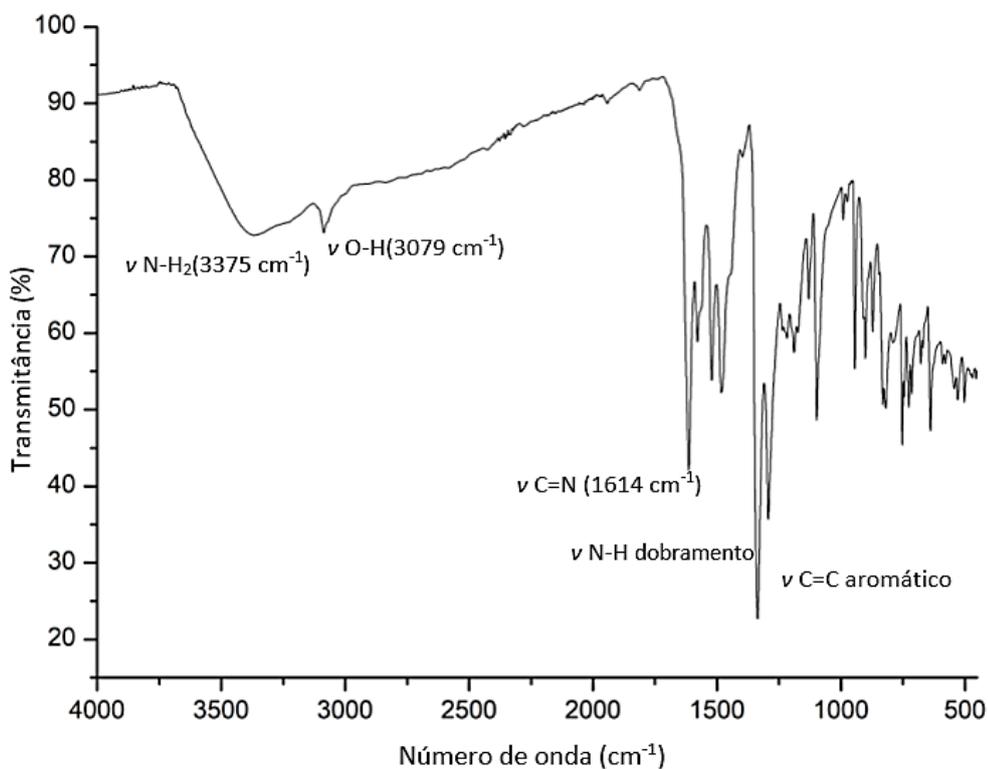
Figura 6 – Representação esquemática da obtenção do composto  $(\text{NH}_2)_2$ -salen.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A caracterização do monômero  $\text{NH}_2$ -01 foi feita por espectroscopia de infravermelho (Figura 7), através da observação de uma banda alargada na região de  $3375 \text{ cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao estiramento assimétrico da ligação N-H do composto reduzido  $(\text{NH}_2)$  (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020). A banda da hidroxila do composto fenólico pode ser observada em  $3079 \text{ cm}^{-1}$ , que aparece levemente deslocada devido a presença do anel aromático extra ligado a diamina. O estiramento da ligação C=N foi observado em  $1614 \text{ cm}^{-1}$ , bem como a presença de bandas que indicam ligação C=C de aromáticos e os dobramentos de N-H ( $1450 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ) (Pavia *et al.*, 2010).

Figura 7 – Espectro FT-IR para caracterização do monômero  $\text{NH}_2$ -01.



Fonte: Elaborado pela autora, (2023).

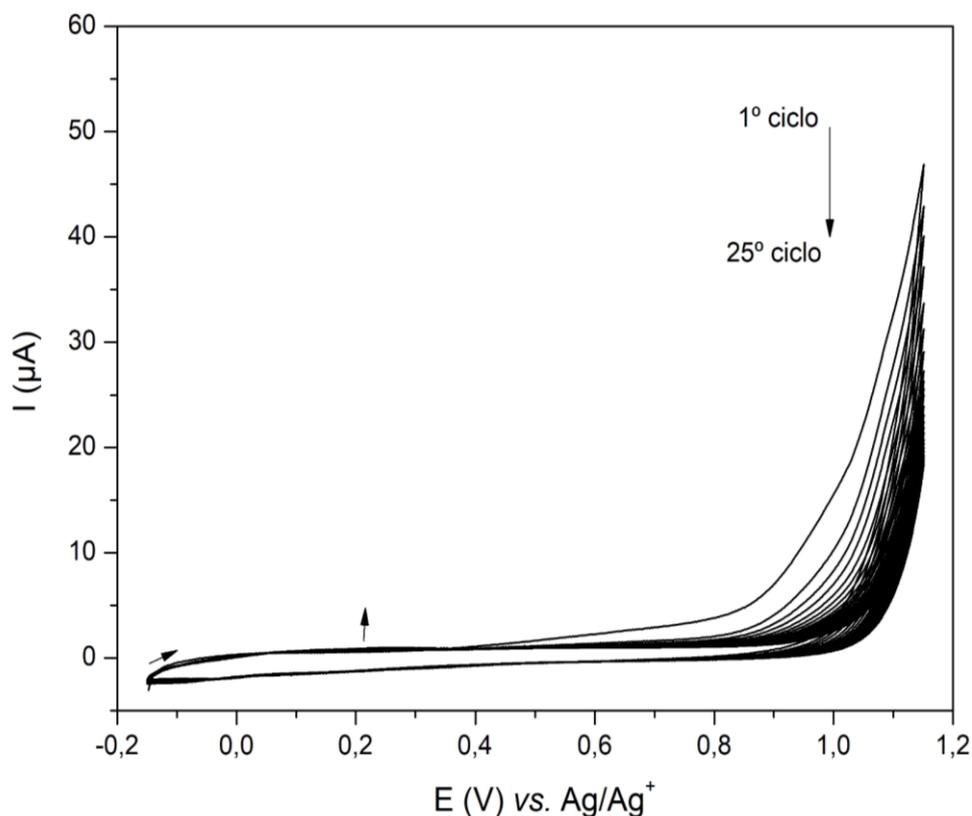
A diferença de coloração entre os monômeros NO<sub>2</sub>-01 e NH<sub>2</sub>-01 amarelo para laranja, respectivamente, pode ser um indício da redução do grupo nitro a amino, pois a redução altera a transição eletrônica do grupo cromóforo (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020). De tal forma, são esperados diferentes comportamentos eletrônicos devido o grupo NO<sub>2</sub> e NH<sub>2</sub> poderem ocasionar o diminuição ou aumento da extensão da conjugação e com isso interferir na efetividade da mesma. A presença do anel aromático extra e o halogênio (Br), quando comparada a base de Schiff com cadeia alifática obtida por Martin e colaboradores (2020), também podem ocasionar diferenças devido a deslocalização de carga presente devido ao sistema  $\pi$ -conjugado ao longo da estrutura.

## 5.2. ENSAIOS ELETROQUÍMICOS REFERENTES A FUNCIONALIZAÇÃO DO GCE COM POLI-NH<sub>2</sub>-01

### 5.2.1. Eletropolimerização do NH<sub>2</sub>-01

A eletropolimerização do monômero NH<sub>2</sub>-01 em GCE foi realizada a partir de uma solução contendo 0,5 mmol L<sup>-1</sup> do monômero em DMSO e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10% v/v). De acordo com a literatura a eletropolimerização de compostos contendo amina são favorecidos em meio ácido (Tang; Kitani; Shiotani, 1996). A solução de síntese também continha 0,05 mol L<sup>-1</sup> de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte. Antes das eletrossínteses a solução foi purgada com argônio por 5 min para remoção do oxigênio dissolvido. Foram aplicados 25 ciclos a uma velocidade de 100 mV s<sup>-1</sup> em uma faixa de potencial entre -0,15 e +1,15 V. A Figura 8 mostra o ciclo de potencial aplicado para formação eletroquímica do filme polimérico a seta indica o sentido de varredura.

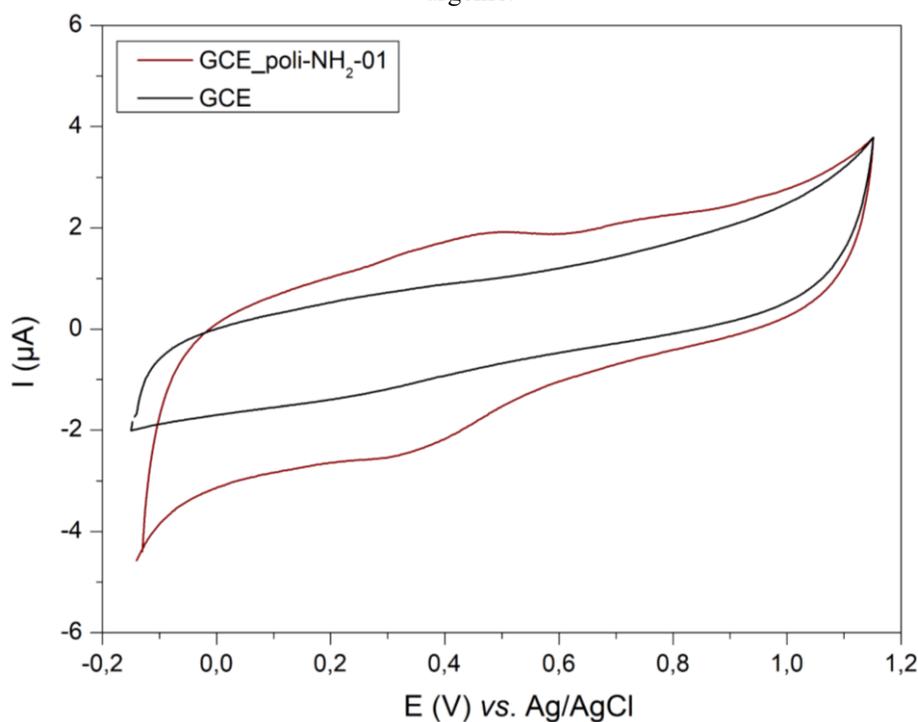
Figura 8 – Voltamogramas para o 1º até 25º ciclo de varredura para a etapa de eletropolimerização de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> do monômero (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-salen dissolvido em DMSO contendo 0,05 mol L<sup>-1</sup> de TBAPF<sub>6</sub> e 10% (v:v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Em um intervalo de potencial de -0,15 a 1,15 V vs. Ag/Ag<sup>+</sup> na velocidade de 100 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 7 mostra dois picos voltamétricos característicos, o processo anódico em +0,90 V referente a formação de cátion radical e acoplamento carbono-nitrogênio que indica decréscimo no valor de corrente e um processo eletroquímico irreversível. Além deste, em  $E_{pa} = +0,22$  V e  $E_{pc} = +0,16$  V um pequeno crescimento de valor de corrente caracteriza o processo de oxidação/redução que determina a deposição de um material eletroativo sobre a superfície do GCE, o comportamento se assemelha ao encontrado por Martin e colaboradores (2020). Os eletrodos modificados com poli-fenazina foram avaliados por CV em um solução aquosa de KCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em pH 2,0 (saturada com argônio), conforme Figura 9, no qual o filme formado apresenta dois processos em potenciais de  $E_{pa} = +0,4$  V e  $E_{pc} = +0,3$  V.

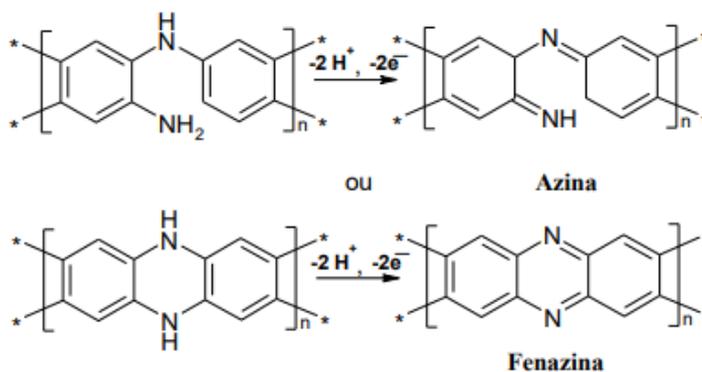
Figura 9 – Voltamograma cíclico do poli-NH<sub>2</sub>-01 em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução KCl (pH 2,0) a 100 mV s<sup>-1</sup>. Eletropolimerização: 25 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> sob atmosfera de argônio.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O processo redox encontrado no voltamograma da Figura 8 pode ser atribuído ao par redox R<sup>1</sup>-NH-C-R<sup>2</sup>/R<sup>1</sup>-N=C-R<sup>2</sup> (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020) (Figura 10), que é o processo que resulta na formação do filme polimérico na superfície do eletrodo.

