UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL *CAMPUS* DE ARAPIRACA QUÍMICA - LICENCIATURA

FHYSMÉLIA FIRMINO DE ALBUQUERQUE

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL DE UM IMUNOSSENSOR NANOESTRUTURADO PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR DE CÂNCER P53.

> ARAPIRACA 2023

Fhysmélia Firmino de Albuquerque

Produção e caracterização superficial de um imunossensor nanoestruturado para detecção do biomarcador de câncer p53.

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Alagoas – Campus de Arapiraca, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thaissa Lúcio Silva.

Coorientador: Dr. Andrey Coatrini Soares.

Arapiraca 2023



Universidade Federal de Alagoas – UFAL Campus Arapiraca Biblioteca Setorial Campus Arapiraca - BSCA

ſ

A345p	Albuquerque, Fhysmélia Firmino de Produção e caracterização superficial de um imunossensor nanoestruturado para detecção do biomarcador de câncer p53 [recurso eletrônico] / Fhysmélia Firmino de Albuquerque. – Arapiraca, 2023.
	43 f.: il.
	Orientadora: Prof ª Dr ª Thaissa Lúcio Silva
	Coorientador: Dr. Andrey Coatrini Soares
	Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Universidade Federal
	de Alagoas, Campus Arapiraca, Arapiraca, 2023.
	Disponível em: Universidade Digital (UD) / RD- BSCA– UFAL (<i>Campus</i> Arapiraca). Referências: f. 38-43.
	 Imunossensores. 2. Quitosana. 3. Sulfato de condroitina. 4. Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE). 5. Programa Aristides Pacheco Leão (PAPL). I. Silva,
	Thaissa Lúcio. II. Soares, Andrey Coatrini. III. Título.
	CDU 54

Bibliotecário responsável: Nestor Antonio Alves Junior CRB-4 / 1557 Fhysmélia Firmino de Albuquerque

Produção e caracterização superficial de um imunossensor nanoestruturado para detecção do biomarcador de câncer p53.

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal de Alagoas – Campus de Arapiraca, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciada em Química.

Data de aprovação: 04/08/2023.

Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Thaissa Lucio Silva Universidade Federal de Alagoas – UFAL *Campus* de Arapiraca (Orientadora)



Documento assinado digitalmente VINICIUS DEL COLLE Data: 18/09/2023 00:53:23-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Vinicius Del Colle Universidade Federal de Alagoas – UFAL *Campus* de Arapiraca (Examinador)



Documento assinado digitalmente JOAO PAULO TENORIO DA SILVA SANTOS Data: 17/09/2023 17:45:56-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr. João Paulo Tenório da Silva Santos Universidade Federal de Alagoas – UFAL *Campus* de Arapiraca (Examinador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À minha família, em especial, minha mãe, Cícera e aos meus irmãos, Fhysmayck, Fhyslauren, Fhyslane e Maria Clara por serem a melhor companhia que eu poderia ter desde os anos 2000. Deus foi generoso quando me presenteou com vocês;

À minha orientadora, Thaissa, por ser uma referência de profissional e pessoa. Agradeço por sempre ter me tratado com respeito e carinho, me escutado com atenção e pela disposição em me ajudar. Sou muito grata ao que construímos e vamos construir nesse processo;

Ao Prof. Vinicius, por ser um grande conselheiro científico. Obrigada por estar sempre disponível para resolver nossos problemas, por me ensinar físicoquímica e usar uma furadeira.

Aos meus professores, em especial, lara, Israel, e Wilmo por todas as palavras de incentivo e conforto quando precisei e por acreditarem no meu potencial; menção honrosa a Adeildo e João Paulo, por me salvarem de cometer algumas "gafes científicas" no laboratório;

À Dany Cândido, por ter sido paciente em me ensinar a trabalhar com a eletroquímica;

À turma de 2018.2 de Licenciatura em Química da Ufal/Arapiraca, em especial, Abigail, Dhensfa, Ires, Mayra, Matheus, Miguel, Rikellen, Roger e Taline por serem como uma segunda família ao longo desses anos. Compartilhamos risos, lágrimas, sucessos e fracassos, mas, acima de tudo, compartilhamos o apoio e sobremesas após o almoço no RU;

Ao Programa de Educação Tutorial – PET Química (2019 – 2023) pelo incentivo ao desenvolvimento da minha autonomia, pelo afeto dos petianos e pelos chás de tarde;

Ao Chu por ter me recebido em seu laboratório e ao Andrey por gentilmente ter me acompanhado durante o estágio no IFSC/USP. Sou muito grata a ambos pelos momentos de discussão essenciais para a produção desta monografia; À Debora e Rosângela, pela ajuda com a formalização do estágio.

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica;

À FAPESP pela bolsa de estímulo a vocação científica;

A todos aqueles que, mesmo não estando diretamente envolvidos no desenvolvimento deste trabalho, me apoiaram de alguma forma, seja com palavras de encorajamento ou nos encontros para brindar à vida e às conquistas.

Que cada garrafa aberta seja um brinde a todos vocês, pois cada um desempenhou um papel importante na realização desta monografia. Que a amizade, a alegria e a gratidão estejam sempre presentes em nossas vidas.

Não digo que os dias de universidade não tenham me ensinado alguma filosofia, mas só decorei as fórmulas, o vocabulário, o esqueleto. Durante a noite é que aprendi as coisas sobre a alma, os versos e as carnes.

(André Klotzel).

RESUMO

A presente pesquisa foi proporcionada pela participação no Programa Aristides Pacheco Leão de estímulo às vocações científicas e patrocinado pela FAPESP em acordo com a ABC. Neste estudo, filmes nanoestruturados de quitosana/sulfato de condroitina com uma camada ativa de anticorpo foram elaborados para aplicação em imunossensores para detecção do biomarcador p53. Os filmes foram produzidos pela técnica *layer-by-layer* e diferentes arquiteturas, com uma, três e cinco bicamadas de quitosana/sulfato de condroitina foram testadas. Para avaliar os limites de detecção dos sensores, curvas de calibração foram elaboradas a partir de espectros de capacitância construídos na região de 1 a 10⁶ Hz. Além disso, foi importante caracterizar a superfície dos filmes com o objetivo de avaliar o tipo de interação existente entre sensor e analito e, para isto, espectros de PM-IRRAS foram construídos. Os resultados indicaram que os biossensores produzidos, além de econômicos e não invasivos, são sensíveis e seletivos.

Palavras-chave: imunossensores; quitosana; sulfato de condroitina; p53; espectroscopia de impedância elétrica; Programa Aristides Pacheco Leão (PAPL).

ABSTRACT

The present research was provided by participation in the Aristides Pacheco Leão Program for the stimulation of scientific vocations and sponsored by FAPESP in agreement with ABC. In this study, nanostructured films of chitosan/chondroitin sulfate with an active layer of antibody were developed for application in immunosensors for the detection of the biomarker p53. The films were produced using the layer-by-layer technique, and different architectures with one, three, and five bilayers of chitosan/chondroitin sulfate were tested. To evaluate the sensor's detection limits, calibration curves were elaborated based on capacitance spectra constructed in the range of 1 to 10⁶ Hz. Additionally, it was important to characterize the surface of the films to assess the type of interaction between sensor and analyte, for which PM-IRRAS spectra were constructed. The results indicated that the produced biosensors, in addition to being cost-effective and non-invasive, are sensitive and selective.

