UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

STHÉFANE VALLE DE ALMEIDA

# DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA O MONITORAMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GUARAPUAVA

2019

STHÉFANE VALLE DE ALMEIDA

# DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA O MONITORAMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Andressa Galli
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi

GUARAPUAVA
2019

Catalogação na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

A447d

Almeida, Sthéfane Valle de
Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico para o monitoramento de células cancerosas / Sthéfane Valle de Almeida. – – Guarapuava, 2019.
xiv, 78 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, 2019

Orientadora: Andressa Galli
Coorientadora: Juliana Cancino Bernardi
Banca examinadora: Andressa Galli, Luiz Henrique Dall Antonia, Mauro Chierici Lopes

Bibliografia

1. Química. 2. Imunossensor impedimétrico. 3. Espectroscopia de impedância eletroquímica. 4. Detecção de transferrina. 5. Validação. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 542

**STHÉFANE VALLE DE ALMEIDA**

# DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA MONITORAMENTO DE CÉLULAS CANCEROSAS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Impresso com recursos públicos por rateio/gasto na UNICENTRO

Aprovado em 22 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia - UEL

Prof. Dr. Mauro Chierici Lopes - UNICENTRO

Profª. Drª. Andressa Galli

Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela força recebida e proteção em toda minha vida, em especial durante o mestrado.

Aos meus pais Antonio Carlos e Leni, por todo o apoio, dedicação, paciência e amor. Se sou o que sou hoje, é pela educação que recebi de vocês.

Aos familiares que me deram todo o apoio, incentivo e carinho desde sempre, principalmente aos que acompanharam de perto os percalços desses dois anos de mestrado.

À minha orientadora e mãe científica, professora Dra. Andressa Galli, pelos ensinamentos e por me guiar no caminho da pesquisa com toda a dedicação, paciência, incentivo e confiança no meu potencial.

À minha coorientadora, professora Dra. Juliana Cancino Bernardi, por todo o aprendizado, apoio, acolhimento, incentivo e paciência.

Ao professor Dr. Valtencir Zucolotto e ao Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia – GNano, pela confiança e acolhimento durante o período em que estive em São Carlos. Também, agradeço imensamente pela infraestrutura fornecida, sem a qual esta pesquisa não seria possível.

A todos os professores do PPGQ-Unicentro, em especial à professora Dra. Maria Lurdes Felsner e ao professor Dr. Mauro Chierici Lopes, pela disposição em sanar dúvidas sempre que necessário e pelas sugestões dadas, que certamente ajudaram no aprimoramento do trabalho desenvolvido.

À Dra. Jucimara Kulek de Andrade, por ter dedicado parte de seu tempo para me ajudar e pelo carinho, atenção e amizade recebidos.

A Jonatas Schadeck Carvalho, pelo carinho, atenção e apoio, por ter ouvido minhas reclamações e assistido minhas apresentações milhares de vezes (muitas a contragosto).

Aos amigos que me apoiaram, principalmente no tempo em que estive longe, não deixando que eu me sentisse sozinha. Em especial, agradeço aos amigos Gabriel e João Fabio, pela disposição em ajudar sempre que necessário (só Deus sabe quantos chocolates lhes devo) e pelo incentivo recebido desde o momento da prova de seleção.

A todos os colegas do GEMN, pelo apoio, incentivo e principalmente pelos desabafos acerca dos percalços da pesquisa, que de certa forma fizeram me sentir melhor quando as coisas davam errado.

À coordenação e secretaria de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO, sempre dispostos a ajudar quando solicitados.

A todos os órgãos de fomento, em especial Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida. (O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001).

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Há uma teimosia em relação a mim que nunca pode suportar ter medo da vontade dos outros. Minha coragem sempre aumenta a cada tentativa de me intimidar.”*

– Jane Austen

## RESUMO

Câncer é a segunda causa de morte no mundo, e foi responsável por cerca de 10 milhões de mortes em 2018, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Diversos estudos apontam que a transferrina é um biomarcador canceroso em potencial, uma vez que células cancerosas expressam níveis de transferrina maiores que células saudáveis. Neste contexto, este trabalho descreve o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a detecção de transferrina (Tf), nas formas apo-Tf (não ligada à ferro) e holo-Tf (ligada à ferro). O imunossensor foi baseado na imobilização do anticorpo policlonal anti-transferrina (anti-Tf) pelo método de ligação covalente cruzada, empregando os agentes de comprimento zero 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e n-hidroxisuccinimida (NHS). Como superfície transdutora, placas de ITO (óxido de índio dopado com estanho) foram utilizadas e os resultados foram obtidos pela adequação dos dados experimentais ao circuito equivalente de Randles. Todas as medidas foram realizadas pela técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), em meio de hexacianoferrato de potássio (II) 4 mmol $L^{-1}$ preparado em tampão fosfato pH 7,4. A caracterização dos imunossensores foi realizada utilizando a técnica de EIE e voltametria cíclica (VC), avaliando assim a resposta eletroquímica de apo-Tf e holo-Tf. Observou-se que os dispositivos desenvolvidos foram capazes de detectar ambas as formas de Tf, em termos de resistência de transferência de carga ($R_{ct}$). As melhores condições experimentais foram avaliadas para o desenvolvimento dos imunossensores, realizando estudos acerca da aferição da área geométrica do ITO, da ativação da superfície eletródica, do meio de imobilização ao anticorpo, do tempo de incubação e concentração de anti-Tf e do tempo de incubação de cada antígeno. Curvas analíticas foram construídas para cada antígeno, utilizando cinco níveis de concentração em duplicata. Realizou-se um estudo inicial para a validação completa dos dispositivos as figuras de mérito de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e linearidade, esta última avaliada estatisticamente por meio de regressão linear e teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança. Ademais, os imunossensores desenvolvidos foram aplicados na detecção de células cancerosas A549 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama), comparando-as com a linhagem celular saudável dos rins BHK. Visando avaliar se as respostas obtidas diferem estatisticamente das células de controle (BHK) foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de um fator e um teste de Dunnett a um nível de 95% de confiança. Assim, foi observado que a resposta impedimétrica das células saudáveis difere significativamente da resposta das células cancerosas, indicando a potencialidade dos imunossensores para o diagnóstico de câncer. Deste modo, o dispositivo construído pode ser considerado como um avanço na detecção de apo-Tf e holo-Tf, bem como em diagnósticos clínicos rápidos e de baixo custo.



**Palavras-chave:** Imunossensor impedimétrico. Espectroscopia de impedância eletroquímica . Detecção de transferrina. Validação.

## ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death globally, and was responsible for an estimated 10 million deaths in 2018, according to the World Health Organization. Several studies shown that transferrin is a potential cancer biomarker because tumour cells are able to overexpress high levels of transferrin compared with their normal counterparts. In this context, this paper describes the development of an electrochemical immunosensor for the detection of transferrin (Tf), in the forms apo-Tf (non-iron-bound) and holo-Tf (iron-bound). The immunosensor was based on the immobilization of the polyclonal antibody anti-transferrin (anti-Tf) by the method of covalent crosslinking, employing the zero-length agents 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and n- hydroxysuccinimide (NHS). As transducing surface, ITO (índium-tin oxide) slides have been used and the results were obtained by the adequacy of the experimental data to Randles equivalent circuit. All measures were performed by the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) technique, in 4 mmol $L^{-1}$ potassium hexacyanoferrate (II) prepared in phosphate buffer pH 7.4. The immunosensors characterization was performed using the technique of EIS and cyclic voltammetry (CV), evaluating the electrochemical response of apo-Tf and holo-Tf. It was observed that the devices developed were capable of detecting both forms of Tf, in terms of charge transfer resistance ($R_{ct}$). The best experimental conditions were evaluated for the development of the immunosensors, performing studies about the measure of the geometrical area of ITO, the activation of the eletrodic surface, the mean of the antibody immobilization, the anti-Tf incubation time and concentration and the antigens incubation time. Analytical curves have been built for each antigen, using five levels of concentration in duplicate. It was performed an initial study for the full validation of the developed devices. For this, it was estimated the figures of merit of limit of detection (LOD) and of quantification (LOQ), precision and linearity, the last being statistical by linear regression and lack of fit test in the 95% level of confidence. Thus, the developed immunosensors were applied in the detection of two cancer cells A549 (lung cancer) and MCF-7 (breast cancer), comparing with the healthy kidney lineage cell BHK. Intending to evaluate if the obtained responses differ significantly from the control cells (BHK), it was performed an one-factor variance analys (ANOVA) and a Dunnett's test in 95% confidence level. This way, it was observed that the impedimetric response of healthy cells differ significantly from the cancerous cells, indicates the immunosensors potential for cancer diagnosis. Thereby, the device constructed can be consider as an advance for the detection of apo-Tf and holo-Tf, as well as in fast and low cost clinical diagnosis.



**Key words:** Impedimetric immunosensor. Electrochemical impedance spectroscopy. Transferrin detection. Validation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – (A) ESTRUTURA DO ANTICORPO E (B) COMPLEXO IMUNE ..... 18
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DE DIAGRAMA DE NYQUIST ..... 19
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DO CIRCUITO EQUIVALENTE DE RANDLES ..... 20
FIGURA 4– (A) VARREDURA DE POTENCIAL DA VOLTAMETRIA CÍCLICA EM FUNÇÃO DO TEMPO. (B) VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA REAÇÃO REVERSÍVEL. ..... 21
FIGURA 5 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO. (A) ADSORÇÃO FÍSICA, (B) OCLUSÃO, (C) LIGAÇÃO COVALENTE E (D) *CROSSLINKING*. ..... 24
FIGURA 6 – ESQUEMA DA CELA ELETROQUÍMICA UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS ..... 35
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES ..... 38
FIGURA 8 – (A) HASTE METÁLICA EM SOLUÇÃO E (B) HASTE METÁLICA FORA DA SOLUÇÃO ..... 39
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA PARA A AVALIAÇÃO DO MEIO DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO. (A) MISTURA EDC/NHS SEGUIDA DE ANTI-TF E (B) MISTURA EDC/NHS/ANTI-TF NA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA ..... 40
FIGURA 10 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA (A) APO-TF E (B) HOLO-TF ..... 44
FIGURA 11 – CIRCUITO EQUIVALENTE DE RANDLES ..... 45
FIGURA 12 – DIAGRAMAS DE NYQUIST DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA (A) APO-TF E (B) HOLO-TF ..... 46
FIGURA 13 – DIAGRAMA DE NYQUIST PARA ETAPA DE SILANIZAÇÃO DE ELETRODO MARCADO COM ARALDITE® E MARCADO NA HASTE SUPORTE ..... 48
FIGURA 14 – SILANIZAÇÃO EM ELETRODO ATIVADO *VS* ELETRODO SEM ATIVAÇÃO ..... 49
FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTICORPO ..... 50
FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO ..... 51
FIGURA 17 – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTÍGENO ..... 54
FIGURA 18 – (A) DIAGRAMA DE NYQUIST E (B) CURVA ANALÍTICA PARA APO-TF ..... 56
FIGURA 19– DIAGRAMA DE NYQUIST (A) E CURVA ANALÍTICA (B) PARA HOLO-TF ..... 57
FIGURA 20– GRÁFICOS DE RESÍDUO PARA (A) APO-TF E (B) HOLO-TF ..... 60
FIGURA 21 – DIAGRAMAS DE NYQUIST PARA A DETECÇÃO DE LINHAGENS CELULARES (A) BHK, (B) A549 E (C) MCF-7 EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES. ..... 62
FIGURA 22 – VARIAÇÃO DA RESPOSTA IMPEDIMÉTRICA PARA AS CÉLULAS A549, MCF-7 E BHK, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ..... 63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROCEDÊNCIA E PUREZA DOS REAGENTES UTILIZADOS ..... 34
TABELA 2 – PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO AVALIADOS ..... 41
TABELA 3 – VALORES OBTIDOS DOS VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E DIAGRAMAS DE NYQUIST PARA CADA ANTÍGENO ..... 47
TABELA 4 – TABELA ANOVA PARA A SIGNIFICÂNCIA DAS DIFERENÇAS ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTI-TF NA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO ..... 52
TABELA 5 - TABELA ANOVA PARA A SIGNIFICÂNCIA DAS DIFERENÇAS ENTRE AS CONCENTRAÇÕES ESCOLHIDAS DE ANTI-TF NA ETAPA DE DETECÇÃO DOS ANTÍGENOS ..... 53
TABELA 6 – AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE PARA A CURVA ANALÍTICA DE APO-TF POR REGRESSÃO LIENAR (95% CONFIANÇA) ..... 58
TABELA 7 – AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE PARA A CURVA ANALÍTICA DE HOLO-TF POR REGRESSÃO LIENAR (95% CONFIANÇA) ..... 58
TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE IMUNOSSENSORES ENCONTRADOS NA LITERATURA ..... 61
TABELA 9 – RESULTADOS DE DPR (%) OBTIDOS PELOS ESTUDOS DE PRECISÃO PARA DETECÇÃO DE APO-TF E HOLO-TF ..... 61
TABELA 10 - TABELA ANOVA PARA A SIGNIFICÂNCIA DAS DIFERENÇAS ENTRE AS CÉLULAS BHK, A549 E MCF-7 PARA $10^2$ E $10^4$ CÉLULAS $ML^{-1}$ ..... 63

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| A | Área Geométrica |
| A549 | *Alveolar 549* (célula epitelial de adenocarcinoma de pulmão) |
| Ab | Anticorpo |
| AC | *Alternate Current* |
| ANOVA | Análise de variâncias |
| Anti-Tf | Anticorpo de Transferrina |
| Apo-Tf | Transferrina não ligada à ferro |
| APTES | (3-Aminopropil)trietoxisilano |
| At | Antígeno |
| AuNPs | Nanopartículas de ouro |
| B | Coeficiente Angular |
| BHK | *Baby Hamster Kidney* (célula de rim saudável) |
| BSA | *Bovine serum albumin* (albumina so soro bovino) |
| $C_{dc}$ | Capacitância da dupla camada elétrica |
| CLTF | Capacidade de ligação total do ferro |
| CPE | Elemento de fase constante |
| Con A | Concanavalin A |
| Da | Dalton |
| DNA | *Deoxyribonucleic Acid* |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| EDC | Etil-dimetilaminopropil carbodiimida |
| EIE | Espectroscopia de Impedância Eletroquímica |
| ELISA | *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* |
| FeS | Ferro sérico |
| $F_{faj}$ | Valor de *F* para falta de ajuste |
| $F_{obs}$ | Valor de *F* observado |
| HIF1α | *Hypoxia inducible fator 1 alpha* |
| Holo-Tf | Transferrina ligada à ferro |
| IC | Intervalo de Confiança |
| ICP-MS | *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* |
| IgG | Imunoglobulina G |

| | |
|---|---|
| IP | Intervalo de Predição |
| IST | Índice de Saturação de Transferrina |
| ITO | *Indium-Tin Oxide* (óxido de índio dopado com estanho) |
| LD | Limite(s) de Detecção |
| LQ | Limite(s) de Quantificação |
| MCFA | *Multicommutated Flow Analysis* |
| MCF-7 | célula epitelial de adenocarcinoma de mama |
| NHS | N-Hidroxisuccinimida |
| $p$ | Probabilidade de significância |
| PA | Pureza Analítica |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| $r$ | Coeficiente de correlação |
| $R^2$ | Coeficiente de determinação |
| $R_{ct}$ | Resistência de transferência de carga |
| $R_s$ | Resistência da solução eletrolítica |
| $S_b$ | Desvio Padrão |
| SPR | *Surface Plasmon Ressonance* |
| $t_{inclinação}$ | Teste-t para coeficiente angular |
| $t_{intercepto}$ | Teste-t para coeficiente linear |
| Tf | Transferrina |
| Tf-R | Receptor celular de transferrina |
| V | Volts |
| VC | Voltametria Cíclica |
| W | Elemento de Warburg |
| Z | Impedância |
| Z’ | Componente real da impedância |
| -Z” | Componente imaginária da impedância |
| $\Delta$Ep | Diferença de potencial entre pico anódico e pico catódico |
| $\Delta R_{ct}$ | Variação de resistência de transferência de carga |
| $\Omega$ | Ôhm |

## SUMÁRIO


**1 INTRODUÇÃO** ..... 14

**2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... 16

2.1 TRANSFERRINA (TF) ..... 16

2.1.1 O ciclo da transferrina ..... 16

2.1.2 Anticorpos ..... 17

2.2 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS ..... 18

2.2.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) ..... 18

2.2.2 Voltametria cíclica ..... 20

2.3 BIOSSENSORES ..... 21

2.3.1 Tipos de biossensores ..... 22

2.3.2 Imobilização de biomoléculas ..... 23

2.4 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS ..... 25

2.4.1 Imunossensores impedimétricos ..... 25

2.4.2 Instrumentação eletroquímica ..... 26

2.5 CÉLULAS A549 E MCF-7 ..... 27

2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ..... 28

2.7 ESTADO DA ARTE ..... 29

2.7.1 Detecção de Tf ..... 29

2.7.2 Monitoramento de células A549 e MCF-7 ..... 31

2.7.3 Validação no desenvolvimento de imunossensores ..... 32

2.8 JUSTIFICATIVA ..... 32

**3 OBJETIVOS** ..... 33

3.1 OBJETIVO GERAL ..... 33

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 33

**4 METODOLOGIA** ..... 34

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES ..... 34

4.2 INSTRUMENTAÇÃO ..... 35

4.3 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS IMUNOSSENSORES ..... 36

4.4 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IDEAIS ..... 38

4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO ..... 41

4.6 CULTURA DE CÉLULAS ..... 42

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 43

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES ..... 43

5.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IDEAIS ..... 47
5.2.1 Definição da área geométrica do eletrodo ..... 47
5.2.2 Ativação de superfície eletródica ..... 48
5.2.3 Meio de imobilização do anticorpo ..... 49
5.2.4 Tempo de incubação do anticorpo ..... 50
5.2.5 Concentração do anticorpo ..... 51
5.2.6 Tempo de incubação do antígeno ..... 53
5.3 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO ANALÍTICO ..... 54
5.3.1 Linearidade ..... 54
5.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação ..... 60
5.3.3 Precisão ..... 61
5.4 DETECÇÃO DE CÉLULAS CANCEROSAS ..... 62
**6 CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... 65
**REFERÊNCIAS** ..... 66

# 1 INTRODUÇÃO

São ditas cancerosas as células que apresentam crescimento rápido, desordenado e incontrolável, com comportamento diferente das demais células do corpo. As células cancerosas são formadas por mutações genéticas e os genes que sofrem essas mutações são chamados de oncogenes. Tumores (acúmulos de células cancerosas) são considerados malignos quando possuem a capacidade de invadir órgãos inicialmente normais [1, 2].

No Brasil, para os anos de 2018-2019, a estimativa é de 420 mil novos casos de câncer, sendo 70% deste valor nas Regiões Sul e Sudeste. Destes, os tipos de câncer com maior incidência são os que acometem o pulmão e a mama [3]. O câncer de mama, o mais comum entre as mulheres, apresenta uma incidência de 56,3 casos a cada 100 mil mulheres. Apesar de ser o tipo de câncer mais relacionado a casos de morte (12,9 em 100 mil), este também apresenta maior cura, principalmente quando descoberto precocemente. O câncer de pulmão, por sua vez, apresenta incidência de 11,81 casos a cada 100 mil mulheres e 18,16 casos a cada 100 mil homens, superando em números totais as ocorrências de câncer de próstata, o mais comum no sexo masculino. Como não apresenta sintomas iniciais, o câncer de pulmão é considerado um dos tipos de câncer mais agressivos e com alta taxa de mortalidade, pois em geral é descoberto já em estágio avançado. Assim, apenas entre 10 e 15% dos pacientes apresentam sobrevida de cinco anos [3].

Atualmente, o diagnóstico do câncer ocorre por meio do monitoramento de marcadores tumorais, também chamados de biomarcadores, que são moléculas de importância biológica cuja atividade está relacionada diretamente a processos específicos de nível celular. Assim, estas moléculas podem ser monitoradas para averiguar perturbações no organismo [4]. A cada marcador tumoral está relacionado um valor de referência, que indica a maior concentração que pode ser encontrada no organismo sem que este seja considerado doente [5].

Um biomarcador de diversos tipos de câncer, incluindo de mama [6] e de pulmão [7], é a transferrina (Tf) [8], uma glicoproteína transportadora de íon $Fe^{3+}$ no organismo. Como o ferro é requerido para o crescimento e a proliferação celular, este é exigido em grandes quantidades em células cancerosas, que têm a característica de se proliferarem rapidamente. Assim, o maior transporte de ferro leva à utilização em excesso de Tf na célula cancerosa, de modo que esta apresenta uma variação que pode ser monitorada para diagnóstico e controle da doença [9]. Esta substância pode ser encontrada no organismo de duas formas: holo-Tf, quando ligada à $Fe^{3+}$, e apo-Tf, quando não ligada ao íon. É importante que o dispositivo analítico que

realize o monitoramento de Tf seja capaz de reconhecer ambas, de modo que o diagnóstico possa ser realizado independente de qual forma esteja presente em excesso no momento da detecção [10].

Os dispositivos analíticos utilizados atualmente para a detecção de biomarcadores são os biossensores, por serem fáceis de manusear e rápidos na obtenção dos resultados. Os biossensores consistem de um material biológico (biorreceptor) acoplado à uma superfície transdutora, que realiza a leitura da reação de bioreconhecimento entre este biorreceptor e o que se quer detectar, traduzindo-a em um sinal analítico [11]. Estes dispositivos podem ser classificados de acordo com o tipo de biorreceptor e o tipo de transdutor, sendo que dentre os biorreceptores mais comuns encontram-se os imunossensores, que são baseados na interação imunológica entre antígeno e anticorpo, os quais podem utilizar transdutores piezoelétricos [12], óticos [13] ou eletroquímicos [14]. Os imunossensores eletroquímicos apresentam maior precisão, facilidade e rapidez de construção que os demais, destacando-se os impedimétricos, que utilizam a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Esta técnica mede a impedância relacionada à interação entre as biomoléculas, sendo ideal para ambientes de alta resistividade por não ser perturbativa ou destrutiva [15].

Todavia, para que uma metodologia seja considerada apropriada para análises de rotina, é necessário que sua eficácia seja comprovada experimentalmente. Este processo, chamado de validação, envolve a análise de diferentes parâmetros, que tem por objetivo avaliar se o método é confiável o suficiente para a aplicação pretendida [16]. No caso de imunossensores eletroquímicos, são comumente avaliados o limite de detecção, a linearidade e, raramente, o limite de quantificação e a precisão. Assim, visando obter uma confiabilidade maior acerca do sistema estudado, ferramentas estatísticas podem ser utilizadas. Por meio destas, pode-se observar o quanto o modelo adotado é aplicável ao ajuste dos dados experimentais, qual a relação entre a concentração do analito e a resposta gerada e o quanto esta resposta varia sob diferentes condições [17].

Entrentanto, até o momento, não existe um procedimento eficaz e pouco invasivo para o diagnóstico da doença. Assim, há a necessidade de métodos mais rápidos, de custo reduzido e alta sensibilidade para identificar a doença em seu estágio inicial [18]. Desta forma, imunossensores impedimétricos foram desenvolvidos e caracterizados, utilizando anti-Tf como camada de bioreconhecimento para a determinação dos antígenos apo-Tf e holo-Tf. Estes sensores tiveram seu desempenho analítico avaliado estatisticamente, sendo posteriormente aplicados para monitoramento de duas linhagens de células cancerosas modelo, do tipo A549 (câncer de pulmão) e MCF-7 (câncer de mama).

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 TRANSFERRINA (TF)

Transferrina (Tf) é uma glicoproteína composta por 679 aminoácidos, presente no sangue de todos os mamíferos, produzida pelo fígado e excretada no plasma. É responsável pelo transporte do íon ferro (III) no organismo, podendo penetrar na célula por meio de um receptor específico. Assim, as concentrações de Tf e $Fe^{3+}$ podem ser relacionadas [19]. Devido à importância biológica do $Fe^{3+}$ no organismo, tanto para processos de respiração celular quanto para reações enzimáticas de replicação de DNA, a Tf serve como um indicador para o diagnóstico de diversas doenças [20, 21].

Em um organismo saudável, os níveis de transferrina variam de 0,20 a 0,38 g $dL^{-1}$, logo, concentrações acima ou abaixo desta faixa podem indicar distúrbios no organismo. Nos casos de hemorragia, anemia ferropriva e hepatite, os níveis de Tf apresentam-se acima do normal, enquanto que na ocorrência de cirrose e reumatismo, doenças que levam à sobrecarga de ferro, esta é encontrada a níveis mais baixos que o comum. Estudos desenvolvidos nos últimos anos reportaram superexpressão de Tf e TfR em células cancerosas [22], podendo assim ser relacionada com estágio e progressão do câncer. Ademais, a Tf também é utilizada em processos de *drug-delivery* [23]. Como possui grande facilidade de penetração na parede celular, vem sendo empregada principalmente em medicamentos de combate ao câncer, transportando e depositando-os em órgãos específicos, sem afetar o restante do organismo.

