



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**



**ISEL**  
INSTITUTO SUPERIOR DE  
ENGENHARIA DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DE LISBOA**  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

# **Desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico para determinação de ácido úrico em amostras biológicas: prevenção e controlo da gota úrica**

**Inês Filipa de Sousa Martins**

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Biomédica**

## **Orientadores**

Professor Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)  
Professora Doutora Magda Cardoso Nobre Semedo (ISEL/IPL)

Maio 2022



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**



**ISEL**  
INSTITUTO SUPERIOR DE  
ENGENHARIA DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE  
TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DE LISBOA**  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

Instituto Superior de Engenharia de Lisboa  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

# **Desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico para determinação de ácido úrico em amostras biológicas: prevenção e controlo da gota úrica**

**Inês Filipa de Sousa Martins**

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de  
**Mestre em Engenharia Biomédica**

## **Orientadores**

Professor Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)  
Professora Doutora Magda Cardoso Nobre Semedo (ISEL/IPL)

## **Júri**

Presidente: Professor Doutor Manuel Matos (ISEL/IPL)  
Vogais: Professor Doutor Hugo Félix Silva (ISEL/IPL)  
Professor Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)

Maio 2022

## **Agradecimentos**

Esta dissertação reflete os últimos meses de dedicação e aprendizagem e não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para tornar possível a sua realização.

Ao professor Doutor Nelson Silva, meu orientador, o meu profundo e sincero agradecimento por toda a ajuda, acompanhamento, paciência que sempre demonstrou ao longo de todo o meu trabalho, e acima de tudo pela excelente orientação e rigor exigido.

À professora Doutora Magda Semedo, minha orientadora, pela disponibilidade, ajuda, simpatia e paciência.

Ao professor Doutor Miguel Minhalma pela ajuda prestada na produção de membranas e pela boa disposição. Foram dias com um ambiente muito divertido.

À professora Doutora Ana Charas, do Instituto de Telecomunicações (IT), polo do Instituto Superior Técnico, pela disponibilidade e ajuda na aquisição de imagens de Microscopia de Força Atómica.

À comissão diretiva do Centro de Estudos de Engenharia Química do ISEL (CEEQ), pela permissão de utilização do respetivo laboratório para realização do trabalho experimental.

Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito do projeto IDI&CA, IPL/2020/BioAURIC\_ISEL, a cuja instituição se agradece o financiamento do projeto.

À Mariana Patornilo, minha colega e amiga, pelo companheirismo que fez com que estes 2 anos de mestrado tivessem sido mais suportáveis.

Nada disto seria possível sem as pessoas a quem devo tudo. Um agradecimento especial aos meus pais pela força, apoio, por todo o esforço que fizeram e por me deixarem sempre sonhar.



## Resumo

O presente trabalho versa o desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico para a determinação do ácido úrico em amostras de urina na perspectiva do controlo e prevenção de gota úrica. A motivação principal deste trabalho prende-se com o desenvolvimento de uma metodologia alternativa aos procedimentos de diagnósticos estabelecidos, em particular um imunossensor piezoelétrico, para determinação precoce de ácido úrico na urina, caracterizada, essencialmente, por um procedimento simplificado, uma resposta rápida, pela possível reutilização e por um baixo custo associado.

O elemento de reconhecimento biológico ou bioreceptor do biossensor desenvolvido, consistiu em anticorpos policlonais contra o ácido úrico. Este elemento de reconhecimento foi imobilizado na superfície do transdutor selecionado para o biossensor desenvolvido que consistiu num cristal de quartzo, piezoelétrico, com 14 mm de diâmetro, recoberto com um elétrodo de ouro em ambas as superfícies e exibindo uma frequência de ressonância nativa de 10 MHz. Como complemento do sistema de transdução, foi utilizada uma microbalança de cristal de quartzo, a qual permitiu a medição da variação da frequência de vibração do cristal piezoelétrico decorrente da ligação da espécie de interesse ao bioreceptor.