Figura 10 – Representação do processo redox atribuído ao par redox R<sup>1</sup>-NH-CR<sup>2</sup>/R<sup>1</sup>-N=C-R<sup>2</sup>



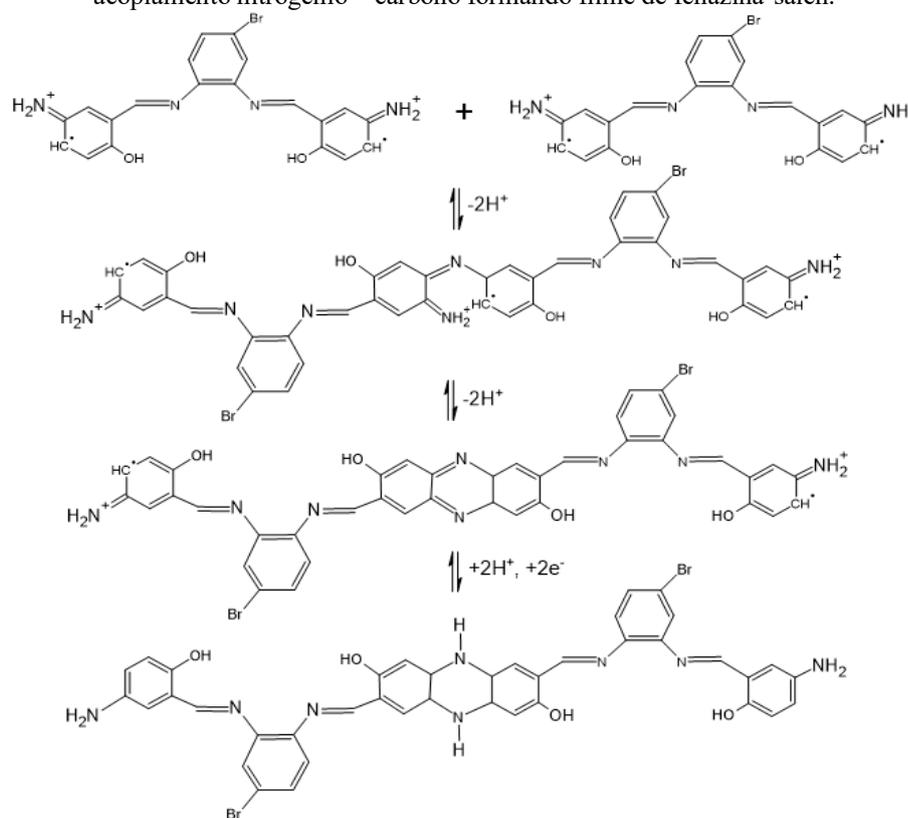
Fonte: Adaptado de Martin, Olean-Oliveira e Teixeira, 2020.

O mecanismo da polimerização ocorre por acoplamento nitrogênio-carbono (Figura 11), em que o processo voltamétrico de formação anódica do radical ocorre a partir da amina

presente na estrutura do monômero evidenciado pelo decaimento da corrente a cada ciclo em +0,9 V.

A primeira etapa é a oxidação do monômero e formação de um radical, o qual pode sofrer deslocalização em diferentes posições do anel aromático, a segunda etapa envolve o cátion amino ( $\text{NH}_2^+$ ) e o radical formado na posição mais favorável da molécula resultando uma ligação (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020). No entanto, conferindo o efeito de densidade eletrônica dos grupos substituintes presentes no monômero o ataque é preferencial na posição *para* ao grupo  $\text{—C=N—}$ . Essa posição é preferencial comparando com Martin e colaboradores (2020) visto que o monômero apresenta maior efeito retirador de elétrons ainda mais intenso devido o anel aromático modificado com Br, que possui efeito retirador indutivo e ocasionaria um radical de maior instabilidade. Por isso, o mecanismo proposto considera que o acoplamento pode formar um polímero com uma cadeia fechada entre os monômeros através de uma ligação fenazina, como representado na Figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática da formação do polímero a partir do monômero  $\text{NH}_2\text{-01}$  através do acoplamento nitrogênio – carbono formando filme de fenazina-salen.

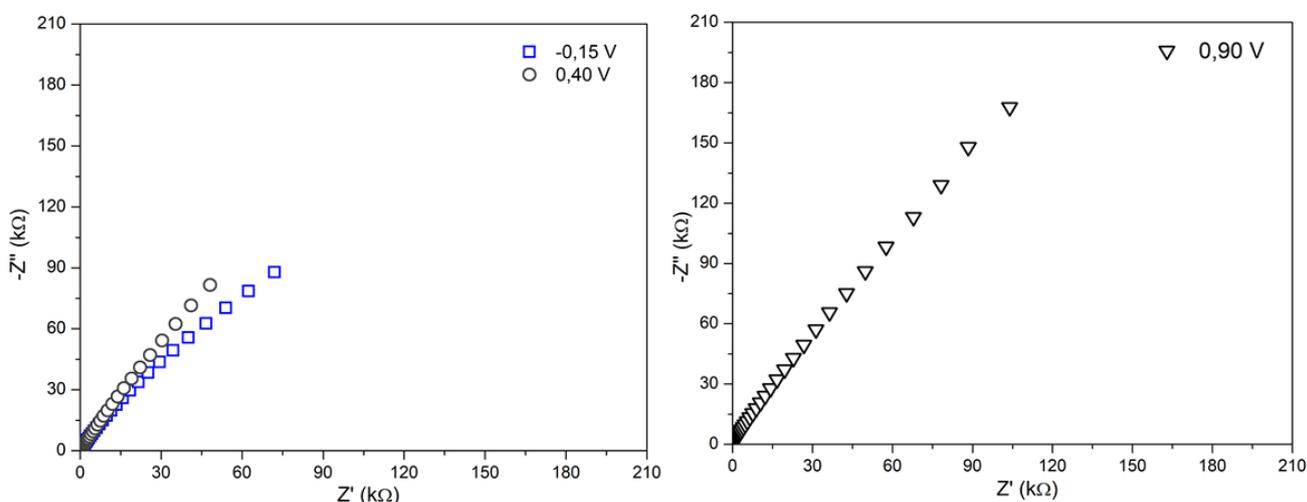


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para investigação utilizando EIS (Figura 12), foram aplicados potenciais de -0,15 V, +0,40 V e +0,9 V (*vs.* Ag/AgCl) durante a varredura de frequências em solução aquosa de KCl

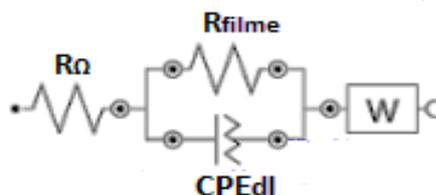
0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH = 2,00). Dessa forma, foi possível complementar a investigação sobre os fenômenos presentes na interface do filme polimérico através dos espectros de Nyquist e com o modelo de circuito presente na Figura 13. O circuito proposto compreende a resistência de solução do eletrólito ( $R_{\Omega}$ ) em série com uma combinação em paralelo da resistência de transferência de carga do filme polimérico ( $R_{filme}$ ) e o elemento de fase constante (CPE), que relaciona-se com a capacitância do sistema, enquanto o elemento aberto de Warburg ( $W_o$ ) simula a resistência difusional de contra-íons através do polímero (Dominguez-Benetton *et al.*, 2012).

Figura 12 – Espectros de impedância de poli(fenazina-salen) registrados em diferentes potenciais aplicados em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,00): -0,15, +0,40 e 0,90 V vs. Ag/AgCl.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 13 – Modelo de circuito equivalente proposto para os espectros de Nyquist dos filmes de poli(fenazina-salen) em potencial de -0,15 V, +0,40 V e 0,90 V (vs. Ag/AgCl).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Tabela 1 encontram-se os valores de resistência total ( $R_t$ ) obtidos pelo módulo de impedância na região de baixa frequência (10 mHz) e do valor de CPE encontrado no circuito, observa-se que no potencial de oxidação do monômero (+0,4 V) o valor de resistência é menor que no potencial aplicado com valor suficiente para provocar a redução de todos sítios ativos fenazina (-0,15 V), devido à ausência do sistema  $\pi$ -conjugado do polímero na forma reduzida (NH-C-C-NH). O valor da resistência é maior também no potencial de formação do cátion radical (+0,90 V), por isso pode-se considerar que o polímero polimerizado sobre a superfície

do eletrodo gera um sistema capacitivo e semicondutor (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020).

Tabela 1 – Valores de resistência total ( $R_t$ ) para o filme formado de poli(fenazina-salen).

Potencial aplicado (V)	$R_t$ ( $k\Omega\text{ cm}^2$ )
-0,15 V	113,62
+0,40 V	96,60
+0,90 V	197,301

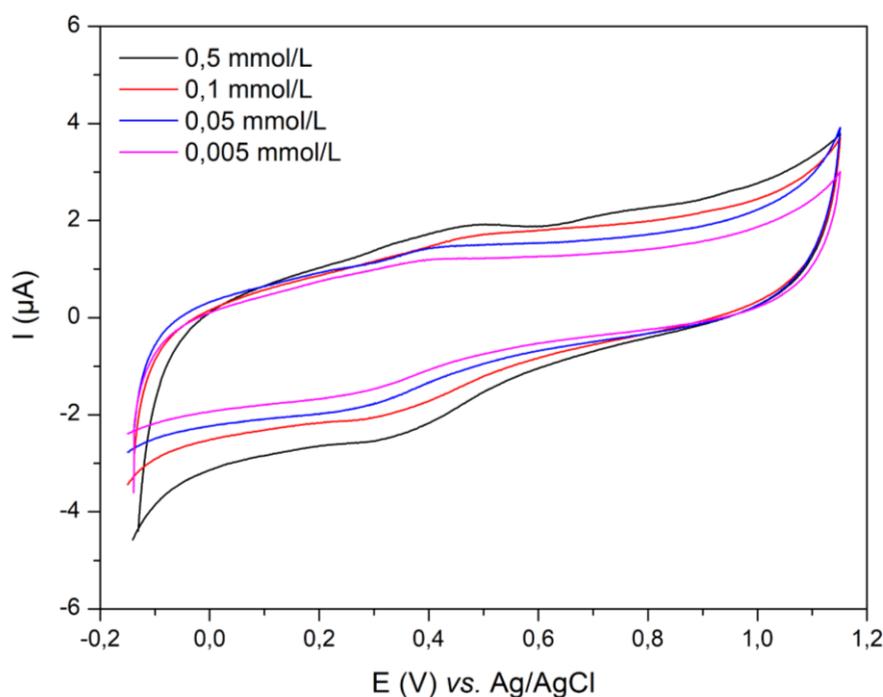
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

## 5.2.2. Otimização da formação do filme de poli-(NH<sub>2</sub>-01)

### 5.2.2.1 Estudo da concentração do monômero

O estudo da influência da concentração do monômero NH<sub>2</sub>-01 na formação do filme eletropolimerizado foi realizado utilizando as concentrações de 0,005 mmol L<sup>-1</sup>, 0,05 mmol L<sup>-1</sup>, 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, sendo que, em todas elas, o perfil voltamétrico manteve-se com um par redox (Figura 13). Os voltamogramas mostrados na Figura 14 demonstram que há um favorecimento na formação de radicais com o aumento na concentração do monômero, visto que há um pequeno aumento na corrente e também aumento na reversibilidade do processo, pois os valores de diferença de potencial ( $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ ), para os processos do filme, diminuem proporcionalmente com o aumento da concentração (Tabela 2). Com esses resultados foi escolhido a maior concentração do monômero igual a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> para obtenção de filmes de poli-NH<sub>2</sub>-01

Figura 14 – Voltamogramas cíclicos em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,0), com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>, para o eletrodo modificado por eletropolimerização em concentração de 0,005, 0,05, 0,1 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> do monômero (NH<sub>2</sub>)-01.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 2 – Comportamento eletroquímico em solução aquosa para os filmes poliméricos obtidos em diferentes concentrações do monômero.