### 2.1.1 O ciclo da transferrina

O processo de transporte de ferro inicia-se no intestino, quando a Tf liga-se ao íon $Fe^{3+}$, juntamente com um ânion carbonato ($CO_3^{2-}$) para neutralizar as cargas positivas e evitar a repulsão do cátion, em pH sanguíneo levemente básico. Isso ocorre em pH 7,4, uma vez que os grupos funcionais da Tf tendem a estar desprotonados (ponto isoelétrico entre 5,4 e 5,9), levando a uma carga total negativa da proteína [24]. O carbonato forma ligações de hidrogênio com a Tf, preparando o sítio de ligação para o metal. Forma-se então um complexo $Fe^{3+}$/Tf, que percorre o organismo pelo sangue, chegando à célula onde deve adentrar. O receptor de transferrina (TfR) está presente na superfície da maioria das células, de modo que o complexo é internalizado por endocitose (absorção através da membrana celular). Dentro da célula, ocorre então a queda do pH, rompendo as ligações de hidrogênio, liberando o $Fe^{3+}$ e fazendo com que

a transferrina seja excretada da célula. Novamente livre no organismo, ela está apta a ligar-se à ferro mais uma vez, reiniciando o ciclo [25].

Cada Tf pode carregar até 2 íons, porém apenas 1/3 de toda Tf no organismo está ligada a $Fe^{3+}$, sendo chamada de holo-Tf. A holo-Tf apresenta conformação fechada devido às ligações de hidrogênio formadas pelo carbonato, que mantém o $Fe^{3+}$ imobilizado no sítio ativo. Quando essas ligações de hidrogênio se rompem, a conformação se torna aberta e a Tf é chamada de apo-Tf [26]. O processo de transporte do ferro, a endocitose e a liberação de apo-Tf leva cerca de 10 minutos e estima-se que cada Tf possa realizar esse ciclo cerca de 100 vezes [27, 28].

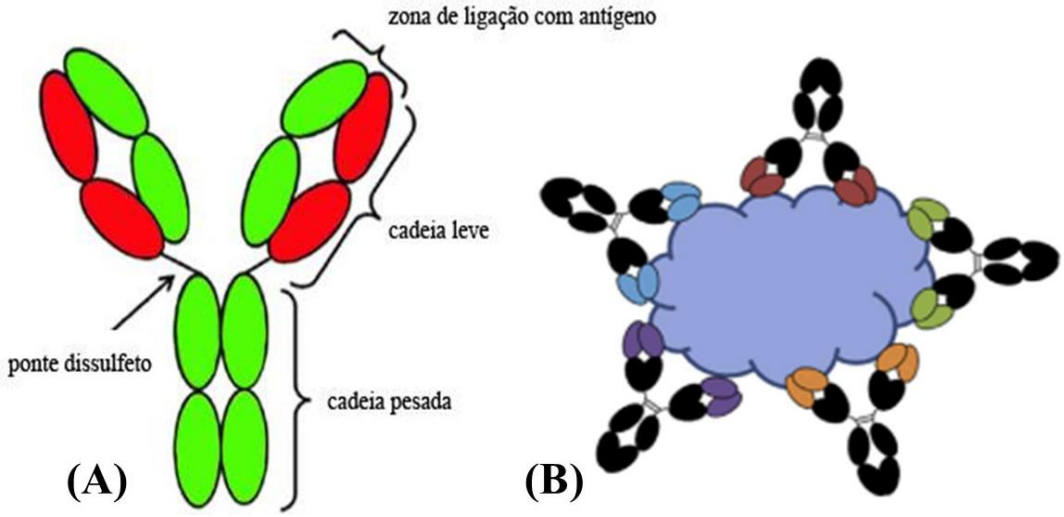
### 2.1.2 Anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas produzidas pelo sistema imunológico, tendo como função marcar os componentes estranhos ao organismo para eliminação. Estes componentes são conhecidos como antígenos, podendo ser desde polissacarídeos até moléculas presentes em microrganismos em geral. A interação entre antígeno e anticorpo leva à geração de um complexo imune (ou imunocomplexo), de acordo com a Equação 1, sendo Ab o anticorpo e At o antígeno. O imunocomplexo é mantido por interações intermoleculares fracas (forças de van der Waals, ligação de hidrogênio e forças iônicas), de ligação reversível [29].

$$Ab + At \leftrightharpoons AbAt \qquad (Equação\ 1)$$

Os anticorpos são formados por quatro cadeias de polipeptídeos, duas leves (23 kDa) e duas cadeias pesadas (53 – 75 kDa), ligadas entre si por pontes dissulfeto (Figura 1A). Possuem dois sítios idênticos de interação com o antígeno, chamados de epítopos, possibilitando a formação de um complexo estável (Figura 1B) [30]. Eles podem ser divididos em isótipos (classes), de acordo com suas características estruturais. Nos mamíferos, por exemplo, há cinco isótipos que diferem entre si pelas cadeias pesadas [31].

**FIGURA 1 –** (A) ESTRUTURA DO ANTICORPO E (B) COMPLEXO IMUNE




**FONTE:** Adaptada de KARYNAKARAN, PANDIARAJ e SANTHARAMAN (2015) [61].

Quando a Tf está superexpressa no organismo, ela desencadeia a produção do anticorpo anti-transferrina (anti-Tf). A anti-Tf é um anticorpo policlonal (originário de diferentes linfócitos B), ou seja, as zonas de ligação não reagem com apenas uma região do antígeno [32]. Este anticorpo é de isótipo imunoglobulina G (IgG), do tipo que corresponde à cerca de 73% dos anticorpos no organismo, com cadeia pesada representada pela letra grega γ. Assim como os demais anticorpos IgG, a anti-Tf recobre o antígeno, marcando-o para consumo pelos fagócitos [33].

A anti-Tf pode ser utilizada para determinação da concentração de Tf, por meio do monitoramento da formação do complexo antígeno-anticorpo. Atualmente, são encontrados comercialmente kits de imunoensaios para a determinação *in vitro* de Tf, utilizando turbidimetria [34]. Também, foram desenvolvidos dispositivos compactos para o monitoramente deste imunocomplexo [35], ainda não disponíveis no mercado.

## 2.2 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

### 2.2.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) utiliza a teoria de corrente alternada (AC, do inglês *alternating current*), onde a impedância (Z) é definida como a relação entre o potencial e a corrente, sendo considerada um tipo de resistência presente em circuitos AC. Assim, esta técnica envolve a aplicação de um potencial de baixa amplitude ao sistema em estado de equilíbrio, em um intervalo de frequência. Esse potencial gera uma corrente elétrica

resultante, sendo então registrado em cada frequência a relação corrente-potencial [36, 37].

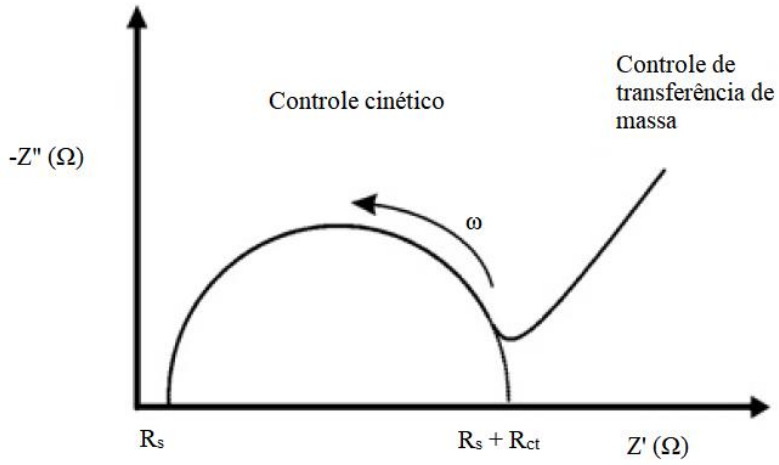
A impedância é, graficamente, representada como uma função complexa, sendo matematicamente dividida em uma componente imaginária (-Z") e uma componente real (Z') (Equação 2) [36], sendo Z a impedância total do sistema e *j* o número imaginário definido como $(-1)^{1/2}$.

$$Z = Z_{real} + j * Z_{imaginária} \qquad (Equação\ 2)$$

Um dos diagramas mais utilizados para esta representação é o de Nyquist, que apresenta um gráfico de -Z" *versus* Z', em Ohms (Ω). O diagrama de Nyquist é caracterizado como um semicírculo em regiões de altas frequências e uma região linear em regiões de médias e baixas frequências (Figura 2). Da região gráfica de altas frequências, pode-se obter informações como a resistência da solução eletrolítica ($R_s$), a resistência de transferência de carga ($R_{ct}$) e a capacitância da dupla camada elétrica ($C_{dc}$) representada por um elemento de fase constante (CPE, do inglês *constant phase element*), no caso de capacitores não ideais. Em baixas frequências, onde pode-se observar uma reta após o final do semicírculo, está a região referente ao transporte de massa por difusão das espécies. A capacitância da dupla camada elétrica é obtida por meio da Equação 3, sendo f o valor de frequência do máximo do semicírculo [38].

$$C_{dc} = \frac{1}{2\pi f R_{ct}} \qquad (Equação\ 3)$$

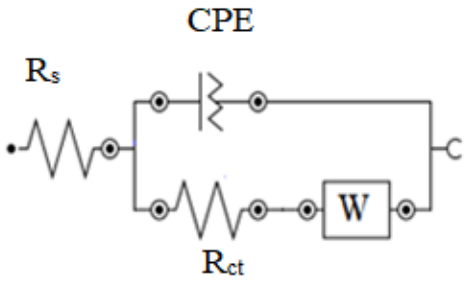
**FIGURA 2 –** REPRESENTAÇÃO DE DIAGRAMA DE NYQUIST




**FONTE:** Adaptada de PRODOMIDIS (2010) [39].

Os valores numéricos referentes às resistências e à capacitância são obtidos por meio de modelagem com um circuito equivalente, sendo o que comumente se adapta aos dados experimentais de biossensores o circuito de Randles [40], representado na Figura 3. Este circuito apresenta, além de $R_{ct}$, $R_s$ e CPE, o elemento de Warburg (W), relacionado à difusão das espécies [41].

**FIGURA 3 –** REPRESENTAÇÃO DO CIRCUITO EQUIVALENTE DE RANDLES



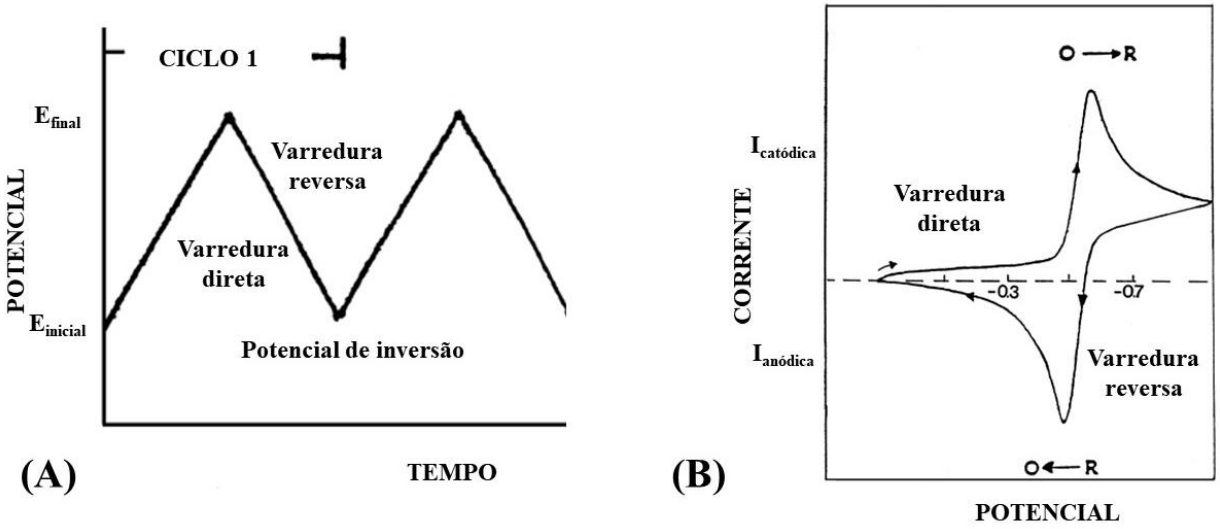

**FONTE:** O Autor (2018).

A EIE é utilizada em estudos de processos interfaciais [42] e fontes de energia [43], fornecendo informações cinéticas e mecanísticas da eletroquímica envolvida. Assim, ela é aplicada, em geral, juntamente com a técnica de voltametria cíclica (VC) na caracterização de sistemas [36].

### 2.2.2 Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica (VC) é utilizada para a obtenção de informações qualitativas acerca da eletroquímica do sistema estudado. Ela consiste na varredura triangular de potencial sobre o eletrodo de trabalho estacionário, primeiro no sentido direto e depois no sentido reverso (Figura 4A) [44]. Essa varredura é registrada em função da corrente resultante, de modo que a redução ou oxidação do composto é observada pelo surgimento de picos (Figura 4B).

**FIGURA 4–** (A) VARREDURA DE POTENCIAL DA VOLTAMETRIA CÍCLICA EM FUNÇÃO DO TEMPO. (B) VOLTAMOGRAMA CÍCLICO PARA REAÇÃO REVERSÍVEL.




**FONTE:** Adaptado de WANG [45]

A VC é utilizada para avaliar a reversibilidade, calcular o número de elétrons e avaliar a cinética envolvida na reação redox. Ademais, ela também pode ser utilizada para a caracterização de sistemas adsortivos, acompanhando uma reação redox estabelecida na literatura. Por exemplo, pode-se utilizar o par redox ferri/ferrocianeto e observar a variação da corrente resultante e o deslocamento de potencial oriundos da adsorção de espécies na superfície eletródica [45].

## 2.3 BIOSSENSORES

Biossensores são dispositivos analíticos que utilizam um componente biológico (biorreceptor) para reconhecimento do analito de interesse, numa reação que é traduzida por um transdutor. O sinal gerado é amplificado e então processado, estando assim pronto para ser analisado [46]. Possuem a vantagem de serem seletivos à determinada molécula ou grupo de moléculas, dependente do biorreceptor utilizado. Também apresentam possibilidade de miniaturização, rápida obtenção de resultados e limites de detecção pequenos quando comparado com outros dispositivos analíticos [47].

A reação de bioreconhecimento entre o biorreceptor e a substância de interesse deve gerar uma alteração química ou física no sistema, que seja estável por tempo suficiente para ser traduzida em sinal analítico pelo transdutor. O biorreceptor precisa apresentar interação seletiva com a substância que se deseja detectar, devendo assim ser escolhido de acordo com o analito de interesse [48].

Os biossensores tiveram origem em 1956, com Leyland C. Clark e o sensor amperométrico de oxigênio [49]. Este eletrodo, com glicose oxidase imobilizada, era capaz de monitorar o peróxido de hidrogênio gerado como produto da reação de oxidação envolvendo glicose, oxigênio e a enzima biorreceptora. Assim, em 1962, o dispositivo foi fabricado em massa e comercializado pela empresa norte americana Yellow Springs Instruments, sendo também o primeiro biossensor a entrar no mercado [46]. Desde então, os biossensores vêm sendo utilizados para diversos fins, dentre eles: monitoramento ambiental [50, 51], detecção de microorganismos e metabólitos tóxicos em alimentos [52, 53], controle de qualidade de fármacos [54] e análises clínicas para diagnóstico de doenças [4, 55].

### 2.3.1 Tipos de biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o transdutor e o biorreceptor escolhidos. O transdutor é um dos componentes essenciais de todo biossensor, sendo responsável pela conversão da reação de bioreconhecimento em um sinal capaz de ser mensurado [56]. Os mais comuns são os piezoelétricos [12], óticos [13] e eletroquímicos [14]. Os transdutores que utilizam cristais piezoelétricos baseiam-se na diferença de frequência de ressonância do cristal, inversamente proporcional à diferença de massa gerada pela reação de bioreconhecimento [57]. Por sua vez, os dispositivos óticos medem as variações geradas por meio de transmissão de luz, utilizando propriedades óticas como comprimento de onda, absorção e fosforescência [58]. Já os sensores eletroquímicos monitoram alterações nas propriedades elétricas na interface eletrodo/eletrólito, tais como diferença de potencial e corrente elétrica, resistência e capacitância [59].

Os biossensores óticos e piezoelétricos, entretanto, possuem um custo elevado devido à necessidade de equipamentos e acessórios adequados (monocromadores, fontes de luz, balança de cristal de quartzo). Deste modo, os eletroquímicos vêm a ser a alternativa mais viável economicamente, devido ao baixo custo de instrumentação quando comparado a outros dispositivos [60]. Também, necessitam de pouco ou nenhum preparo de amostra, apresentam rapidez na obtenção de resultados e possibilidade de miniaturização, de modo que as análises não dependam de grandes volumes, podendo ser realizadas em escala de microlitros ou nanolitros [61, 62].

Os biorreceptores mais comuns são as enzimas [63] que, como o sensor de Clark, compõem um biossensor enzimático. Estes possuem a vantagem de apresentar elevada seletividade quando comparados com outros materiais utilizáveis, embora também sejam

menos estáveis às variações do meio reacional [64]. Biossensores que utilizam fitas de DNA (ácido desoxirribonucleico), nos chamados genossensores [65] e anticorpos (proteínas de defesa) nos ditos imunossensores [66] vêm ganhando espaço, pois apresentam maior estabilidade do que os enzimáticos. Atualmente, são utilizados para os mais diversos fins, em especial para análises clínicas [67, 68].

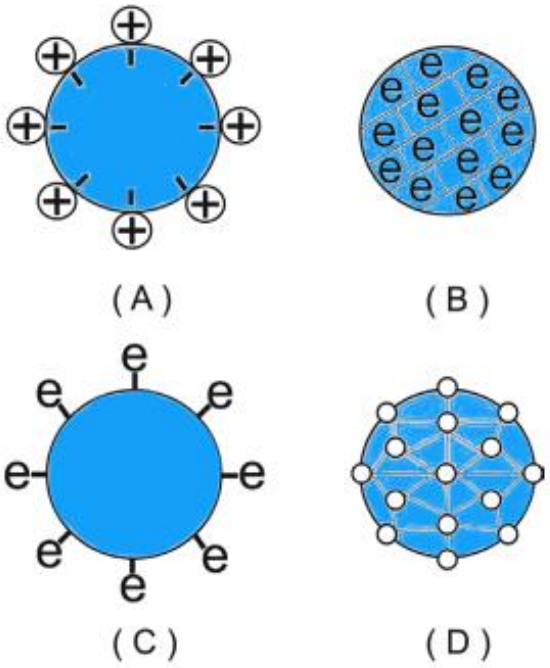
Porém, apesar da ampla gama de aplicações em análises de DNA, os genossensores apresentam limitações devido à complexidade do genoma humano. Deste modo, o desenvolvimento de imunossensores torna-se uma alternativa tanto ao uso de enzimas quanto de DNA, apresentando maior facilidade de manuseio e estabilidade frente às diferentes condições adversas à que uma análise de rotina está sujeita [11].

### 2.3.2 Imobilização de biomoléculas

Para o desenvolvimento de um biossensor, necessita-se de um processo de imobilização entre o biorreceptor e o transdutor, de modo que os sítios que devem se ligar ao analito fiquem expostos e não haja desnaturação da biomolécula. Entretanto, a escolha do método imobilizador depende não só do material biológico, mas também dos compostos a serem utilizados nesse procedimento. Assim, métodos que utilizam substâncias estáveis, baratas e de baixa toxicidade são preferíveis [69, 70].

Atualmente, existem quatro métodos para a imobilização de biomoléculas, representados pela Figura 5. São eles: (A) adsorção física (envolve interações eletroestáticas, geralmente iônicas), (B) oclusão (utiliza polímeros para a formação de matriz tridimensional, que aprisiona o biorreceptor), (C) ligação covalente (uma ligação covalente é formada entre a plataforma imobilizadora e um grupo funcional presente no biorreceptor) e (D) *crosslinking* ou ligação covalente cruzada (com um agente de reticulação, a biomolécula forma uma rede rígida entre suas moléculas), sendo o último o método mais utilizado atualmente [71, 72].

**FIGURA 5** – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO. (A) ADSORÇÃO FÍSICA, (B) OCLUSÃO, (C) LIGAÇÃO COVALENTE E (D) *CROSSLINKING*.




**FONTE:** Adaptada de MARQUES e YAMANAKA (2008) [73].

O método de ligação covalente cruzada apresenta menor custo e maior estabilidade frente aos demais métodos. Ele envolve o uso de um agente de reticulação, também chamado de *crosslinker*. O *crosslinker* deve apresentar em sua estrutura duas ou mais extremidades reativas, com afinidade por grupos funcionais presentes na biomolécula. Um desses agrupamentos terminais deve ligar-se covalentemente ao biorreceptor, enquanto que o outro deve formar ligação com a superfície transdutora [69, 61].

Os agentes de reticulação mais comuns são os de comprimento zero, que mediam a imobilização de biomoléculas sem participar da ligação final. Um exemplo de agente de comprimento zero é o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), usada para unir grupos carboxila à aminas primárias. Esta reação gera um intermediário reativo, de modo que faz-se necessário o uso de n-hidroxisuccinimida (NHS) para formação de um novo intermediário mais estável [74]. Como vantagem para o uso destes reagentes, pode-se citar a baixa toxicidade dos subprodutos gerados, solubilidade em água e eficiência de acoplamento em pH fisiológico (4,5 – 7,5) a temperatura ambiente [72, 74, 75].

## 2.4 IMUNOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

A formação de imunocomplexos vem sendo utilizada em dispositivos analíticos compactos, chamados imunossensores [76]. O primeiro imunossensor eletroquímico foi desenvolvido em 1975 [77], onde utilizou-se a proteína *Concanavalin A* (Con A), imobilizada em uma membrana polimérica. O sensor baseava-se na formação do complexo entre a Con A e manano de levedura, numa relação similar à de antígenos e anticorpos, que resultou em variação de potencial com a formação do complexo imune. Desde então, os imunossensores vêm sendo estudados cada vez mais, buscando aplicações em testes de qualidade de alimentos [78], monitoramento ambiental [79, 80] e em análises clínicas para o diagnóstico de diversas enfermidades [81, 82], principalmente diferentes tipos de câncer [83, 84].

As características dos imunossensores podem variar de acordo com a clonalidade do anticorpo utilizado. Imunossensores que fazem uso de anticorpos policlonais apresentam maior sensibilidade e menor complexidade, uma vez que não há necessidade de modificantes intermediários que garantam o posicionamento especial para que ocorra a reação de bioreconhecimento. Entretanto, são menos seletivos, podendo ligar-se também a outros antígenos de estrutura semelhante à do antígeno de interesse [85].

Os imunossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o parâmetro eletroquímico mensurado. Os mais comuns são: amperométricos ou voltamétricos, que medem a corrente elétrica resultante da reação redox [86, 87]; potenciométricos, que medem a diferença de potencial [88]; condutimétricos, que medem a variação de condutância [89]; e impedimétricos, que medem a impedância e as propriedades resistivas do sistema [90]. Além disso, a técnica eletroquímica utilizada depende da interação entre o antígeno de interesse e o anticorpo utilizado, do material transdutor (eletrodo) e do método de imobilização adotado, de modo a garantir que a camada de material biológico na superfície eletródica não seja danificada ou removida.

Neste sentido, destaca-se a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), uma técnica não destrutiva que fornece informações acerca das resistências e capacitância envolvidas no processo de bioreconhecimento.

### 2.4.1 Imunossensores impedimétricos

Como é considerada uma técnica precisa, reprodutível e não destrutiva devido à magnitude baixa do potencial aplicado, a EIE vem sendo utilizada no trabalho com

biomoléculas [80, 91]. Deste modo, imunossensores impedimétricos podem ser utilizados para monitoramento ambiental de corantes [92] e pesticidas [80], na detecção de toxinas [93] e microrganismos em alimentos [94] e na medicina humana [81] e veterinária [95].

Todavia, como mencionado, a reação de bioreconhecimento entre o antígeno e o anticorpo leva à formação de um complexo imune. Esse processo não envolve transferência eletrônica, de modo que não pode ser monitorado eletroquimicamente de maneira direta. Assim, o método utilizado para essa detecção consiste no acompanhamento da variação da resposta eletroquímica de um composto eletroativo modelo, como por exemplo ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) ou ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$).

Utilizando a técnica de EIE, pode-se então observar os valores de resistência de transferência de carga ($R_{ct}$) de cada etapa da reação de bioreconhecimento. Quando a superfície eletródica está limpa (sem biomoléculas imobilizadas), a reação redox é efetiva, havendo maior corrente envolvida e, consequentemente, menor $R_{ct}$. Com a imobilização do biorreceptor, ocorre o bloqueio desta superfície, de modo que a reação redox não ocorre mais em toda interface eletrodo-solução. Assim, há aumento de $R_{ct}$. A formação do complexo imune, com a adição do antígeno, leva ao bloqueio dos sítios de ligação da biomolécula imobilizada, aumentando a $R_{ct}$ mais uma vez.