O procedimento de imobilização do bioreceptor incluiu a preparação inicial de uma monocamada automontada de ácido 11-mercaptoundecanóico na superfície do sensor, ativada com uma mistura de *N*-Hidroxissuccinimida e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. As condições experimentais inerentes à formação da biocamada foram otimizadas com base numa análise de variância (ANOVA) de acordo com um planeamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup>. Neste sentido, foram estudados 3 fatores, designadamente a concentração de ácido 11-mercaptoundecanóico, a relação entre o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e o *N*-Hidroxissuccinimida e a diluição da solução de anticorpo comercial e 2 níveis para cada fator. Devido a limitações do planeamento, foram realizados alguns ensaios adicionais visando a otimização da resposta analítica biossensor e que versaram, nomeadamente, o efeito do tempo de ligação dos anticorpos policlonais à monocamada automontada e do tempo de incubação do antigénio ao bioreceptor. Em termos da sua performance analítica, o biossensor desenvolvido exibiu um intervalo de resposta linear entre 10 mM e 500 mM de ácido úrico, uma sensibilidade de 0,578 Hz  $\mu\text{g}^{-1}$  mL, um limite de deteção de 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , um limite de quantificação de 18,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e um tempo de resposta de ~20min.

O biossensor desenvolvido foi utilizado na determinação da concentração de ácido úrico em amostras de urina fortificadas com uma solução de antigénio comercial. Obteve-se um erro relativo inferior a 10% para todas as concentrações de controlo, nomeadamente 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido úrico, o que traduz uma exatidão bastante significativa das medidas efetuadas.

**Palavras-chave:** Imunossensor, transdução piezoelétrica, ácido úrico, urina.



## Abstract

The present work deals with the development of a piezoelectric biosensor for the determination of uric acid in urine samples in the perspective of control and prevention of gout. The main motivation of this work was the development of an alternative methodology to the established diagnostic procedures, in particular a piezoelectric immunosensor, for the early determination of uric acid in urine, characterized essentially by a simplified procedure, a fast response, the possible reuse and a low associated cost.

The biological recognition element or bioreceptor of the developed biosensor, consisted of polyclonal antibodies against uric acid. This recognition element was immobilized on the surface of the transducer selected for the developed biosensor which consisted of a quartz crystal, piezoelectric, 14 mm in diameter, covered with a gold electrode on both surfaces and exhibiting a native resonance frequency of 10 MHz. As a complement of the transduction system, a quartz crystal microbalance was used, which allowed the measurement of the variation of the vibration frequency of the piezoelectric crystal resulting from the binding of the species of interest to the bioreceptor.

The immobilization procedure of the bioreceptor included the initial preparation of a self-assembled monolayer of acid 11-mercaptoundecanoic acid on the sensor surface, activated with a mixture of N-Hydroxysuccinimide and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide. The experimental conditions inherent to the formation of the bilayer were optimized based on an analysis of variance (ANOVA) according to a 2<sup>3</sup> factorial planning. In this sense, 3 factors were studied, namely the concentration of 11-mercaptoundecanoic acid, the ratio between 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide and the dilution of the commercial antibody solution and 2 levels for each factor. Due to planning limitations, some additional assays were performed aiming to optimise the biosensor analytical response, namely the effect of the binding time of the polyclonal antibodies to the self-assembled monolayer and the incubation time of the antigen to the biosensor. In terms of its analytical performance, the developed biosensor exhibited a linear response range between 10 mM and 500 mM uric acid, a sensitivity of 0,578 Hz  $\mu\text{g}^{-1}$  mL, a limit of detection of 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a limit of quantification of 18,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and a response time of ~20min.

The developed biosensor was used in the determination of uric acid concentration in urine samples fortified with a commercial antigen solution. A relative error lower than 10% was obtained for all control concentrations, namely 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of uric acid, which translates into a very significant accuracy of the measurements performed.

**Keywords:** Immunosensor, piezoelectric transduction, uric acid, urine.



## **Produção científica**

Em termos de produção científica, no presente trabalho, salienta-se as seguintes comunicações em conferência:

### **Comunicação em poster**

Martins, I.; Silva, N.; Semedo, M.; H.F.; Minhalma, M.; Matos, M.J. Desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico para determinação de ácido úrico em amostras biológicas: Caracterização e otimização do sistema de medida; 7º Fórum de Engenharia Química e Biológica, ISEL, 11 a 13 de Maio 2021, Lisboa, Portugal.

### **Comunicação oral**

Silva, N.; Semedo, M.; Martins, I.; Silva, H.F.; Minhalma, M.; Matos, M.J. *Development of an immunosensor for gout monitorization in the academic population: Optimization of the bioreceptor immobilization procedure*; CQE Days 2021 – Spring Meeting, IST, 27 e 28 de Maio 2021, Lisboa, Portugal.