Concentração do monômero (mmol L <sup>-1</sup> )	E <sub>pa</sub> (mV)	E <sub>pc</sub> (mV)	ΔE (mV)
0,005	392,8	265,5	127,3
0,05	415,0	290,5	124,5
0,1	448,1	334,7	113,4
0,5	470,0	359,7	110,3

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

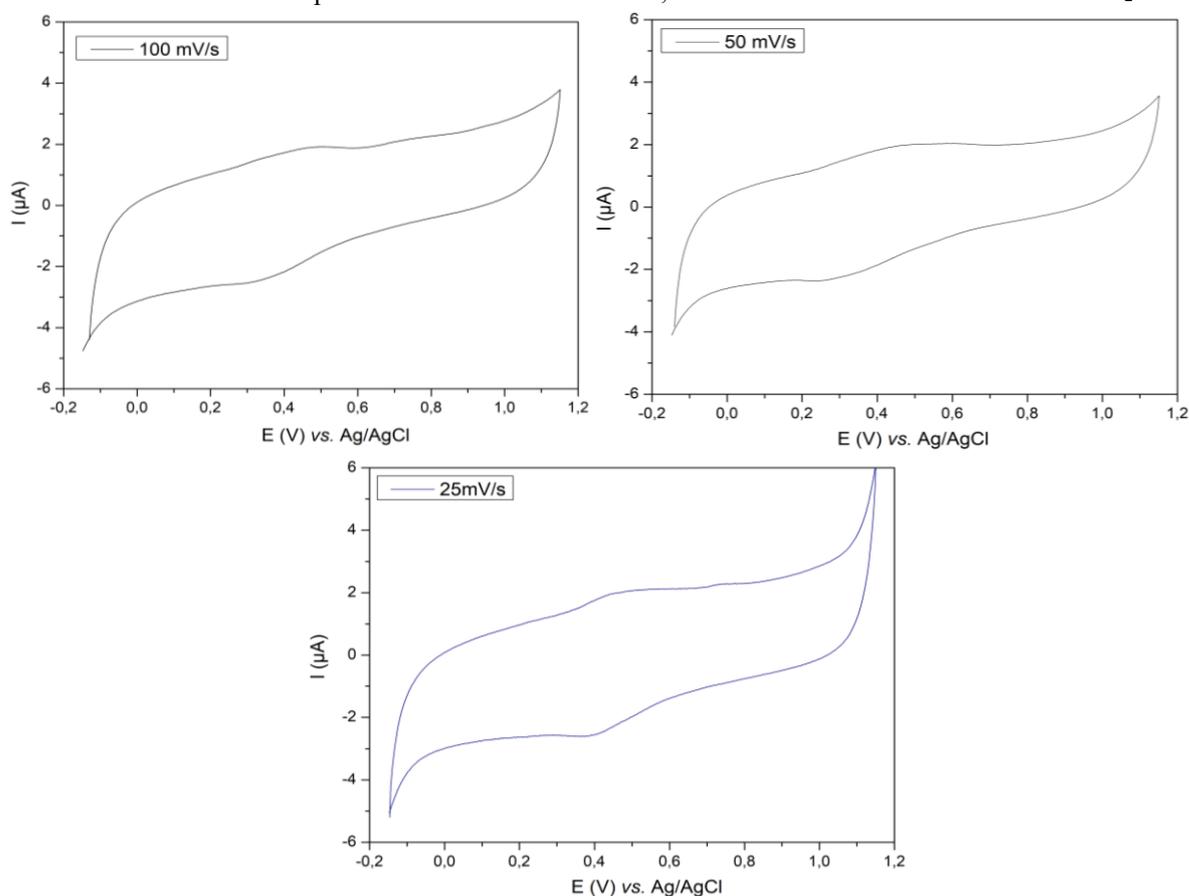
### 5.2.2.2 Velocidade de eletropolimerização do monômero

Neste estudo, analisou-se a melhor velocidade de varredura ao processo de eletropolimerização sob a superfície do eletrodo de carbono vítreo, visto que o método de eletropolimerização escolhido foi o método potenciodinâmico, e a formação do filme polimérico está relacionado com o efeito de deslocalização da carga do radical do grupamento amino ao carbono do anel aromático (Martin; Olean-Oliveira; Teixeira, 2020). Dessa forma,

considera-se que em baixas velocidades de varredura há a formação de um filme polimérico mais espesso, devido ao tempo maior em que há o deslocamento de carga. Enquanto, para as maiores velocidades de deposição há favorecimento de filmes poliméricos mais finos (Liu *et al.*, 2011).

Na Figura 15 verificou-se que o par redox característico do filme eletropolimerizado na velocidade de  $25 \text{ mV s}^{-1}$  está mais definido, mas nas três velocidades as magnitudes de corrente anódica e catódica foram próximas como apresentado na Tabela 3. Os parâmetros eletroquímicos obtidos nas diferentes velocidades revelaram um sistema reversível e termodinamicamente favorável, com o mesmo comportamento muito similar independente da velocidade, contudo, a velocidade de varredura de síntese reflete diferentes tempos de eletrodeposição, sendo 44 min para  $25 \text{ mV s}^{-1}$ , 22 min para  $50 \text{ mV s}^{-1}$  e 11 min a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , sendo assim, foi escolhida a velocidade de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para obtenção de filmes de poli-NH<sub>2</sub>-01, tornando essa etapa mais rápida.

Figura 15 – Voltamogramas em solução de KCl  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,0) e atmosfera de argônio para os filmes formados com 25 ciclos de potenciais em velocidades de 25, 50 e  $100 \text{ mV s}^{-1}$  em  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de NH<sub>2</sub>-01.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 3 – Comportamento eletroquímico em solução aquosa para os filmes poliméricos obtidos em diferentes velocidades de deposição do monômero.

<b>Velocidade de eletropolimerização (mV s<sup>-1</sup>)</b>	<b>I<sub>pa</sub> (μA)</b>	<b>I<sub>pc</sub> (μA)</b>	<b>E<sub>pa</sub> (mV)</b>	<b>E<sub>pc</sub> (mV)</b>	<b>ΔE (mV)</b>
25	2,07	-2,53	490,1	393,1	97,0
50	1,97	-2,20	462,3	331,9	130,6
100	1,90	-2,40	481,5	346,1	135,4

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 5.3. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO COM NANOTUBO DE CARBONO

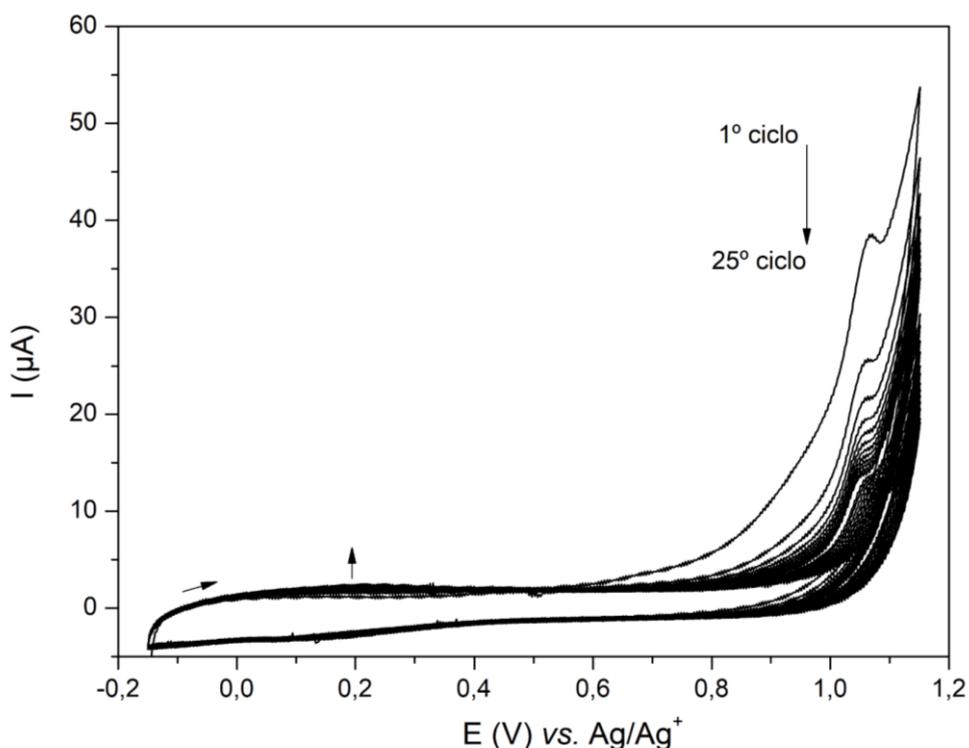
A formação de um nanocompósito consiste na utilização de uma fase particulada dispersa, por exemplo o NTC, com um polímero condutor ou semiconductor, sendo um dos mecanismos de formação a eletropolimerização. Os NTC possuem propriedades intrínsecas para a aplicação em compósitos poliméricos, como o tamanho pequeno de partículas, baixa densidade e alta condutividade, que propiciam a formação de nanocompósitos com propriedades importantes (Zarbin; Oliveira, 2013).

A utilização de nanocompósitos no desenvolvimento de biossensores é destacado devido às características condutoras quando aplicados na modificação da superfície do eletrodo. O transporte elétrico de carga é maior quando um polímero condutor ou semiconductor polimeriza-se na superfície de um nanotubo de carbono, sendo a resistência mecânica e química também maiores e assim tem-se uma superfície estável e com alta aderência ao eletrodo (Terrones, 2003). Dessa forma, de modo a otimizar a superfície de eletropolimerização do polímero de fenazina-salen realizou-se a deposição de uma dispersão de nanotubo de carbono modificada que configura uma maior área superficial para a formação do filme polimérico.

A eletropolimerização para formação do nanocompósito encontra-se na Figura 16 em que o perfil é característico ao filme de poli-NH<sub>2</sub>-01 com um par redox pronunciado em E<sub>pa</sub> = +0,22 V e E<sub>pc</sub> = +0,19 V relacionado ao do processo de oxidação e redução do grupamento fenazina, visto que há um incremento de corrente e assim um indicativo de material eletroativo depositado na superfície do GCE modificada com o NTC. Também há a presença de formação de cátions radicais pois no potencial de +0,9 V o decréscimo na corrente a cada ciclo é verificado, assim considera-se que há a formação do filme polimérico durante a varredura anódica em que os grupos amino terminais dos monômeros reagem entre si em meio ácido

formando uma ligação carbono-nitrogênio que é seguidamente oxidado, liberando também  $2H^+$ , e resultando no composto de azina (Olean-Oliveira; Brito; Teixeira, 2020).

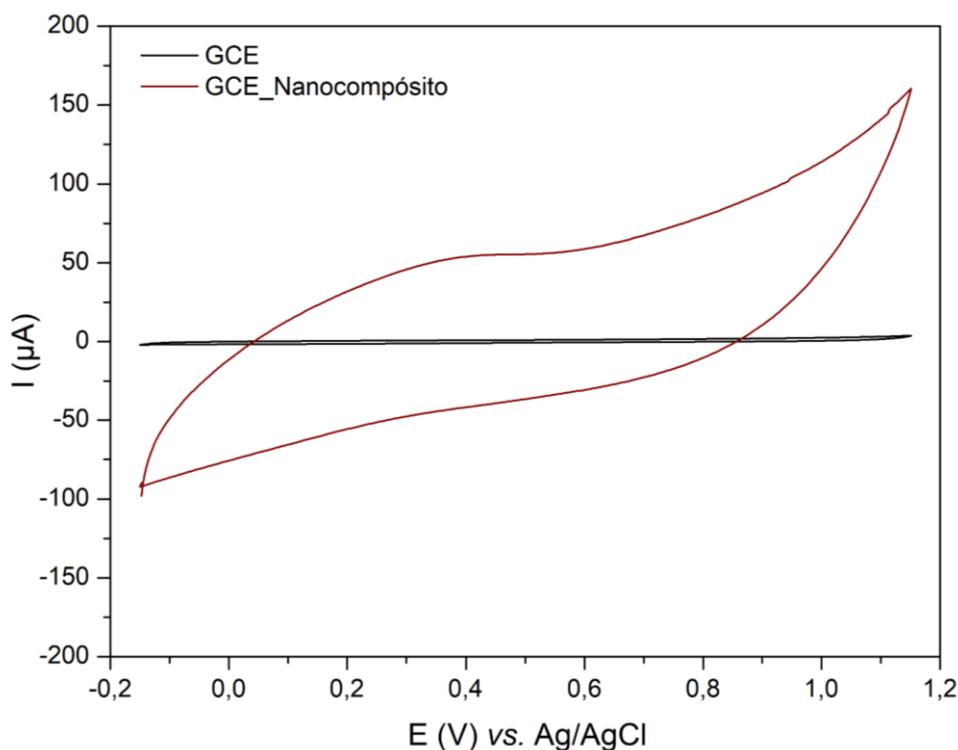
Figura 16 – Voltamogramas para o 1º até 25º ciclo de potencial para a etapa de eletropolimerização de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  do monômero  $(NH_2)_2$ -salen sob superfície de NTC/GCE para formação do nanocompósito. Em um intervalo de potencial de  $-0,15$  a  $1,15 \text{ V vs. Ag/Ag}^-$  na velocidade de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O nanocompósito obtido também foi analisado em solução de  $KCl \text{ } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 2,0$ ) (Figura 17). Apresentou um comportamento eletroquímico característico com  $E_{pa} = +0,4 \text{ V}$  e  $E_{pc} = +0,2 \text{ V}$ , também foi possível observar um incremento dos valores de corrente em relação ao filme de  $NH_2$ -01 em GCE, revelando uma influência direta da presença do NTC na resposta eletroquímica do filme de poli- $NH_2$ -01. Apresentou um aumento dos valores de corrente em 29 vezes, visto que as correntes de pico observadas são  $I_{pa} = 1,91 \text{ } \mu\text{A}$  e  $I_{pa} = 54,6 \text{ } \mu\text{A}$  para o filme do polímero de fenazina-salen e nanocompósito formado, respectivamente. Também foi observado uma maior contribuição da corrente capacitiva, que é prevista quando nanomateriais derivados do carbono são empregados na modificação de eletrodos (Huang; Li; Shi, 2014).

Figura 17 – Voltamograma cíclico do nanocompósito em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de solução KCl (pH 2,0) a 100 mV s<sup>-1</sup>. Eletropolimerização: 25 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> sob atmosfera de argônio.