Keywords: biosensors; chitosan; chondroitin sulfate; p53; electrical impedance spectroscopy; Aristides Pacheco Leão Program (APLP).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama para o princípio dos biossensores13
Figura 2 - Representação estrutural da quitosana15
Figura 3 - Unidades dissacarídicas típicas encontradas no sulfato de condroitina16
Figura 4 - Princípio da automontagem de filmes segundo a técnica LbL18
Figura 5 - Frequência de mutação (%) do p53 em diferentes tumores20
Figura 6 – Modelo para um eletrodo interdigitado25
Figura 7 – Esquema de reação elementar para ativação de grupos carboxila26
Figura 8 – Espectros de capacitância para os biossensores com 1, 3 e 5 bicamadas
de quitosana/sulfato de condroitina para detecção de células da linhagem MCF-7,
nas concentrações de 0, 0,01, 0,03, 0,1, 1,0, 5,0, 10,0, 50,0, 100,0, e 1000,0 U $_{\mbox{\tiny cel}}/\mbox{mL}$
e células da linhagem CACO2. Estas linhagens foram selecionadas pelo Hospital de
Amor da cidade de Barretos, pois são células que expressam a proteína p53 em
pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço28
Figura 9 – Curvas de calibração da capacitância em função da concentração em
2,15 Hz (linha preta) e 1,0 Hz (linha vermelha)30
Figura 10 – Espectros de PM-IRRAS normalizados dos biossensores construídos. A
linha de base foi tomada como o espectro das arquiteturas, nas quais uma camada
de anticorpo p53 foi imobilizada. Estudo realizado nas concentrações de 0, 50, 100 e
1000 U _{cel} /mL33

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	DeoxyriboNucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)				
SC	Sulfato de condroitina				
LbL	Layer-by-Layer (camada por camada)				
ABC	Academia Brasileira de Ciências				
PAPL	Proprama Aristides Pacheco Leão				
EDC	1-etil-3-(3–dimetilaminopropil) carbodiimida				
NHS	N-hidroxissuccinimida				
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com				
	Fosfato)				
EIE	Espectroscopia de Impedância Elétrica				
PM-IRRAS	Polarization modulation-infrared				
	reflection-adsorption spectroscopy (Espectroscopia de Reflexão-				
	Absorção na Região do Infravermelho com Modulação da				
	Polarização)				
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay				
	(Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)				

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	Dos biossensores	13
2.2	Dos filmes nanoestruturados	14
2.2.1	Da quitosana	14
2.2.2	Do sulfato de condroitina	16
2.2.3	Dos nanofilmes automontados por adsorção física	17
2.3	Do biomarcador p53	19
2.4	Do Programa Aristides Pacheco Leão de Estímulo a Vocações Científica	S
		20
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Dos reagentes e soluções	23
4.3	Da fabricação dos imunossensores	23
4.4	Das técnicas utilizadas na detecção e caracterização	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.2	Do desenvolvimento das arquiteturas	25
5.3	Do limite de detecção: avaliação da sensibilidade do método	27
5.4	Da caracterização das arquiteturas	33
6	CONCLUSÃO	36
7	PERSPECTIVAS	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A transformação é uma característica marcante da Química. Dessa forma, conhecer a matéria e energia, historicamente, foi e é um modo de transformar a vida dos sujeitos. De alambiques, passando pelas bombas de vácuo e tubos de raios catódicos aos espectrofotômetros a Química se relaciona intimamente com o que Hannah Arendt chamou de trabalho¹ em A Condição Humana (ARENDT, 2007).

Nessa perspectiva, o conhecimento científico contribui para a transformação do mundo natural, mas, de fato, as relações sociais ditam como, quando, o quê, quando, porquê e para quem as novas tecnologias são empregadas (SANTOS, 2018). Seja para produção de vacinas ou de armas, a Ciência está a serviço de uma parte da sociedade e um dos grandes desafios políticos da atualidade é democratizar o acesso à ciência e suas produções.

De fato, o modo de vida contemporâneo tem colaborado com o desenvolvimento de doenças que demandam por métodos analíticos que possam agir no prognóstico, diagnóstico e monitoramento de patologias. Dessa forma, novos dispositivos têm sido construídos para analises cada vez mais rápidas e sensíveis, não invasivas ou destrutivas (VERDOODT *et al.*, 2017, DHULL *et al.*, 2019) para contribuir com a melhoria de vida dos sujeitos.

Nesse cenário, os filmes nanoestruturados têm apresentado potencial para o aprimoramento de sensores no que tange seu tempo de resposta e número de etapas (SANTOS *et al.*, 2022), sua seletividade e sensibilidade (LIU *et al.*, 2021) e também para conferir um maior controle das propriedades físico-químicas do sensor (PICCOLI *et al.*, 2021).

Pensando nas contribuições do biossensoriamento para a sociedade, neste trabalho, será discutido o desenvolvimento de arquiteturas nanoestruturadas para produção de um biossensor de baixo custo empregado na detecção do antígeno p53, um biomarcador² importante para identificação de alguns tipos de câncer, doença que ainda apresenta altas taxas de incidência e mortalidade entre a população.

¹ Nesse contexto, 'Trabalho' é definido por Arendt como "a atividade correspondente ao artificialismo da existência humana". Prosseguindo, a alemã sustenta que o trabalho "produz um mundo *artificial* de coisas, nitidamente diferente de qualquer ambiente natural" (ARENDT, 2007, p. 15).

² Utilizando uma definição objetiva, biomarcador pode ser entendido como "características quantificáveis de processos biológicos" (STRIMBU; TAVEL, 2010, p. 464).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dos biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que combinam elementos biológicos, como proteínas, DNA e enzimas com elementos de transdução, como eletrodos, para detectar e quantificar a presença de substâncias alvo em amostras biológicas (NARESH; LEE, 2021). Esses dispositivos têm desempenhado um papel cada vez mais importante em diversas áreas, como medicina, meio ambiente, segurança alimentar e indústria farmacêutica, devido à sua capacidade de fornecer informações rápidas, sensíveis e específicas sobre diferentes componentes biológicos (HATTA *et al.*, 2023; JAYAN; PU; SUN, 2020; PAQUIM; BRETT, 2021).

A base fundamental de um biossensor reside na interação seletiva entre o componente biológico, também conhecido como elemento de reconhecimento, e a substância alvo presente na amostra. Essa interação desencadeia uma resposta físico-química que é convertida em um sinal mensurável por um equipamento, geralmente uma mudança de corrente elétrica, voltagem, impedância, fluorescência ou absorção de luz. Essa resposta é proporcional à concentração da substância alvo, permitindo a detecção e quantificação (SHARMA, 2023).