Silva, N.; Semedo, M.; Martins, I.; Silva, H.F.; Minhalma, M.; Matos, M.J. *Development of a piezoelectric biosensor for uric acid determination. Optimization of the bioreceptor immobilization procedure*. XXVII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, 14 a 16 de julho 2021, Braga, Portugal.



# Índice

|  |          |
|--|----------|
| Agradecimentos .....   | i        |
| Resumo .....   | iii      |
| Abstract .....   | v        |
| Produção científica .....  | vii      |
| Lista de acrónimos .....   | xiii     |
| Índice de figuras.....   | xv       |
| Índice de tabelas .....  | xix      |
| <b>Capítulo 1 - Enquadramento do trabalho .....</b>                              | <b>1</b> |
| <b>Capítulo 2 - Introdução .....</b>   | <b>3</b> |
| 2.1. Ácido úrico .....   | 3        |
| 2.2. Técnicas utilizadas na determinação do ácido úrico .....                    | 4        |
| 2.3. Biossensores .....  | 7        |
| 2.3.1. Elemento de reconhecimento biológico.....                                 | 9        |
| 2.3.1.1. Imunossensor .....  | 10       |
| 2.3.2. Transdutor.....   | 13       |
| 2.3.2.1. Transdutores eletroquímicos .....                                       | 14       |
| 2.3.2.1.1. Transdutores amperométricos.....                                      | 15       |
| 2.3.2.1.2. Transdutores potenciométricos.....                                    | 15       |
| 2.3.2.1.3. Transdutores condutimétricos.....                                     | 16       |
| 2.3.2.2. Transdutores óticos .....   | 16       |
| 2.3.2.3. Transdutores piezoelétricos .....                                       | 19       |
| 2.3.3. Metodologias de imobilização do elemento de reconhecimento biológico..... | 21       |
| 2.3.3.1. Adsorção física .....   | 21       |
| 2.3.3.2. Ligação covalente.....  | 22       |
| 2.3.3.3. Ligação covalente cruzada.....  | 23       |
| 2.3.3.4. Encapsulamento.....   | 24       |
| 2.3.3.5. Confinamento no interior de uma matriz polimérica.....                  | 24       |
| 2.3.3.6. Monocamadas automontadas .....  | 25       |
| 2.4. Características ideais de um biossensor .....                               | 29       |
| 2.4.1. Seletividade .....  | 30       |
| 2.4.2. Intervalo de resposta linear .....  | 30       |
| 2.4.3. Sensibilidade.....  | 31       |
| 2.4.4. Limite de deteção e limite de quantificação.....                          | 31       |
| 2.4.5. Precisão e exatidão .....   | 32       |
| 2.4.6. Tempo de resposta.....  | 33       |
| 2.5. Técnicas de caracterização microscópicas .....                              | 33       |
| 2.5.1. Microscopia de força atómica .....  | 33       |
| 2.6. Filtração com membranas poliméricas .....                                   | 35       |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.1. Classificação das membranas.....  | 37        |
| 2.6.2. Limitações inerentes à utilização de membranas de filtração .....   | 39        |
| <b>Capítulo 3 - Materiais e métodos.....</b>   | <b>41</b> |
| 3.1. Reagentes, materiais e equipamento .....  | 42        |
| Reagentes.....   | 42        |
| Amostras analisadas.....   | 43        |
| Materiais.....   | 43        |
| Equipamentos .....   | 43        |
| Software .....   | 44        |
| 3.2. Montagem experimental .....   | 44        |
| 3.3. Caracterização do sistema de fluxo.....   | 45        |
| 3.4. Preparação da superfície do sensor piezoelétrico para imobilização do bioreceptor .....                       | 46        |
| 3.5. Formação da monocamada automontada e imobilização do bioreceptor: Ensaios preliminares...47                   |           |
| 3.6. Caracterização da superfície modificada do sensor piezoelétrico por Microscopia de Força atômica .....        | 49        |
| 3.7. Planeamento experimental para otimização dos parâmetros intervenientes na imobilização do bioreceptor.....    | 50        |
| 3.7.1. Funcionalização da superfície de ouro.....  | 53        |
| 3.7.2. Imobilização do elemento de reconhecimento biológico.....   | 54        |
| 3.7.3. Reconhecimento e ligação do antigénio.....  | 54        |
| 3.7.4. Regeneração da superfície do sensor.....  | 56        |
| 3.8. Calibração do biossensor piezoelétrico .....  | 57        |
| 3.9. Estudo de diferentes arquiteturas de superfície para imobilização do bioreceptor.....                         | 57        |
| 3.10. Determinação do ácido úrico em amostras de urina com o biossensor desenvolvido .....                         | 59        |
| 3.10.1. Preparação das membranas de ultrafiltração para purificação das amostras de urina ...                      | 59        |
| 3.10.2. Ultrafiltração.....  | 61        |
| 3.10.3. Determinação de ácido úrico em amostra de urina.....   | 62        |
| <b>Capítulo 4 - Resultados experimentais e discussão .....</b>   | <b>63</b> |
| 4.1. Caracterização e otimização do funcionamento do sistema de fluxo .....  | 64        |
| 4.2. Preparação da superfície do sensor para a imobilização do bioreceptor .....                                   | 66        |
| 4.3. Formação da monocamada automontada e imobilização do bioreceptor: Ensaios preliminares...68                   |           |
| 4.4. Caracterização da superfície do sensor piezoelétrico por Microscopia de Força Atômica.....                    | 71        |
| 4.5. Planeamento experimental para otimização dos parâmetros intervenientes na imobilização do bioreceptor .....   | 75        |
| 4.6. Otimização da diluição e tempo de incubação da solução de anticorpo e do tempo de incubação do antigénio..... | 78        |
| 4.6.1. Otimização da diluição da solução de anticorpo .....  | 78        |
| 4.6.2. Otimização do tempo de imobilização do anticorpo .....  | 79        |
| 4.6.3. Otimização do tempo de imobilização do antigénio .....  | 80        |
| 4.7. Regeneração da superfície do sensor.....  | 81        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.8. Calibração do biossensor desenvolvido .....                           | 82         |
| 4.9. Modificação da superfície do sensor com diferentes arquiteturas ..... | 88         |
| 4.10. Determinação de ácido úrico em amostras de urina .....               | 94         |
| <b>Capítulo 5 - Conclusão .....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>Capítulo 6 - Perspetivas futuras .....</b>                              | <b>101</b> |
| <b>Referências bibliográficas .....</b>                                    | <b>103</b> |