De maneira semelhante, a $R_{ct}$ varia com a concentração de antígeno ligada ao anticorpo imobilizado. Quanto maior o número de imunocomplexos formado, maior é a resistência do sistema, uma vez que há bloqueio do eletrodo para a transferência de carga decorrente dos novos processos redox.

### 2.4.2 Instrumentação eletroquímica

Para a utilização das técnicas de EIE e VC, é necessária uma cela eletroquímica composta por três eletrodos: eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl), eletrodo auxiliar (placa de platina) e eletrodo de trabalho, sendo este último onde ocorre o bioreconhecimento. Os eletrodos de trabalho mais comumente utilizados em imunossensores impedimétricos são de ouro [96], carbono vítreo [97], impressos (*screen-printed*) [98] e ITO (do inglês, *indium-tin oxide* ou óxido de índio dopado com estanho) [99].

Dentre estes, as placas de ITO se destacam devido à estabilidade física e química, bem como à ampla janela de potencial. O ITO é um óxido semicondutor transparente, capaz de refletir radiação eletromagnética na região do infravermelho. Apresentam também baixa resistividade elétrica, de modo que podem ser utilizados como transdutores eletroquímicos

[100]. Frente aos eletrodos de ouro e carbono vítreo, possuem a vantagem de ser descartáveis, eliminando assim o tempo de limpeza e diminuindo interferentes de análises anteriores. Quando comparados aos eletrodos impressos, apresentam maior homogeneidade de superfície, de modo a facilitar a deposição e aumentar a precisão do sistema [101]. São utilizadas não só como superfícies eletródicas, mas também em células fotovoltaicas [102] e em equipamentos óticos [103].

## 2.5 CÉLULAS A549 E MCF-7

Ao câncer gerado pela reprodução anormal de células epiteliais é dado o nome de carcinoma, sendo o tipo que mais se manifesta em humanos, devido à sua capacidade de auto renovação [1]. Os carcinomas mais comuns são no cólon, bexiga, próstata, pulmão e mama, com destaque aos últimos por apresentarem taxas de incidência acima dos demais [104]. Desta forma, dentre as células de carcinoma, pode-se destacar as linhagens A549, de pulmão, e MCF-7, de mama, utilizadas amplamente como modelo em estudos acerca de tumores.

As células epiteliais MCF-7 provenientes de adenocarcinoma mamário de mulher, foram isoladas em 1970, sendo estabelecidas para uso em 1973 na Fundação de Michigan para o Câncer [105]. É considerada pouco agressiva e não invasiva, com pouco potencial de metástase [106]. Ao longo dos anos, vem sendo usada para estudos acerca do câncer de mama, como indução de apoptose [107] e *drug delivery* [108].

As células epiteliais A549 (*Alveolar 549*) são provenientes de adenocarcinoma (tecido glandular) pulmonar de homem, sendo cultivadas para estudo desde 1972 [109]. Quando se proliferam *in vivo*, são escamosas, responsáveis pela difusão de substâncias pelo alvéolo [110]. É utilizada em estudos de toxicidade [111], apoptose (morte celular programada) [112] e desenvolvimento de medicamentos antitumorais [113]. Como é cancerosa, apresenta superexpressão de proteínas necessárias à reprodução celular, de modo que é também aplicada no estudo de outras doenças, como por exemplo tuberculose [114].

Ademais, ressalta-se que ambas as linhagens de células cancerosas mencionadas superexpressam Tf, de modo que este biomarcador canceroso pode ser utilizado para o monitoramento de A549 e MCF-7.

## 2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Quando um novo método analítico é desenvolvido, é necessário garantir que seus resultados sejam estatisticamente confiáveis, mostrando assim sua eficácia. Esta avaliação de desempenho, chamada de *validação*, pretende assegurar a proximidade entre o resultado experimental da metodologia proposta e o resultado real, atestando sua aplicabilidade para análises de rotina [115, 12]. Deve-se ressaltar, também, que a validação não é utilizada apenas para avaliar a confiabilidade de metodologias, sendo também requerida no desenvolvimento de dispositivos de análise (sensores).

A validação é realizada por meio de figuras de mérito, que são os diferentes parâmetros indicativos de desempenho analítico. Os parâmetros a serem avaliados dependem das particularidades de cada sistema, do objetivo proposto, dos recursos disponíveis e da aplicabilidade requerida, de modo que nem todos os processos são avaliados da mesma forma [116, 117]. No desenvolvimento de sensores, geralmente são utilizadas as figuras de mérito de linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão [118].

O LD pode ser definido como a menor quantidade de um analito que pode ser distinguida do branco da amostra, mas não quantificada, a um determinado nível de confiança. É diferente de LQ, que representa a menor quantidade que pode ser determinada com níveis de precisão e exatidão adequados [119, 120].

A precisão é tida como o nível de concordância dos resultados entre si. Pode ser avaliada de três maneiras diferentes: repetibilidade (amostras avaliadas pelo mesmo analista, no mesmo dia e com a mesma instrumentação), precisão intermediária (avaliação da amostra em dias diferentes ou com analistas diferentes, mas com a mesma instrumentação) e reprodutibilidade (amostra analisada em diferentes laboratórios). Em geral, são avaliadas apenas a repetitividade e a precisão intermediária, buscando tornar o trabalho independente de outros grupos de pesquisa [116].

A linearidade é a capacidade de obtenção de respostas analíticas proporcionais à concentração do analito na amostra. Comumente, é representada pelo coeficiente de correlação ($r$), embora este fator sozinho não seja suficiente para determinar se um sistema é linear. Neste contexto, o uso de ferramentas estatísticas, faz-se necessário para compreender também a homogeneidade de variâncias, a aleatoriedade dos erros, a significância dos coeficientes e o grau de adequação do modelo linear aos dados experimentais [121]. Para a linearidade de métodos bioanalíticos, segundo Shah *et al.* [122], é necessário a construção de curvas analíticas, com no mínimo cinco pontos. Esta curva deve abranger toda a faixa de concentração pretendida,

devendo ser analisada com o uso de um algoritmo simples (regressão linear) e de um teste de falta de ajuste.

## 2.7 ESTADO DA ARTE

### 2.7.1 Detecção de Tf

Como mencionado anteriormente, a detecção de Tf pode ser realizada por meio de imunoensaios turbidimétricos comerciais [34]. Existe também um exame clínico chamado de índice de saturação de transferrina (IST), que representa a porcentagem de Tf que está ligada à $Fe^{3+}$. O IST pode ser calculado conhecendo-se a concentração de ferro sérico (FeS) e a capacidade total de ligação do ferro (CTLF), obtidos por ensaios colorimétricos [123, 124]. Ademais, são encontrados na literatura trabalhos que retratam a detecção de Tf utilizando eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas [125], espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) [126, 127], sistema aquoso bifásico com líquidos iônicos [128], análise de fluxo por multicomutação (MCFA) [129], quimioluminescência [130] e teste ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) [131]. Entretanto, os sistemas acima citados apresentam elevado tempo de análise e custo de instrumentação, de modo que dispositivos mais simples e compactos são requeridos. Neste contexto, biossensores vêm sendo desenvolvidos, visando diminuir o tempo e o custo das análises e facilitar o manuseio dos sistemas estudados. Destaca-se que todos os biossensores encontrados são do tipo imunológico, não sendo encontrados sensores enzimáticos ou de DNA para detecção de Tf.

O primeiro registro da detecção de Tf utilizando um biossensor é de 1990, quando Prusak-sochaczewski e Luong [132] desenvolveram um imunossensor com a proteína A (encontrada na bactéria *Staphylococcus aureus*) imobilizada em um cristal piezoelétrico. Este sensor apresentou resposta linear para concentrações entre $10^{-4}$ e 0,1 mg $mL^{-1}$ de Tf, com tempo de análise aproximado de 40 minutos. Outro trabalho que utilizou sistema piezoelétrico para detecção de Tf foi desenvolvido por Wu *et al.* [133], empregando polietilenoglicol como agente aglutinante, em um imunoensaio líquido. Neste trabalho, foi obtida uma resposta linear de 0,16 a 0,24 µg $mL^{-1}$ e um limite de detecção de 0,16 µg $mL^{-1}$. O imunossensor foi aplicado em soro humano, apresentando resultados comparáveis estatisticamente com os de imunoensaios turbidimétricos comerciais.

A maioria dos biossensores para detecção de Tf, entretanto, são os óticos, em especial os que utilizam ressonância de plasmons de superfície (SPR, do inglês *surface plasmon*

*ressonance*). Esses trabalhos fazem uso de materiais amplificadores de sinal, como nanopartículas de ouro (AuNPs) [134, 135], óxido de grafeno [135], ácido borônico [136] e filmes de ouro [137], obtendo limites de detecção na escala de µg $mL^{-1}$ [132, 136]. Outros dispositivos óticos envolvem o uso de fluorescência com *quantum dots* [138, 139] e com nanopartículas magnéticas [140], apresentado valores de limite de detecção similares aos encontrados com SPR.

Os biossensores eletroquímicos para monitoramento de Tf, apesar do baixo custo e de apresentarem menores limites de detecção (escala de ng $mL^{-1}$), são escassos na literatura. O trabalho mais recente é de Matysiak-Brynda *et al.* [141], que produziram um imunossensor baseado em nanopartículas de ferro encapsulado por carbono (Fe@C). Utilizou-se neste trabalho um eletrodo de ouro aliado às técnicas de EIE, gravimetria e voltametria de varredura linear, tendo como biorreceptor um anticorpo monoclonal. Este dispositivo foi aplicado em amostras de sangue de ratos, com limites de detecção de 0,150 ng $mL^{-1}$ para EIE, 0,120 ng $mL^{-1}$ para gravimetria e 0,240 ng $mL^{-1}$ para voltametria.

Antes disso, Hu *et al.* [142] produziram um imunossensor capacitivo baseado no oligômero o-aminobenzentiol, utilizando eletrodo de ouro. O limite de detecção obtido para este dispositivo foi igual a 0,12 ng $mL^{-1}$.

Também utilizando o-aminobenzentiol em eletrodo de ouro, Zeng *et al.* [143] desenvolveram um imunossensor capacitivo para a detecção de apo-Tf e holo-Tf. A capacitância foi medida por pulsos potenciostáticos e foi obtido um limite de detecção de 0,04 ng $mL^{-1}$ para holo-Tf e de 0,15 ng $mL^{-1}$ para apo-Tf, indicando que holo-Tf é mais suscetível à determinação pelo dispositivo. Entretanto, apesar da eficiência de detecção, apenas 52% dos antígenos ligaram-se aos anticorpos imobilizados, demonstrando que pouco mais da metade de Tf presente estava orientada de modo que a formação do imunocomplexo ocorresse.

Por sua vez, Yin *et al.* [144] utilizaram filmes derivados de alumina-sol-gel e AuNPs, visando a detecção de Tf por meio de um imunossensor. Foi utilizada a técnica de EIE, com faixa linear de trabalho de 1,0 a 75,0 ng $mL^{-1}$. O limite de detecção obtido foi igual a 0,050 ng $mL^{-1}$ e o sistema apresentou boa taxa de restauração, indicando a possibilidade de uso para mais de uma análise.

Ademais, Kong *et al.* [19] desenvolveram um imunossensor baseado em eletroquimioluminescência para o monitoramento de Tf em soro humano. Foram utilizadas AuNPs, luminol e eletrodos impressos de carbono, avaliando uma faixa de concentração de 0,10 a 18,0 ng $mL^{-1}$. Para este sensor, obteve-se um limite de detecção de 0,033 ng $mL^{-1}$, biocompatibilidade e boa seletividade frente à possíveis interferentes.

Ressalta-se que, com exceção ao trabalho de Zeng *et al.*, todos os estudos detectaram Tf de maneira geral, sem diferenciar quanto à ocupação dos terminais de ligação com $Fe^{3+}$. Adicionalmente, salienta-se que não foram encontrados relatos acerca da aplicação de imunossensores para detecção de Tf em cultura celular cancerosa.

### 2.7.2 Monitoramento de células A549 e MCF-7

Atualmente, a detecção de células cancerosas é realizada por meio de exames de imagem (ultrassom, ressonância magnética) e de sangue, capaz de detectar a presença de biomarcadores utilizando ensaios quimioluminescentes [145]. Neste contexto, visando diminuir o custo e o tempo de análises clínicas, materiais compactos vêm sendo estudados, em sua maioria biossensores. Assim, foram encontrados sensores que utilizam diversas técnicas, dentre as quais pode-se destacar SPR [146] e fluorescência [147] como as mais aplicadas. Também, encontrou-se dispositivos eletroquímicos que utilizam voltametria [148], amperometria [149] e EIE [79].

As linhagens celulares MCF-7 e A549 são exploradas para estudos relacionados à câncer, em especial apoptose e *drug-delivery* de medicamentos. Entretanto, pouco se encontra na literatura acerca de imunossensores para a detecção das mesmas. Assim, para o monitoramento de MCF-7, foram encontrados imunossensores eletroquímicos que relatam a utilização de técnicas voltamétricas com diversos materiais, dentre eles AuNPs [150, 151, 152], *quantum-dots* [153], *nanoclusters* [154] e nanopartículas híbridas de grafeno e prata [155]. Adicionalmente, destaca-se o trabalho de Hussain *et al.* [156], que retrata o desenvolvimento de um imunossensor amperométrico para a detecção de MCF-7 e A549. Neste estudo, visou-se a detecção do biomarcador HIF1α (do inglês, *hypoxia inducible fator 1 alpha*), usando um polímero condutor e AuNPs acopladas à superfície de um eletrodo de carbono vítreo. O imunossensor apresentou estabilidade e seletividade frente à possíveis interferentes, sendo proposto como um complemento aos exames de imagem tradicionais. Para as células A549, este foi o único imunossensor desenvolvido até o momento.

Ademais, não foram encontrados relatos de metodologias que utilizam Tf para o monitoramento de A549 e MCF-7, apesar da potencialidade desse biomarcador no diagnóstico de câncer.

### 2.7.3 Validação no desenvolvimento de imunossensores

Segundo a ANVISA [120], o processo de validação é dependente das características do analito e da natureza do método desenvolvido, de modo que as figuras de mérito e os critérios de aceitação variam de sistema para sistema. Os imunossensores, em sua maioria, realizam validação cruzada, que consiste na comparação entre uma metodologia estabelecida como padrão de análise e a que se quer validar. Em geral, é utilizada quando são comparados sistemas que fazem uso de técnicas diferentes [115, 157], sendo o teste imunoenzimático ELISA a referência mais aplicada.

Embora a validação de métodos não seja algo novo, o uso de ferramentas estatísticas para a avaliação de figuras de mérito não é comum. Para a linearidade, em geral, estima-se o coeficiente de correlação (*r*) e o coeficiente de determinação ($R^2$), sendo considerados lineares os sistemas que apresentem valores próximos à 1 e 100%, respectivamente. Estudos de regressão linear e teste de falta de ajuste, como sugeridos na literatura [122, 9], são raros, especialmente para o desenvolvimento de sensores biológicos.

Para imunossensores, foi encontrado apenas o estudo de Talib *et al.* [158], que desenvolveram um sensor amperométrico baseado em nanotubos de carbono e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) para a detecção de clenbuterol. A avaliação estatística se deu pela construção de curvas analíticas em uma faixa de concentração de 0 – 250,0 ng $mL^{-1}$, adotando-se o modelo quadrático. Após, foi aplicada uma análise de variâncias (regressão quadrática) e um teste de falta de ajuste, que mostrou por meio de um teste *F* que a regressão fora significativa sem falta de ajuste ao modelo utilizado.

## 2.8 JUSTIFICATIVA

O câncer é, atualmente, a segunda doença não transmissível que mais mata no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública, em especial em países em desenvolvimento, onde é mais incidente. Neste contexto, é imprescindível o diagnóstico clínico precoce da doença, uma vez que quanto mais rápida for a identificação, maiores são as chances de controle, contribuindo para o aumento da sobrevida e queda da taxa de mortalidade. Ressalta-se que, até então, não existe um procedimento ideal, capaz de detectar a presença de células cancerosas ainda no início de sua proliferação e com potencial para ser aplicado em larga escala. Para tal, faz-se necessário o desenvolvimento de dispositivos sensíveis, estáveis e com alto nível de confiança, podendo ser utilizados eficientemente em análises de rotina. Também, busca-se metodologias de baixo custo e com tempo total de análise reduzido, tornando o exame acessível para todos de maneira rápida e efetiva.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral dessa dissertação foi desenvolver um imunossensor impedimétrico para detecção do biomarcador canceroso transferrina (Tf) nas formas apo-Tf e holo-Tf, visando o monitoramento das linhagens cancerosas A549 e MCF-7.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar o anticorpo anti-Tf na superfície eletródica pelo método de ligação covalente cruzada, utilizando os reagentes de comprimento zero EDC e NHS;
- Estabelecer as melhores condições experimentais para a imobilização de anti-Tf e detecção de apo-Tf e holo-Tf, de modo a obter a resposta mais intensa e precisa;
- Caracterizar os imunossensores construídos por meio das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE);
- Avaliar o desempenho analítico dos imunossensores por meio do cálculo de parâmetros de validação como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão;
- Detectar as células A549 e MCF-7 pela utilização do imunossensor impedimétrico desenvolvido, diferenciando-as estatisticamente da célula saudável de controle.

# 4 METODOLOGIA

## 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções utilizaram água ultrapura, proveniente em uma unidade de purificação Mega UP (Mega Purity®). Para realizar as medidas analíticas, utilizou-se pipetas automáticas de 1, 50 e 1000 μL (Costar®), com ponteiras volumétricas descartáveis de polietileno. As demais vidrarias (béqueres e balões volumétricos) foram mantidas por 24h em solução de $HNO_3$ 10% (v/v) para limpeza e lavadas com água ultrapura abundante antes da utilização, visando eliminar quaisquer interferentes de análises anteriores.

A origem dos reagentes utilizados encontra-se na Tabela 1.

**TABELA 1** – PROCEDÊNCIA E PUREZA DOS REAGENTES UTILIZADOS

| **Reagente** | **Fórmula Química** | **Marca** | **Pureza (%)** |
|---|---|---|---|
| Hexacianoferrato de potássio (II) | $K_4Fe(CN)_6$ | Sigma-Aldrich | 99,0 |
| Peróxido de hidrogênio | $H_2O_2$ | Sigma-Aldrich | 30,0 |
| Hidróxido de amônio | $NH_4OH$ | Sigma-Aldrich | 30,0 |
| Álcool isopropílico | $C_3H_7OH$ | Synth | 99,9 |
| Propanona | $C_3H_5OH$ | Synth | 99,9 |
| Álcool etílico | $C_2H_5OH$ | Synth | 99,9 |
| Hidróxido de Sódio | NaOH | Sigma-Aldrich | 98,0 |
| Fosfato dissódico | $Na_2HPO_4$ | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| Fosfato monosódico | $NaH_2PO_4$ | Sigma-Aldrich | 99,5 |
| (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) | $C_9H_{23}NO_3Si$ | Sigma-Aldrich | 99,0 |
| 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) | $C_8H_{17}N_3$ | Sigma-Aldrich | 97,0 |
| N-hidroxisuccinimida (NHS) | $C_4H_5NO_3$ | Sigma-Aldrich | 98,0 |
| Albumina de soro bovino (BSA) | - | Sigma-Aldrich | 98,0 |
| Anticorpo Anti-Tf | - | Sigma-Aldrich | 98,0 |
| Antígeno Apo-Tf | - | Sigma-Aldrich | 98,0 |
| Antígeno Holo-Tf | - | Sigma-Aldrich | 97,0 |

**FONTE:** O Autor (2018**)**.

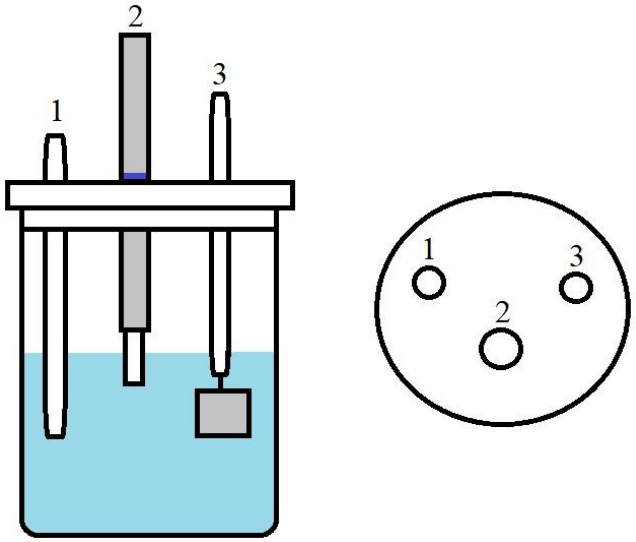
A solução de tampão fosfato 0,1 mol $L^{-1}$ foi feita com dissolução de 2,84 g de $Na_2HPO_4$ e 4,14 g de $NaH_2PO_4$ em 500 mL de água ultrapura Mega UP (Mega Purity ®). O pH foi ajustado para 7,4, utilizando NaOH 0,1 mol $L^{-1}$. As demais soluções foram preparadas em meio de tampão fosfato 0,1 mol $L^{-1}$ pH 7,4, exceto a solução de APTES (meio etanólico) e a de BSA (meio aquoso). A solução de APTES foi preparada com concentração 2% (v/v) em meio de etanol, utilizando alíquotas previamente separadas na *glovebox*, devido à sensibilidade do APTES em condições ambiente. Por sua vez, a solução de BSA foi preparada com concentração de 0,1% (m/v) em meio aquoso.

A mistura EDC/NHS foi feita com concentrações de 8,0 mmol $L^{-1}$ de EDC e 5,0 mmol $L^{-1}$ de NHS, estabelecidas na literatura [159]. Também, foi preparada uma solução estoque de 10 mL de hexacianoferrato de potássio (II) com concentração de 4 mmol $L^{-1}$, sendo mantida protegida da luz para evitar fotodegradação durante a realização das medidas eletroquímicas.

## 4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Para a execução das medidas, foi utilizada uma célula de vidro Pyrex®, com capacidade para 30 mL, equipada com tampa em Teflon®. Utilizou-se três eletrodos, dispostos na cela conforme mostra a Figura 6: (1) eletrodo de referência Ag/AgCl em KCl 3,0 mol $L^{-1}$, (2) imunossensor construído sobre placas de ITO com área geométrica de 0,5 $cm^2$, fixos em um suporte metálico, como eletrodo de trabalho e (3) placa de platina com área de 1,3 $cm^2$ como contra-eletrodo. Os eletrodos ITO foram obtidos originalmente da Delta Technologies, como placas retangulares medindo 75x25 mm (altura x largura) e 1,1 mm de espessura, com resistência de 8-12 Ω.

**FIGURA 6 –** ESQUEMA DA CELA ELETROQUÍMICA UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS




**LEGENDA:** (1) eletrodo de referência Ag/AgCl; (2) eletrodo de trabalho (suporte metálico e placa de ITO); (3) contra-eletrodo de placa de platina.
**FONTE:** O Autor (2018).

As medidas foram realizadas em um potenciostato Autolab® equipado com os *softwares* GPES 4.9 e FRA 4.9. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em uma velocidade de varredura igual a 100 mV $s^{-1}$, em um intervalo de potencial de -0,2 a 0,8 V *vs* Ag/AgCl. O intervalo de frequências varridas pela EIE foi de 10 kHz a 10 mHz, sendo registrados os

espectros em 51 pontos. Uma amplitude de 10 mV foi utilizada para obter linearidade na relação corrente-potencial, característica em condições não perturbativas, de modo que os espectros de impedância sejam bem definidos e não haja remoção do biorreceptor imobilizado na superfície eletródica [160].

Como os eletrodos ITO são descartáveis, as respostas de EIE foram avaliadas por valores de $\Delta R_{ct}/A$, visando comparação entre os resultados obtidos. Assim, utilizou-se a Equação 4 para avaliar a resposta da formação do complexo antígeno-anticorpo e a Equação 5 para avaliar a imobilização do anticorpo na superfície eletródica. $R_{ct_{anticorpo}}$ corresponde à resistência de transferência de carga do anticorpo imobilizado na superfície eletródica, $R_{ct_{antígeno}}$ é a resistência de transferência de carga da etapa de detecção (formação do complexo antígeno-anticorpo) e $R_{ct_{silanização}}$ é a resistência de transferência de carga relacionada à etapa de funcionalização com APTES.

$$\Delta R_{ct}/A = \frac{R_{ct_{antígeno}} - R_{ct_{anticorpo}}}{área\ geométrica\ do\ eletrodo} \qquad \text{(Equação 4)}$$

$$\Delta R_{ct}/A = \frac{R_{ct_{anticorpo}} - R_{ct_{silanização}}}{área\ geométrica\ do\ eletrodo} \qquad \text{(Equação 5)}$$

As medidas foram obtidas em condição de circuito aberto em meio de hexacianoferrato de potássio (II), com concentração de 4 mmol $L^{-1}$ em tampão fosfato, pH 7,4.