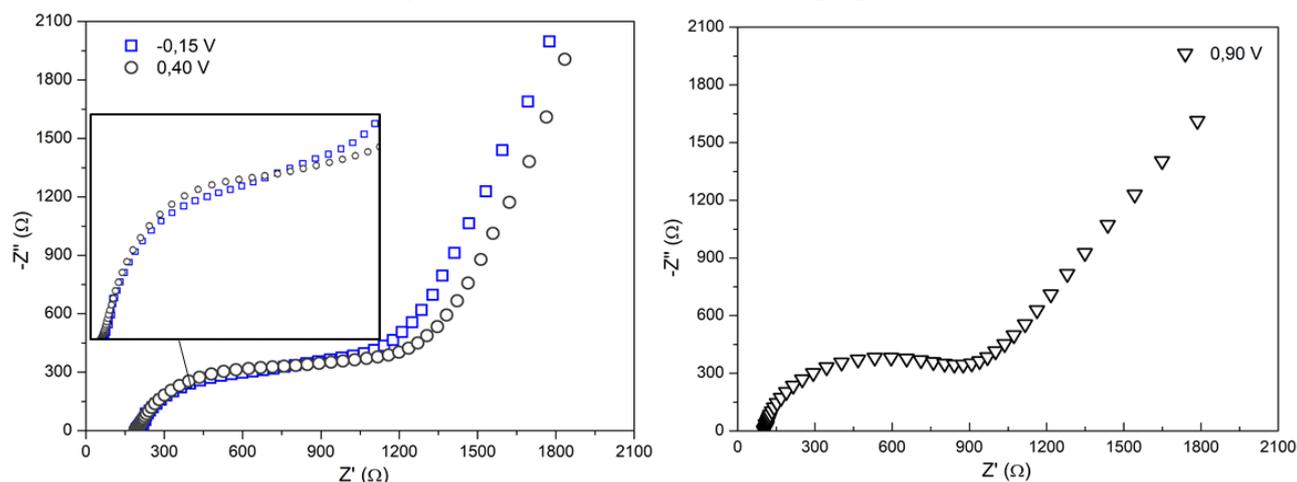
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O nanocompósito formado em GCE foi também investigado por EIS (Figura 18). Foram aplicados potenciais de -0,15 V, +0,40 V e +0,9 V (*vs.* Ag/AgCl) durante a varredura de frequências em solução aquosa de KCl 0,10 mol L<sup>-1</sup> (pH = 2,00), considerando os aumentos significativos nos valores de correntes de pico com a presença do NTC observados por CV.

Dessa forma, foi possível complementar a investigação sobre os fenômenos presentes na interface do filme do nanocompósito através dos espectros de Nyquist (Figura 19) e com o modelo de circuito equivalente Figura 19-A para os potenciais de -0,15 V, +0,40 V e (Figura 19-B para +0,90 V. No circuito proposto para +0,90 V temos a contribuição da solução do eletrólito ( $R_{\Omega}$ ) em série com dois circuitos em paralelos, contendo um CPE e uma resistência à transferência de carga  $R_{CT}$  cada. Sendo  $R_{NTC}$  a resistência de transferência de carga para a interface solução/camada de NTC,  $R_{filme}$  a resistência de transferência de carga para a interface NTC/poli(NH<sub>2</sub>-01),  $CPE_{filme}$  o elemento de fase constante para o comportamento capacitivo do filme e  $CPE_{dl}$  o elemento de fase constante para o comportamento capacitivo da dupla camada elétrica. Para -0,15 V e +0,40 V há a resistência ôhmica da solução eletrolítica ( $R_{\Omega}$ ), a capacitância de dupla camada elétrica ( $CPE_{dl}$ ) e a resistência de transferência de carga de cada

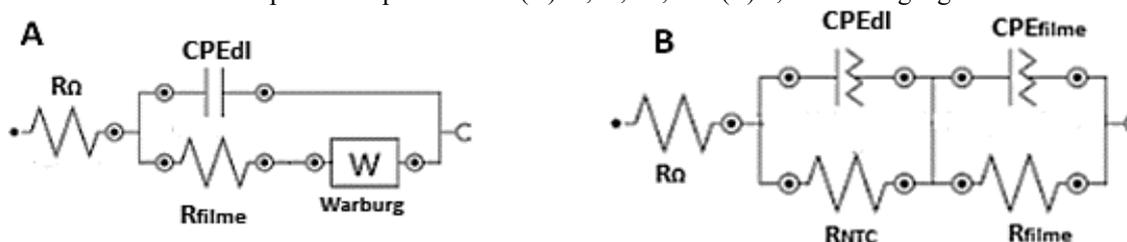
filme modificado ( $R_{\text{filme}}$ ) em série com elemento aberto de Warburg ( $W_0$ ) (Olean-Oliveira; Brito; Teixeira, 2020).

Figura 18 – Espectros de Nyquist do nanocompósito registrados em diferentes potenciais aplicados em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 2,00): -0,15, +0,40, e 0,90 V vs. Ag/AgCl.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 19 – Modelos de circuito equivalente propostos para os espectros de Nyquist dos filmes de nanocompósito em potencial de (A) -0,15, +0,40 e (B) 0,90 V vs. Ag/AgCl.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

De acordo com Dominguez-Benetton, e colaboradores (2012), eletrodos modificados com compósitos poliméricos condutores apresentam comportamentos impedimétricos com um semicírculo em regiões de alta frequência característico do controle de difusão ( $R_{ct}$ ). Corroborando com o comportamento observado na Figura 18 para o nanocompósito obtido. As medidas de capacitância estão relacionadas a dupla camada na interface do solução e do filme formado, bem como ao acúmulo de carga no substrato, dessa forma os valores de capacitância maiores para o potencial de -0,15 V frente ao potencial do pico anódico é devido uma maior área de superfície ativa revestida com o polímero e a difusão limitada de íons  $H^+$  na estrutura do nanocompósito no potencial de +0,4 V.

Tabela 4 – Valores de resistência total ( $R_t$ ) e da capacitância ( $CPE_{\text{filme}}$ ) para o filme formado de nanocompósito.

Potencial aplicado (V)	$R_t$ ( $\Omega \text{ cm}^2$ )	CPE ( $\mu\text{F cm}^{-2}$ )
-0,15 V	3031,6	11,34
+0,40 V	2987,2	7,205
+0,90 V	2046,3	16,7

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

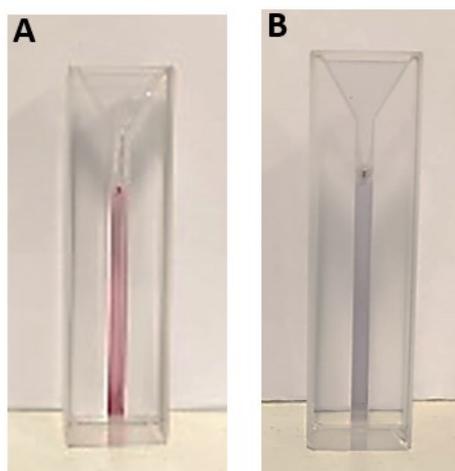
Com os dados da Tabela 4 e por meio dos gráficos de EIS observa-se que houve uma diminuição significativa dos valores de resistência com a presença do NTC, apresentando um semicírculo na região de alta frequência e sendo um comportamento interdependente com o obtido nos dados voltamétricos, de modo que o nanocompósito forma um filme com características condutoras. Embora o filme apenas de poli(NH<sub>2</sub>-01) em sua forma reduzida tenha gerado maiores valores de resistência, os dados obtidos mostram que a combinação do filme de poli(NH<sub>2</sub>-01) com NTC diminui a resistência à transferência de carga, devido a condução de corrente inter e intra cadeias (Olean-Oliveira; Brito; Teixeira, 2020).

#### 5.4. ESTRUTURAÇÃO DOS ELETRODOS E CONSTRUÇÃO DA FASE BIOSENSORIA

##### 5.4.1. Caracterização das Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro apresentaram um papel importante na etapa de imobilização do anticorpo, visto que são amplamente utilizadas devido às propriedades aplicáveis ao encapsulamento e interações específicas, além de características como a biocompatibilidade e elevada condutividade (Morel *et al.*, 2011). A conjugação da solução de anticorpo com as AuNPs foi observada por espectrofotometria, tendo em vista que era observado uma alteração da cor da solução avermelhada para roxo após adição de abHER2 em uma proporção 1:1 (v/v) de AuNPs com 1000 ng mL<sup>-1</sup> de abHER2 como na Figura 20.

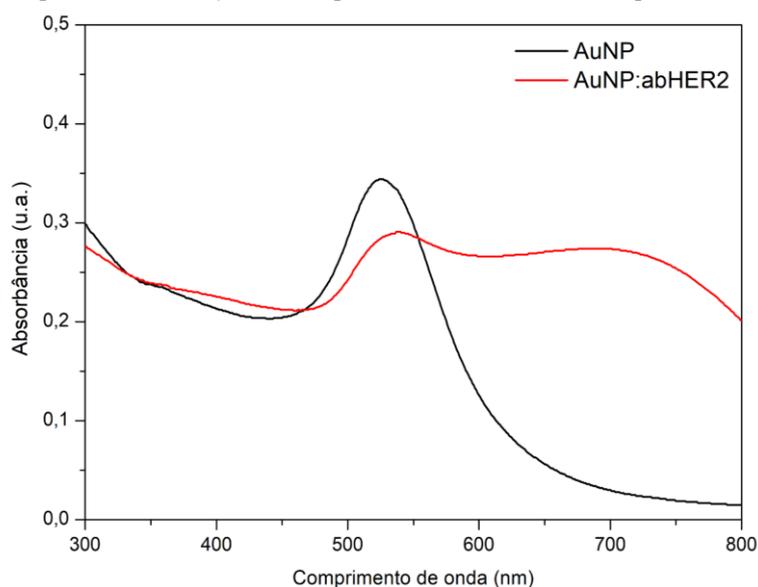
Figura 20 – Coloração das AuNPs dispersas (A) e Mistura das AuNPs com abHER2 (B).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os espectros de absorvância (Figura 21) foram medidos com varredura entre 800 nm a 300 nm, de modo a conformar a interação das nanopartículas com as moléculas de anticorpo. O espectro da AuNPs antes da conjugação com abHER2, mostrou uma absorção típica em 524 nm. Após a misturas com o anticorpo, é observado um deslocamento da banda para 539 nm e aumento da absorção em 690 nm, de mais baixa energia, confirmando a adsorção das partículas de anticorpo na superfície do ouro, formando conjugados estáveis que não alteram as propriedades biológicas e permitem a aplicação no biossensor (Thobhani *et al.*, 2010).

Figura 21 – Espectros de absorção das suspensões de AuNPs antes e após a imobilização de abHER2.

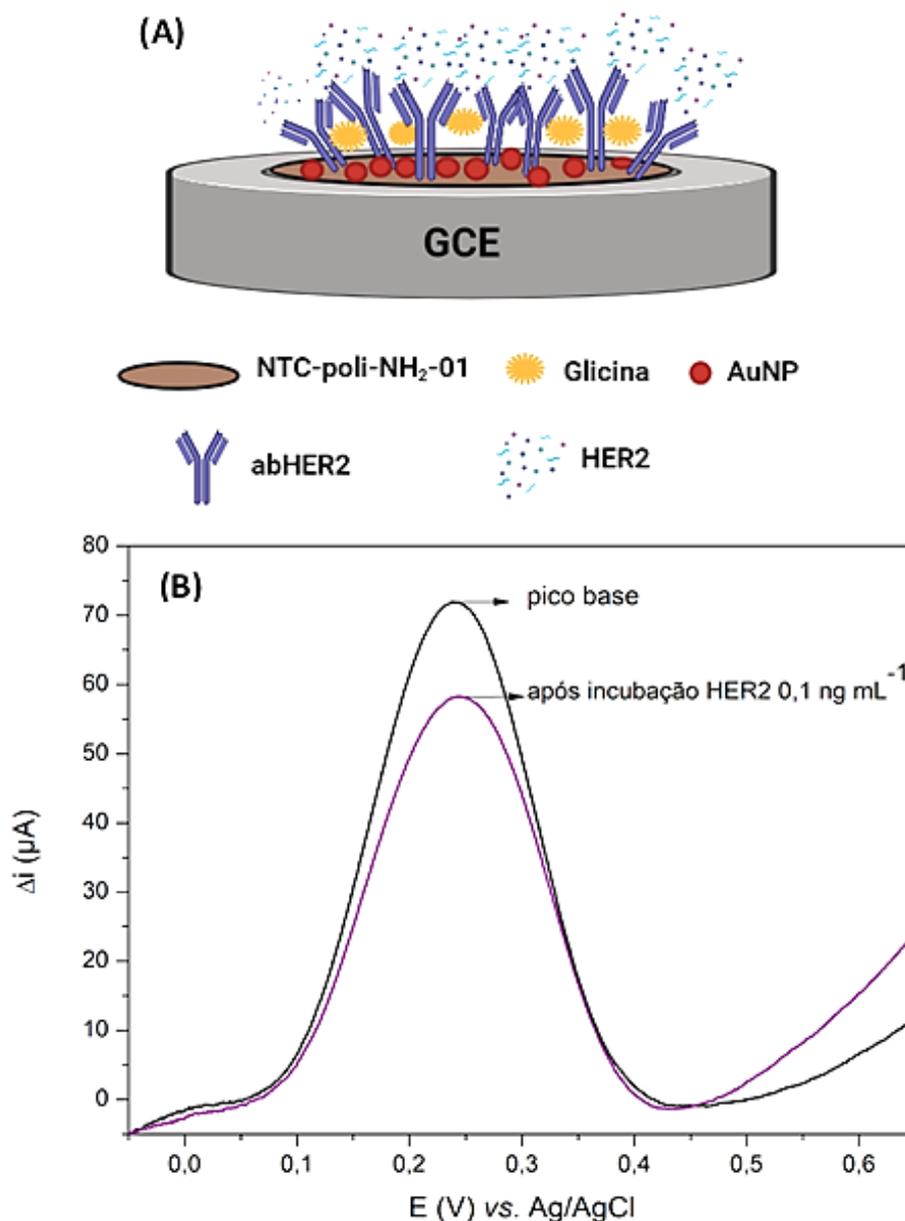


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 5.5. Princípio de funcionamento do imunossensor