Figura 1 - Diagrama para o princípio dos biossensores.

Fonte: A autora (2023). Adaptado de Srivastava et al. (2015).

Existem diferentes tipos de biossensores, dependendo do tipo de elemento de reconhecimento utilizado. Os biossensores podem ser baseados, por exemplo, em anticorpos (NANGARE; PATIL, 2023), ácidos nucleicos (PAQUIM; BRETT, 2021) e enzimas (YUAN *et al.*, 2023). Além disso, o transdutor utilizado pode variar de

acordo com a aplicação, podendo ser eletroquímico, óptico ou piezoelétrico (FEIZIAZAR *et al.*, 2022).

2.2 Dos filmes nanoestruturados

A modificação de sensores é uma abordagem promissora para aprimorar suas características de detecção, tal como sensibilidade e seletividade, quando comparado ao sensor sem modificações (IBRAHIM; ISSA; ABU-SHAWISH, 2007; REN; MURA; IRUDAYARAJ; 2015; KANOUN *et al.*; 2021). Neste trabalho, exploramos a utilização dos polímeros naturais quitosana e sulfato de condroitina como agentes modificadores da superfície de um eletrodo interdigitado de ouro. Esses polímeros apresentam propriedades que podem ser exploradas para melhorar a sensibilidade, seletividade e estabilidade do dispositivo, o que nos propomos a discutir nos próximos itens.

2.2.1 Da quitosana

A quitosana é amplamente utilizada na modificação de imunossensores³. Provavelmente, a aceitação no campo científico em relação ao uso da quitosana no biossensoriamento se dá por seu baixo custo associado à sua excelente biocompatibilidade e capacidade de formação de filmes, além de oferecer uma boa adesão ao substrato (DIREKSILP *et al.*, 2023; YU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022).

Também é relatado que a quitosana possui características de biodegradabilidade, propriedades antimicrobianas e antifúngicas (KIM *et al.*, 2001). Este policátion é produzido a partir da desacetilação da quitina e é composta por unidades de glicosamina e *N*-acetilglicosamina (figura 2). Segundo Zouaoui (2020), para que o polímero seja considerado quitosana, é preciso que seu grau de desacetilação seja maior que 60%, caso contrário, ainda será considerado quitina.

A incorporação da quitosana em imunossensores busca melhorar a imobilização de componentes biológicos, tais como anticorpos, na superfície do sensor. Dessa forma pode ser aplicada como revestimento ou matriz para a construção de arquiteturas moleculares para imobilização de biomoléculas nos sensores em questão.

³ Imunossensor é aquele tipo de biossensor em que a camada ativa é composta pela imobilização de antígenos ou anticorpos na superfície transdutora do sensor e que baseia sua detecção na interação de reconhecimento antígeno-anticorpo (LEVA-BUENO; PEYMAN; MILLNER, 2020).



Figura 2 - Representação estrutural da quitosana.

Fonte: A autora (2023). Adaptado de Laranjeira e Fávere (2009).

Uma vantagem significativa da quitosana em imunossensores é a sua capacidade de interagir com diversas moléculas, estabelecendo ligações eletrostáticas e interações hidrofóbicas que permite um planejamento para imobilização seletiva de anticorpos específicos de acordo com o biomarcador desejado, favorecendo a sensibilidade e seletividade da detecção (ZOUAOUI *et al.*, 2020).

Segundo Laranjeira e Fávere (2009), a alta hidrofilicidade da quitosana se dá devido a numerosa presença de grupos hidroxila, que favorecem a formação de ligações de hidrogênio, no entanto, tal solubilidade só é favorecida em meio levemente ácido, quando os grupos amino livres encontram-se protonados. De acordo com Fernandes (2009), "quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a solvatação em água".

Adicionalmente, os pesquisadores apontam que a versatilidade deste biopolímero no campo das modificações de sensores se dá pela "presença de uma alta porcentagem de grupos amino reativos distribuídos na matriz polimérica" (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009, p. 672). A reatividade desses grupos pode ser justificada pela presença de pares eletrônicos desemparelhados no átomo de nitrogênio que podem ser transferidos ou compartilhados durante a interação com outras partículas. Além disso, a hibridização sp³ do átomo de N nesse grupo confere 25% de caráter s ao orbital hibridizado e, logo, uma maior energia e menor estabilidade (SOLOMONS, 2001)

Além disso, a quitosana possui capacidade de ancorar biomoléculas de forma estável, protegendo-as contra a degradação e mantendo sua atividade biológica por um período prolongado (KATAS *et al.*, 2019). Esse aspecto é particularmente

relevante em aplicações clínicas, onde a estabilidade do imunossensor é crucial para uma detecção precisa e confiável dos biomarcadores.

Vale ainda destacar a versatilidade do processo de funcionalização deste composto. Graças a presença de grupos reativos, como os grupos amino e carboxílicos, é possível realizar uma derivação da quitosana que beneficia cada tipo de aplicação (SUGINTA; KHUNKAEWLA; SCHULTE, 2013).

Somado a esses aspectos, é importante ressaltar a disponibilidade e o baixo custo da quitosana. O material, derivado de exoesqueleto de crustáceos, está amplamente disponível no mercado e seu custo é relativamente baixo em comparação com outros polímeros utilizados em imunossensores. Essa característica torna a quitosana uma opção viável e econômica para a fabricação em larga escala de imunossensores, ampliando sua aplicabilidade em diferentes setores, incluindo saúde, indústria alimentícia e meio ambiente (KOU; PETERS; MUCALO, 2021).

Esses parâmetros analíticos também podem ser otimizados na construção de um dispositivo mais robusto ao conjugar a quitosana com outros polímeros, tal como o sulfato de condroitina, objeto de investigação do próximo item.

2.2.2. Do sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina (SC) é um polissacarídeo sulfatado encontrado naturalmente em tecidos conectivos de animais, como cartilagem, pele, tendões e ossos, sendo um componente essencial da matriz extracelular que fornece resistência, elasticidade e lubrificação aos tecidos. Esse composto é formado por unidades repetitivas de ácido urônico e N-acetil-hexosamina (figura 3).

Figura 3 - Unidades dissacarídicas típicas encontradas no sulfato de condroitina.



Fonte: A autora (2023). Adaptado de Mikami; Kitagawa (2013).

Ao utilizar a quitosana e o sulfato de condroitina em conjunto, numa matriz nanoestruturada, é possível obter um sistema mais robusto e resistente a fatores que poderiam comprometer a funcionalidade do imunossensor. De fato, esses biopolímeros causam impacto nas propriedades físico-químicas da matriz, tal como a "molhabilidade, grau de reticulação, degradação enzimática e propriedades mecânicas" (KLARA *et al.*, 2022). Dessa forma, é relatado que a combinação desses dois biopolímeros pode promover uma maior estabilidade, sensibilidade e seletividade do sistema (CHEN *et al.*, 2005).