## 4.3 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS IMUNOSSENSORES

A construção dos imunossensores foi realizada por meio da imobilização da biomolécula anti-Tf à superfície eletródica, sendo utilizados eletrodos ITO. Inicialmente, os eletrodos ITO foram limpos em banho de ultrassom na seguinte sequência: 5 minutos em acetona, 5 minutos em etanol, 5 minutos em isopropanol e 15 minutos em água, sendo esse procedimento realizado em triplicata. Em seguida, os eletrodos foram colocados para secar em estufa por 90 minutos.

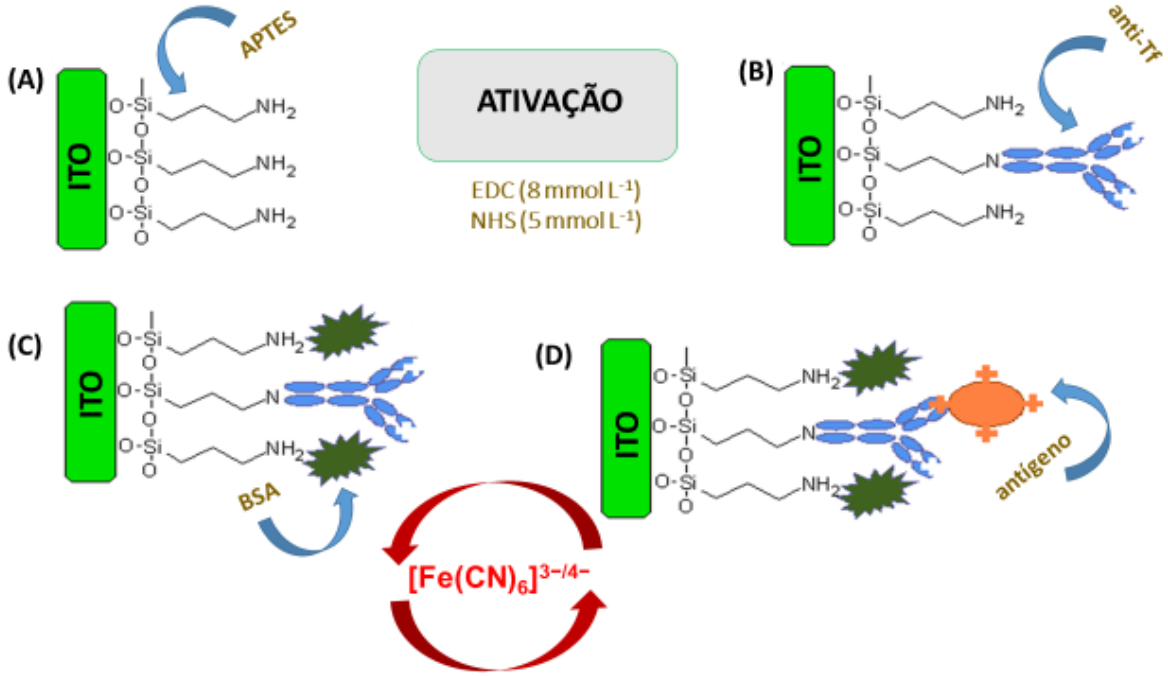
A primeira etapa da construção do imunossensor foi a funcionalização do eletrodo ITO, utilizando o aminosilano APTES (Figura 7A). Este processo, chamado de silanização, envolve a formação de uma ligação Si-O-Si- entre o grupo silano do APTES e os átomos de

oxigênio presentes no ITO, fixando o composto na superfície eletródica. Deste modo, os grupos amina terminais ficam expostos, estando passíveis de ligação com a biomolécula. Para este processo, os eletrodos foram imersos por 60 minutos em uma solução de APTES 2% em etanol.

Simultaneamente à silanização da superfície eletródica, os grupos carboxila presentes na biomolécula foram ativados pela reação carbodiimida/succinimida (EDC/NHS), em um mecanismo conhecido [37]. O anticorpo foi colocado em contato com solução de EDC 8 mmol $L^{-1}$ e NHS 5 mmol $L^{-1}$ e deixado em repouso por 90 minutos, em temperatura ambiente. Durante este tempo, um dos nitrogênios do grupo carbodiimida (-N=C=N-) da molécula de EDC reage com um grupo carboxílico terminal da biomolécula, formando um éster intermediário ativado. Este intermediário é hidrolisável, justificando assim a necessidade da utilização de NHS para a formação de uma amida estável. Ocorre, em seguida, a imobilização do anticorpo via ligação covalente cruzada (Figura 7B) dos grupos carboxilato terminais ativados no anticorpo e as aminas expostas no eletrodo. Esta reação substitui a ligação formada com os grupos amina do NHS, liberando-o em solução juntamente com o EDC. Para que tal ligação ocorresse, os eletrodos funcionalizados foram colocados em contato com a solução EDC/NHS/anti-Tf por 90 minutos.

Após, foi realizado enxague com tampão fosfato pH 7,4 para remover os anticorpos que não foram imobilizados. Os eletrodos foram então imersos em uma solução 0,1% (m/v) de albumina de soro bovino (BSA), para bloqueio dos grupos amina ainda disponíveis (não ligados a anticorpo) e dos sítios de ligação não específicos do anticorpo, visando garantir a seletividade do imunossensor (Figura 7C) [159]. Então, foi feita a imersão do imunossensor construído no antígeno, levando à formação do complexo antígeno/anticorpo, passível de monitoramento (Figura 7D).

**FIGURA 7 –** REPRESENTAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES




**LEGENDA:** (A) Silanização dos eletrodos ITO com APTES (B) Imobilização de anti-Tf (C) Bloqueio com BSA (D) Reconhecimento do antígeno (apo-Tf ou holo-Tf).
**FONTE:** Adaptada de Freitas *et al.* [159]

Após cada etapa, os eletrodos foram cuidadosamente lavados em tampão fosfato 0,1 mol $L^{-1}$ e secos sob um fluxo de $N_2$ antes de serem caracterizados pelas técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Todo o processo foi conduzido à temperatura ambiente (25°C). Finalmente, foi utilizado o *software* Nova 2.1.3 para adotar um modelo de circuito equivalente adequado aos dados obtidos.

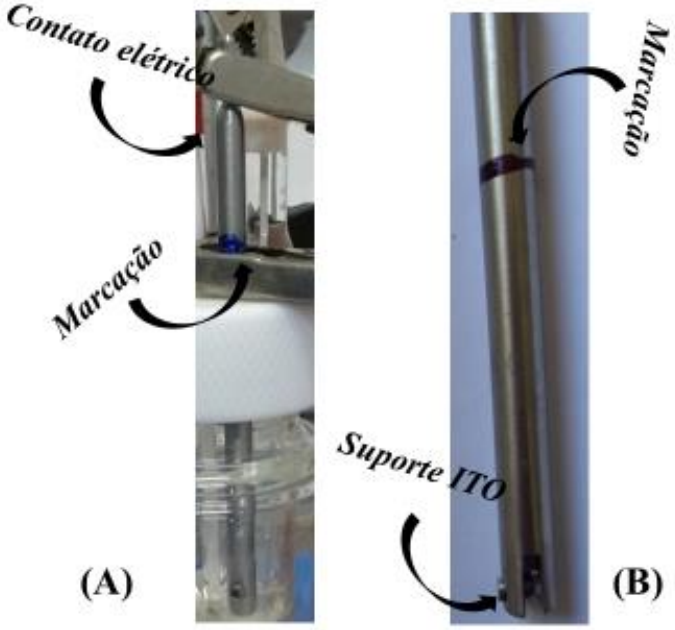
## 4.4 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IDEAIS

As condições ideais para a construção e aplicação dos imunossensores foram avaliadas para que houvesse uma resposta mais intensa e precisa de $R_{ct}$. Assim, foram realizados estudos relacionados à definição da área superficial do eletrodo, ativação da superfície eletródica, meio de imobilização do anticorpo, concentração do anticorpo e tempos de incubação do anticorpo e dos antígenos. Todas os parâmetros foram estudados para os antígenos apo-Tf e holo-Tf, avaliando os espectros de impedância com o anticorpo e com cada antígeno.

Deste modo, o primeiro estudo realizado foi a avaliação do melhor método para a definição da área geométrica do eletrodo. O método utilizado pelo grupo de pesquisa (Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, IFSC – USP) para a limitação da área geométrica do eletrodo ITO é com cola isolante Araldite®, que demora entre 4 e 8 horas para secagem. Esta

cola é solúvel em etanol e, como a silanização é realizado em meio etanólico, a demarcação foi realizada após este processo. O eletrodo silanizado foi então colocado na *glovebox* para secar por 8 horas. Entretanto, como esta espera aumentaria o tempo total de análise, buscou-se também um método alternativo para a delimitação da área que não necessitasse de secagem. Assim, a hipótese proposta foi a de realizar uma marcação na haste metálica de suporte do eletrodo ITO (Figura 8), de modo a controlar o quanto este eletrodo é imerso na solução presente na cela eletroquímica. Para fins de comparação, a área geométrica foi fixa em 0,5 cm² para os dois casos e os diagramas de Nyquist para a etapa de silanização foram avaliados.

**FIGURA 8 –** (A) HASTE METÁLICA EM SOLUÇÃO E (B) HASTE METÁLICA FORA DA SOLUÇÃO



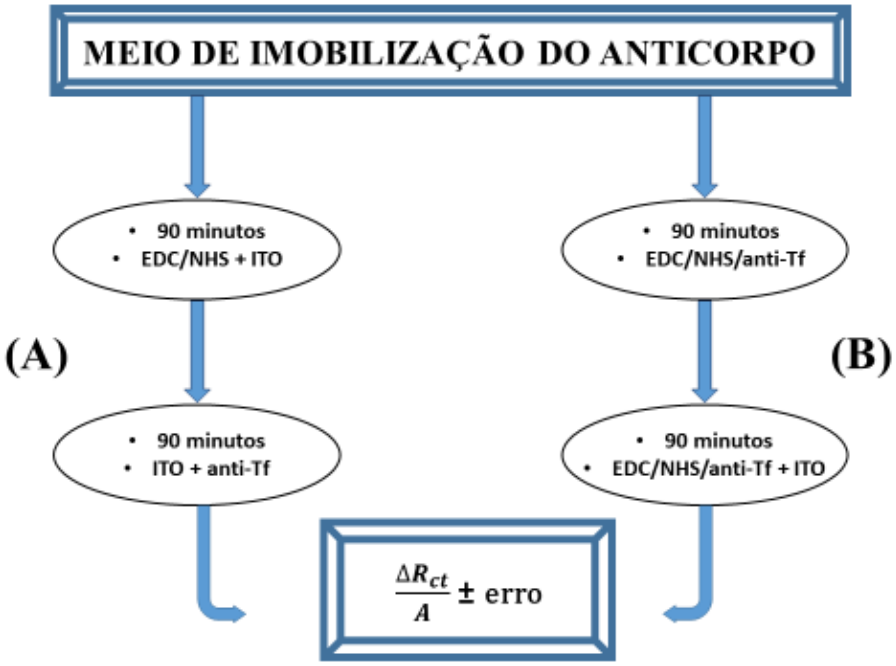

**Fonte:** O Autor (2018).

Em seguida, foi realizada uma etapa de pré-tratamento da superfície eletródica, por um procedimento descrito na literatura [159]. Este procedimento visa melhorar a ancoragem do APTES à superfície eletródica por meio da formação de grupos hidroxila no eletrodo. Assim, foi realizada a imersão dos ITOs em solução 5:1:1 (v/v/v) de $H_2O$:$H_2O_2$:$NH_4OH$, a 80ºC por 15 minutos. Após, estes foram lavados com água ultrapura em abundância e imersos em solução etanólica de APTES, sendo então avaliadas as respostas de $\Delta R_{ct}/A$ na etapa de silanização para eletrodos com e sem este processo de ativação.

Após, para a avaliação do meio de imobilização do anticorpo, foram realizados testes em triplicata de duas situações, representadas na Figura 9. No primeiro caso, os eletrodos ITO

foram imersos por 90 minutos em uma mistura de EDC e NHS. Em seguida, foram colocados em imersão novamente em uma solução de anti-Tf com concentração de 6 µg $mL^{-1}$ por 90 minutos, a 4ºC (Figura 9A). No segundo caso, uma mistura contendo EDC, NHS e anti-Tf (também com concentração de 6 µg $mL^{-1}$) foi preparada e deixada em repouso por 90 minutos, a temperatura ambiente. Após, os eletrodos ITO foram imersos por 90 minutos, a 4 ºC (Figura 9B). As soluções de EDC (8 mmol $L^{-1}$) e NHS (5 mmol $L^{-1}$) são estabelecidas na literatura para o trabalho com eletrodos ITO [161], visando ativar os grupos carboxila do anticorpo ou proteína para a posterior imobilização na superfície modificada com APTES.

**FIGURA 9 –** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA PARA A AVALIAÇÃO DO MEIO DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO. (A) MISTURA EDC/NHS SEGUIDA DE ANTI-TF E (B) MISTURA EDC/NHS/ANTI-TF NA SUPERFÍCIE ELETRÓDICA




**FONTE:** O Autor (2018).

As últimas condições experimentais avaliadas foram os parâmetros de incubação: tempo de imersão do eletrodo no anticorpo, concentração do anticorpo e tempo de imersão do eletrodo no antígeno. Os parâmetros de incubação avaliados constam na Tabela 2, sendo cada teste realizado em duplicada. Os testes de tempo e concentração do anticorpo foram avaliados na ausência e na presença de cada antígeno, com concentração de 250 ng $mL^{-1}$ e tempo de incubação de 30 minutos. Tempos de incubação dos antígenos acima de 30 minutos não foram utilizados devido à inaplicabilidade em cultura celular, podendo ocasionar a morte das células estudadas. Ademais, quando os resultados obtidos para estas avaliações não seguiam uma

tendência (aumento ou queda de resposta com aumento da concentração ou tempo utilizado), realizou-se uma análise de variâncias (ANOVA) de um fator, no nível de 95% de confiança.

**TABELA 2** – PARÂMETROS DE INCUBAÇÃO AVALIADOS

| | |
|---|---|
| **Tempo anticorpo** | 30, 60, 90 e 120 minutos |
| **Concentração anticorpo** | 3, 6, 9, 12 e 16 μg $mL^{-1}$ |
| **Tempo antígeno** | 10, 20 e 30 minutos |

**FONTE:** O Autor (2018**)**

## 4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ANALÍTICO

O desempenho dos imunossensores desenvolvidos foi avaliado por meio da construção de curvas analíticas. Utilizando os melhores parâmetros, os imunossensores foram incubados em diferentes concentrações de cada antígeno, em meio de tampão fosfato pH 7,4. Utilizou-se concentrações de 3,0 – 50,0 ng $mL^{-1}$ para apo-Tf e de 5,0 – 50,0 ng $mL^{-1}$ para holo-Tf, avaliando-se cinco pontos, cada um em duplicata. Após o tempo de incubação requerido para a formação do complexo, a técnica de EIE foi utilizada para obter os valores de $\Delta R_{ct}/A$.

A relação entre a concentração de cada antígeno e a resposta de $\Delta R_{ct}/A$, ou seja, a linearidade do sistema, foi avaliada pela aplicação da técnica de regressão linear e de um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança, bem como pelos valores de *r* (coeficiente de correlação) e $R^2$ (coeficiente de determinação). Os resultados estatísticos foram avaliados por meio do software computacional Minitab for Windows 16.2.2 (*Minitab, Minitab Incorporation, USA, 2010)*.

Também, foi possível realizar os cálculos dos limites de detecção e de quantificação para cada antígeno (Equações 6 e 7, respectivamente) [162], onde $B$ é a inclinação da curva analítica e $S_b$ é o desvio padrão do anticorpo imobilizado (branco) dos 10 eletrodos utilizados na construção da curva [120].

$$LD = \frac{3{,}3 * S_b}{B} \qquad (Equação\ 6)$$

$$LQ = \frac{10 * S_b}{B} \qquad (Equação\ 7)$$

Ademais, um estudo foi conduzido para estimar a precisão dos imunossensores, pelo cálculo das estimativas de repetitividade e de precisão intermediária. Para a repetitividade, foram construídos dois sensores no mesmo dia e cada sensor foi avaliado em triplicata. Por sua

vez, para a precisão intermediária, foram construídos dois sensores, cada um em um dia diferente, também avaliados em triplicata. Os respectivos resultados foram expressos como desvios padrão relativos (DPR).

## 4.6 CULTURA DE CÉLULAS

As células epiteliais cancerosas A549 e MCF-7, bem como as células saudáveis de controle (células fibroblastos saudáveis dos rins - BHK570) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células A549 e BHK570 foram cultivadas em meio DMEM – *Dulbecco´s Modified Eagle Medium*, enquanto a célula MCF-7 cultivada no meio de cultura RPMI-1640 (Vitrocell, Campinas, Brasil) suplementados com 10% de soro bovino fetal (FBS, Vitrocell, Campinas, Brasil) e mantidas em incubadora a 5% de $CO_2$ a 37 °C.

As células foram separadas do meio de cultura e ressuspensas em tampão fosfato a pH 7,4 nas concentrações $10^2$ e $10^4$ células $mL^{-1}$ para experimentação. Essa suspensão foi mantida em gelo e por curto tempo em tampão até os experimentos serem realizados para evitar degradação e morte celular. O tampão fosfato foi utilizado como o eletrólito devido ao ambiente isotônico e não tóxico proporcionado para as células durante as medidas [163].

Após a separação das células, foi realizada então a detecção com os imunossensores construídos. Adicionalmente, realizou-se uma análise de variâncias (ANOVA) e um teste de Dunnet, no nível de 95% de confiança, visando avaliar a significância estatística da diferença de resposta impedimétrica entre as células cancerosas e o controle (célula saudável).

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

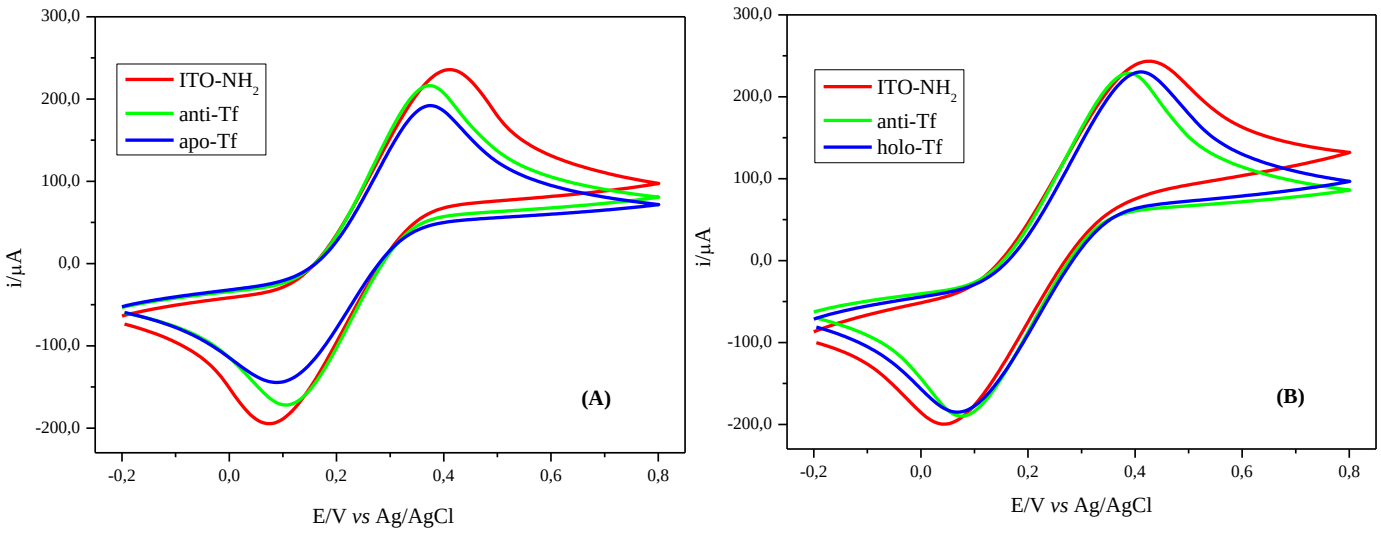
## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS IMUNOSSENSORES

As técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas para avaliar cada etapa da construção dos imunossensores. Foi avaliada a possibilidade de uso de ambas as técnicas para a detecção e quantificação dos antígenos, observando as variações de corrente de pico ($I_p$) e resistência de transferência de carga ($R_{ct}$) obtidos respectivamente pelos voltamogramas cíclicos e diagramas de Nyquist.

Na Figura 10 estão representados os voltamogramas cíclicos para as etapas de silanização (ITO-$NH_2$) em vermelho, imobilização do anticorpo (anti-Tf) em verde e a detecção dos antígenos apo-Tf (Figura 10A) e holo-Tf (Figura 10B) em azul. Os dados foram obtidos com velocidade de varredura de 100 mV $s^{-1}$, concentração do antígeno de 250 ng $mL^{-1}$ e concentração do anticorpo de 12 µg $mL^{-1}$ para holo-Tf e 16 µg $mL^{-1}$ para holo-Tf. Os tempos de incubação do anticorpo e do antígeno foram de 90 e 30 minutos, respectivamente.

Nota-se que as correntes de pico ($I_p$) referente ao processo de silanização são as mais intensas, indicando os grupos amina expostos e passíveis de ligação na superfície eletródica. Na etapa de imobilização do anticorpo ocorre então o bloqueio dos sítios de ligação da superfície eletródica para novas transferências de carga, fazendo com que haja queda de ($I_p$). Nesta mesma etapa, pode-se observar, também, um deslocamento de potencial de pico para regiões mais negativas. Com a adição de apo-Tf, ocorre novamente queda de $I_p$, indicando o bloqueio dos sítios de ligação com o antígeno – ou seja, a formação do complexo antígeno-anticorpo. Entretanto, com a adição de holo-Tf, houve apenas variação de potencial de pico ($E_p$), sem queda de corrente.

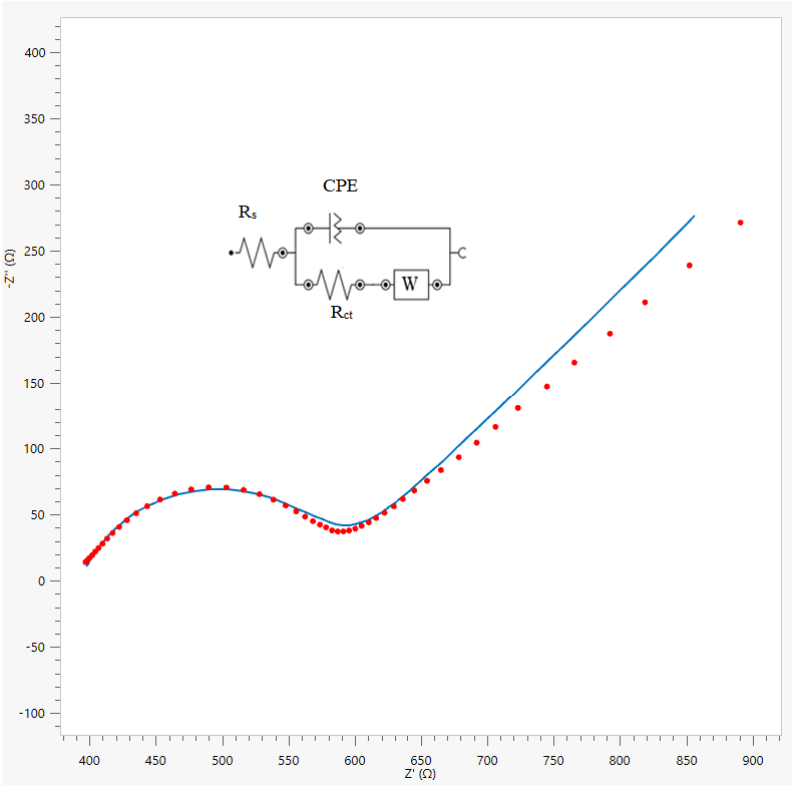
**FIGURA 10** – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA (A) APO-TF E (B) HOLO-TF




**LEGENDA:** (—) silanização; (—) imobilização do anticorpo; (—) formação do complexo antígeno-anticorpo. Voltamogramas obtidos em meio de $K_4[Fe(CN)_6]$ 4,0 mmol $L^{-1}$, com velocidade de varredura de 100 mV $s^{-1}$, emum intervalo de potencial de -0,2 a 0,8 V *vs* Ag/AgCl.
**FONTE:** O Autor (2018).