## Lista de acrónimos

|              |  |
|--------------|--|
| <b>Ab</b>    | Antibody / Anticorpo   |
| <b>AC</b>    | Acetato de celulose  |
| <b>AFM</b>   | Atomic Force Microscope / Microscopia de força atómica   |
| <b>Ag</b>    | Antigénio  |
| <b>AU</b>    | Ácido úrico  |
| <b>EDC</b>   | 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida  |
| <b>ERB</b>   | Elemento de Reconhecimento Biológico   |
| <b>FDA</b>   | Food Drug Administration / Administração de Alimentos e Medicamentos                               |
| <b>HPLC</b>  | High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de alto desempenho                  |
| <b>IUPAC</b> | International Union of Pure and Applied Chemistry / União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| <b>LOD</b>   | Limit of Detection / Limite de deteção   |
| <b>LOQ</b>   | Limit of Quantification / Limite de quantificação  |
| <b>MUA</b>   | Ácido 11-Mercaptoundecanóico   |
| <b>NHS</b>   | N-Hidroxisuccinimida   |
| <b>OMS</b>   | Organização Mundial de Saúde   |
| <b>PrA</b>   | Proteína A   |
| <b>QCM</b>   | Quartz Crystal Microbalance / Balança de Cristal de Quartzo  |
| <b>SAM</b>   | Self-Assembled Monolayers / Monocamada Auto-montada  |



## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.1</b> – Áreas do conhecimento tipicamente envolvidos no estudo e desenvolvimento de biossensores, evidenciando a multidisciplinariedade desta área de investigação.....  | 7  |
| <b>Figura 2.2</b> – Principais elementos que constituem um biossensor. ....  | 8  |
| <b>Figura 2.3</b> – Estrutura geral de um anticorpo. ....  | 11 |
| <b>Figura 2.4</b> – Classificação do biossensor baseado nos diferentes tipos de transdutores. ....   | 14 |
| <b>Figura 2.5</b> – Esquema representativo da transdução ótica com recurso a um marcador .....   | 17 |
| <b>Figura 2.6</b> – (A) Princípio de funcionamento de um transdutor do tipo SPR; (B) Perfil de variação da intensidade da radiação refletida em função do ângulo da radiação incidente.....  | 18 |
| <b>Figura 2.7</b> – Representação esquemática de uma Balança de Cristal de Quartzo. ....   | 20 |
| <b>Figura 2.8</b> – Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por adsorção física .....   | 22 |
| <b>Figura 2.9</b> – Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por ligação covalente.....  | 23 |
| <b>Figura 2.10</b> – Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por ligação covalente cruzada ...  | 23 |
| <b>Figura 2.11</b> – Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por encapsulamento .....   | 24 |
| <b>Figura 2.12</b> – Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por confinamento no interior de uma matriz polimérica .....  | 25 |
| <b>Figura 2.13</b> – (A) Estrutura típica de um alcanotiol, (B) Estrutura típica de uma monocamada automontada .....   | 27 |
| <b>Figura 2.14</b> – Esquema simplificado da formação de uma monocamada automontada (SAM) numa superfície de ouro. Solução contendo o derivado de tiol (A); a superfície de ouro é imersa na solução de derivado de tiol (B); os tióis começam a estabelecer ligação com a superfície de ouro originando a ligação de Au-S (C). .... | 28 |
| <b>Figura 2.15</b> – Monocamada automontada formada a partir de um alcanotiol com grupo carboxilo como grupo funcional terminal, evidenciado a ligação do grupo de tiol à superfície de ouro, através do átomo de enxofre.....   | 28 |
| <b>Figura 2.16</b> – Representação de um intervalo de resposta linear de um biossensor (reta a cheio)....  | 30 |
| <b>Figura 2.17</b> – Determinação da sensibilidade dada pelo declive da reta que traduz a relação linear entre a resposta do biossensor e a concentração do analito.....   | 31 |
| <b>Figura 2.18</b> – Esquema simplificado dos elementos que constituem um AFM.....   | 34 |
| <b>Figura 2.19</b> – Curva de separação ponta-amostra ilustrando os principais modos de caracterização de uma superfície por AFM. ....   | 35 |
| <b>Figura 2.20</b> – Processo básico por filtração por membrana.....   | 36 |
| <b>Figura 2.21</b> – Representação esquemática da estrutura e modo de funcionamento das membranas assimétricas (A) e simétricas (B).....   | 38 |
| <b>Figura 3.1</b> – Montagem experimental utilizada para a realização dos ensaios com o biossensor piezoelétrico desenvolvido: Sistema de fluxo constituído por uma bomba peristáltica, uma microbalança de cristal de quartzo e por um sistema de aquisição de dados. ....  | 44 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3.2</b> – Componentes da microbalança de cristal de quartzo.....   | 45 |
| <b>Figura 3.3</b> – Procedimentos testados na limpeza da superfície de ouro do sensor de cristal de quartzo com vista à imobilização da biocamada contendo o elemento de reconhecimento biológico.....   | 47 |
| <b>Figura 3.4</b> – Esquema genérico da modificação do sensor piezoelétrico utilizada nos ensaios preliminares.....  | 48 |
| <b>Figura 3.5</b> – Resposta analítica inicialmente considerada para o biossensor desenvolvido.....  | 48 |
| <b>Figura 3.6</b> – (A) Esquema da modificação do sensor piezoelétrico para a caracterização por AFM. (B) Foto real da montagem efetuada.....  | 49 |
| <b>Figura 3.7</b> – Microscópio de força atômica utilizado na aquisição de imagens da superfície do sensor piezoelétrico.....  | 50 |
| <b>Figura 3.8</b> – Geometria do desenho fatorial.....   | 51 |
| <b>Figura 3.9</b> – (A) Formação de uma monocamada automontada de MUA na superfície do eletrodo de ouro, (B) Ativação dos grupos carboxilo do MUA com EDC e NHS, formando grupos éster ativados.....   | 54 |