Uma característica relevante deste glicosaminoglicano, para a produção de filmes nanoestruturados, é a presença de grupamentos carboxílicos e sulfitos que conferem carga negativa ao SC e permite a ligação e a imobilização eficiente de partículas carregadas positivamente, como a quitosana e alguns anticorpos. Dessa forma, a produção de biossensores segundo a técnica de automontagem eletrostática camada por camada (em inglês, *Layer-by-Layer*, LbL) é uma opção versátil e que oferece um bom desempenho analítico podendo ser realizada até mesmo com microlitros de soluções, o que otimiza o processo e diminui a quantidade de reagentes utilizados (JO *et al.*, 2016; ERKMEN *et al.*, 2022).

2.2.3 Dos nanofilmes automontados por adsorção física

A imobilização é uma etapa crucial no preparo de qualquer biossensor, o objetivo desta etapa é garantir, ou ao menos favorecer, que as biomoléculas estejam ligadas à superfície do eletrodo ou matriz de forma estável (ERKMEN *et al.*, 2022). Nesse sentido, as bases teórico-práticas da técnica de construção de filmes automontados por adsorção física, uma das mais utilizadas no biosensoriamento, datam da década de 1960 quando Joseph Jack Kirkland e colaboradores investigaram a "formação de multicamadas por deposição alternativa de colóides com carga positiva e negativas por adsorção da solução" (TORRES, 2021, p. 23).

A técnica de LbL é simples e de baixo custo, não necessitando de aparelhagem específica para ser realizada; nela, as interações eletrostáticas entre espécies de cargas elétricas opostas motivam a adsorção de biomoléculas num substrato sólido. Os filmes são então formados a partir da deposição alternada de camadas de compostos catiônicos e aniônicos (ARIGA *et al.*, 2019).

Normalmente, a deposição é realizada pela imersão vertical do substrato na solução do composto, seguido pela lavagem e secagem para remoção das partículas fracamente adsorvidas (ZHANG; CHEN; ZHANG, 2007; RICHARDSON *et al.*, 2016). Esse procedimento pode ser repetido diversas vezes, até atingir o número pretendido de camadas.

Como alternativa, ao invés de mergulhar o substrato em soluções das biomoléculas, uma alíquota destas podem ser pipetadas manualmente sobre a superfície de trabalho do eletrodo. Isso reduz os custos com o uso de materiais, tanto quanto a produção de resíduos no laboratório. Um esquema para esse processo é representado na figura 4.

Figura 4 - Princípio da automontagem de filmes segundo a técnica LbL.



Fonte: A autora (2023).

Apesar de ser um processo versátil e barato, o tempo para produção de filmes segundo a técnica LbL pode ser bastante demorado devido ao tempo de interação necessário entre substrato e biomolécula para favorecer sua adsorção. Segundo Erkmen *et al.* (2022), esse tempo de espera é relativo e depende da taxa de

adsorção líquida do substrato em questão. Em contrapartida, já existem inovações tecnológicas que permitem diminuir o tempo de produção de filmes LbL, utilizando, por exemplo, *spin-coating* (revestimento por rotação), um processo automatizado que usa da força centrífuga para formar filmes finos, homogêneos e num curto período de tempo (ARIGA *et al.*, 2019).

De fato, uma série de materiais podem ser utilizados como substrato para montagem de uma arquitetura nanoestruturada seguindo os preceitos da LbL por pipetagem. Aqui, investigaremos a modificação de eletrodos interdigitados de ouro.

2.3 Do biomarcador p53

O p53 foi identificado pela primeira vez em 1979 como uma proteína de 53.000 daltons⁴. A proteína p53 é um fator de transcrição, ou seja, ela se liga ao DNA e regula a expressão de outros genes. Ela atua como um regulador chave do ciclo celular, o que significa que desempenha um papel crítico no controle do crescimento celular, na reparação do DNA e na prevenção de mutações genéticas. Alguns mecanismos de defesa estão relacionados a ação da p53 no organismo como interrupção do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (LANE; CRAWFORD, 1979; ZHAO; SANYAL, 2022).

A presença da mutação do p53 é praticamente universal para casos de câncer humano (GOH; COFFILL; LANE, 2011). Por isso, a concentração deste biomarcador pode ser monitorada para avaliar o desenvolvimento de neoplasias. A frequência de mutações p53 em diferentes tumores humanos está exposta na figura 5.

Sendo assim, considerando a alta incidência de casos de doenças crônicas e neurodegenerativas entre a população e considerando sua possível relação com o índice de desenvolvimento humano (MANSUR; BARROSO, 2023) é imprescindível que existam meios para monitorar e detectar essas condições. É nesse sentido que o desenvolvimento de biossensores, tal como o apresentado neste trabalho, seja alvo das pesquisas brasileiras.

⁴ O dalton (Da) é uma unidade de medida usada para expressar a massa molecular de moléculas biológicas, como proteínas.



Figura 5 - Frequência de mutação (%) do p53 em diferentes tumores.

2.4 Do Programa Aristides Pacheco Leão de Estímulo a Vocações Científicas

Em 1994, o Programa de Estímulo a Vocações Científicas da Academia Brasileira de Ciências (ABC) recebeu o nome do neurofisiologista Aristides Azevedo Pacheco Leão (1914-1993) em homenagem às suas contribuições ao progresso e desenvolvimento da Ciência e Tecnologia brasileira (Velloso; Gitirana, 2001). Com o objetivo de fomentar o desenvolvimento de estudantes vocacionados ao trabalho científico, o Programa Aristides Pacheco Leão (PAPL) ocorreu de forma ininterrupta por dez anos (1094-2004), mas foi interrompido entre 2005 e 2014. Reeditado em 2015, o programa passou por outra pausa em 2019 por falta de apoio financeiro. Em 2022, o PAPL volta às suas atividades com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo em acordo com a ABC.

O desenvolvimento desta pesquisa se deu como resultado da participação da autora no PAPL, no verão de 2023, num estágio de 50 dias que possibilitou aprender os procedimentos para fabricação de biossensores e de seu uso na detecção de um biomarcador de câncer. O trabalho se deu sob orientação do Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Júnior, membro da ABC e acompanhamento do pós-doutorando Andrey Coatrini Soares.

A existência de ambientes de intercâmbio intelectual, como os proporcionados pelo PAPL, é essencial na construção do conhecimento científico, ampliando significativamente as possibilidades de atuação na Ciência e Tecnologia. Além disso,

Fonte: A autora (2023). Adaptado de Lutz e Nowakowska-Świrta (2002).

as redes de contato formadas entre as Instituições de Ensino reiteram o caráter colaborativo e social da Ciência. Desta forma, é importante que tais programas de intercâmbio sejam oferecidos periodicamente, visto que eles têm o poder de transformar a visão de mundo de jovens potencialmente pesquisadores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar superficialmente um imunossensor nanoestruturado baseado na detecção do biomarcador de câncer p53.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver arquiteturas de quitosana/sulfato de condroitina/proteína em eletrodos interdigitados de ouro para produção de um imunossensor.
- Ativar os grupos carboxílicos terminais das matrizes utilizando NHS/EDC.
- Avaliar o limite de detecção dos imunossensores.
- Caracterização das arquiteturas à base de quitosana/sulfato de condroitina/proteína utilizando espectroscopia PM-IRRAS.