Os resultados experimentais de impedância foram obtidos por meio de modelagem com um circuito equivalente. Para tal, foi utilizado o *software* Nova 2.1.3 para escolher o modelo mais adequado ao sistema (Figura 11), sendo o circuito de Randles o que mais se aproximou aos dados. Tem-se CPE como a capacitância com elemento de fase constante, $R_{ct}$ como resistência de transferência de carga, $R_s$ como resistência da solução eletrolítica e W como elemento de Warburg, referente à difusão das espécies eletroativas na solução. A região de frequências baixas (representada por W) mostra divergência entre o resultado experimental e o esperado para o circuito equivalente escolhido. Entretanto, esta diferença não foi considerada na modelagem, uma vez que os dados necessários para o desenvolvimento dos sensores são apenas os de $R_{ct}$, representados pelo diâmetro do semicírculo.

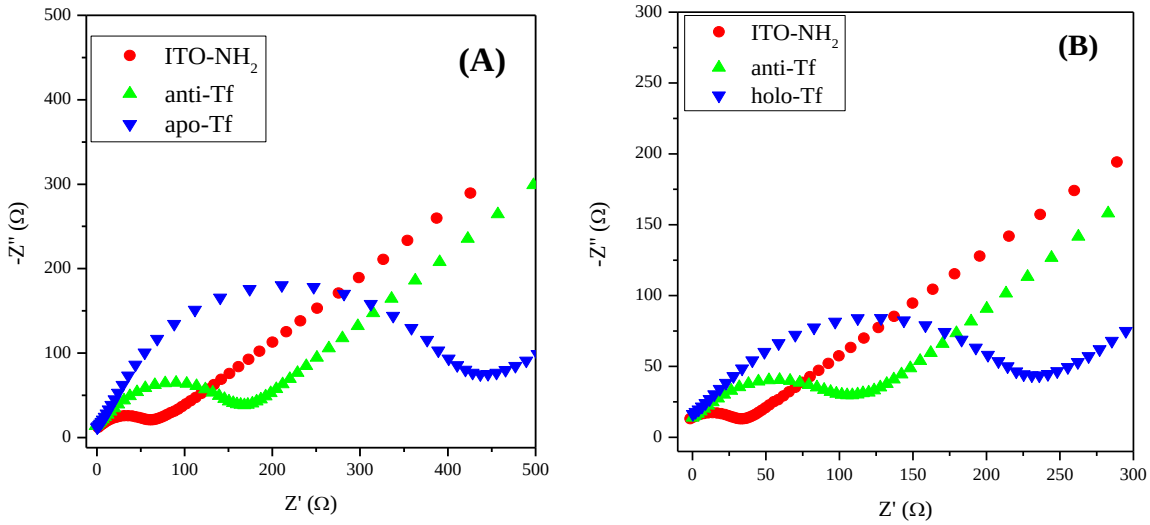
**FIGURA 11** – CIRCUITO EQUIVALENTE DE RANDLES




**LEGENDA:** Em azul, o circuito de Randles adotado. Em vermelho, o dado experimental utilizado como base.
**FONTE:** O Autor (2018).

Os diagramas de Nyquist para a caracterização das etapas de silanização (ITO-$NH_2$) em vermelho, imobilização do anticorpo (anti-Tf) em verde e detecção dos antígenos apo-Tf e holo-Tf em azul estão representados na Figura 12 (A e B, respectivamente). Os dados foram obtidos em um intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz, com registro dos espectros de impedância em 51 pontos e amplitude 10 mV. As concentrações do antígeno e do anticorpo, bem como os tempos de incubação de ambos, são os mesmos utilizados para obtenção dos voltamogramas cíclicos.

**FIGURA 12** – DIAGRAMAS DE NYQUIST DAS ETAPAS DE CONSTRUÇÃO DOS IMUNOSSENSORES PARA (A) APO-TF E (B) HOLO-TF




**LEGENDA:** (—) silanização; (—) imobilização do anticorpo; (—) formação do complexo antígeno-anticorpo. Diagramas de Nyquist obtidos em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 4,0 mmol $L^{-1}$, em circuito aberto, com amplitude de 10 mV e intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz.
**FONTE:** O Autor (2018).

Como descrito pela literatura, pode-se observar a formação de um semicírculo em frequências altas, equivalente à resistência de transferência de carga ($R_{ct}$). Nota-se que na primeira etapa, em vermelho, $R_{ct}$ é pequena quando comparada com as subsequentes. Com a imobilização do anticorpo, então, o valor de $R_{ct}$ aumenta, reagindo com os grupos livres na superfície eletródica e bloqueando-os para novas transferências de carga. Em seguida, com a imersão no antígeno, ocorre novo aumento de resistência, indicando que houve o reconhecimento da espécie pelo bloqueio dos sítios de ligação do anticorpo.

Os valores obtidos por meio dos voltamogramas cíclicos ($E_p$ e $I_p$ para os processos de oxidação e redução) e diagramas de Nyquist ($R_{ct}$, $R_s$ e $C_{dc}$ fornecidos pela modelagem do circuito) estão apresentados na Tabela 3. Deve-se levar em conta que a concentração de antígeno detectada (250 ng $mL^{-1}$) é considerada alta, uma vez que está acima da faixa de trabalho utilizada para controle de biomarcadores cancerosos [164, 165], especialmente com dispositivos eletroquímicos [166, 167]. Assim, observando a variação de resposta entre as etapas de imobilização de anti-Tf e detecção de cada antígeno, nota-se que os valores de $E_p$ e $I_p$ apresentam diferença menor que os valores de $R_{ct}$ e CPE. Isso leva a crer que a técnica de VC não é adequada para o monitoramento dos antígenos, apresentando baixa sensibilidade frente à EIE.

**TABELA 3** – VALORES OBTIDOS DOS VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS E DIAGRAMAS DE NYQUIST PARA CADA ANTÍGENO

| | | | **Valores VC** | | **Valores EIE** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Etapa*** | $E_{p\ Ox}$ ***(mV)*** | $E_{p\ Red}$ ***(mV)*** | $I_{p\ Ox}$ ***(µA)*** | $I_{p\ Red}$ ***(µA)*** | $R_s$ ***(Ω)*** | $R_{ct}$ ***(Ω)*** | ***CPE (F)*** |
| **ITO-$NH_2$** | 408 | 76 | 235 | -195 | 401 | 60 | $3 \times 10^{-6}$ |
| **Anti-Tf** | 375 | 108 | 216 | -171 | 296 | 168 | $4 \times 10^{-6}$ |
| **Apo-Tf** | 378 | 95 | 193 | -146 | 252 | 436 | $5 \times 10^{-6}$ |
| | | | **Valores VC** | | **Valores EIE** | | |
| ***Etapa*** | $E_{p\ Ox}$ ***(mV)*** | $E_{p\ Red}$ ***(mV)*** | $I_{p\ Ox}$ ***(µA)*** | $I_{p\ Red}$ ***(µA)*** | $R_s$ ***(Ω)*** | $R_{ct}$ ***(Ω)*** | ***CPE (F)*** |
| **ITO-$NH_2$** | 430 | 46 | 243 | -202 | 458 | 33 | $2 \times 10^{-6}$ |
| **Anti-Tf** | 386 | 76 | 230 | -191 | 376 | 104 | $4 \times 10^{-6}$ |
| **Holo-Tf** | 413 | 68 | 230 | -183 | 361 | 234 | $4 \times 10^{-6}$ |

**FONTE:** O Autor (2018)

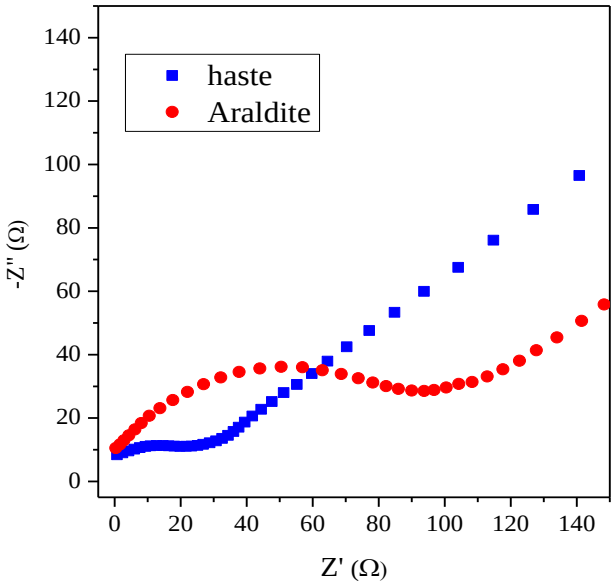
Adicionalmente, nota-se que a diferença de $R_{ct}$ para holo-Tf ($\Delta R_{ct}$ = 130 Ω) é menor que para apo-Tf ($\Delta R_{ct}$ = 268 Ω). Isto se deve ao fato de holo-Tf apresentar $Fe^{3+}$, um facilitador de transferência eletrônica, em seus terminais de ligação. Ao mesmo tempo em que o antígeno liga-se ao anticorpo, bloqueando-o para novas transferências de carga, o íon $Fe^{3+}$ exposto é capaz de realizar troca de elétrons com a solução de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, diminuindo a resistência do sistema.

## 5.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IDEAIS

### 5.2.1 Definição da área geométrica do eletrodo

O primeiro método avaliado para a definição da área geométrica do ITO foi realizado utilizando cola Araldite®, logo após o processo de silanização. O eletrodo foi seco em $N_2$ e demarcado com uma ponteira descartável de polietileno para que a área utilizada fosse de 0,5 cm². Em seguida, foi deixado na *glovebox* para secar por 8 horas. No segundo método, a haste suporte do eletrodo ITO (Figura 8) foi marcada à caneta para que somente uma área de 0,5 cm² de ITO fosse imersa na solução do eletrólito. Esta marcação foi a mesma para todas as medidas, de modo que a área fosse constante. Após, foi realizada uma medida de EIE da etapa de silanização para ambos os casos (Figura 13).

**FIGURA 13** – DIAGRAMA DE NYQUIST PARA ETAPA DE SILANIZAÇÃO DE ELETRODO MARCADO COM ARALDITE® E MARCADO NA HASTE SUPORTE



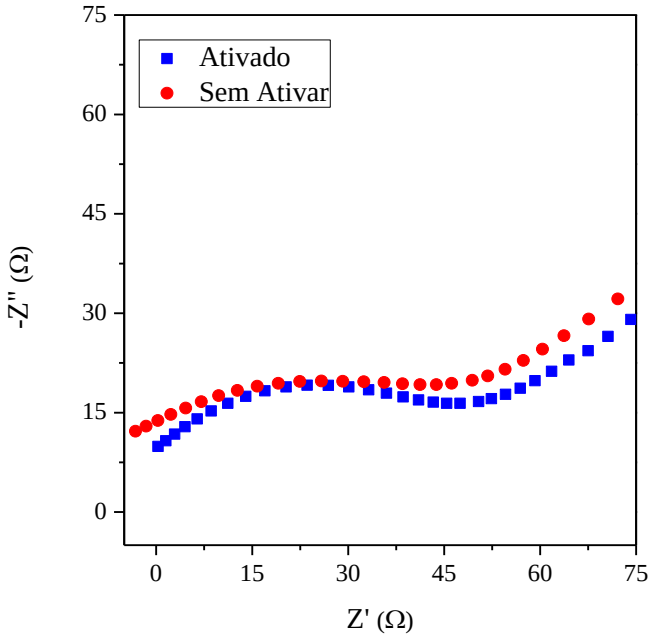

**LEGENDA:** (—) marcação com cola Araldite®; (—) marcação na haste suporte. Diagramas de Nyquist obtidos em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 4,0 mmol $L^{-1}$, em circuito aberto, com amplitude de 10 mV e intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz.
**FONTE:** O Autor (2018).

Notou-se que $R_{ct}$ (diâmetro do semicírculo) para o primeiro método é maior do que para o segundo, considerando a mesma área geométrica em ambas as situações. Esta diferença se deve à umidade do ar a que a superfície é exposta durante a secagem da cola, que gera a decomposição do APTES [168] e, consequentemente, leva a um menor número de moléculas ancoradas à superfície eletródica. Isso indica que no primeiro caso há menos agrupamentos aminas expostos quando comparado com o segundo, ou seja, há menos sítios de ligação disponíveis para interação com o anticorpo, diminuindo a eficiência da imobilização da biomolécula. Desta forma, foi escolhida então a marcação na haste metálica de suporte do eletrodo ITO como o método ideal, fixando a área imersa no eletrólito em 0,5 cm².

### 5.2.2 Ativação de superfície eletródica

Para avaliar a ativação da superfície do ITO, foi realizado um pré-tratamento estabelecido na literatura [161], envolvendo a imersão dos eletrodos em uma solução 5:1:1 (v/v/v) de $H_2O$:$H_2O_2$:$NH_4OH$, a 80ºC por 15 minutos. Após, o eletrodo foi funcionalizado com APTES, sendo esta etapa então avaliada por meio de EIE. O diagrama de Nyquist referente à esta avaliação está representado na Figura 14.

**FIGURA 14** – SILANIZAÇÃO EM ELETRODO ATIVADO *VS* ELETRODO SEM ATIVAÇÃO




**LEGENDA:** (–) eletrodo silanizado sem etapa de pré-tratamento; (–) eletrodo silanizado com etapa de pré tratamento. Diagramas de Nyquist obtidos em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 4,0 mmol $L^{-1}$, em circuito aberto, com amplitude de 10 mV e intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz.
**FONTE:** O Autor (2018).

Foi observado, entretanto, que não houve diferença significativa de $R_{ct}$ na etapa de silanização com e sem esta ativação, de modo que o processo não é justificável. Assim, a etapa de ativação foi eliminada da metodologia.

### 5.2.3 Meio de imobilização do anticorpo

Para a escolha do melhor meio de imobilização do anticorpo, foram realizados testes com duas situações. Na primeira, o eletrodo é imerso em uma mistura de EDC/NHS, seguida de nova imersão em anti-Tf. Na segunda, a imersão ocorre em uma mistura EDC/NHS/anti-Tf, em uma só etapa. Assim, foram avaliados tanto a intensidade de resposta de $\Delta R_{ct}/A$ quanto o erro das triplicatas.

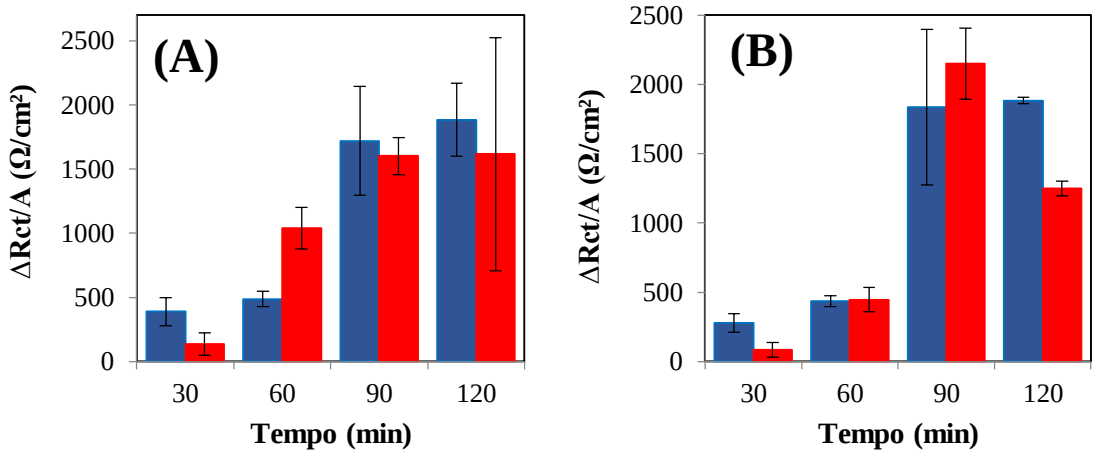
No primeiro caso, o valor de $\Delta R_{ct}/A$ encontrado foi de 1184 ± 1105 $\Omega/cm^2$, enquanto que no segundo caso $\Delta R_{ct}/A$ foi igual a 485 ± 144 $\Omega/cm^2$. Nota-se que, apesar da primeira situação apresentar maior magnitude de $R_{ct}$, também apresenta um erro de 93,3% do valor de $\Delta R_{ct}/A$, maior que no segundo caso, cujo o erro é de 29,6% da resposta. Deste modo, pode-se afirmar que quando os eletrodos são imersos na mistura de EDC/NHS/anti-Tf os resultados são mais precisos do que quando a imersão é feita na mistura de EDC/NHS seguida de Tf. Assim,

a imobilização de anti-Tf foi realizada em meio de EDC/NHS/anti-Tf, buscando maior precisão das medidas realizadas.

### 5.2.4 Tempo de incubação do anticorpo

Foram testados quatro tempos para a incubação do eletrodo ITO na mistura EDC/NHS/anti-Tf, sendo estes 30, 60, 90 e 120 minutos. Para tal, utilizou-se a técnica de EIE, realizando duplicata de três medidas: a primeira, na etapa de silanização, a segunda após a imobilização do anticorpo e a última para o imunocomplexo formado na presença de cada antígeno. Assim, os resultados foram avaliados de acordo com valores de $\Delta R_{ct}/A$, obtidos por meio da Equação 4 para a imobilização de anti-Tf e da Equação 5 para a detecção de apo-Tf e holo-Tf. Utilizou-se concentração do anticorpo igual a 6 $\mu g\ mL^{-1}$ e concentração do antígeno de 250 $ng\ mL^{-1}$, com tempo de incubação de 30 minutos. A Figura 15 mostra os resultados obtidos para os antígenos apo-Tf (A) e holo-Tf (B).

**FIGURA 15** – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTICORPO




**LEGENDA:** (–) $\Delta R_{ct}/A$ do anticorpo; (–) $\Delta R_{ct}/A$ do antígeno (A) apo-Tf e (B) holo-Tf.
**FONTE:** O Autor (2018).

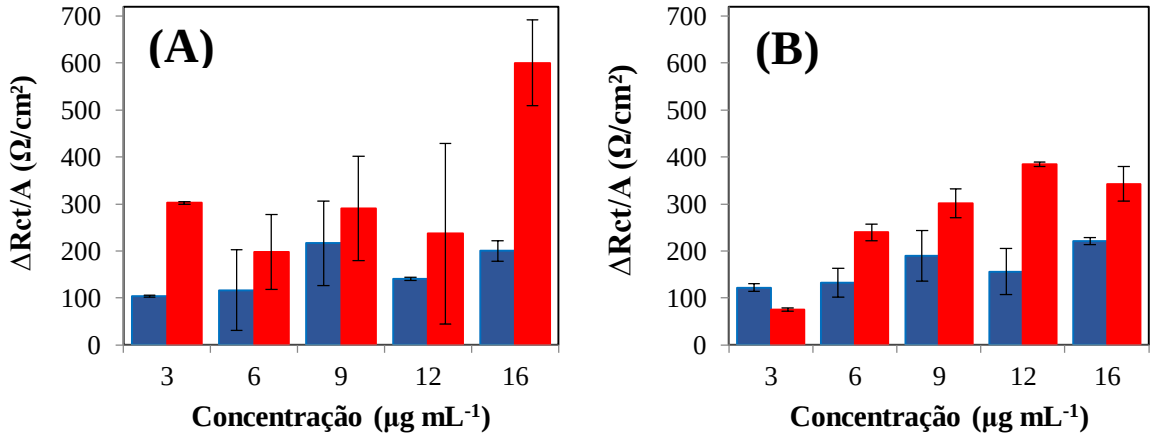
Nota-se que a resposta do anticorpo aumenta com o tempo, mantendo-se constante de 90 a 120 minutos. De maneira semelhante, apo-Tf (Figura 15A) mostra-se constante acima de 90 minutos. Holo-Tf (Figura 15B), por sua vez, exibe um aumento de $\Delta R_{ct}/A$ até 90 minutos, seguido de uma queda de resposta para 120 minutos, indicando possível saturação da superfície eletródica. Deste modo, para ambos os antígenos o tempo escolhido para a detecção de apo-Tf e holo-Tf foi de 90 minutos.

### 5.2.5 Concentração do anticorpo

A concentração do anticorpo foi avaliada em cinco pontos: 3, 6, 9, 12 e 16 µg $mL^{-1}$. Novamente utilizando a técnica de EIE, foram realizadas duplicatas de três medidas, uma na silanização, a segunda após a imobilização do anticorpo e a última na detecção do antígeno. O tempo de incubação do anticorpo foi de 90 minutos, escolhido previamente, com concentração de anti-Tf igual a 6 µg $mL^{-1}$. Foi usada uma concentração de cada antígeno de 250 ng $mL^{-1}$, com tempo de incubação de 30 minutos. A Figura 16 mostra os resultados obtidos para o antígeno apo-Tf (A) e holo-Tf (B).

Para a imobilização do anticorpo, nota-se que os valores de $\Delta R_{ct}/A$ não variam proporcionalmente com as diferentes concentrações. Desse modo, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) de um fator e um teste de Tukey, no nível de 95% de confiança, de modo a avaliar se as respostas obtidas diferem entre si. Para tal, utilizou-se quatro replicatas para cada concentração, duas referentes ao sensor que avaliou apo-Tf e duas ao sensor que avaliou holo-Tf, uma vez que esta etapa foi realizada da mesma maneira para os dois casos.

**FIGURA 16** – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ANTICORPO




**LEGENDA:** (—) $\Delta R_{ct}/A$ do anticorpo; (—) $\Delta R_{ct}/A$ do antígeno (A) apo-Tf e (B) holo-Tf.
**FONTE:** O Autor (2018).

Os resultados, presentes na Tabela 4, mostram que as concentrações apresentam diferença significativa entre si ($F_{observado} > F_{crítico}$; $p < 0,05$). Ademais, com base no teste de Tukey, os dados puderam ser distribuídos em três grupos (agrupamentos A, B e C), cujos componentes não diferem significativamente. Assim, as concentrações de 3, 6 e 12 µg $mL^{-1}$ não apresentam diferenças significativas. Também não diferem entre si as concentrações de 9, 12 e

16 µg $mL^{-1}$, bem como 6, 9 e 12 µg $mL^{-1}$. As demais relações apresentam diferença que deve ser considerada.

**TABELA 4 –** TABELA ANOVA PARA A SIGNIFICÂNCIA DAS DIFERENÇAS ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE ANTI-TF NA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO

| ***Concentração (µg $mL^{-1}$)*** | ***Média*** | ***Agrupamento**** | $F_{observado}$** | ***p*** |
|---|---|---|---|---|
| 3 | 113 | A | | |
| 6 | 125 | A, B | | |
| 9 | 203 | B,C | 5,78 | 0,005 |
| 12 | 136 | A, B, C | | |
| 16 | 211 | C | | |

**LEGENDA: *** letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias. ****$F_{crítico\ (0,05;\ 4,15)}$** = 3,06.
**FONTE:** O Autor (2018).

Sabendo então que as concentrações avaliadas são agrupadas conforme as diferenças estatísticas e que existem três grupos possíveis para o conjunto de dados avaliado, deve-se considerar a resposta do complexo antígeno-anticorpo para a escolha da melhor concentração. Assim, para apo-Tf, pode-se observar aumento significativo da resposta para 16 µg $mL^{-1}$, quando comparado com as demais. Para holo-Tf, ocorre um aumento de $R_{ct}$ para cada concentração até 12 µg $mL^{-1}$. Ao atingir a concentração de 16 µg $mL^{-1}$, entretanto, deu-se a queda de resposta de 384 ± 5 Ω/$cm^2$ para 343 ± 37 Ω/$cm^2$, indicando a saturação da superfície eletródica. Deste modo, as concentrações escolhidas foram de 12 µg $mL^{-1}$ para holo-Tf e 16 µg $mL^{-1}$ para apo-Tf.

Entretanto, caso este imunossensor seja futuramente aplicado em larga escala, deve-se considerar o uso da mesma concentração para ambas as formas da Tf, visando simplificar seu processo de fabricação. Para tal, é necessário avaliar se seria possível a utilização de uma concentração comum por meio de uma análise de variância (ANOVA) de um fator e um teste de Tukey, no nível de 95% de confiança. Deste modo, foi avaliada a diferença estatística entre as concentrações que apresentaram melhor resposta impedimétrica (12 e 16 µg $mL^{-1}$). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 para apo-Tf e holo-Tf. Segundo o teste de Tukey, as concentrações de 12 e 16 µg $mL^{-1}$ não apresentam diferença significativa. Isso pode ser observado na coluna de agrupamento, sabendo que médias que compartilham a mesma letra não diferem entre si.