A estratégia empregada para a aplicação do imunossensor proposto foi utilizar o nanocompósito como plataforma de imobilização covalente da mistura de anticorpo com AuNPs. A resposta analítica obtida tem origem na interação entre o antígeno e as moléculas de ab-HER2 imobilizadas na superfície, essa interação causa um bloqueio parcial da superfície do eletrodo resultando na diminuição da corrente de pico. Desta forma, a quantificação do antígeno presente na amostra analisada é proporcional ao sinal analítico (corrente elétrica), representado pelo inibição relativa (%). Na Figura 22-A encontra-se a representação esquemática da modificação do GCE pelo nanocompósito, mistura de abHER2-AuNPs e glicina. A Glicina foi utilizada para bloquear sítios de ligação não específicos ao antígeno. Essa superfície antes da incubação com o antígeno dá origem ao pico base, após a incubação por 15 min na presença de HER2 ( $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) podemos observar a redução na corrente elétrica. As medidas foram obtidas por SWV em PBS contendo  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  como sonda redox, dessa forma, a supressão da corrente de pico em relação ao pico base, indica que a imunorreação ocorreu na superfície do eletrodo (Figura 22-B).

Figura 22 – (A) Representação esquemática do princípio de funcionamento do imunossensor. (B) Perfis voltamétricos de onda quadrada na ausência (pico base) e presença de HER2  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$



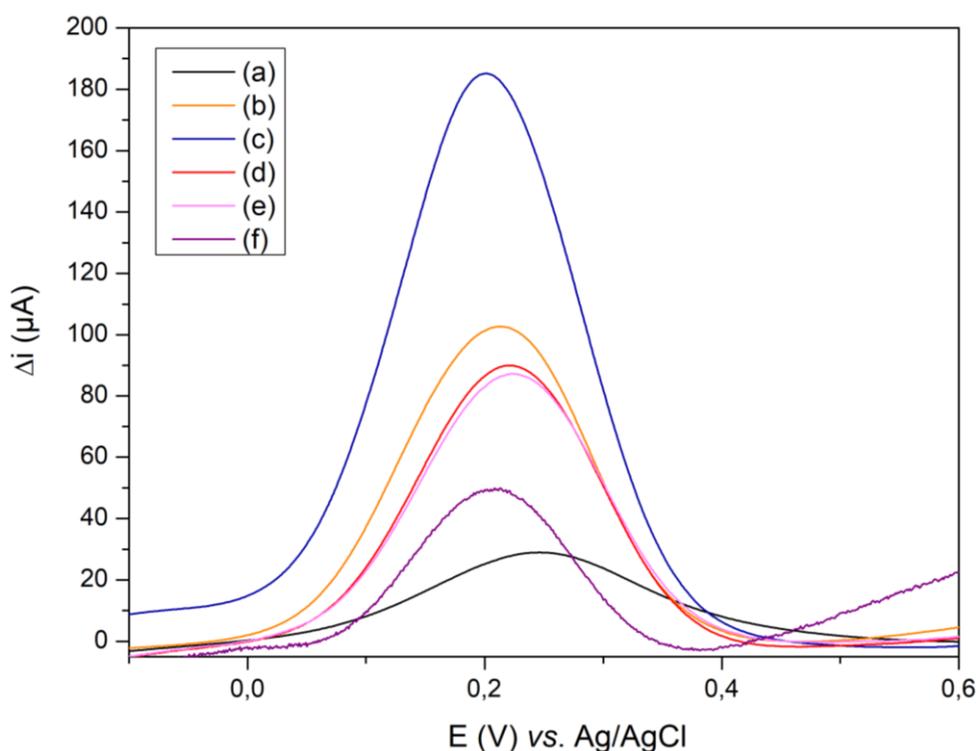
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 5.5.1 Caracterização por CV, SWV e EIS das superfícies modificadas

O efeito de cada etapa da construção do imunossensor nas respostas eletroquímicas do nanocompósito foi analisado por SWV (Figura 23) em PBS na presença de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Para confirmar as observações compreendidas a partir das medidas voltamétricas, também foram realizadas medidas de CV (Figura 24) e EIS (Figura 25) por meio do diagrama de Nyquist para cada modificação da superfície do eletrodo sendo (a) GCE, (b) NTC/GCE, (c)

poli-(NH<sub>2</sub>-01)/NTC/GCE, d)abHER2-AuNPs/poli-(NH<sub>2</sub>-01)/NTC/GCE, (e) Glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH<sub>2</sub>-01)/NTC/GCE, f) HER2/Glicina/abHER2:AuNPs/poli-(NH<sub>2</sub>-01)/NTC/GCE.

Figura 23 – Voltamogramas de onda quadrada em solução de tampão PBS contendo K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (5 mmol L<sup>-1</sup>) após cada etapa de modificação do eletrodo: (a) GCE, (b) NTC/GCE, (c) poli-(NH<sub>2</sub>-01):NTC/GCE, (d) abHER2-AuNPs/poli-(NH<sub>2</sub>-01)-NTC/GCE, (e) glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH<sub>2</sub>-01)-NTC/GCE, (f) HER2/Glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH<sub>2</sub>-01)-NTC/GCE.

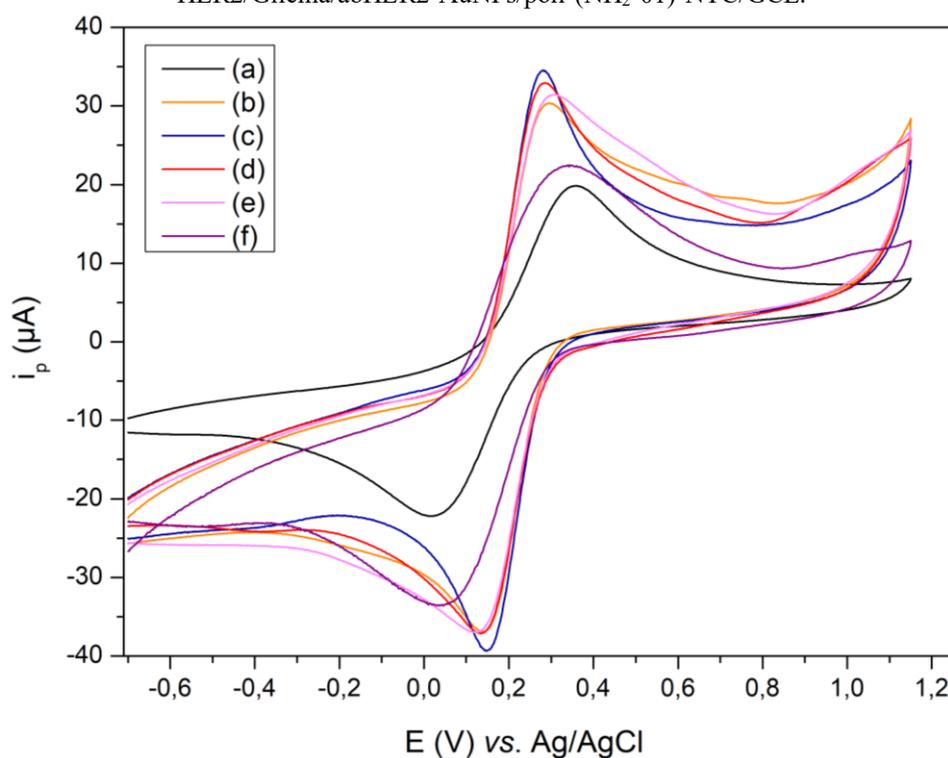


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A resposta do GCE limpo (voltamograma a) mostra um pico pouco pronunciado, referente como resposta apenas a sonda redox presente. Após a modificação da superfície do GCE com o filme de NTC (voltamograma b), seguido da modificação com o filme eletropolimerizado de poli-(NH<sub>2</sub>-01) resultando no nanocompósito poli-(NH<sub>2</sub>-01)-NTC (voltamograma c) foi observado um aumento expressivo na medida de corrente para essas duas modificações da superfície, evidenciando a atividade eletrocatalítica dos modificadores. Após a deposição da mistura de ab-HER2:AuNPs (voltamograma d) pode-se notar uma diminuição significativa na corrente de pico em comparação com a curva “c”. Isto se deve à presença de anticorpos imobilizados que dificultam parcialmente a transferência de carga na superfície do eletrodo, devido a natureza isolante da proteína. Além disso, a presença de glicina no eletrodo

(voltamograma e) resultou em uma pequena diminuição na corrente o que indica que as ligações inespecíficas foram evitadas. Por fim, após a obtenção do pico base (voltamograma e), o imunossensor foi incubado durante 15 min com HER2 ( $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (voltamograma f), resultando na formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo que ocorre na superfície do eletrodo, que foi evidenciado, pela queda proporcional da corrente de pico, como resultado do impedimento parcial ao fluxo de elétrons atribuído a alterações na superfície do eletrodo com a presença de uma quantidade crescente de proteína, que é uma molécula com características isolante

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos em solução de tampão PBS contendo  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) após cada etapa de modificação do eletrodo: (a) GCE, (b) NTC/GCE, (c) poli-( $\text{NH}_2$ -01):NTC/GCE, (d) abHER2-AuNPs/poli-( $\text{NH}_2$ -01)-NTC/GCE, (e) glicina/abHER2-AuNPs/poli-( $\text{NH}_2$ -01)-NTC/GCE, (f) HER2/Glicina/abHER2-AuNPs/poli-( $\text{NH}_2$ -01)-NTC/GCE.

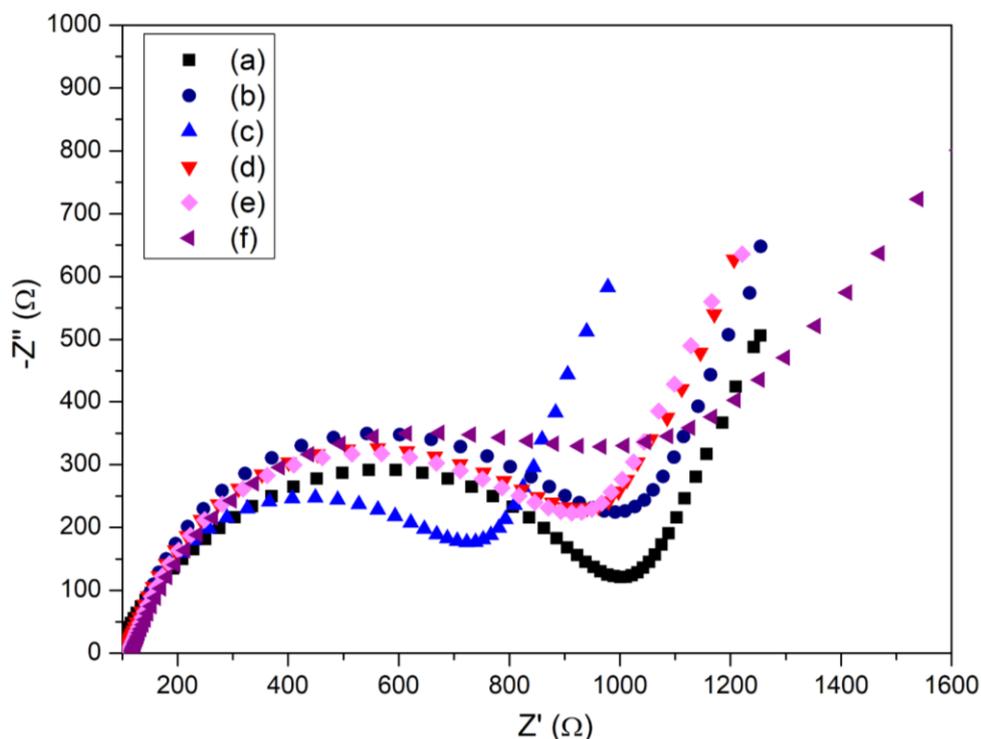


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Desta forma, através dos voltamogramas cíclicos o sinal anódico do par redox em  $+0,36 \text{ V}$  do GCE limpo em  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  sofre um pequeno deslocamento e aumento da reversibilidade e corrente com o sensor modificado com NTC (b), bem como com a formação do nanocompósito o par redox é característico em  $+0,28 \text{ V}$  devido o potencial de maior transferência de elétrons associado ao aumento no pico da corrente (c). Com a imobilização das moléculas de anticorpo com as nanopartículas de ouro (d) e glicina (e) há uma corrente menor

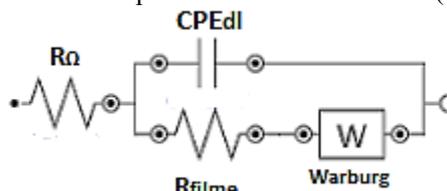
frente a etapa anterior. Além disso, a queda do pico redox e deslocamento após a incubação do antígeno também foi verificada no voltamograma cíclico (f).