4 METODOLOGIA

4.1 Dos reagentes e soluções

Para produção dos imunossensores, as seguintes soluções foram preparadas: solução tamponada de quitosana em tampão acetato (pH 4.5, massa molecular de 87,000 g/mol, Golden-Shell Biochemical, China) a 1 mg/mL; solução aquosa de sulfato de condroitina (massa molecular de 22,000 g/mol, Solabia, Brasil) a 1 mg/mL; solução aquosa de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (massa molecular de 155,24 g/mol, Sigma-Aldrich, USA) a 0,1 mol/L; solução aquosa de N-hidroxisuccinimida (NHS) (massa molecular de 115,06 g/mol, Sigma-Aldrich, USA) a 0,1 mol/L; solução tamponada diluída 1:200 em tampão PBS pH 7,4 do anticorpo anti-p53 (Dako, 53 kDa, Clone DO-7, pronto para uso) e diluições a partir da solução do antígeno p53 presente em linhagem de células MCF-7.

4.3 Da fabricação dos imunossensores

Os filmes nanoestruturados foram desenvolvidos usando uma técnica LbL sobre eletrodos interdigitados de ouro. Inicialmente, 20 µL da solução de quitosana foram depositados sobre o eletrodo por um período de 10 minutos. Em seguida, a lavagem em água ultra pura foi realizada para remover as partículas fracamente adsorvidas.

A segunda camada do nanofilme foi composta pela deposição de 20 µL da solução de sulfato de condroitina, imobilizado da mesma maneira descrita anteriormente. Dessa forma, uma bicamada foi construída. Foram preparados filmes com diferentes números de bicamadas, sendo testados três diferentes configurações: 1 bicamada, 3 bicamadas e 5 bicamadas.

É importante manter a ordem de deposição entre quitosana/sulfato de condroitina durante a formação dos filmes pois é necessário que, para a próxima etapa, existam grupos carboxílicos disponíveis para ativação.

Após a formação das bicamadas, os grupos ácido carboxílicos presentes no sulfato de condroitina foram ativados, durante 30 minutos, usando uma combinação de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) na proporção de 1:1. Da mesma forma, 20 µL da solução foram depositados sobre o eletrodo. Nesse momento, a lavagem também foi necessária.

Por fim, a camada ativa do biossensor, composta por anticorpos anti-p53, foi imobilizada sobre os filmes nanoestruturados usando a técnica de automontagem por adsorção física. Essa técnica envolveu a deposição de 20 μ L da solução contendo os anticorpos anti-p53 sobre os eletrodos por um período de 40 minutos. Na detecção, foram testadas diferentes concentrações do antígeno p53 (0; 0,01; 0,03; 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 e 1000,0 U_{células}/mL) bem como a análise de falsos positivos com células do tipo CACO-2.

4.4 Das técnicas utilizadas na detecção e caracterização

As medidas para detecção do biomarcador p53 foram realizadas por meio da Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) com suporte de um analisador de impedância Solartron modelo SI 1260 A, na faixa de frequência de 1 a 10⁶ Hz. Uma tensão de 50 mV foi aplicada aos sensores (avaliada previamente em trabalhos anteriores do Grupo de Polímeros do IFSC-USP).

A EIE, foi reportada pela primeira vez na literatura por Walther Nernst (1864-1941), com ampla abrangência de aplicação na química analítica. Tal técnica vem sendo largamente relatada na pesquisa sobre diagnósticos (172) e monitoramento (147) de diversas doenças, dentre elas câncer, diabetes, dengue, COVID-19, dentre outras. (Resultados da pesquisa com os indexadores "electrical impedance spectroscopy", "cancer", "diagnosis" e "monitoring" no dia 25/01/2023 na base de dados Web of Science). A aceitação dessa técnica no corpo científico pode ser explicada, principalmente, por ser uma técnica não invasiva (BERA, 2014; ZAKRIA *et al.*, 2022) e de rápido resultado, o que pode otimizar as análises.

Por outro lado, as medidas para caracterização da interação superficial dos biossensores produzidos foram realizadas com aporte de um espectrofotômetro capaz de realizar Espectroscopia no Infravermelho com Modulação de Polarização (em inglês, Polarization modulation-infrared reflection-adsorption spectroscopy - PM-IRRAS). Esta técnica permite avaliar mecanismos de adsorção/detecção a partir de mudanças de orientação molecular dos dipolos após interação específica entre os pares anticorpos-antigenos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2 Do desenvolvimento das arquiteturas

Os eletrodos interdigitados são dispositivos capacitivos (BROSEL-OLIU *et al.*, 2019) formados a partir de trilhas de um material metálico fixadas num substrato e ordenadas de forma a produzir capacitores em série que permitam a análise do acúmulo de cargas elétricas. Ao passo que uma tensão é aplicada aos eletrodos, um campo elétrico é formado entre os dígitos. A largura, espessura e distância entre os dígitos são parâmetros importantes que interferem na resposta elétrica, pois quanto mais reduzido for o espaçamento entre esses dígitos, maior a área capacitiva do eletrodo, o que pode ser uma característica positiva para aplicações clínicas. Neste trabalho, eletrodos interdigitados de ouro são compostos por 50 pares de interdígitos, com distância de 10µm entre os dígitos. A figura 6 ilustra um modelo genérico destes eletrodos.

Nesta pesquisa, os eletrodos interdigitados de ouro são especialmente úteis por permitirem medições em escala micro ou nano, onde a miniaturização é essencial para obter informações mais precisas (LIU *et al.*, 2022).



Figura 6 – Modelo para um eletrodo interdigitado.

No caso deste trabalho, biossensores elétricos baseados na interação anticorpos-antígenos foram produzidos a partir de filmes finos de quitosana/sulfato

Fonte: A autora (2023).

de condroitina depositados sobre a superfície de eletrodos interdigitados de ouro. A partir da matriz acima, a imobilização da proteína anti-p53 foi favorecida através da ativação dos grupos carboxílicos terminais do SC com N-hidroxisuccinimida (NHS)/1etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), para formação de um éster instável e, enfim, favorecer a formação de ligações amida entre o SC e o anticorpo. Um esquema para este processo pode ser visto na figura 7.

Figura 7 – Esquema de reação elementar para ativação de grupos carboxila.



Fonte: A autora (2023). Adaptado de Foguel (2011); Soares (2016).