**TABELA 5 -** TABELA ANOVA PARA A SIGNIFICÂNCIA DAS DIFERENÇAS ENTRE AS CONCENTRAÇÕES ESCOLHIDAS DE ANTI-TF NA ETAPA DE DETECÇÃO DOS ANTÍGENOS

| | ***APO-TF*** | |
|---|---|---|
| ***Concentração (µg mL$^{-1}$)*** | ***Média*** | ***Agrupamento*** |
| 12 | 237 | A |
| 16 | 600 | A |
| | ***HOLO-TF*** | |
| ***Concentração (µg mL$^{-1}$)*** | ***Média*** | ***Agrupamento*** |
| 12 | 324 | A |
| 16 | 343 | A |

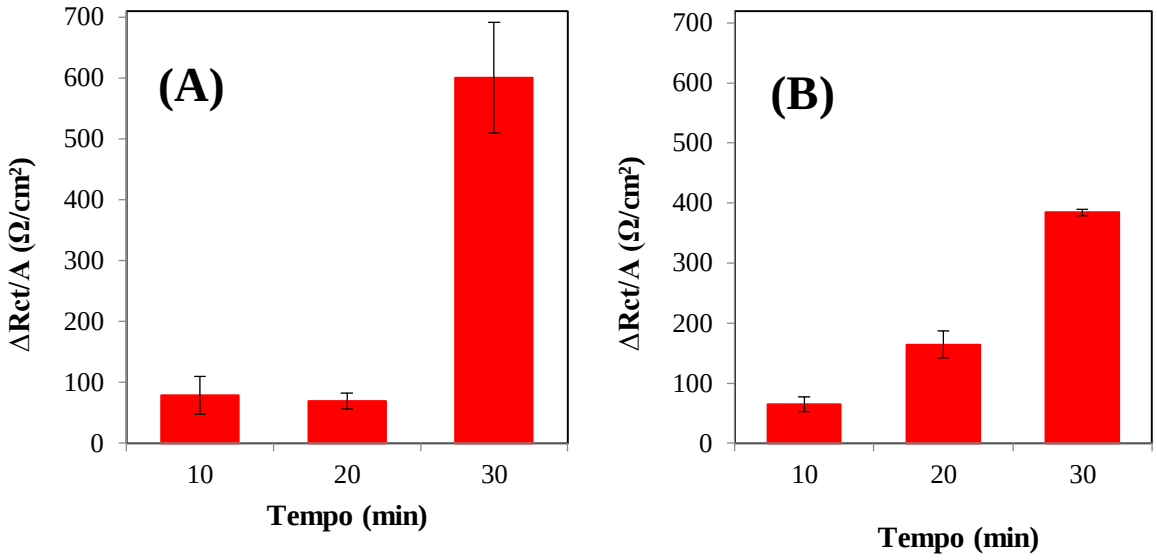
**FONTE:** O Autor (2018).

Assim, pode-se afirmar que ambas as concentrações avaliadas podem ser utilizadas para a detecção de Tf, ligada ou não à $Fe^{3+}$. Isso indica que uma concentração padrão de anti-Tf pode ser usada para a construção de imunossensores em larga escala, visando facilitar sua aplicação em análises de rotina. Porém, como pretende-se realizar a detecção de ambas as formas de Tf de modo separado, foram utilizadas as concentrações de 12 µg mL$^{-1}$ para holo-Tf e 16 µg mL$^{-1}$ para apo-Tf, escolhidas devido à maior intensidade de resposta impedimétrica da formação do imunocomplexo (Figura 16).

### 5.2.6 Tempo de incubação do antígeno

Ambos os antígenos tiveram seu tempo de incubação avaliados, sendo considerados 10, 20 e 30 minutos, usando EIE, com concentração fixa de 250 ng mL$^{-1}$. Tempos acima de 30 minutos não foram avaliados devido à aplicabilidade em análise de células, uma vez que poderiam ocasionar a morte das mesmas. Foi utilizado um tempo de incubação do anticorpo de 90 minutos, com concentração de 12 µg mL$^{-1}$ para holo-Tf e 16 µg mL$^{-1}$ para apo-Tf, avaliados anteriormente. As barras de erro para apo-Tf e holo-Tf estão representadas na Figura 17**,** A e B respectivamente.

**FIGURA 17** – AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTÍGENO




**LEGENDA:** (–) $\Delta R_{ct}/A$ do antígeno (A) apo-Tf e (B) holo-Tf.
**FONTE:** O Autor (2018).

Para apo-Tf, observa-se resposta similar em 10 e em 20 minutos, tendo $\Delta R_{ct}/A$ igual a 79 ± 31 e 69 ± 13 Ω/cm$^2$, respectivamente. Em 30 minutos, ocorre então aumento de resistência, levando a um valor de $\Delta R_{ct}/A$ de 600 ± 91 Ω/cm$^2$. No caso de holo-Tf, ocorre um aumento de resistência entre 10 e 20 minutos, apresentando valores de $\Delta R_{ct}/A$ iguais a 65 ± 13 e 164 ± 23 Ω/cm$^2$, respectivamente. Para 30 minutos, $\Delta R_{ct}/A$ foi de 385 ± 5 Ω/cm$^2$.

Estes valores mostram que tempos abaixo de 30 minutos não são suficientes para que o anticorpo se ligue à todas as moléculas de Tf disponíveis, de modo então que 30 minutos foi o tempo escolhido para apo-Tf e holo-Tf.

## 5.3 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO ANALÍTICO

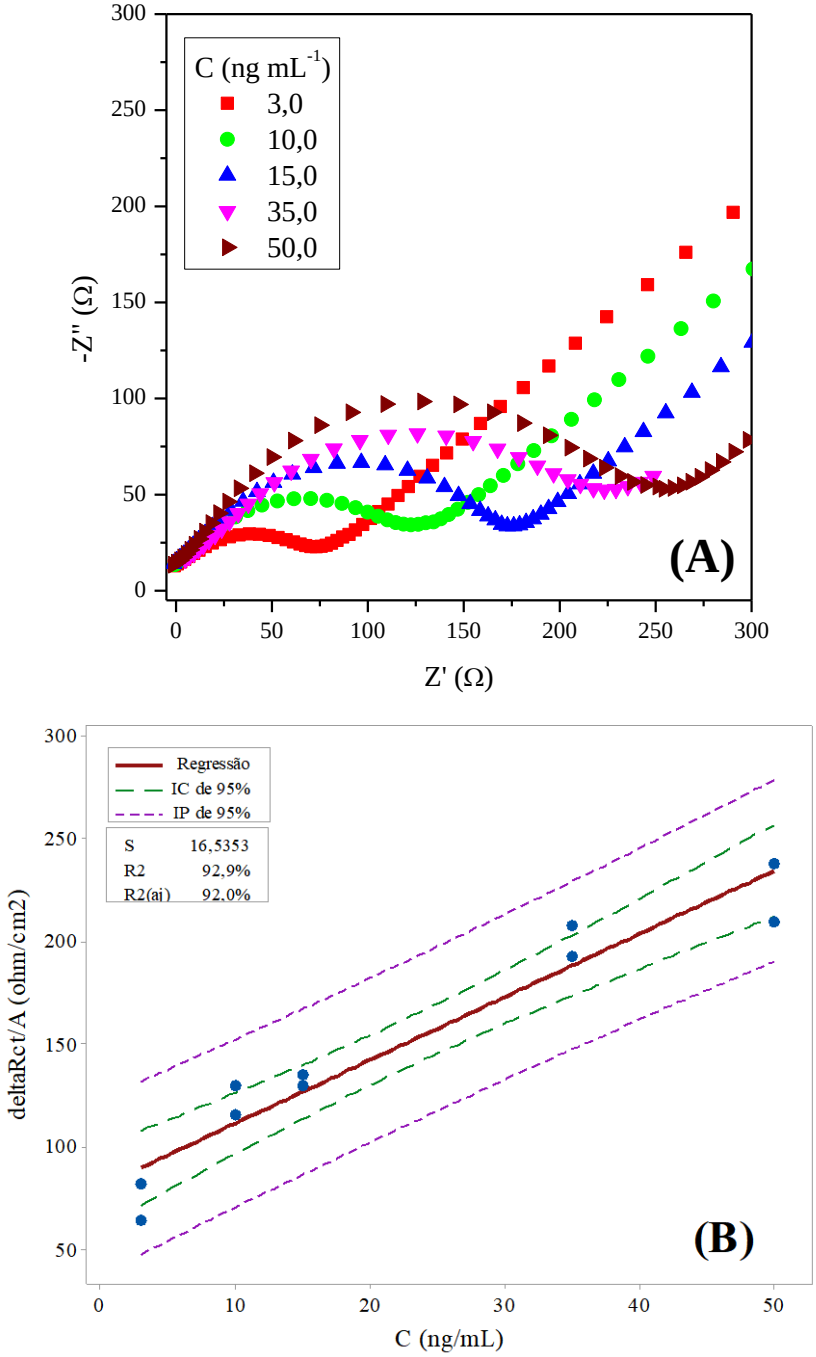
### 5.3.1 Linearidade

Após encontrar as melhores condições para a construção e caracterização dos imunossensores, foi realizado um estudo da relação entre $\Delta R_{ct}/A$ e a concentração de ambos os antígenos. O modelo de regressão linear foi utilizado para ajustar os dados experimentais. Assim, foi utilizado o *software* Minitab for Windows 16.2.2 para aplicar a regressão e o teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança.

Os diagramas de Nyquist obtidos para diferentes concentrações de apo-Tf estão representados na Figura 18A. Foi construída uma curva analítica (Figura 18B) para 5 níveis de

concentração, cada um avaliado em duplicata: 3, 10, 15, 35 e 50 ng $mL^{-1}$. Os valores de $R_{ct}$ (diâmetro do semicírculo) apresentam comportamento crescente com a concentração do antígeno, indicando aumento de moléculas de apo-Tf ligadas ao imunossensor. Utilizando o valor das médias encontradas e por meio de regressão linear, foi observada a proporcionalidade entre a concentração do antígeno e valor de $\Delta R_{ct}/A$. Também, pode-se observar que nem todos os pontos estão dentro do intervalo de confiança (IC, referente à variabilidade da resposta), o que indica que há erros puros que devem ser considerados, podendo afetar a precisão das análises. Entretanto, todos os pontos estão dentro do intervalo de predição (IP, referente à variabilidade na concentração do antígeno), de modo que a faixa de concentração é considerada adequada para a determinação de apo-Tf.

**FIGURA 18** – (A) DIAGRAMA DE NYQUIST E (B) CURVA ANALÍTICA PARA APO-TF

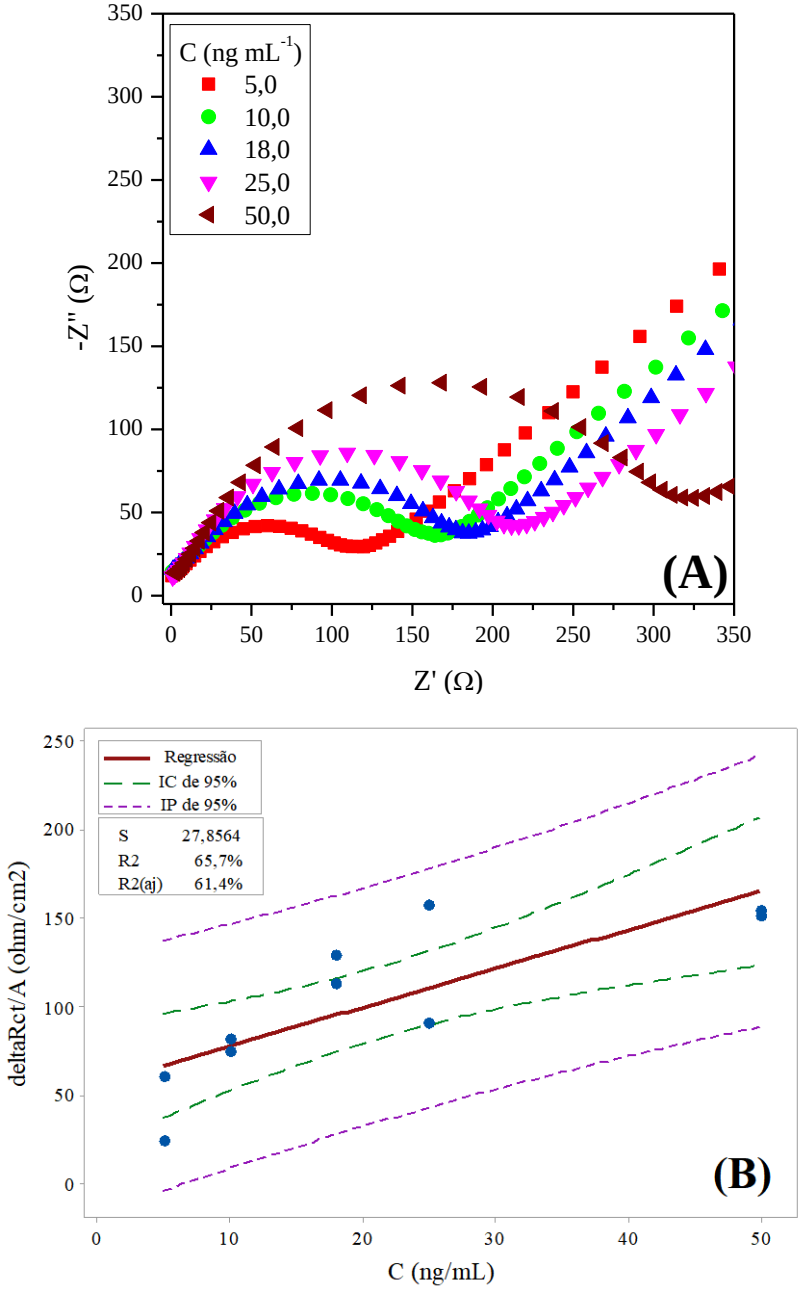



**LEGENDA:** (A) Diagramas de Nyquist obtidos em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 4,0 mmol $L^{-1}$, em circuito aberto, com amplitude de 10 mV e intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz.
(B) ( __ ) Regressão, ( _ _ ) Intervalos de confiança (95%) e (----) Intervalos de Predição (95%).
**FONTE:** O Autor (2018).

Da mesma forma, por meio da resposta eletroquímica obtida pelos diagramas de Nyquist (Figura 19A), uma curva analítica foi construída para holo-Tf (Figura 19B). Utilizou-se, também, 5 níveis de concentração avaliados em duplicata: 5, 10, 18, 25 e 50 ng $mL^{-1}$. O comportamento observado para holo-Tf foi semelhante ao descrito para o apo-Tf (Figuras 18A e 18B). Conforme o aumento da concentração de holo-Tf, nota-se que ocorre também o

aumento de $R_{ct}$, indicando um maior número de biomoléculas ligando-se ao anticorpo imobilizado. Novamente, percebe-se que todos os pontos estão dentro do IP, mas alguns encontram-se fora do IC. Nota-se, também, que IP e IC são maiores (mais largos) para holo-Tf do que para apo-Tf, indicando que holo-Tf apresenta erro puro maior e precisão menor.

**FIGURA 19**– DIAGRAMA DE NYQUIST (A) E CURVA ANALÍTICA (B) PARA HOLO-TF




**LEGENDA:** (A) Diagramas de Nyquist obtidos em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 4,0 mmol $L^{-1}$, em circuito aberto, com amplitude de 10 mV e intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz.
(B) ( __ ) Regressão, ( _ _ ) Intervalos de confiança (95%) e (----) Intervalos de Predição (95%).
**FONTE:** O Autor (2018).

Desta forma, visando avaliar o ajuste dos sistemas ao modelo linear aplicado, foram obtidos dados estatísticos, como constam nas Tabelas 6 e 7 para apo-Tf e holo-Tf, respectivamente.

**TABELA 6 –** AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE PARA A CURVA ANALÍTICA DE APO-TF POR REGRESSÃO LIENAR (95% CONFIANÇA)

| **Faixa linear de trabalho (ng mL$^{-1}$)** | | | | 3 – 50 | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Regressão*** | | **Falta de ajuste**** | | ***r*** | ***R$^2$ (%)*** |
| ***F$_{regressão}$*** | ***p*** | ***F$_{falta\ de\ ajuste}$*** | ***p*** | 0,929 | 92,89 |
| 104,46 | 0,000 | 2,98 | 0,135 | | |
| **Coeficientes da Reta ± Erro Padrão** | | | | ***t$_{observado}$**** | ***p*** |
| Intercepto: 80,1 ± 8,6 | | | | 9,33 | 0,000 |
| Inclinação: 3,1 ± 0,3 | | | | 10,22 | 0,000 |

**LEGENDA:** *$F_{crítico(0,025;1;8)}$ = 5,32; **$F_{crítico(0,025;3;5)}$ = 4,07; ***$t_{crítico(0,025;8)}$ = 2,31.
**FONTE:** O Autor (2018).

**TABELA 7** – AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE PARA A CURVA ANALÍTICA DE HOLO-TF POR REGRESSÃO LIENAR (95% CONFIANÇA)

| **Faixa linear de trabalho (ng mL$^{-1}$)** | | | | 5 – 50 | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Regressão*** | | **Falta de ajuste**** | | **r** | **R$^2$ (%)** |
| ***F$_{regressão}$*** | ***p*** | ***F$_{falta\ de\ ajuste}$*** | ***p*** | 0,957 | 65,70 |
| 15,32 | 0,004 | 1,75 | 0,272 | | |
| **Coeficientes da Reta ± Erro Padrão** | | | | ***t$_{observado}$**** | ***p*** |
| Intercepto: 55,9 ± 14,9 | | | | 3,74 | 0,006 |
| Inclinação: 2,2 ± 0,6 | | | | 3,91 | 0,004 |

**LEGENDA:** *$F_{crítico(0,025;1;8)}$ = 5,32; **$F_{crítico(0,025;3;5)}$ = 4,07; ***$t_{crítico(0,025;8)}$ = 2,31.
**FONTE:** O Autor (2018).

Visando avaliar a significância dos coeficientes da reta de regressão, foi realizado um teste-*t* no nível de 95% de confiança. Os valores de $t_{intercepto}$ e $t_{inclinação}$ apresentam-se acima do valor de $t_{crítico}$ (2,31) e os valores de $p_{intercepto}$ e $p_{inclinação}$ são menores que 0,05 para ambos os antígenos. Desta forma, tanto o coeficiente angular quanto o linear são estatisticamente significativos, devendo ser inseridos na equação da reta para apo-Tf e holo-Tf.

O coeficiente de correlação (*r*) indica a dependência entre duas variáveis dentro do modelo escolhido. Este valor tende a ser próximo de -1 ou +1, caso uma variável diminua ou aumente em relação ao crescimento da outra, respectivamente. Analogamente, se não há correlação linear entre elas, *r* será igual a zero [169]. Assim, os valores de *r* encontrados (0,929 para apo-Tf e 0,957 para holo-Tf) indicam um bom ajuste do sistema ao modelo linear.

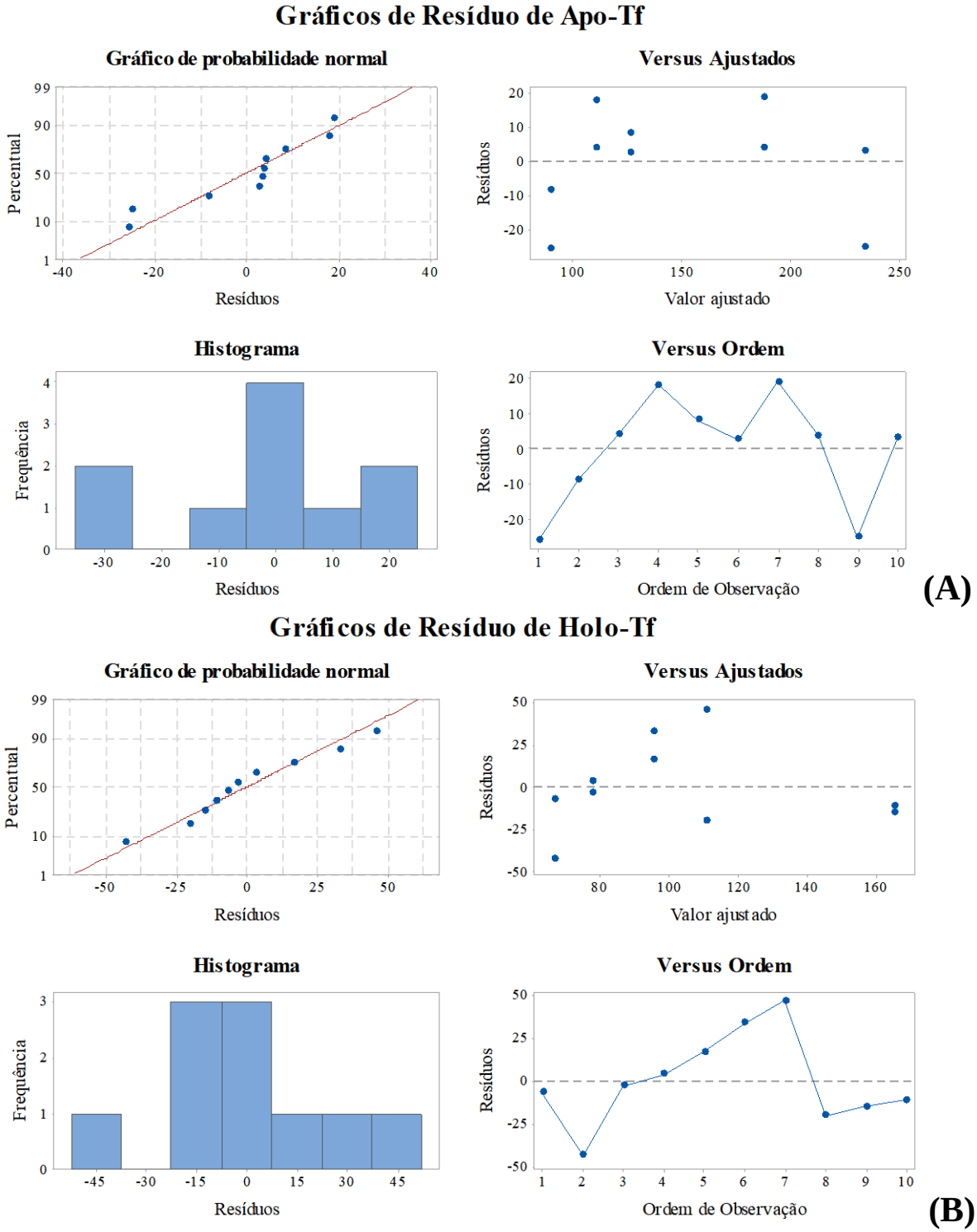
Por sua vez, o coeficiente de determinação ($R^2$), também conhecido como percentagem de variação explicada, avalia o quão próximos os resíduos (dados reais) estão do valor previsto (curva traçada a partir da média das replicatas). Deste modo, quanto mais próximo de 100% está $R^2$, menores os resíduos, ou seja, menor a variação ao redor da média. Para apo-Tf, este valor está próximo o suficiente de 100% para que o modelo seja considerado adequado para

descrever os dados experimentais. Entretanto, para holo-Tf, $R^2$ encontra-se abaixo do esperado. Isso indica que a distribuição dos pontos está distante da reta traçada modelo de regressão ajustado, o que pode dar-se devido à inadequação ao modelo linear utilizado ou ao erro puro entre os resíduos [119].

Em contrapartida, $R^2$ não é suficiente para definir a aplicabilidade de um modelo, fazendo-se necessário observar os valores de $F_{regressão}$. Assim, para ambos os antígenos, os valores de $F_{regressão}$ são maiores que o valor de $F_{crítico}$ tabelado de 5,32, confirmando assim a linearidade do sistema [16]. Da mesma forma, para avaliar o ajuste do sistema ao modelo e sua significância, utilizou-se o teste de falta de ajuste (*lack of fit*), no nível de 95% de confiança. Os valores de $F_{falta\ de\ ajuste}$ são maiores que o $F_{crítico}$ tabelado de 4,07, o que indica que não existe falta de ajuste dos dados ao modelo linear, corroborando com os dados anteriores [170, 171]. Conclui-se, então, que o valor de $R^2$ de 65,70% é causado devido ao erro elevado entre as replicatas, não indicando falta de ajuste ao modelo adotado.

Ademais, é necessário realizar uma análise dos resíduos para confirmar a adequação dos dados experimentais ao modelo linear aplicado. Deste modo, a Figura 20 mostra os gráficos de resíduos referentes à apo-Tf (A) e holo-Tf (B). Observando os gráficos de probabilidade normal, pode-se notar ausência de pontos distantes ou inclinações, apresentando os dados distribuídos ao longo de uma linha reta. Isto indica, assim, que os resíduos são distribuídos normalmente. Complementarmente, o histograma de resíduos determina se os dados são assimétricos ou possuem valores atípicos. Entretanto, devido ao número de pontos abaixo de 20, os histogramas não são totalmente confiáveis, de modo que cada barra apresenta valores insuficientes para avaliar a assimetria ou atipicidade do sistema. O gráfico de resíduos *versus* ajustados, por sua vez, deve apresentar distribuição aleatória em torno de zero para que a variância seja constante. Em ambos os casos, porém, agrupamentos podem ser observados, o que indica que os valores obtidos encontram-se distantes do valor esperado (média), devido ao erro entre as medidas. Finalmente, os gráficos de resíduos *versus* ordem não apresentam padrões, indicando que os resíduos são independentes entre si e não resultado de variáveis não avaliadas [172].