Figura 25 – Espectro de impedância eletroquímica em solução de tampão PBS contendo  $K_3[Fe(CN)_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) após cada etapa de modificação do eletrodo: (a) GCE, (b) NTC/GCE, (c) poli-( $NH_2-01$ ):NTC/GCE, (d) abHER2-AuNPs/poli-( $NH_2-01$ )-NTC/GCE, (e) glicina/abHER2-AuNPs/poli-( $NH_2-01$ )-NTC/GCE, (f) HER2/Glicina/abHER2-AuNPs/poli-( $NH_2-01$ )-NTC/GCE.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 26 – Modelo de circuito equivalente proposto para os espectros de Nyquist na construção do imunossensor em potencial de circuito aberto (OCP).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As medidas de impedância foram realizadas para corroborar os estudos feitos por meio de CV e SWV, de tal forma que obtiveram-se informações sobre a resistência do eletrodo após cada modificação da superfície. Na Figura 25 demonstra-se os diagramas de Nyquist, obtidos em regime OCP, cujos valores foram determinados através de um circuito equivalente (Figura 26) incluindo a resistência ôhmica da solução eletrolítica ( $R_{\Omega}$ ), a capacitância de dupla camada elétrica ( $CPE_{dl}$ ) e a resistência de transferência de carga de cada filme modificado ( $R_{filme}$ ) em

série com elemento aberto de Warburg ( $W_o$ ). Os valores de  $R_t$  (Resistência total) obtidos e OCP estão representados na Tabela 5. Conforme observado, houve um aumento no valor de resistência com a modificação da superfície com o anticorpo e o antígeno, bem como a menor medida de resistência do filme compreende a etapa de modificação com o nanocompósito de NTC com o polímero de fenazina-salen que reflete ao comportamento voltamétrico dos sensores. Além disso, o deslocamento nos valores de OCP também pode ser indicativo de modificação de superfície.

Tabela 5 – Valores de resistência total ( $R_t$ ) e do OCP para cada filme modificado na superfície do GCE.

<b>Superfície modificada</b>	<b><math>R_t</math> (<math>\Omega</math>)</b>	<b>OCP (V) vs. Ag/AgCl</b>
GCE	1352	0,273
NTC/GCE	1361	0,249
poli-(NH <sub>2</sub> -01)/NTC/GCE	1138	0,325
abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)/NTC/GCE	1359	0,218
glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)/NTC/GCE	1376	0,221
HER2/glicina/abHER2-AuNPs/poli-(NH <sub>2</sub> -01)/NTC/GCE	1800	0,259

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

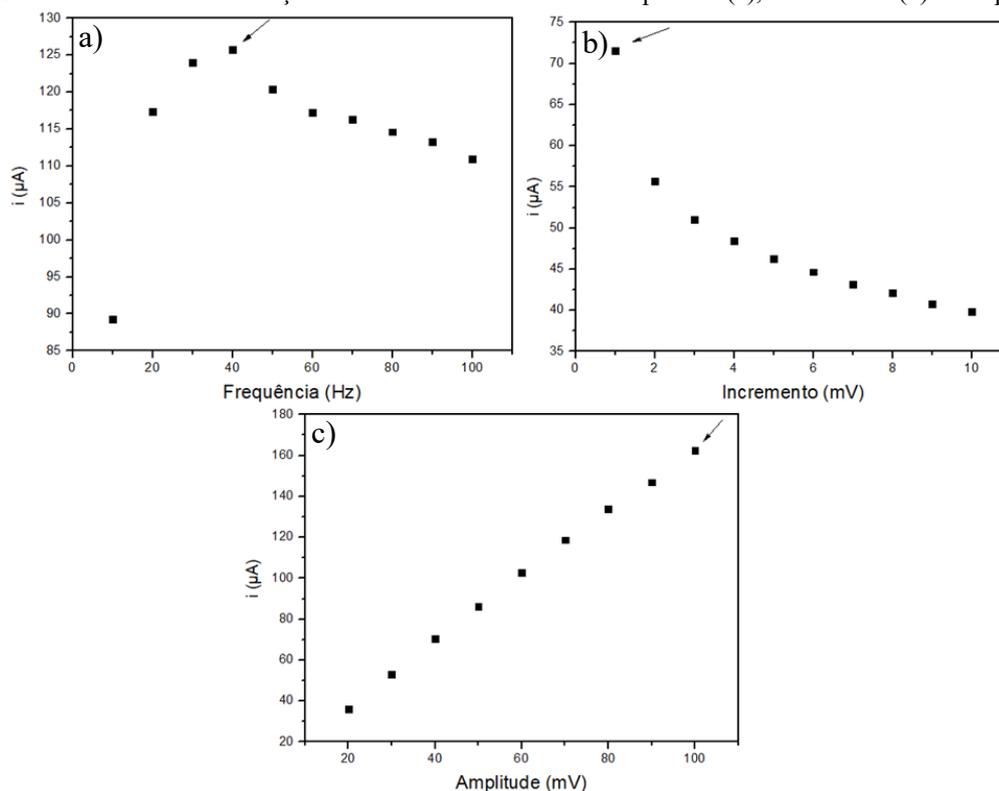
## 5.6. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CONSTRUÇÃO E OPERAÇÃO DO IMUNOSSENSOR

Para uma melhor condição de operação do imunossensor eletroquímico é de extrema importância a determinação da quantidade de anticorpo a ser imobilizada, bem como o tempo de incubação do antígeno para o resultado de um sistema imunocomplexo mais estável e promissor. Considerou-se ainda a possibilidade de interferentes ao biossensor já presentes no soro sanguíneo, por isso foram analisados compostos que poderiam afetar a funcionalidade e seletividade do mesmo. Assim, os parâmetros investigados por meio de SWV com intuito de otimizar as condições de construção e operação do imunossensor proposto também foram otimizados os parâmetros da técnica de análise sendo elas: a amplitude, frequência e incremento.

### 5.6.1. Otimização dos parâmetros da SWV

A técnica de análise escolhida foi a SWV, dessa forma foi avaliada a resposta do eletrodo em diferentes faixas de parâmetros instrumentais, sendo frequência (10–100 Hz), amplitude (20–100 mV) e incremento (1–10 mV) (Figura 27). Assim sendo, as maiores respostas foram obtidas em frequência de 40 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 1 mV, e, portanto, foram os parâmetros selecionados para a aplicação nos experimentos subsequentes.

Figura 27 – Parâmetros de otimização das medidas de SWV em Frequência (a), Incremento (b) e Amplitude (c).



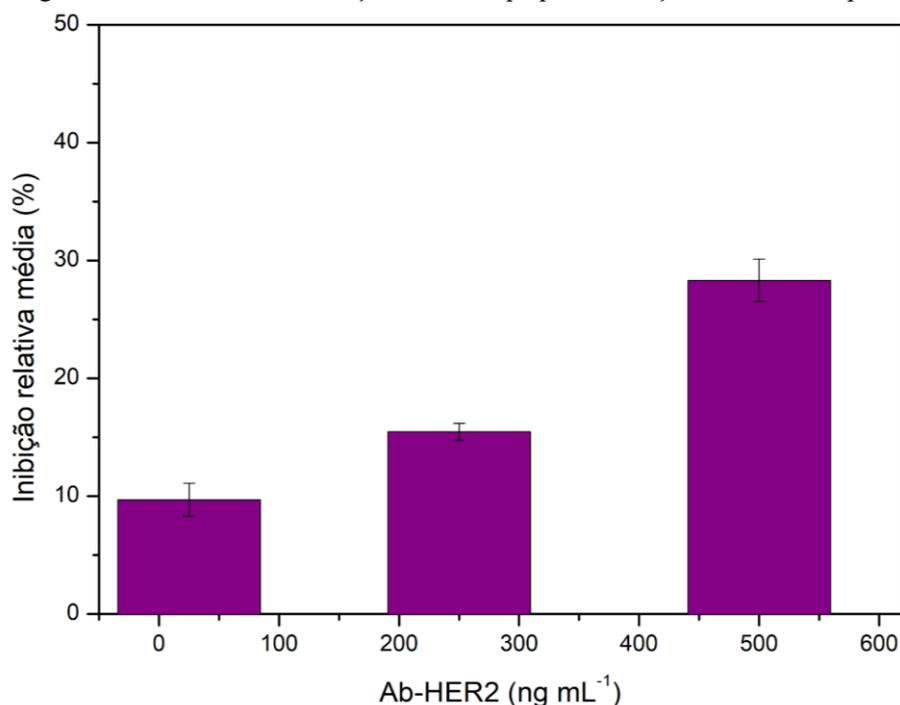
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 5.6.2. Imobilização e otimização da concentração do anticorpo

Com o objetivo de otimizar a concentração do anticorpo na detecção do antígeno HER2, realizaram-se ensaios utilizando as seguintes condições: abHER2 (500, 250 e 25  $\text{ng mL}^{-1}$ ). A partir dos resultados determinados, observou-se que quanto maior a concentração, maior o decréscimo de corrente do pico base e conseqüentemente, maior o bloqueio da superfície condutora, indicando que é maior a taxa de moléculas de analito imobilizadas no sensor (Figura 28). O bloqueio completo da superfície do eletrodo não é interessante para obtenção do imunossensor, pois é na etapa de formação do imunocomplexo que será avaliada a inibição da

corrente voltamétrica, dessa forma com  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  acredita-se ter uma quantidade elevada de abHER2 na superfície do eletrodo, sem comprometer a condutividade, sendo portanto, essa foi a concentração selecionada para a aplicação nos experimentos subsequentes.

Figura 28 – Efeito da concentração de anticorpo para formação do imunocomplexo.

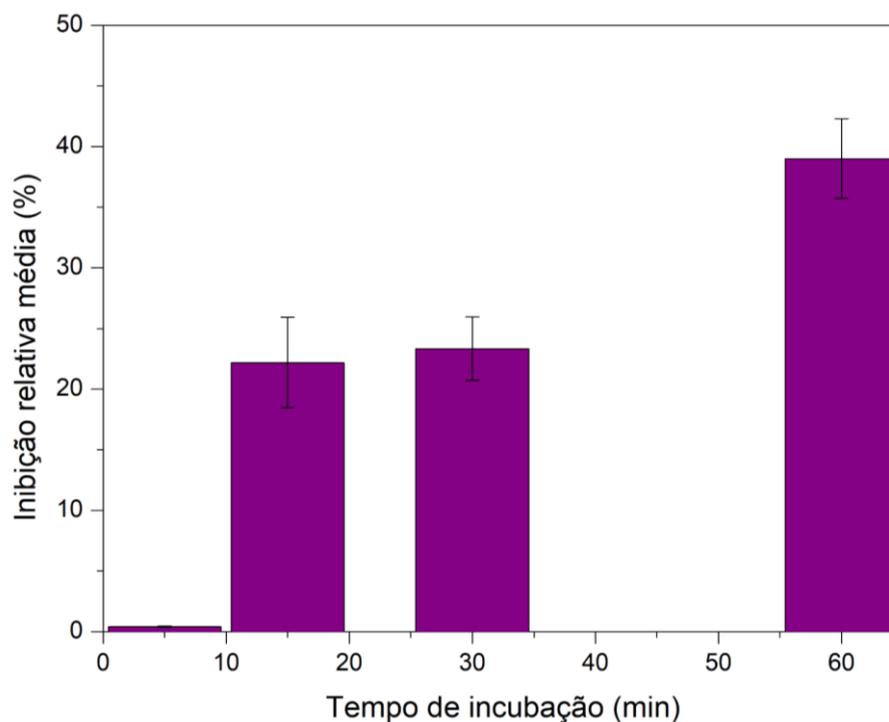


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 5.6.3. Otimização do tempo de incubação do antígeno

O tempo de incubação de HER2 ( $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) foi estudado nas condições de 5, 15, 30 e 60 min, de maneira que pudesse ser analisado o tempo ideal para ocorrer a formação de ligação entre o anticorpo e o antígeno, para isso selecionou-se a concentração  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  de HER2. Na Figura 29 observa-se que para incubação de 15 e 30 min há proximidade nos valores de inibição relativa indicando, dessa forma, 15 min já se mostra suficiente para haver a formação do imunocomplexo, com uma inibição relativa de 22,2%. No tempo de 5 min não há indicativo da formação significativa de imunocomplexo, enquanto o tempo de 60 min gerou uma inibição cerca de 50% maior, contudo tornaria o diagnóstico muito demorado. Portanto, considerando que entre 15 e 30 min há uma saturação na resposta de inibição da interação entre anticorpo e antígeno, foi selecionado o tempo de 15 min para a incubação do HER2 e aplicação do imunossensor.