5.3 Do limite de detecção: avaliação da sensibilidade do método

Parâmetros analíticos dos biossensores, tais como a seletividade e sensibilidade, foram otimizadas a partir da construção de diferentes números de bicamadas de quitosana/sulfato de condroitina sobre os eletrodos, já que o filme nanoestruturado pode auxiliar na manutenção da atividade da camada ativa e, consequentemente na interação entre o anticorpo-antígeno (WU *et al.*, 2016). Desta forma, o objetivo deste tipo de modificação superficial é atingir a sinergia entre os materiais, permitindo obter dispositivos altamente sensíveis e seletivos que detectem rastros do analito de interesse em diferentes tipos de amostras, dentre elas sangue, saliva, urina e outras (SHARMA; SWETHA; ROY, 2019).

Neste trabalho, três tipos de arquitetura foram produzidos com quitosana/sulfato de condroitina com o intuito de avaliar qual ofereceria um melhor limite de detecção. Para isso, espectros de capacitância (Figura 8) foram construídos na faixa de frequência de 10⁶ - 1 Hz.

A análise dessas curvas indica a interação entre o anticorpo imobilizado sobre o filme e o antígeno p53 contido nas amostras, pois, ao passo que o imunossensor age como um capacitor, é possível interpretar o aumento da capacitância em regiões de média e baixa frequência (abaixo de 10⁴ Hz) como o acúmulo de cargas nos sensores, ou seja, a adsorção do antígeno presente nas células testadas.

Este fenômeno era esperado pois a resposta elétrica, nessa faixa de frequência, é dominada por efeitos da "dupla camada elétrica" (SOARES *et al.*, 2020; BONDANCIA *et al.*, 2022).

Esta região do espectro de impedância, de baixa e média frequência, representa a resposta de interação de interface entre imunossensor e solução onde ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo (QURESHI *et al.*, 2010; TICIANELLI, 1998) ao passo que uma fonte externa controla a diferença de potencial do sistema.

Figura 8 – Espectros de capacitância para os biossensores com 1, 3 e 5 bicamadas de quitosana/sulfato de condroitina para detecção de células da linhagem MCF-7, nas concentrações de 0, 0,01, 0,03, 0,1, 1,0, 5,0, 10,0, 50,0, 100,0, e 1000,0 U_{cel}/mL e células da linhagem CACO2. Estas linhagens foram selecionadas pelo Hospital de Amor da cidade de Barretos, pois são células que expressam a proteína p53 em pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço.

(continua)



(conclusão)



Fonte: A autora (2023).

Além da detecção, a espectroscopia de impedância elétrica permite a construção de curvas de calibração a partir dos espectros de capacitância. Com estes dados, os parâmetros analíticos dos imunossensores podem ser extraídos, dentre eles o limite de detecção dos sensores. Este parâmetro foi calculado a partir do método da IUPAC (equação 1) na qual SD é o desvio padrão das curvas 0 U/ml.

$$LoD=3 \times SD(1)$$

O método acima obtém o par ordenado (concentração; capacitância) nos espectros da figura 9. Os valores de capacitância do LoD (Sinal-LoD) foram obtidos a partir da equação 2 abaixo, na qual S₀ é o valor de capacitância nos pontos 0 U/mL de cada frequência. Com os valores de capacitância, o limite de detecção foi obtido pela leitura da concentração de p53 nos espectros da figura 9

$$Sinal_{LoD} = S_0 + 3 \times SD(2)$$

Figura 9 – Curvas de calibração da capacitância em função da concentração em 2,15 Hz (linha preta) e 1,0 Hz (linha vermelha).

(continua)





(conclusão)



Fonte: A autora (2023).

Para construção das curvas de calibração, duas regiões do espectro de capacitância foram consideradas (1,0 e 2,15 Hz). Essa região foi definida após estudos dos espectros pela técnica de coordenadas paralelas é possível apontar a capacidade mais destacada dos biossensores em termos de discernimento, levando em consideração o valor do coeficiente de silhueta S. Mais informações sobre essa técnica de visualização de informação podem ser acessadas em Paulovich *et al.* (2011).

Observa-se que a mudança do número de bicamadas influencia diretamente nos parâmetros analíticos dos sensores, obtendo-se a melhor otimização nos biossensores produzidos com uma bicamada.

Tal comportamento pode ocorrer devido ao aumento da deposição de material sobre os eletrodos, influenciando no acúmulo de carga nos capacitores. De fato, tanto a quitosana quanto o sulfato de condroitina são materiais isolantes, o que pode ter levado os filmes com menor número de bicamadas a terem melhor condutividade elétrica, e consequentemente melhor performance analítica.

		u	e controluna			
Bicamadas	Frequência (Hz)	SD	3xSD	S ₀	S ₀ + 3xSD	LoD
Dicamauas						(U _{cel} /mL)
1	2,15	8,68E-09	2,60E-08	1,18E-08	3,79E-08	0,0013
	1	1,06E-08	3,19E-08	1,72E-08	4,91E-08	0,0016
3	2,15	2,03E-09	6,08E-09	2,48E-08	3,09E-08	0,0022
	1	1,84E-09	5,52E-09	3,26E-08	3,81E-08	0,0025
5	2,15	2,46E-08	7,37E-08	1,74E-08	9,11E-08	0,0075
	1	2,83E-08	8,50E-08	2,09E-08	1,06E-07	0,0081

Tabela 1 – Limites de detecção em diferentes frequências para para os imunossensores produzidos com 1, 3 e 5 bicamadas da matriz de quitosana-sulfato de condroitina.

Fonte: A autora (2023).

Dessa forma, os resultados apontam para um método promissor na área dos diagnósticos clínicos ao passo que representa um teste rápido e econômico, quando comparado a métodos convencionais de detecção do biomarcador p53, tal como o teste sorológico ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), que apesar de apresentar altos níveis de repetibilidade e reprodutibilidade, é realizado em várias etapas, durante longos períodos de incubação, é relativamente caro e ainda passível de resultar em falsos positivos/negativos (ATTALLAH *et al.*, 2003; PUNDIR *et al.*, 2020). Por esses motivos, o biossensoriamento vem sendo um importante objeto de investigação para otimização de detecção.

5.4 Da caracterização das arquiteturas

Ao elaborar biossensores imobilizando um anticorpo em sua superfície, espera-se que as interações formadas sejam específicas do tipo AB-AG (nesse contexto, "AB" representa o anticorpo - ou imunoglobulina - e "AG" representa o antígeno) (DAMMER *et al.*, 1996; YADAV *et al.*, 2010; KAPINGIDZA; KOWAL; CHRUSZCZ, 2020).

No entanto, com os ensaios até aqui apresentados e discutidos, não existem evidências suficientes que justifiquem esse tipo específico de interação entre a superfície do sensor e as amostras estudadas. Para buscar essas evidências, espectros de PM-IRRAS foram performados na região de 1500 a 1750 cm⁻¹, pois esta corresponde a bandas amida I e II, características de proteínas (figura 10).

Figura 10 – Espectros de PM-IRRAS normalizados dos biossensores construídos. A linha de base foi tomada como o espectro das arquiteturas, nas quais uma camada de anticorpo p53 foi imobilizada. Estudo realizado nas concentrações de 0, 50, 100 e 1000 U_{cel}/mL.