**FIGURA 20**– GRÁFICOS DE RESÍDUO PARA (A) APO-TF E (B) HOLO-TF




**FONTE:** O Autor (2018)

### 5.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados por meio das curvas analíticas de apo-Tf e holo-Tf, conforme as equações 6 e 7 citadas na metodologia,

e constam na Tabela 8, juntamente com valores referentes aos demais trabalhos da literatura. Nota-se que o imunossensor apresentado neste trabalho apresenta LD similar aos demais, bem como faixa de trabalho, embora não sejam encontrados valores de LQ para comparação. Os valores de $S_b$ utilizados para apo-Tf e holo-Tf foram de 191 e 149, respectivamente, e *b* pode ser encontrado nas equações da reta. Nota-se, assim, que tanto LD quanto LQ estão abaixo do primeiro ponto das curvas analíticas, indicando que os antígenos podem ser detectados e quantificados na faixa de trabalho adotada.

**TABELA 8** – COMPARAÇÃO ENTRE IMUNOSSENSORES ENCONTRADOS NA LITERATURA

| Referência | Técnica Eletroquímica | Faixa de trabalho (ng $mL^{-1}$) | LD (ng $mL^{-1}$) | LQ (ng $mL^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| Hu *et al.* (2002) [142] | Pulso potenciostático | 1,25 - 80,0 | 0,120 | - |
| Zeng *et al.* (2005) [143] | Pulso | | | |
| apo-Tf | potenciostático | 1,00 – 12,50 | 0,150 | |
| holo-Tf | | | 0,040 | |
| Yin *et al.* (2006) [144] | EIE | 1,0 – 75,0 | 0,050 | - |
| Kong *et al.* (2014) [19] | Eletroquimio-luminescência | 0,1 – 18,0 | 0,033 | - |
| Matysiak-brynda *et al.* (2017) [141] | EIE | 5,0 – 5,0x$10^5$ | 0,150 | - |
| | Voltametria linear | | 0,240 | |
| Este trabalho | EIE | | | |
| apo-Tf | | 3,0 – 50,0 | 0,049 | 0,162 |
| holo-Tf | | 5,0 – 50,0 | 0,053 | 0,147 |

**FONTE:** O Autor (2018).

### 5.3.3 Precisão

A Tabela 9 mostra os resultados para o estudo de precisão, estimados como desvios padrão relativos (% DPR). Os resultados de repetitividade e precisão intermediária ficaram abaixo do limite de 15 % tido como aceitável para métodos bioanalíticos [122], permitindo uma análise confiável dos dois antígenos no mesmo dia e em dias diferentes.

**TABELA 9** – RESULTADOS DE DPR (%) OBTIDOS PELOS ESTUDOS DE PRECISÃO PARA DETECÇÃO DE APO-TF E HOLO-TF

| Sensor | DPR (%) | |
|---|---|---|
| | Repetitividade | Precisão intermediária |
| apo-Tf | 2,9 | 8,3 |
| holo-Tf | 8,9 | 12,3 |

**FONTE:** O Autor (2018).

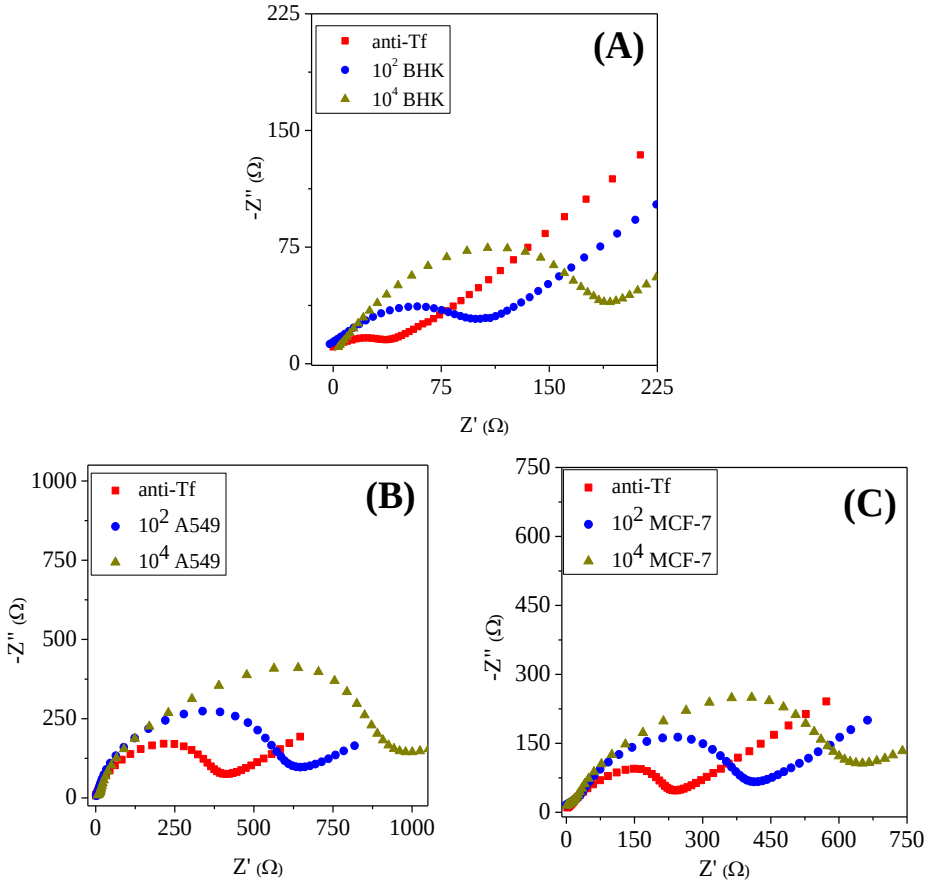
Ressalta-se, novamente, que a diferença entre os dois antígenos deve-se aos terminais de ligação ocupados com $Fe^{3+}$ em holo-Tf e livres em apo-Tf, oferecendo assim valores distintos relacionados com a linearidade e com a precisão do sistema. Sem o facilitador de transferência

eletrônica, apo-Tf apresenta menor erro puro entre as replicatas, fato observado comparando os coeficientes de determinação ($R^2$) e os intervalos de predição (IP) e de confiança (IC). Também, liga-se melhor ao anticorpo utilizado, apresentando melhor precisão (% DPR menor) em análises inter e intradias.

## 5.4 DETECÇÃO DE CÉLULAS CANCEROSAS

A capacidade de detecção de Tf em células cancerosas foi avaliada por EIE, novamente observando a variação de $R_{ct}$ pela área geométrica do imunossensor. As linhagens utilizadas foram A549, MCF-7 e BHK (controle), sendo todas avaliadas em duas concentrações: $10^2$ e $10^4$ células $mL^{-1}$. Os resultados estão apresentados na Figura 21, respectivamente para as células BHK (A), A549 (B) e MCF-7 (C), com escalas diferentes para melhor visualização do sinal impedimétrico.

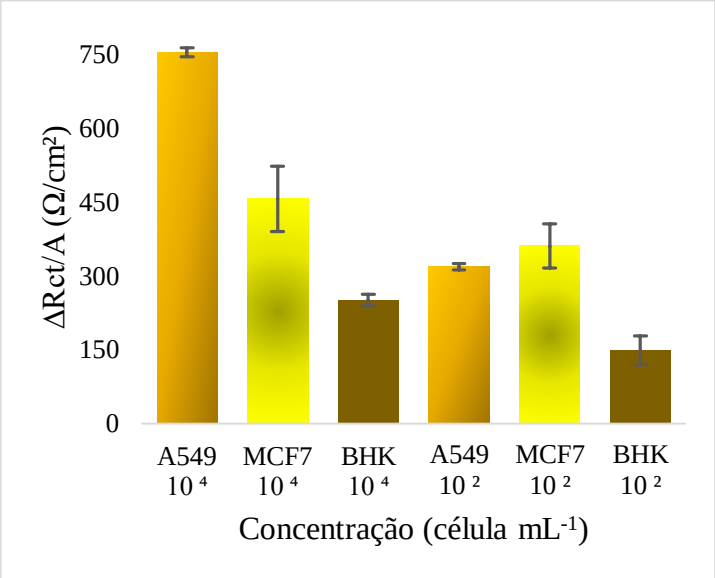
**FIGURA 21** – DIAGRAMAS DE NYQUIST PARA A DETECÇÃO DE LINHAGENS CELULARES (A) BHK, (B) A549 E (C) MCF-7 EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES.




**LEGENDA:** Diagramas de Nyquist obtidos em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 4,0 mmol $L^{-1}$, em circuito aberto, com amplitude de 10 mV e intervalo de frequência de 10 kHz a 10 mHz.
**FONTE:** O Autor (2018).

Pode-se observar que, embora as células BHK também possam ser detectadas, devido à presença de Tf, em todas as células, a resposta impedimétrica é menor que o encontrado para células cancerosas, pois nesse caso a Tf é superexpressa. Deste modo, os imunossensores construídos são capazes de diferenciar os três tipos de linhagem celular estudados por meio da EIE. A intensidade das respostas de $\Delta R_{ct}/A$ para cada célula e cada concentração está apresentada na Figura 22.

**FIGURA 22 –** VARIAÇÃO DA RESPOSTA IMPEDIMÉTRICA PARA AS CÉLULAS A549, MCF-7 E BHK, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES




**FONTE:** O Autor (2018).

Ademais, de modo a avaliar estatisticamente se as respostas obtidas para cada célula diferem entre si, foi aplicada uma ANOVA de um fator e um teste de Dunnett (comparação com controle – célula saudável), no nível de 95% de confiança.

**TABELA 10 -** TABELA ANOVA PARA A SIGNIFICÂNCIA DAS DIFERENÇAS ENTRE AS CÉLULAS BHK, A549 E MCF-7 PARA $10^2$ E $10^4$ CÉLULAS $ML^{-1}$

| *Concentração* | *Célula* | *Média* | *Agrupamento** | $F_{observado}$** | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| $10^2$ células $mL^{-1}$ | BHK | 149 | A | 26,14 | 0,013 |
| | A549 | 319 | - | | |
| | MCF-7 | 361 | - | | |
| $10^4$ células $mL^{-1}$ | BHK | 251 | A | 82,60 | 0,002 |
| | A549 | 755 | - | | |
| | MCF-7 | 457 | - | | |

**LEGENDA: *** médias não rotuladas com a letra A diferem significativamente do nível de controle (célula saudável). ****$F_{crítico\ (0,05;\ 2,3)}$** = 9,55.
**FONTE:** O Autor (2018).

Observando os valores de $F_{observado}$ para ambas as concentrações de células e comparando-o com o respectivo $F_{crítico}$, pode-se afirmar que há diferenças significativas entre a célula saudável e as cancerosas ($F_{observado} > F_{crítico}$). Este fato é corroborado pelos valores de *p* serem menores que 0,05, confirmando assim que o imunossensor construído foi capaz de diferenciar entre as células saudáveis e as cancerosas.

# 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, imunossensores impedimétricos para o monitoramento de apo-Tf e holo-Tf foram desenvolvidos, utilizando eletrodos ITO como transdutores e o anticorpo policlonal anti-Tf como biorreceptor. Os dispositivos puderam ser utilizados para a determinação de Tf quando ligada ou não à $Fe^{3+}$, indicando que a detecção pode ser realizada em qualquer etapa do transporte do íon.

Os imunossensores construídos apresentaram características de desempenho analítico importantes para seu uso rotineiro, tais como boa linearidade (no nível de 95% de confiança), estabilidade e precisão, as quais são adequadas à sistemas biológicos. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos na escala de ng $mL^{-1}$, sendo os LD condizentes com o encontrado na literatura para demais imunossensores eletroquímicos de Tf, enquanto que os LQ são inéditos, não sendo encontrados outros valores para comparação. Além disto, o tempo total de análise foi de 4h, considerado pequeno para uso clínico. Isso indica que, em um eventual exame de rotina realizado com os dispositivos, os resultados podem ser fornecidos no mesmo dia, sendo um avanço com relação aos métodos utilizados atualmente.

Em decorrência ao bom desempenho analítico, os imunossensores foram capazes de diferenciar as células cancerosas das células de controle, em duas diferentes concentrações. Entretanto, a detecção celular realizada foi de caráter preliminar, sendo necessária a realização de um teste de seletividade com interferentes possivelmente encontrados em amostras reais. Deve-se avaliar, então, o melhor procedimento de preparo da amostra, visando resultados mais exatos para uma possível aplicação futura dos dispositivos em análises de rotina. Da mesma forma, para facilitar a construção destes imunossensores em larga escala, faz-se necessário um teste de estabilidade em diferentes períodos de tempo (semanas e meses), buscando definir a validade dos dispositivos em caso de comercialização. Ademais, podem ser realizados estudos acerca da miniaturização do sistema, com a medida realizada em apenas uma frequência fixa, de modo a facilitar e agilizar o resultado. Com este aprimoramento, há possibilidade do sensor ser utilizado dentro do consultório médico, fornecendo um diagnóstico rápido e preciso.

Assim, ainda que mais estudos sejam requeridos para a aplicação dos sensores em larga escala, os dispositivos desenvolvidos mostram-se um avanço no monitoramento do biomarcador canceroso transferrina, uma vez que apresentaram simplicidade e desempenho analítico inéditos até o momento. São, portanto, considerados como uma importante contribuição no aprimoramento de diagnósticos clínicos rápidos e de baixo custo.

## REFERÊNCIAS

[1] INCA. **O que é o câncer?** Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 13 abr. 2017.

[2] BELIZ, E. O próximo desafio - Reverter o câncer. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 184, p. 50–57, 2002.

[3] INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em 28 jun. 2018.

[4] PERFÉZOU, M.; TURNER, A.; MERKOCY, A. Cancer detection using nanoparticle-based sensors. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 7, p. 2606–2622, 2012.

[5] ALMEIDA, J.R.C.; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B.; FLEMING, T.R.P.; CARVALHO, V.H.; CARDOSO, A.A.A. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

[6] SHINDELMAN, J.E.; ORTMEYER, A.E.; SUSSMAN, H.H. Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. **International journal of cancer**, v. 27, n. 3, p. 329-334, 1981.

[7] VOSTREJS, M; MORAN, P.L.; SELIGMAN, P.A. Transferrin synthesis by small cell lung cancer cells acts as an autocrine regulator of cellular proliferation. **The Journal of clinical investigation**, v. 82, n. 1, p. 331-339, 1988.

[8] WU, Y.; XU, J.; CHEN, J.; ZOU, M.; RUSIDANMU, A.; YANG, R. Blocking transferrin receptor inhibits the growth of lung adenocarcinoma cells in vitro. **Thoracic Center**, v. 9, p. 253-261, 2018.

[9] DESCHAMPS, E. M.; MINA, A; DIEGUEZ, M. A. Isoformas de la transferrina: Utilidad clínica de su determinación. **Revista de Diagnóstico Biológico**, v. 52, p. 35-39, 2003.

[10] ZHANG, X.; LAN, L.; YANG, S.; RUI, Y.; LI, Q.; CHEN, H.; SUN, X.; YANG, Q.; TANG, Y. Specific identification of human transferrin conformations using a cyanine dye supramolecular assembly. **RSC Advances**, v. 7, n. 71, p. 44904-44907, 2017.

[11] SOPER, S.A.; BROWN, K.; ELLINGTON, A.; FRAZIER, B.; GARCIA-MANERO, G.; GAU, V.; GUTMAN, S.I.; HAYES, D.F.; KORTE, B.; LANDERS, J.L.; LARSON, D.; LIGLER, F.; MAJUMDAR, A.; MASCINI, M.; NOLTE, D.; ROSENZWEIG, Z.; WANG, J.; WILSON, D. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1932-1942, 2006.

[12] NASCIMENTO, N. M.; JUSTE-DOLZ, A.; GRAU-GARCÍA, E.; ROMÁN-IVORRA, J. A.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.; MORAIS, S.; GOMENEZ-ROMERO, D. Label-free piezoelectric biosensor for prognosis and diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 166–173, 2017.

[13] KIM, N.; KIM, W. Y. Measurement of polyphenol oxidase activity using optical waveguide lightmode spectroscopy-based immunosensor. **Food Chemistry**, v. 169, p. 211-217, 2015.

[14] SILVA, B. V. M.; CAVALCANTI, I. T.; MATTOS, A. B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 1062–1067, 2010.

[15] AFKHAMI, A.; HASHEMI, P.; BAGHERI, H.; SALIMIAN, J.; AHMADI, A.; MADRAKIAN, T. Impedimetric immunosensor for the label-free and direct detection of botulinum neurotoxin serotype A using Au nanoparticles/graphene-chitosan composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 93, p. 124-131, 2017.

[16] NATA: National Association of Testing Authorities. **Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative methods.** Technical Note 17. Autralia, 2013.

[17] NI, Y.; KOKOT, S. Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis? **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 130-146, 2008.

[18] GOLUBNITSCHAJA, O.; FLAMMER, J. What Are the Biomarkers for Glaucoma? **Survey of Ophthalmology**, v. 52, n. 6, p. 155–161, 2007.

[19] KONG, W.; ZHOU, H.; OUYANG, H.; LI, Z.; FU, Z. A disposable label-free electrochemiluminescent immunosensor for transferrin detection based on a luminol- reduced gold nanoparticle-modified screen-printed carbon electrode. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2959–2964, 2014.

[20] FERGUSON, B.J.; SKIKNEB, B.S.; SIMPSON, K.M.; BAYNES, R.D.; COOK, J.D. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 119, n. 4, p. 385-390, 1992.

[21] FISCHER, P.; GÖTZ, M.E.; DANIELCZYK, W.; GSELL, W.; RIEDERER, P. Blood transferrin and ferritin in Alzheimer's disease. **Life sciences**, v. 60, n. 25, p. 2273-2278, 1997.

[22] LURIA-PÉREZ, R.; HELGUERA, G.; RODRÍGUEZ, J. A. Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 73, n. 6, p. 372–379, 2016.

[23] DANIELS, T. R.; BERNABEU, E.; RODRIGUEZ, J. A.; PATEL, S.; KOZMAN, M.; CHIAPPETTA, D. A.; HOLLER, E.; LJUBIMOVA, J.Y.; HEGUERA, G.; PENICHET, M. L. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 3, p. 291–317, 2012.

[24] DESCHAMPS, E. M.; MIÑA, A.; DIÉGUEZ, M. A. Isoformas de la transferrina: Utilidad clínica de su determinación. **Revista de Diagnóstico Biológico**, v. 52, p. 35-39, 2003.

[25] GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

[26] WALLY, J.; HALBROOKS, P.J.; VONRHEIN, C.; ROULD, M.A.; EVERSE, S.J.; MASON, A.B.; BUCHANAN, S.K. The crystal structure of iron-free human serum transferrin provides insight into inter-lobe communication and receptor binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24934–24944, 2006.

[27] SANCHES, R.N.F. **Estudo da interação de metalofármacos de dirutênio-anti-inflamatórios com as proteínas séricas transferrina e albumina**. São Paulo, 2016. 196 p. Tese de Doutorado – Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química de São Paulo – Universidade de São Paulo.

[28] WAGNER, E.; CURIEL, D.; COTTON, M. Delivery of drugs, proteins and genes into cells using transferrin as a ligand for receptor-mediated endocytosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 14, p. 113-135, 1994.

[29] FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

[30] NOSRATI, R.; DEHGHANI, S.; KARIMI, B.; YOUSEFI, M.; TAGHDISI, S.M.; ABNOUS, K.; ALIBOLANDI, M.; RAMEZANI, M. Siderophore-based biosensors and nanosensors; new approach on the development of diagnostic systems. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 1-14, 2018.

[31] BERG, J.M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J.L. Sistema Imunológico. In: **Bioquímica**. 7. ed. Nova Iorque, W.H. Freeman and Company, 2012. p. 1590-1640.

[32] ABCAM. **Anti-transferrin antibody (ab82411)**. Disponível em: <www.abcam.com/transferrin-antibody-ab82411.html>. Acesso em: 9 ago. 2017.

[33] ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2015. p. 212-254.

[34] GT LAB. **Transferrina Immunoquant**. Bula. Disponível em: < https://www.gtlab.com.ar/UserFiles/mediaManager/1/dc6ef39d6ed4bd05cd3db33f0e669d12a94286ee_f8dff6049442c0f08e88d100e476e797d1f876b1.pdf>. Acesso em 9 dez. 2018.

[35] LIU, X.; SUN, Y.; SONG, D.; ZHANG, Q.; TIAN, Y.; ZHANG, H. Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferrin. **Talanta**, v. 68, p. 1026-1031, 2006.

[36] CARVALHO, L.A. **Investigação das propriedades eletroquímicas do sistema Ti/Ru0,3Ti(0,7-x)SnxO2 utilizando a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica**. Ribeirão Preto, 2004. 87 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

[37] ROCHA, C. G. **Desenvolvimento de imunossensor impedimétrico para detecção do corante disperso Red 1**. Araraquara, 2014. 110 p. Dissertação de mestrado – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista.

[38] LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**. Nova Iorque: Springer, 2014.

[39] PRODOMIDIS, M. I. Impedimetric Immunosensors – A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 4227-4233, 2010.

[40] BRAZACA, L.C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**. São Carlos, 2015. 111 p. Dissertação de mestrado – Mestrado em Ciências, Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo.

[41] CARVALHO, L.A.; ANDRADE, A.R.; BUENO, P.R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.

[42] CHAUFFAILLE, S.; DEVOS, O.; JUMEL, J.; SHANAHAN, M. E. R. Liquid diffusion in polymeric adhesives by electrochemical-impedance spectroscopy (EIS). **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 30, n. 7, p. 602-608, 2010.

[43] FERNANDES, J. C. S.; NUNES, A.; CARVALHO, M. J.; DIAMANTINO, T. C. Degradation of selective solar absorber surfaces in solar thermal collectors – An EIS study. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 160, p. 149-163, 2017.

[44] SKOOG, A.D.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, R.S. Voltametria. In: **Fundamentos de Química Analítica**. [s.l]: Thomson, 2006. Tradução da 8ª ed. norte americana. p. 602 –641.

[45] WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. New Jersey: WILEY-VCH, 2006. 250p.

[46] HIGSON, S.P.J. Introdução aos biossensores. In: **Química Analítica**. 1. ed. São Paulo:

McGraw-Hill, 2009. p. 392–399.

[47] RIBOVSKI, L. **Biossensores eletroquímicos para fins medicinais e ambientais**. São Carlos, 2015. 110 p. Dissertação de mestrado – Mestrado em Ciências, Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo .

[48] GRAÇA, S.J.; FERREIRA, M. Encapsulação de Biomoléculas em Lipossomos: Aplicações em Biossensores Enzimáticos e Imunossensores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, 1552-1564, 2015.

[49] CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962.

[50] WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **TrEAC – Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 25-32, 2014.

[51] ZHANG, W.; ASIRI, A.M.; LIU, D.; DU, D.; LIN, Y. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**, v. 54, p. 1-10, 2014.

[52] RUBAB, M.; SHAHBAZ, H.M.; OLAIMAT, A.N.; OH, D.H. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 49-57, 2018.

[53] EVTUGYN, G.; SUBJAKOVA, V.; MELIKISHVILI, S.; HIANIK, T. Chapter Seven - Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. **Advances in food and nutrition research**, v. 85, p. 263-310, 2018.

[54] BRACKE, N.; BARHDADI, S.; WYNENDAELE, E.; GEVAERT, B.; D'HONDT, M.; SPIEGELEER, B. Surface acoustic wave biosensor as a functional quality method in pharmaceutics. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 210, p. 103-112, 2015.

[55] SILVA, M.L.S. Lectin-based biosensors as analytical tools for clinical oncology. **Cancer Letters**, v. 436, p. 63-74, 2018.

[56] BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, p. 1-8, 2016.

[57] OLIVEIRA, A.E.F.; PEREIRA, A.C. Biossensores e a Indústria Alimentar – Revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n.5, p. 1311-1333, 2016.

[58] SEITZ, W.R. Transducer mechanisms for optical biosensors. Part 1: The chemistry of transduction. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 30, n. 1, p. 9-19, 1989.

[59] MEHRVAR, M.; ABDI, M.. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Analytical sciences**, v. 20, n. 8, p. 1113-1126, 2004.

[60] RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.

[61] KARYNAKARAN, C.; PANDIARAJ, M.; SANTHARAMAN, P. Immunosensors. In: KARYNAKARAN, C.; BHARGAVA, K.; BENJAMIN, R. **Biosensors and Bioelectronics**. [s.l.]: Elsevier, 2015. p. 205–245.

[62] KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 88–105, 2016

[63] CALABRIA, D.; CALICETI, C.; ZANGHERI, M.; MIRASOLI, M.; SIMONI, P.; RODA,

A. Smartphone–based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 124-130, 2017.

[64] MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. Rio de Janeiro, 2008. 104 p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

[65] SINGHAL, C.; PUNDIR, C. S.; NARANG, J. A genosensor for detection of consensus DNA sequence of Dengue virus using ZnO/Pt-Pd nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 75-82, 2017.