Figura 29 – Efeito do tempo de incubação de HER2 (0,1 ng mL<sup>-1</sup>) na resposta analítica do imunossensor.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

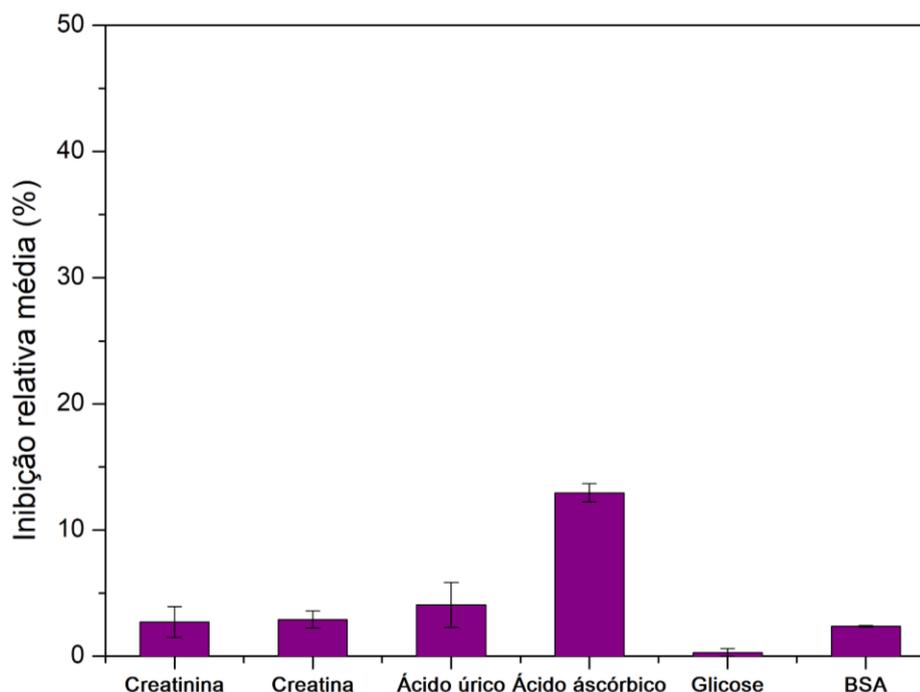
#### 5.6.4. Análise de possíveis interferentes

As soluções dos possíveis interferentes foram preparadas em tampão PBS (0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4), sendo elas de glicose (200 mg L<sup>-1</sup>), creatinina (4,2 mg L<sup>-1</sup>), creatina (10,7 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (10 mg L<sup>-1</sup>), ácido úrico (10 mg L<sup>-1</sup>) e BSA (10 mg L<sup>-1</sup>). A superfície do imunossensor foi incubada com cada uma das soluções, e a mudança de corrente ocasionada foi avaliada. De acordo com a Figura 30, com exceção do ácido ascórbico que inibiu em 12% o sinal do pico base, todos os compostos apresentaram interferência menor que 5% sobre o pico base, de maneira que a inibição relativa média foi baixa e assim pouco influenciaram na medida de detecção da amostra em soro.

No entanto, a concentração de BSA considerada foi 10 mg L<sup>-1</sup> e a mesma interferiu em 2,4%, porém em soro sanguíneo a concentração desta proteína é de 40 mg L<sup>-1</sup> (Györi; Fábíán; Lázár, 2017) e assim considerou-se a diluição da mesma para diminuir os efeitos interferentes no sensor.

Embora o nível de interferência do ácido ascórbico tenha sido superior a 5%, o mesmo pode ser minimizado com estratégias analíticas utilizando o método de adição de padrão na etapa de quantificação, minimizando os efeitos de matriz.

Figura 30 – Análise dos possíveis compostos interferentes ao imunossensor.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 5.6.5. Estudo da repetibilidade do imunossensor

A precisão dos dados obtidos foi avaliada por ensaios de repetibilidade, a média foi considerada a partir de sete eletrodos construídos independentemente sob as mesmas condições experimentais e empregados na medida de  $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$  de HER2, sendo o desvio padrão relativo obtido entre os ensaios igual a 3,2%, mostrando que o imunossensor proposto apresentou baixa dispersão dos resultados, e, portanto boa precisão.

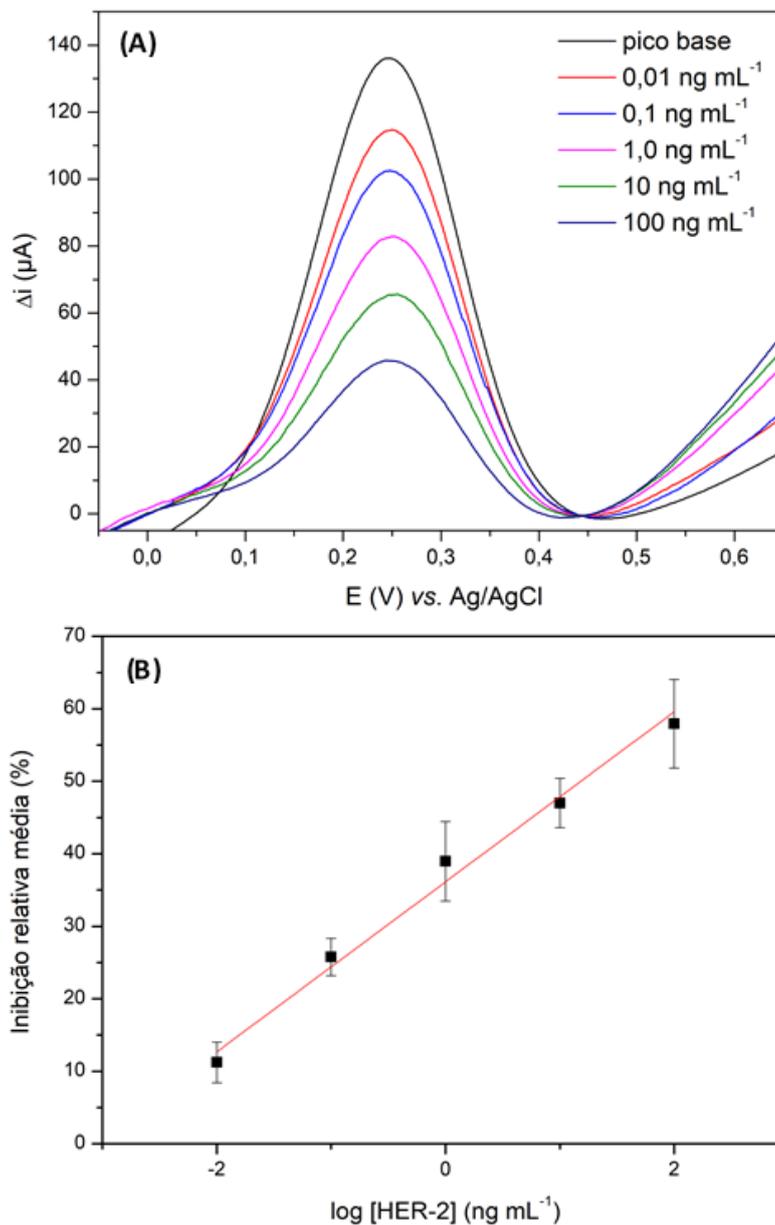
## 5.7. CURVA DE CALIBRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE HER2

### 5.7.1. Curva de Calibração

A Figura 31-B mostra a curva de calibração construída sob as condições otimizadas para diferentes concentrações de HER2 em PBS ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4), as quais foram incubadas na superfície do imunossensor na faixa de  $0,01$  a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Conforme observado na Figura 30-A a inibição do sinal de corrente aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de antígeno. Os pontos da curva foram obtidos em triplicata. A regressão linear obtida foi:  $i_{\text{rel}} = 11,73 (\pm 0,68) \log [\text{HER2}] + 36,13 (\pm 0,96)$  e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,987, sendo  $i_{\text{rel}}$  a inibição relativa média obtido pela supressão do valor de corrente em

relação ao pico base após a incubação da amostra e [HER2] a concentração de biomarcador HER2 em  $\text{ng mL}^{-1}$ .

Figura 31 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em: (a) PBS (pico base) contendo  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e após incubação do imunossensor com: (b) 0,01, (c) 0,1, (d) 1,0, (e) 10,0 e (f) 100,0  $\text{ng mL}^{-1}$  de HER2. (B) Curva de calibração para o imunossensor proposto na faixa de 0,01 a 100  $\text{ng mL}^{-1}$  de HER2 ( $n = 3$ ).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Tabela 6 estão indicadas as características da curva de calibração para a análise de HER2.

Tabela 6 – Parâmetros analíticos de desempenho do imunossensor proposto para a análise de HER2.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Faixa de concentração (ng/mL)	0,01 - 100
Coefficiente de correlação (r)	0,987
Coefficiente angular (m)	11,73
Desvio padrão do coeficiente angular ( $S_m$ )	0,68
Coefficiente linear (a)	36,13
Desvio padrão do coeficiente linear ao ( $S_a$ )	0,96
Limite de detecção (LOD) (ng mL <sup>-1</sup> )	0,25

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O limite de detecção calculado (com base na Equação 3 foi 0,25 ng mL<sup>-1</sup>, assim é possível concluir que o intervalo de concentração e o limite de detecção são adequados para a detecção de HER2 no soro humano, visto que o *cuttof* (valor limite) estabelecido é de 15 ng mL<sup>-1</sup> (Shamshirian *et al.*, 2020). Também é válido ressaltar que o imunossensor proposto possui uma faixa de detecção que possibilita uma detecção de câncer de mama precoce.

$$LOD = \frac{3 \times \text{desvio padrão intercepto}}{\text{coeficiente angular}} \quad (3)$$

### 5.7.2 Determinação de HER2

A resposta analítica do imunossensor foi analisada em um imunoensaio em duplicata, no qual foram incubadas duas concentrações de amostras de soro simulado contendo HER2 a 1 ng mL<sup>-1</sup> e 15 ng mL<sup>-1</sup>. Os resultados destas determinações encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de HER2 obtidos na determinação de soluções em soro sanguíneo simulado.

<b>Amostra</b>	<b>[HER2] esperada (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>[HER2] detectada (ng mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro relativo (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Soro simulado	1,0	0,80±0,03	-19,9	80,0
Soro simulado	15,0	12,8±1,5	-15,0	85,3

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Tabela 8 encontram-se características de imunossensores propostos para análise de HER2 em amostras de soro sanguíneo. De acordo com o trabalho de Freitas, Nouws e Delerue-

Matos (2018), em que o método de detecção eletroquímico através de uma modificação da superfície de um eletrodo com AuNPs para conjugação do anticorpo, o limite de detecção encontrado foi  $0,16 \text{ ng mL}^{-1}$  e a recuperação para amostra de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  foi de 83% analisada em soro humano, e também em outro método de detecção por Amir *et al* (2024) foram obtidos bons resultados com um LOD de  $4,8 \text{ pg mL}^{-1}$  em que os resultados foram obtidos por alteração de corrente após incubação de amostra de soro com HER2 em um eletrodo de grafite (GS) modificado quimicamente, em que não são utilizadas nanopartículas para conjugação do anticorpo.

A modificação de eletrodo impresso de carbono ativado (SPCE) com nanopartículas metálicas (AuNPs) apresenta um menor tempo de ensaio, bem como limites de detecção baixos que favorecem uma detecção precoce. Além disso, na metodologia proposta por Lah e colaboradores (2019) e Amir *et al* (2024) utilizam-se pontos quânticos (QDs) ou pontos quânticos de carbono (CQDs) modificados que ligam-se covalentemente à biomolécula de anticorpo com seletividade. Nestes, obtiveram-se recuperações acima de 90% para a detecção de amostra de HER2.

Tabela 8 – Comparação com outros Imunossensores eletroquímicos propostos para detecção de HER2.

Superfície modificada	Método	Faixa de detecção ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	LOD ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Tempo ensaio	Referência
SPCE/QDs/ abHER2	Voltamétrico	1,0-100	0,28	4 h	Lah <i>et al</i> (2019)
SPCE/abHER2	Voltamétrico	5-200	4,0	6 h	Tallapragada <i>et al</i> (2017)
SPCE/AuNPs/ abHER2	Impedimétrico	0-40	6,0	2 h	Ravalli <i>et al</i> (2015)
GS/QDs/ abHER2	Voltamétrico	0,1-1,0	0,005	2h	Amir <i>et al</i> (2024)
SPCE/AuNPs/ abHER2	Voltamétrico	7,5-50	0,16	2h e 20 min	Freitas, Nouws e Delerue-Matos (2018)
GCE/ NTC-poli-NH <sub>2</sub> / AuNPs:abHER2	Voltamétrico	0,01-100	0,25	1h e 06 min	Este trabalho.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tendo isso em vista, considera-se que o sistema proposto apresentou resultados esperados frente aos imunossensores eletroquímicos comparados, mesmo que os erros relativos obtidos foram maiores que 10% devido a possível efeito de matriz, a qual refere-se ao conjunto dos constituintes da amostra que foram adicionados para simular o ambiente do analito (Skoog *et al.*, 2014).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos e metodologia propostos, pode-se considerar que os mesmos foram alcançados. O estudo de formação do filme da base de Schiff (NH<sub>2</sub>-01) sobre a superfície de carbono vítreo garantiu que a eletropolimerização pela técnica de voltametria cíclica em meio ácido é favorável para aplicação eletroanalítica em concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> a 100 mV s<sup>-1</sup>. Foi verificada uma melhora no desempenho eletroquímico após a incorporação do nanotubo de carbono na metodologia de construção do sensor, visto que houve aumento dos valores de corrente de pico do par redox e consequentemente diminuição dos valores de resistência de transferência de carga do filme garantindo a amplificação da resposta eletroanalítica da sonda redox.