(continua)



(conclusão)





De acordo com a literatura, a banda em ~1650 cm⁻¹ era esperada e corresponde a presença de grupos amida I (BARTH, 2007; SOARES *et al.*, 2020). Segundo os pesquisadores mencionados, a banda é representativa da vibração de estiramento da carbonila (C=O) dos ácidos carboxílicos dos aminoácidos com contribuições em menor escala tanto da vibração de estiramento C–N quanto do dobramento fora do plano da ligação N–H. Já a banda menos intensa entre 1500 e 1600 cm⁻¹ é atribuída a amida II, principalmente devida à deformação do N–H (DI FOGGIA *et al.*, 2011).

Ao analisar os espectros de PM-IRRAS, é possível observar a mudança na intensidade de pico para o estiramento da carbonila, de acordo com a concentração do antígeno p53. Provavelmente, a mudança na área/intensidade da banda de absorção em ~1650 cm⁻¹ de forma decrescente ou não monotônica indica que a interação anticorpo-antígeno é formada e altera a orientação dos dipolos C=O na superfície do sensor. Ou seja, o aumento da área/intensidade da banda indica a formação do complexo anticorpo-antígeno, mas ao passo que essa interação é

formada, a orientação molecular do complexo pode ser alterada e a banda diminui de intensidade.

6 CONCLUSÃO

O biossensoriamento vem ocupando um lugar de destaque entre as pesquisas em biotecnologia. A ideia é de que, em algum tempo, esses dispositivos sejam capazes de substituir e aprimorar os métodos convencionais de detecção. Neste trabalho, inédito para a aplicação de quitosana e sulfato de condroitina em eletrodos interdigitados de ouro para detecção do biomarcador p53, arquiteturas de filmes nanoestruturados foram desenvolvidas para produção de um imunossensor não invasivo, não destrutivo, barato, e, de acordo com os espectros de capacitância e PM-IRRAS, sensível e seletivo. Para isso, os grupos carboxílicos terminais foram ativados NHS/EDC.

A otimização do método indica que aqueles sensores produzidos com uma bicamada de quitosana/sulfato de condroitina apresentam o melhor desempenho quanto ao limite de detecção do antígeno p53, mas ainda existem outras abordagens, como a organização dos dados em mapas de projeções multidimensionais que auxiliam a identificar as faixas ótimas de trabalho para distinção entre amostras.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a seletividade dos sensores produzidos frente a amostras biológicas como suor, saliva ou sangue.
- Analisar os dados construídos a partir de técnicas de visualização de informação.

REFERÊNCIAS

ARENDT, Hannah. **A condição humana**. Tradução de Roberto Raposo. Rio de Janeiro: Forense, 2007.

ARIGA, Katsuhiko *et al.* Layer-by-layer assembly: recent progress from layered assemblies to layered nanoarchitectonics. **Chemistry–An Asian Journal**, v. 14, n. 15, p. 2553-2566, 2019.

ARIGA, Katsuhiko *et al*. Layer-by-layer nanoarchitectonics: invention, innovation, and evolution. **Chemistry Letters**, v. 43, n. 1, p. 36-68, 2014.

ATTALLAH, Abdelfattah Mohamed *et al*. Detection of serum p53 protein in patients with different gastrointestinal cancers. **Cancer Detection and Prevention**, v. 27, n. 2, p. 127-131, 2003.

BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1767, n. 9, p. 1073-1101, 2007.

BERA, Tushar Kanti. Bioelectrical impedance methods for noninvasive health monitoring: a review. **Journal of Medical Engineering**, v. 2014, 17 june 2014.

BONDANCIA, Thalita J. *et al*. Low-cost bacterial nanocellulose-based interdigitated biosensor to detect the p53 cancer biomarker. **Biomaterials Advances**, v. 134, p. 112676, 2022.

BROSEL-OLIU, Sergi *et al.* Impedimetric transducers based on interdigitated electrode arrays for bacterial detection–A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1088, p. 1-19, 2019.

CHEN, Wen-Bin *et al*. Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 75, n. 1, p. 128-137, 2005.

DAMMER, Ulrich *et al.* Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 70, n. 5, p. 2437-2441, 1996.

DHULL, Nidhi *et al.* Highly sensitive and non-invasive electrochemical immunosensor for salivary cortisol detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 293, p. 281-288, 2019.

DIREKSILP, Chatrawee *et al*. A label-free electrochemical immunosensor based on 11-mercaptoundecanoic acid grafted chitosan and poly (N-methylaniline) for the detection of carcinoembryonic antigen. **Bioelectrochemistry**, v. 152, p. 108446, 2023.

ERKMEN, Cem *et al.* Layer-by-layer modification strategies for electrochemical detection of biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 100270, 2022.

FEIZIAZAR, Mahsa *et al.* Recent advances on the piezoelectric, electrochemical, and optical biosensors for the detection of protozoan pathogens. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, p. 116803, oct. 2022.

FOGUEL, Marcos Vinicius. **Desenvolvimento de imunossensores para aflatoxina B1**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

GOH, Amanda M.; COFFILL, Cynthia R.; LANE, David P. The role of mutant p53 in human cancer. **The Journal of Pathology**, v. 223, n. 2, p. 116-126, 2011.

GROSSI, Marco; RICCÒ, Bruno. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, v. 6, n. 2, p. 303-325, 2017.

HATTA, Mohd Hayrie Mohd *et al*. COVID-19: prevention, detection, and treatment by using carbon nanotubes-based materials. **ChemistrySelect**, v. 8, n. 7, p. e202204615, 2023.

IBRAHIM, Hosny; ISSA, Y. M.; ABU-SHAWISH, Hazem M. Improving the detection limits of antispasmodic drugs electrodes by using modified membrane sensors with inner solid contact. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p. 8-15, 2007.

JAYAN, Heera; PU, Hongbin, SUN, Da-Wen. Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 233-246, 2020.

JO, Hyunjin *et al.* Thin Films Bearing Conjugated Polymer Nanoparticles Fabricated by Microliter-Scale Layer-by-Layer Deposition. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 301, n. 5, p. 530-534, 2016.

KANOUN, Olfa *et al*. A review of nanocomposite-modified electrochemical sensors for water quality monitoring. **Sensors**, v. 21, n. 12, p. 4131, 2021.

KAPINGIDZA, A. Brenda; KOWAL, Krzysztof; CHRUSZCZ, Maksymilian. Antigin-Antibody complexes. *In*: HOEGER, Ulrich; HARRIS, Robin. **Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins**. Switzerland: Springer, 2020. p. 465-497.

KARKANI, Dimitra *et al.* Preliminary results of the development of a DNAhybridization-based biosensor for the detection of milk adulteration using gold interdigitated electrodes. **Engineering Proceedings**, v. 35, n. 1, p. 9, 2023.

KATAS, Haliza *et al*. Antibacterial activity of biosynthesized gold nanoparticles using biomolecules from Lignosus rhinocerotis and chitosan. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 2, p. 283-292, 2019.