[66] ARKAN, E.; SABER, R.; KARIMI, Z.; SHAMSIPUR, M. A novel antibody–antigen based impedimetric immunosensor for low level detection of HER2 in serum samples of breast cancer patients via modification of a gold nanoparticles decorated multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 874, p. 66–74, 2015.

[67] SHARIATI, M. The field effect transistor DNA biosensor based on ITO nanowires in label-free hepatitis B virus detecting compatible with CMOS technology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 58-64, 2018.

[68] LI, W.; SHU, D.; ZHANG, D.; MA, Z. Multi-amplification of the signal of voltammetric immunosensors: Highly sensitive detection of tumor marker. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 262, p. 50-56, 2018.

[69] MEDINTZ, I.L.; UYEDA, H.T.; GOLDMAN, E.R.; MATTOUSSI, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. **Nature materials**, v. 4, n. 6, p. 435, 2005.

[70] SOUZA, L.T.A.; VERÍSSIMO, L.A.A.; JOÃO, B.C.P.; SANTORO, M.M.; RESENDE, R.R.; MENDES, A.A. Imobilização Enzimática: Princípios Fundamentais e Tipos de Suporte. In: RESENDE, R.R. (Org.). *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. São Paulo: Blucher, 2016, p. 529-568.

[71] RONKAINEN, N. J.; BRIAN, H.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 29, p. 1747–1763, 2010.

[72] SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012

[73] MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

[74] NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123-130, 1995.

[75] AHMAD, Z.; SHEPHERD, J.H.; SHEPHERD, D.V.; GHOSE, S.; KEW, S.J.; CAMERON, R.E.; BEST, S.M.; BROOKS, R.A.; WARDALE, J.; RUSHTON, N. Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. **Regenerative biomaterials**, v. 2, n. 2, p. 77-85, 2015.

[76] LIN, H. C.; TSAI, W. C. Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin B. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 1479-1483, 2003.

[77] JANATA, J. An Immunoelectrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 10, p. 2914–2916, 1975.

[78] CADKOVÁ, M.; METELKA, R.; HOLUBOVÁ, L.; HURÁK, D.; DVORÁKOVÁ, V.; BÍLKOVÁ, Z.; KORECKÁ, L. Magnetic beads-based electrochemical immunosensor for

monitoring allergenic food proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 484, p. 4-8, 2015.
[79] HAYAT, A.; BARTHELMEBS, L.; MARTY, J. L. Electrochemical impedimetric immunosensor for the detection of okadaic acid in mussel sample. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 171-172, p. 810-815, 2012.
[80] LIU, L.; XU, D.; HU, Y.; LIU, S.; WEI, H.; ZHENG, J.; WANG, G.; HU, X.; WANG, C. Construction of an impedimetric immunosensor for label-free detecting carbofuran residual in agricultural and environmental samples. **Food Control**, v. 53, p. 72-80, 2015.
[81] KHAN, R.; PAL, M.; KUZIKOV, A. V.; BULKO, T.; SUPRUN, E. V.; SHUMYANTSEVA, V. V. Impedimetric immunosensor for detection of cardiovascular disorder risk biomarker. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 52-58, 2016.
[82] MONTROSE, A.; CARGOU, S.; NEPVEU, F.; MANCZAK, R.; GUÉ, A. M.; REYBIER, K. Impedimetric immunosensor for the detection of circulating pro-inflammatory monocytes as infection markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 305-311, 2013.
[83] EISSA, S.; CHINNAPPAN, R.; ZOUROB, M. Label-free Impedimetric Immunosensors for Liver Cancer Stem Cells. **Procedia Technology**, v. 27, p. 287-289, 2017.
[84] GASPAROTTO, G.; COSTA, J. P. C.; COSTA, P. I.; ZAGHETE, M. A.; MAZON, T. Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 1240-1247, 2017.
[85] DILLON, P.P.; DALY, S.J.; KILLARD, A.J.; O'KENNEDY, R. Development and use of antibodies in surface plasmon resonance-based immunosensors for environmental monitoring. **International Journal of Environmental & Analytical Chemistry**, v. 83, n. 7-8, p. 525-543, 2003.

[86] LIANG, R.; QIU, J.; CAI, P. A novel amperometric immunosensor based on three-dimensional sol–gel network and nanoparticle self-assemble technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 534, p. 223-229, 2005.

[87] NEVES, M.M.P.S.; GONZÁLES-GARCÍA, M.B.; SANTOS-SILVA, A.; COSTA-GARCÍA, A. Voltammetric immunosensor for the diagnosis of celiac disease based on the quantification of anti-gliadin antibodies. **Sensors and Actuators B, Chemical**, v. 163, p. 253-259, 2012.

[88] PURVIS, D.; LEONARDOVA, O.; FARMAKOVSKY, D.; CHERKASOV, V. An ultrasensitive and stable potentiometric immunosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 1385-1390, 2003.

[89] OKAFOR, C.; GROOMS, D.; ALOCILJA, E.; BOLIN, S. Fabrication of a Novel Conductometric Biosensor for Detecting *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* Antibodies. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 6015-6025, 2008.

[90] SHARMA, S.; ZAPATERO-RODRÍGUEZ, J.; SAXENA, R.; O'KENNEDY, R.; SRIVASTAVA, S. Ultrasensitive direct impedimetric immunosensor for detection of sérum HER2. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 106, p. 78-85, 2018.

[91] RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Uso da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) para monitoramento da corrosão em concreto armado. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p. 529–546, 2015.
[92] YANG, J.; DA ROCHA, C.G.; WANG, S.; FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. A label-free impedimetric immunosensor for direct determination of the textile dye Disperse Orange 1. **Talanta**, v. 142, p. 183-189, 2015.

[93] MALVANO, F.; ALBANESE, D.; PILLOTON, R.; DI MATTEO, M. A highly sensitive impedimetric label free immunosensor for Ochratoxin measurement in cocoa beans. **Food**

**Chemistry**, v. 212, p. 688-694, 2016.

[94] MUTREJA, R.; JARIYAL, M.; PATHANIA, P.; SHARMA, A.; SAHOO, D.K.; SURI, R. Novel surface antigen based impedimetric immunosensor for detection of Salmonella typhimurium in water and juice samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 707-713, 2016.

[95] CORDEIRO, T.A.R.; GONÇALVES, M.V.C.; FRANCO, D.L.; REIS, A.B.; MARTINS, H.R.; FERREIRA, L.F. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327-332, 2019.

[96] LIU, L.; XU, D.; HU, Y.; LIU, S.; WEI, H.; ZHENG, J.; WANG, G.; HU, X.; WANG, C. Construction of an impedimetric immunosensor for label-free detecting carbofuran residual in agricultural and environmental samples. **Food Control**, v. 53, p. 72-80, 2015.

[97] AFKHAMI, P. H.; BAGHERI, H.; SALIMIAN, J.; AHMADI, A.; MADRAKIAN, T. Impedimetric immunosensor for the label-free and direct detection of botulinum neurotoxin serotype A using Au nanoparticles/graphenechitosan composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 93, p. 124-131, 2017.

[98] RAVALLI, A.; ROCHA, C. G.; YAMANAKA, H.; MARRAZZA, G. A label-free electrochemical affisensor for cancer marker detection: The case of HER2. **Bioelectrochemistry**, v. 106, p. 268-275, 2015.

[99] AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNFα in human saliva and serum samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 97, p. 169-176, 2017.

[100] LIU, Y.; CUI, T.; VARAHRAMYAN, K. All-polymer capacitor fabricated with inkjet printing technique. **Solid-State Electronics**, v. 47, p. 1543-1548, 2003.

[101] BALLARIN, B.; FRALEONI-MORGERA, A.; FRASCARO, D.; MARAZZITA, S.; PIANA, C.; SETTI, L. Thermal inkjet microdeposition of PEDOT:PSS on ITO-coated glass and characterization of the obtained film. **Synthetic Metals**, v. 146, p. 201-205, 2004.

[102] KATORE, M.S.; YAWALE, S.S.; YAWALE, S.P. Photovoltaic study of chemically engineered nano-titanium oxide loaded polyaniline matrix of architecture ITO/titanium oxide-polyaniline/aluminum. **Synthetic Metals**, v. 209, p. 577-582, 2015.

[103] KUMAR, A.; SHARMA, V.K.; KUMAR, D.; KAPOOR, A. Integrated optic TE/TM pass polarizers using resonant coupling between ITO thin film lossy modes and dielectric waveguide modes. **Optics Communications**, v. 291, p. 247-252, 2013.

[104] FRESHNEY, R.I.; FRESHNEY, M.G. **Culture of epithelial cells**. 2. ed. John Wiley & Sons, 2004.

[105] SOULE, H.D.; VAZQUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

[106] GEST, C.; JOIMEL, U.; HUANG, L.; PRITCHARD, L.L.; PETIT, A.; DULONG, C.; BUQUET, C.; HU, C.Q.; MIRSHAHI, P.; LAURENT, M.; FAUVEL-LAFÈVE, F.; CAZIN, L.; VANNIER, J.P.; LU, H.; SORIA, J.; LI, H.; VARIN, R.; SORIA, C. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in

MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 13, n. 63, p. 1471-2407,

2013.

[107] GUL-E-SABA; ISLAMIAH, M.; ISMAIL, N.; MOHAMAD, H.; SUNG, Y.Y.; MUHAMMAD, T.S.T. Induction of apoptosis by Aaptos sp., fractions in human breast cancer cell line, MCF-7**. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 328-337, 2018.

[108] DEB, A.; VIMALA, R. Natural and synthetic polymer for graphene oxide

mediated anticancer drug delivery—A comparative study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2320-2333, 2018.

[109] GIARD, D.J.; AARONSON, S.A.; TODARO, G.J.; ARNSTEIN, P.; KERSEY, J.H.; DOSIK, H.; PARKS, W.P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors **Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1417-1423, 1973.

[110] ECACC. **Cell line profile A549**. Disponível em: < https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/126404/a549-cell-line-profile.pdf >. Acesso em 05 jul. 2018.

[111] CHANG, Y.; YANG, S.T.; LIU, J.H.; DONG, E.; WANG, Y.; CAO, A.; LIU, Y.; WANG, H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. **Toxicology letters**, v. 200, n. 3, p. 201-210, 2011.

[112] LEE, E.J.; LEE, H.J.; PARK, H.J.; MIN, H.Y.; SUH, M.E.; CHUNG, H.J.; LEE, S.K. Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by a benz [f] indole-4, 9-dione analog in cultured human lung (A549) cancer cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 20, p. 5175-5178, 2004.

[113] PENJWEINI, R.; LOEW, H.G.; BREIT, P.; KRATKY, K.W. Optimizing the antitumor selectivity of PVP-Hypericin re A549 cancer cells and HLF normal cells through pulsed blue light. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 10, n. 4, p. 591-599, 2013.

[114] LIN, Y.; ZHANG, M.; BARNES, P.F. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 1121-1126, 1998.

[115] RUIZ-ANGEL, M.J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M.C.; BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 2-9, 2014.

[116] ALMEIDA. S.V.; GALLI, A.; FELSNER, M.L. Tendências e perspectivas na validação de métodos eletroanalíticos. In: VOIGT, C.L. (Org.). **Tendências e Progressos da Eletroquímica e Eletroanalítica no Brasil,** Ponta Grossa: Atena Editora, 2018. Cap. 9. p.110-121.

[117] RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

[118] PAGLIAI, R.L. **Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol**. São Carlos, 2015. 111 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais – Universidade de São Paulo.

[119] THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

[120] ANVISA, RE899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Resolução RE nº**, v. 899, 2003.

[121] MIRANDA, L.; FELSNER, M.L.; TORRES, Y.R.; HOSS, I.; GALLI, A.; QUINÁIA, S.P. Validação intralaboratorial da determinação de metiltestosterona em águas naturais por voltametria usando eletrodo de gota pendente de mercúrio. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 419-426, 2015.

[122] SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.A.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N.; POWELL, M.L; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 2, p. 1551-1577, 2000.

[123] CAMILLO, C.C.; AMANCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S.; BRAGA, J.A.P.; JULIANO, Y. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças de creches de Guaxupé. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 2, p. 154-9, 2008.

[124] LABTEST. **Capacidade de ligação de ferro**. Instruções de uso. Disponível em: < https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Capacidade_de_Ligação_de_Ferro_41_Port.pdf>. Acesso em 11 dez. 2018.

[125] JOU, Y.J.; LIN, C.D.; LAI, C.H.; CHEN, C.H.; KAO, J.Y.; CHEN, S.Y.; TSAI, M.H.; HUANG, S.H.; LIN, C.W. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. **Analytica Chimica Acta**, v. 681, p. 41-48, 2010.

[126] MATTA, M.K.; BEEKMAN, C.R.; GANDHI, A.; NARAYANASAMY, S.; THOMAS, C.D.; MOHAMMAD, A.; STEWART, S.; XU, L.; CHOCKALINGAM, A.; SHEA, K.; PATEL, V.; ROUSE, R. Determination of Non-Transferrin Bound Iron, Transferrin Bound Iron, Drug Bound Iron and Total Iron in Serum in a Rats after IV Administration of Sodium Ferric Gluconate Complex by Simple Ultrafiltration Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. **Nanomaterials**, v. 8, n. 2, p. 101, 2018.

[127] ALONSO-GARCÍA, F.J.; BLANCO-GONZÁLEZ, E.; MONTES-BAYÓN, M. An inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) linked immunoassay by means of iodinated antibodies for transferrin quantitative analysis in breast cancer cell lines. **Talanta**, v. 194, p. 336-342, 2019.

[128] YEE, M.F.; EMMEL, G.N.; YANG, E.J.; LEE, E.; PAEK, J.H.; WU, B.M.; KAMEI, D.T. Ionic Liquid Aqueous Two-Phase Systems for the Enhanced Paper-Based Detection of Transferrin and *Escherichia coli*. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 2018.

[129] STRZELAK, K.; RYBKOWSKA, N.; WISNIEWSKA, A.; KONCKI, R. Photometric flow analysis system for biomedical investigations of iron/transferrin speciation in human serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 995, p. 43-51, 2017.

[130] GAO, H.; WANG, W.; WANG, Z.; HAN, J.; FU, Z. Amorphous carbon nanoparticle used as novel resonance energy transfer acceptor for chemiluminescent immunoassay of transferrin. **Analytica Chimica Acta**, v. 819, p. 102-107, 2014.

[131] ITO, H.; HOSHI, K.; HONDA, T.; HASHIMOTO, Y. Lectin-Based Assay for Glycoform-Specific Detection of 2,6-sialylated Transferrin and Carcinoembryonic

Antigen in Tissue and Body Fluid. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1314-1325, 2018.

[132] PRUSAK-SOCHACZEWSKI, E.; LUONG, J.H.T. Detection of Human Transferrin by the Piezoelectric Crystal. **Analytical Letters**, v. 23, n. 2, p. 183-194, 1990.

[133] WU, Z.Y.; SHEN, G.L.; XIE, L.J.; Y, R.Q. PEG piezoelectric immunoassay for the determination of transferrin in human serum. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 71, p. 99-105, 2000.

[134] LIU, X.; SUN, Y.; SONG, D.; ZHANG, Q.; TIAN, Y.; ZHANG, H. Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferrin. **Talanta**, v. 68, p. 1026-1031, 2006.

[135] ZHANG, J.; SUN, Y.; XU, B.; ZHANG, H.; GAO, Y.; ZHANG, H.; SONG, D. A novel surface plasmon resonance biosensor based on graphene oxide decorated with gold nanorod–antibody conjugates for determination of transferrin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 45, p. 230-236, 2013.

[136] MAYANG, Y.; HE, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Detection of transferrin by using a surface plasmon resonance sensor functionalized with a boronic acid monolayer. **Microchimica Acta**, v. 184, p. 2749–2757, 2017.

[137] CHEN, S.; LIU, Y.; LIU, Z.; CHU, S.; PENG, W. Micro-capillary-based self-referencing surface plasmon resonance biosensor for determination of transferrin. **Applied Optics**, v. 55, n. 30, 8571-8575, 2016.

[138] CHANG, L.; HE, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. A fluorescent sensing for glycoproteins based on the FRET between quantum dots and Au nanoparticles. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 250, p. 17-23, 2017.

[139] CHANG, L.; HE, X.; CHEN, L.; ZHANG, Y. Mercaptophenylboronic acid-capped Mn-doped ZnS quantum dots forhighly selective and sensitive fluorescence detection of glycoproteins. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 243, p. 72-77, 2017.

[140] ZHANG, Y.D.; HUANG, Q.W.; MA, C.; LIU, X.Y.; ZHANG, H.X. Magnetic fluorescent molecularly imprinted nanoparticles for detection and separation of transferrin in human serum. **Talanta**, v. 188, p. 540-545, 2018.

[141] MATYSIAK-BRYNDA, E.; BYSTRZEJEWSKI, M.; WIECKOWSKA, A.; GRUDZINSKI, I.P.; NOWICKA, A.M. Novel ultrasensitive immunosensor based on magnetic particles for direct detection of transferrin in blood. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 249, p. 105–113, 2017.

[142] HU, S.; WU, Z.; ZHOU, Y.; CAO, Z.; SHEN, G.; YU, R. Capacitive immunosensor for transferrin based on an o-aminobenzenthiol oligomer layer. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 297-304, 2002.

[143] ZENG, G.; YANG, P.; ZHENG, Z.; FENG, Q.; CAI, J.; ZHANG, S.; CHEN, Z.W. Nanostructures and molecular force bases of a highly sensitive capacitive immunosensor. **Proteomics**, v. 5, p. 4347-4353, 2005.

[144] YIN, T.; WEI, W.; YANG, L.; GAO, X.; GAO, Y. A novel capacitive immunosensor for transferrin detection based on ultrathin alumina sol–gel-derived films and gold nanoparticles. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 117, p. 286-294, 2006.

[145] CARRERA TORRES, A.; COBOS-FUENTES, M.J.; GALLARDO CASTILLO, I.; CABALLERO AGUILAR, J.; MARTÍNEZ-SAHUQUILLO MÁRQUEZ, A. Quimioluminiscencia como método de screening de cáncer oral. **Avances en Odontoestomatología**, v. 27, n. 6, p. 301-311, 2011.

[146] FERHAN, A.R.; JACKMAN, J.A.; PARK, J.H.; CHO, N.J.; KIM, D.H. Nanoplasmonic sensors for detecting circulating cancer biomarkers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 125, p. 48-77, 2018.

[147] ZHANG, Y.; GUO, S.; HUANG, H.; MAO, G.; JI, X.; HE, Z. Silicon nanodot-based aptasensor for fluorescence turn-on detection of mucin 1 and targeted cancer cell imaging. **Analytica Chimica Acta**, v. 1035, p. 154-160, 2018.

[148] RUIYI, L.; FANGCHAO, C.; HAIYAN, Z.; XIULAN, S.; ZAIJUN, L. Electrochemical sensor for detection of cancer cell based on folic acid and octadecylamine-functionalized

graphene aerogel microspheres. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 119, p. 156-162, 2018.

[149] PALLELA, R.; CHANDRA, P.; NOH, H.B.; SHIM, Y.B. An amperometric nanobiosensor using a biocompatible conjugate for early detection of metastatic cancer cells in biological fluid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 883-890, 2016.

[150] HASANZADEH, M.; BAGHBAN, H.N.; SHADJOU, N.; MOKHTARZADEH, A. Ultrasensitive electrochemical immunosensing of tumor suppressor protein p53 in unprocessed human plasma and cell lysates using a novel nanocomposite based on poly-cysteine/graphene quantum dots/gold nanoparticle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1348-1363, 2018.

[151] ZHU, Y.; CHANDRA, P.; SHIM, Y.B. Ultrasensitive and Selective Electrochemical Diagnosis of Breast Cancer Based on a Hydrazine−Au Nanoparticle−Aptamer Bioconjugate. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 1058-1064, 2013.

[152] HASANZADEH, M.; BAGHBAN, H.N.; MOKHTARZADEH, A.; SHADJOU, N.; MAHBOOB, S. An innovative immunosensor for detection of tumor suppressor protein p53 in unprocessed human plasma and cancer cell lysates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1337-1348, 2017.

[153] WU, Y.; XUE, P.; KANG, Y.; HUI, K.M. Highly Specific and Ultrasensitive Graphene-Enhanced Electrochemical Detection of Low-Abundance Tumor Cells Using

Silica Nanoparticles Coated with Antibody-Conjugated Quantum Dots. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 3166-3173, 2013.

[154] GUO, Q.; LI, X.; SHEN, C.; ZHANG, S.; QI, H.; LI, T.; YANG, M. Electrochemical immunoassay for the protein biomarker mucin 1 and for MCF-7 cancer cells based on signal enhancement by silver nanoclusters. **Microchimica Acta**, v. 182, p. 1483-1489, 2015.

[155] GENG, P.; FU, Y.; YANG, M.; SUN, Q.; LIU, K.; ZHANG, X.; XU, Z.; ZHANG, W. Amplified Electrochemical Immunosensor for Calmodulin Detection Based on Gold-Silver-Graphene Hybrid Nanomaterials and Enhanced Gold Nanorods Labels. **Electroanalysis**, v. 26, p. 2002-2009, 2014.

[156] HUSSAIN, K.K.; GURUDATT, N.G.; MIR, T.A.; SHIM, Y.B. Amperometric sensing of HIF1α expressed in cancer cells and the effect of hypoxic mimicking agents. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 83, p. 312-318, 2016.

[157] PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

[158] TALIB, N.A.A.; SALAM, F.; YUSOF, N.A.; AHMAD, S.A.A.; AZID, M.Z.; MIRAD, R.; SULAIMAN, Y. Enhancing a clenbuterol immunosensor based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/multi-walled carbon nanotube performance using response surface methodology. **RSC Advances**, v. 8, p. 15522-15532, 2018.

[159] FREITAS, M.; CORRER, W.; CANCINO-BERNARDI, J.; BARROSO, M. F.; DELERUE-MATOS, C.; ZUCOLOTTO, V. Impedimetric immunosensors for the detection of

Cry1Ab protein from genetically modified maize seeds. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, v. 237, p. 702-709, 2016.

[160] DANIELS, J.S.; POURMAND, N. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.

[161] BRAZACA, L.C.; BRAMORSKI, C.B.; CANCINO-BERNARDI, J.; CRUZ-MACHADO, S.S.; MARKUS, R.P.; JANEGITZ, B.C.; ZUCOLOTTO, V. An antibody-based platform for melatonin quantification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 94-100, 2018.

[162] GUIDELINE, ICH Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In: **International Conference on Harmonization**, Geneva, Switzerland. 2005. p. 11-12.

[163] SKOTTMAN, H.; MURANEN, J.; LÄHDEKORPI, H.; PAJULA, E.; MÄKELÄ, K.; KOIVUSALO, L.; KOISTINEN, A.; UUSITALO, H.; KAARNIRANTA, K.; UUSITALO, K. J. Contacting co-culture of human retinal microvascular endothelial cells alters barrier function of human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelial cells. **Experimental Cell Research**, v. 359, p. 101-111, 2017.

[164] SHAO, N.; WICKSTROM, E.; PANCHAPAKESAN, B. Nanotube–antibody biosensor arrays for the detection of circulating breast cancer cells. **Nanotechnology**, v. 19, p. n. 46, p. 465101-465112, 2008.

[165] KLEIN, T., WANG, W., YU, L., WU, K., BOYLAN, K.L., VOGEL, R.I., SKUBITZ, A.P.N.; WANG, J.P. Development of a multiplexed giant magnetoresistive biosensor array prototype to quantify ovarian cancer biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 301-307, 2019.

[166] KIM, D.J.; LEE, N.E.; PARK, J.S.; PARK, I.J.; KIM, J.G.; CHO, H.J. Organic electrochemical transistor based immunosensor for prostate specific antigen (PSA) detection using gold nanoparticles for signal amplification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2477-2482, 2010.

[167] DEVILLERS, M.; AHMAD, L.; KORRI-YOUSSOUFI, H.; SALMON, L. Carbohydrate-based electrochemical biosensor for detection of a cancer biomarker in human plasma. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 96, p. 178-185, 2017.

[168] XU, Z.; LIU, Q.; FINCH, J.A. Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: I. Direct silanation. **Applied Surface Science**, v. 120, p. 269-278, 1997.

[169] NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

[170] RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M. C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Validation spreadsheet: a new tool for estimating the analytical figures of merit for the validation of univariate methods. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

[171] AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Guideline for Standard Method Performance Requirements: Appendix F,** 2012.

[172] MiniTab. **Gráficos de resíduos para regressão não linear.** Disponível em:

< https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/regression/how-to/nonlinear-regression/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/residual-plots/#residuals-versus-order >. Acesso em: 17 abr. 2018.