Além disso, foi promissora a interação entre anticorpos abHER2 com as nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato como agente redutor, sendo a conjugação verificada por espectrofotometria UV-VIS. Portanto, a superfície do eletrodo modificada com o nanocompósito foi funcionalizada com a mistura de abHER2 e AuNPs-citrato, garantindo uma plataforma estável e sensível a incubação do biomarcador HER2 para a sua detecção. Para avaliar o comportamento e construção do imunossensor foram realizadas medidas de voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e espectroscopia de impedância eletroquímica, as quais obtiveram boa concordância entre os comportamentos observados.

Portanto, pela otimização da sensibilidade do imunossensor considerou-se que a concentração de anticorpo de 500 ng mL<sup>-1</sup> e tempo de incubação com o antígeno em 15 min foram eficazes para melhor aplicação do imunossensor proposto. No entanto, os estudos de interferência realizados demonstraram que o ácido ascórbico é um potencial interferente as medidas do imunossensor nas condições analisadas, pois apresentou uma inibição relativa de 12% e o BSA a solução de 10 mg L<sup>-1</sup> já interferiu com 2,4%, de maneira que em soro sanguíneo a concentração da mesma é de 40 mg L<sup>-1</sup> e por isso uma diluição da mesma se fez necessária.

Através disso, foi possível a construção de uma curva de calibração em tampão PBS pH 7,4 com uma faixa de detecção de HER2 entre  $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , garantindo que valores acima de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  do biomarcador pudessem ser detectados, e consequente diagnosticar o câncer de mama. O limite de detecção encontrado foi  $0,25 \text{ ng mL}^{-1}$  contribuindo para uma detecção precoce do câncer. Todavia, a determinação em amostras em soro sanguíneo simulado com  $1$  e  $15 \text{ ng mL}^{-1}$  apresentaram uma recuperação de 80 e 85 % respectivamente, demonstrando que há efeito de matriz devido às interferências presentes no soro simulado. Por fim, apesar dos resultados obtidos neste trabalho indicarem que o sistema do imunossensor proposto é útil no diagnóstico de câncer de mama, estudos futuros deverão ser realizados para validar a sua utilização.

## **7. ESTUDOS FUTUROS E PERSPECTIVAS**

De maneira a funcionalizar o nanocompósito formado na superfície do eletrodo com a eletropolimerização de NH<sub>2</sub>-01 considera-se importante realizar um estudo da melhor velocidade de eletrodeposição e a quantidade de ciclos de deposição do monômero sobre a dispersão de NTC sobre o eletrodo, bem como caracterizar o comportamento eletroquímico por meio de EIS e CV utilizando uma sonda redox. Além disso, estudar estratégias para diminuir a interferência dos compostos interferentes na resposta do imunossensor de maneira a diminuir o efeito matriz obtido na detecção da amostra e podendo assim obter resultados mais precisos e exatos na etapa de determinação do antígeno HER2. Por fim, para também contribuir com uma detecção de câncer de mama mais eficaz seria importante construir uma curva de calibração com soluções preparadas em soro simulado, de modo a complementar o estudo e diminuir os desvios presentes na determinação.

## REFERÊNCIAS

- AMIR, Humayun *et al.* Nitrogen-enhanced carbon quantum dots mediated immunosensor for electrochemical detection of HER2 breast cancer biomarker. **Bioelectrochemistry**, [S.L.], v. 155, p. 108589, fev. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108589>.
- AMORIM, Leiliane Coelho André. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 158-170, jun. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-790x2003000200009>.
- ANSELMO, Daniele. **LEWIS ACIDIC Zn(II) SCHIFF BASE COMPLEXES IN HOMOGENEOUS CATALYSIS**. 2013. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, 2013.
- BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R.. **ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001. 850 p.
- BEZERRA, Giselda *et al.* Electrochemical aptasensor for the detection of HER2 in human serum to assist in the diagnosis of early stage breast cancer. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 411, n. 25, p. 6667-6676, 5 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-019-02040-5>.
- BRETT, Ana Maria Oliveira; BRETT, Christopher M. A.. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Estados Unidos: Almedina, 1996.
- CARNEY, Walter P. Circulating oncoproteins HER2/neu, EGFR and CAIX (MN) as novel cancer biomarkers. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 309-319, maio 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.7.3.309>.
- CERVANTES-DÍAZ, María Teresa; PIÑA-SÁNCHEZ, Patricia; LEAL-HERRERA, Yelda Aurora. El uso de biomarcadores en cáncer de mama. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 83-90, fev. 2020.
- CHEPURNAYA, Irina A. et al. Redox-conducting polymers based on metal-salen complexes for energy storage applications. **Pure And Applied Chemistry**, [S.L.], v. 92, n. 8, p. 1239-1258, 10 jul. 2020. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/pac-2019-1218>.
- COUTO, Maria do Rosário *et al.* Papel do HER2/NEU sérico como factor preditivo e de monitorização no cancro da mama sob terapêutica com trastuzumab. **Acta Médica Portuguesa**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 5-16, 28 fev. 2011. Ordem dos Medicos. <http://dx.doi.org/10.20344/amp.349>.
- D'ORAZIO, Paul. Biosensors in clinical chemistry — 2011 update. **Clinica Chimica Acta**, [S.L.], v. 412, n. 19-20, p. 1749-1761, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.06.025>.

DOMINGUEZ-BENETTON, Xochitl; SEVDA, Surajbhan; VANBROEKHOVEN, Karolien; PANT, Deepak. The accurate use of impedance analysis for the study of microbial electrochemical systems. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 41, n. 21, p. 7228, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35026b>.

FREITAS, Maria; NOUWS, Henri P. A.; DELERUE-MATOS, Cristina. Electrochemical Sensing Platforms for HER2-ECD Breast Cancer Biomarker Detection. **Electroanalysis**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 121-128, 27 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201800537>.

GAO, Caiqin *et al.* Surface modification methods and mechanisms in carbon nanotubes dispersion. **Carbon**, [S.L.], v. 212, p. 118133, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2023.118133>.

GOUD, K. Yugender *et al.* A highly sensitive electrochemical immunosensor for zearalenone using screen-printed disposable electrodes. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 832, p. 336-342, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.10.058>.

HUANG, Liang; LI, Chun; SHI, Gaoquan. High-performance and flexible electrochemical capacitors based on graphene/polymer composite films. **J. Mater. Chem. A**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 968-974, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3ta14511e>.

HU, Chengguo; HU, Shengshui. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Sensors: principles and applications in biomedical systems. **Journal Of Sensors**, [S.L.], v. 2009, p. 1-40, 2009. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2009/187615>.

LAH, Zur Mira Azizah Nor Haiza; AHMAD, Shahrul Ainliah Alang; ZAINI, Muhammad Safwan; KAMARUDIN, Mazliana Ahmad. An Electrochemical Sandwich Immunosensor for the Detection of HER2 using Antibody-Conjugated PbS Quantum Dot as a label. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 174, p. 608-617, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.024>.

LE, Thanh-Hai; KIM, Yukyung; YOON, Hyeonseok. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. **Polymers**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 150, 23 abr. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym9040150>.

LIU, Ya Ting; DENG, Jian; XIAO, XI Lin; DING, Li; YUAN, Ya Li; LI, Hui; LI, Xiu Ting; YAN, Xiao na; WANG, Li Li. Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. **Electrochimica Acta**, [S.L.], v. 56, n. 12, p. 4595-4602, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2011.02.088>.

MARCH, Jerry; SMITH, Michael B.. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. 6. ed. Estados Unidos: Wiley-Interscience, 2007.

MARTIN, Cibely S.; OLEAN-OLIVEIRA, André; TEIXEIRA, Marcos F.s.. A new polymeric thin film by using electropolymerization: thin film of poly(phenazine-salen) obtained from 2,2'-[1,2-ethanediylbis(nitrilomethylidyne)]-bis[4-amino-phenol]. **Journal Of Electroanalytical**

**Chemistry**, [S.L.], v. 873, p. 114404, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114404>.

MOREL, Anne-Laure; BOUJDAY, Souhir; MÉTHIVIER, Christophe; KRAFFT, Jean-Marc; PRADIER, Claire-Marie. Biosensors elaborated on gold nanoparticles, a PM-IRRAS characterisation of the IgG binding efficiency. **Talanta**, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 35-42, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.028>.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1250 p.

OLEAN-OLIVEIRA, André; BRITO, Gilberto A. Oliveira; TEIXEIRA, Marcos F. S. Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of  $\pi$ -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: an electrochemical impedance spectroscopy study. **Acs Omega**, [S.L.], v. 5, n. 40, p. 25954-25967, 30 set. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c03391>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (org.). **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Área de Edição e Produção de Materiais Técnico-Científicos, 2022. 160 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (org.). **Parâmetros técnicos para detecção precoce do câncer de mama. / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Área de Edição e Produção de Materiais Técnico-Científicos, 2022. 48 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//parametros-tecnicos-deteccao-precoce-cancer-de-mama.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (org.). **Global Cancer Observatory: Breast Source: Globocan 2020**. Glogal Cancer Observatory. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2023.

PAGE, David B. *et al.* Monosomy 17 in potentially curable HER2-amplified breast cancer: prognostic and predictive impact. **Breast Cancer Research And Treatment**, [S.L.], v. 167, n. 2, p. 547-554, 6 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-017-4520-1>.

PARK, Seon; KWON, Oh; LEE, Ji; JANG, Jyongsik; YOON, Hyeonseok. Conducting Polymer-Based Nanohybrid Transducers: a potential route to high sensitivity and selectivity sensors. **Sensors**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 3604-3630, 20 fev. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s140203604>.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S.; VYVYAN, James R. **INTRODUCTION TO SPECTROSCOPY**. 4. ed. USA: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PERFÉZOU, Maëlle; TURNER, Anthony; MERKOÇI, Arben. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. **Chem. Soc. Rev.**, [S.L.], v. 41, n. 7, p. 2606-2622, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1cs15134g>.

PERUMAL, Veeradasan; HASHIM, Uda. Advances in biosensors: principle, architecture and applications. **Journal Of Applied Biomedicine**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-15, 1 jan. 2014. University of South Bohemia in Ceske Budejovice. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>.

RAVALLI, Andrea; ROCHA, Carolina Gomes da; YAMANAKA, Hideko; MARRAZZA, Giovanna. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection: the case of her2. **Bioelectrochemistry**, [S.L.], v. 106, p. 268-275, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.010>.

RIBEIRO, D.V.; SOUZA, C.A.C.; ABRANTES, J.C.C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista Ibracon de Estruturas e Materiais**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 529-546, ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1983-41952015000400007>.

SHAMSHIRIAN, Amir *et al.* Diagnostic value of serum HER2 levels in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Bmc Cancer**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 0-10, 31 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-020-07545-2>.

SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

TANG, Heqing; KITANI, Akira; SHIOTANI, Masaru. Effects of anions on electrochemical formation and overoxidation of polyaniline. **Electrochimica Acta**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 1561-1567, jun. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0013-4686\(95\)00408-4](http://dx.doi.org/10.1016/0013-4686(95)00408-4).

TALLAPRAGADA, Sagarika Deepthy; LAYEK, Keya; MUKHERJEE, Runu; MISTRY, Kalyan Kumar; GHOSH, Monidipa. Development of screen-printed electrode based immunosensor for the detection of HER2 antigen in human serum samples. **Bioelectrochemistry**, [S.L.], v. 118, p. 25-30, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.06.009>.

TERRONES, Mauricio. Science and Technology of the Twenty-First Century: synthesis, properties, and applications of carbon nanotubes. **Annual Review Of Materials Research**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 419-501, ago. 2003. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.matsci.33.012802.100255>.

THOBHANI, Smita; ATTREE, Simon; BOYD, Robert; KUMARSWAMI, Neelam; NOBLE, James; SZYMANSKI, Mateusz; PORTER, Robert A.. Bioconjugation and characterisation of gold colloid-labelled proteins. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 356, n. 1-2, p. 60-69, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2010.02.007>.

TURNER, Anthony P. F.. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, [S.L.], v. 42, n. 8, p. 3184, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3cs35528d>.

WAN, Ying *et al.* Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors And Bioelectronics**, [S.L.], v. 47, p. 1-11, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.045>.

ZOU, Li; MAI, Chuoying; LI, Mengyan; LAI, Yufen. Smartphone-assisted colorimetric sensing of enzyme-substrate system using pH-responsive gold nanoparticle assembly. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 1178, p. 338804, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2021.338804>.