KIM, Se-Kwon *et al*. Subacute toxicity of chitosan oligosaccharide in Sprague-Dawley rats. **Arzneimittelforschung**, v. 51, n. 09, p. 769-774, 2001.

KLARA, Joanna *et al.* Lysine-functionalized chondroitin sulfate improves the biological properties of collagen/chitosan-based injectable hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 202, p. 318-331, 2022.

KOU, Shijie Gabriel; PETERS, Linda M.; MUCALO, Michael R. Chitosan: a review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 85-94, 2021.

LANE, David P.; CRAWFORD, Lionel V. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. **Nature**, v. 278, n. 5701, p. 261-263, 1979.

LI, Bing *et al*. Clinical detection of neurodegenerative blood biomarkers using graphene immunosensor. **Carbon**, v. 168, p. 144-162, 2020.

LI, Mantong *et al*. Recent progress in biosensors for detection of tumor biomarkers. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7327, 2022.

LIU, H. *et al.* Laser processing of flexible in-plane micro-supercapacitors: progresses in advanced manufacturing of nanostructured electrodes. **ACS Nano**, v. 16, n. 7, p. 10088-10129, 2022.

LIU, Q. *et al.* Preparation of nanostructured PDMS film as flexible immunosensor for cortisol analysis in human sweat. **Analytica Chimica Acta**, v. 1184, p. 339010, 2021.

LUTZ, Waldemar; NOWAKOWSKA-SWIRTA, Ewa. Gene p53 mutations, protein p53, and anti-p53 antibodies as biomarkers of cancer process. **International Journal of Ocupational Medicine and Environmental Health**, v. 15, n. 3, p. 209-218, 2002.

MANSUR, Alfredo José; BARROSO, Lucia Pereira. Índice de desenvolvimento humano e doenças crônicas no Brasil entre 1980 e 2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 120, p. e20230213, 2023.

MIKAMI, Tadahisa; KITAGAWA, Hiroshi. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4719-4733, 2013.

NANGARE, Sopan; PATIL, Pravin. Poly (allylamine) coated layer-by-layer assembly decorated 2D carbon backbone for highly sensitive and selective detection of Tau-441 using surface plasmon resonance biosensor. **Analytica Chimica Acta**, p. 341474, 2023.

NARESH, Varnakavi; LEE, Nohyun. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021.

PAHAL, Suman *et al.* Nanoarchitectonics for free-standing polyelectrolyte multilayers films: exploring the flipped surfaces. **ChemNanoMat**, v. 9, n. 2, p. e202200462, 2022.

PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O. DNA electrochemical biosensors for in situ probing of pharmaceutical drug oxidative DNA damage. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1125, 2021.

PAULOVICH, Fernando V. *et al.* Information visualization techniques for sensing and biosensing. **Analyst**, v. 136, n. 7, p. 1344-1350, 2011.

PICCOLI, Julia P. *et al.* Nanostructured functional peptide films and their application in C-reactive protein immunosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 138, p. 107692, 2021.

PUNDIR, Shikha *et al.* Detection of tumor suppressor protein p53 with special emphasis on biosensors: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 588, p. 113473, 2020.

QURESHI, Anjum *et al.* Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2318-2323, 2010.

RAUF, S. *et al.* Ultrasensitive leaky surface acoustic wave immunosensor for realtime detection of alpha-fetoprotein in biological fluids. **Chemosensors**, v. 9, n. 11, p. 311, 2021.

REN, Wen; MURA, Stefania; IRUDAYARAJ, Joseph MK. Modified graphene oxide sensors for ultra-sensitive detection of nitrate ions in water. **Talanta**, v. 143, p. 234-239, 2015.

SAM, S. *et al.* Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 809-814, 2010.

SANTOS, B. S. Um discurso sobre as ciências. São Paulo: Cortez, 2018.

SANTOS, L. K. B. *et al*. A redox-probe-free immunosensor based on electrocatalytic prussian blue nanostructured film one-step-prepared for Zika virus diagnosis. **Biosensors**, v. 12, n. 8, p. 623, 2022.

SHARMA, Mansi. **Recent developments in biosensors**: an overview. 2023. 52 p. Dissertation (Master in Chemistry) – Department of Applied Chemistry, Delhi Technological University, Delhi, 2023.

SHARMA, Reena *et al.* Chondroitin sulfate: emerging biomaterial for biopharmaceutical purpose and tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 286, p. 119305, 2022.

SHARMA, Swati; SWETHA, K. Laxmi; ROY, Aniruddha. Chitosan-chondroitin sulfate based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 97-108, 2019.

SOARES, A. C. *et al.* Immunosensors containing solution blow spun fibers of poly (lactic acid) to detect p53 biomarker. **Materials Science and Engineering**, v. 115, p. 111120, 2020.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica,** Vol 1. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.

SRIVASTAVA, A. *et al.* Marine biomaterials in therapeutics and diagnostics. *In:* KIM, S. K. **Springer handbook of marine biotechnology**, Berlin: Springer, 2015. p. 1247-1263.

SUGINTA, W.; KHUNKAEWLA, P.; SCHULTE, A. Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 7, p. 5458-5479, 2013.

TICIANELLI, E. A. **Eletroquímica:** princípios e aplicações, Vol. 17. São Paulo: Edusp, 1998.

VELLOSO, I. R. B., GITIRANA, T. B. Arquivo fotográfico Aristides Azevedo Pacheco Leão. **História, Ciências, Saúde**, v. 8, n. 2, p.454 - 458, 2001.

VERDOODT, N *et al*. Development of a rapid and sensitive immunosensor for the detection of bacteria. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1792-1796, 2017.

WU, D. *et al*. Zinc-stabilized chitosan-chondroitin sulfate nanocomplexes for HIV-1 infection inhibition application. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 3279-3291, 2016.

WÜNSCH, F. V; e GATTÁS, G. J. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 467-480, 2001.

YADAV, S. *et al.* Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1152-1168, 2010.

YU, W. *et al.* Electrochemical immunosensor based on carboxylated single-walled carbon nanotube-chitosan functional layer for the detection of cephalexin. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 1001-1011, 2020.

YUAN, R. *et al.* Carbon dot-modified branched tio2 photoelectrochemical glucose sensors with visible light response. **ACS Omega**, v. 8, n. 24, p. 22099–22107, 2023.

ZAKRIA, D. *et al.* Electrical impedance spectroscopy significantly enhances correct biopsy choice for pigmented skin lesions beyond clinical evaluation and dermoscopy. **Melanoma Research**, v. 33, n. 1, p. 80-83, 2022.

ZHANG, H. *et al.* A simple electrochemical immunosensor based on a chitosan/reduced graphene oxide nanocomposite for sensitive detection of biomarkers of malignant melanoma. **RSC Advances**, v. 12, n. 40, p. 25844-25851, 2022.

ZHAO, L.; SANYAL, S. p53 isoforms as cancer biomarkers and therapeutic targets. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3145, 2022.

ZOUAOUI, F. *et al.* Electrochemical sensors based on molecularly imprinted chitosan: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 130, p. 115982, 2020.