| <b>Figura 3.10</b> – (A) Formação de uma monocamada automontada de (MUA) na superfície do eletrodo de ouro, (B) Ativação dos grupos carboxílicos do MUA com EDC e NHS, (C) Imobilização do anticorpo policlonal contra o ácido úrico.....  | 54 |
| <b>Figura 3.11</b> – (A) Formação de uma monocamada automontada de (MUA), (B) Ativação dos grupos carboxílicos do MUA com EDC e NHS, (C) Imobilização do anticorpo policlonal contra o ácido úrico, (D) Reconhecimento e ligação do antigénio (ácido úrico).....   | 55 |
| <b>Figura 3.12</b> – Procedimento experimental executado nas diversas etapas de modificação da superfície do sensor piezoelétrico, visando a formação da biocamada com ERB imobilizado para o reconhecimento e ligação do antigénio na etapa D.....  | 56 |
| <b>Figura 3.13</b> – Modificação da superfície de ouro que recobre o cristal de quartzo: (A) Superfície de ouro despida; (B) Modificação com proteína A; (C) Imobilização do elemento de reconhecimento biológico (D) Reconhecimento e ligação do antigénio.....   | 58 |
| <b>Figura 3.14</b> – Modificação da superfície de ouro que recobre o cristal de quartzo: (A) Formação de uma monocamada automontada de MUA; (B) Ativação dos grupos carboxílicos do MUA com EDC e NHS; (C) Ligação da proteína A; (D) Imobilização do elemento de reconhecimento biológico; (E) Reconhecimento e ligação do antigénio..... | 58 |
| <b>Figura 3.15</b> – (A)Esquema representativo do processo de inversão de fases utilizado para a preparação das membranas de ultrafiltração de acetato de celulose, (B) Faca utilizada na preparação das membranas.....  | 61 |
| <b>Figura 3.16</b> – (A) Esquema representativo do processo de ultrafiltração, (B) Foto real do suporte para a ultrafiltração, contendo uma amostra de urina em processo de purificação/filtração.   | 61 |
| <b>Figura 4.1</b> – Sequência de imagens que mostram o caso em que o sistema de fluxo se encontra completamente estanque e também o caso indesejável em que o nível de reagente varia com o tempo.....   | 65 |
| <b>Figura 4.2</b> – Calibração da bomba peristáltica utilizando o valor médio dos caudais (n=3) registados para cada posição.....  | 65 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.3</b> – Esquema simplificado da arquitetura de superfície que caracteriza o biossensor utilizado nos ensaios iniciais. ....  | 68 |
| <b>Figura 4.4</b> – Resposta analítica do sistema de medição onde se mostra: (A) câmara de reação a ser preenchida com solução de antígeno; (B) diminuição da frequência de vibração do sensor piezoelétrico em resultado do preenchimento da câmara de reação com a solução de antígeno preparada em PBS; (C) estabilização da frequência de vibração do sensor após reconhecimento e ligação do antígeno. ....   | 69 |
| <b>Figura 4.5</b> – Sensograma que esquematiza a resposta preliminar obtida para diferentes diluições de antígeno e também a resposta analítica final considerada para os ensaios subsequentes efetuados com o biossensor piezoelétrico desenvolvido .....   | 70 |
| <b>Figura 4.6</b> – Esquema que traduz um corte transversal da câmara de reação, onde se pretende evidenciar a relação quantitativa entre o solvente (PBS) e soluto (antígeno, Ag) e o efeito quase exclusivo que o primeiro, face à sua elevada quantidade relativa em todas as soluções, exerce na variação de frequência de vibração do cristal piezoelétrico. Mostram-se, como exemplo, três concentrações de antígeno onde, $CAg\ 3 > CAg\ 2 > CAg\ 1$ . .... | 71 |
| <b>Figura 4.7</b> – Caracterização por AFM da superfície de ouro do sensor “despido” ou não modificado   | 72 |
| <b>Figura 4.8</b> – Caracterização por AFM da superfície de ouro do sensor modificado .....  | 73 |
| <b>Figura 4.9</b> – Gráficos de superfície de resposta (3D) do modelo desenvolvido, representando a interação das variáveis que afetam a variação da frequência, [MUA] e [EDC] em função da diluição de anticorpo. (A) nível baixo da diluição (-), diluição 1:1000; (B) nível alto da diluição (+), diluição 1:500.....   | 77 |
| <b>Figura 4.10</b> – Otimização da diluição da solução de anticorpo a ser utilizada no procedimento de imobilização do elemento de reconhecimento biológico. ....  | 79 |
| <b>Figura 4.11</b> – Otimização do tempo de imobilização do anticorpo na superfície do sensor piezoelétrico.....   | 80 |
| <b>Figura 4.12</b> – Otimização do tempo de incubação da solução de antígeno.....  | 82 |
| <b>Figura 4.13</b> – Arquitetura de superfície do biossensor utilizada na calibração do dispositivo .....  | 82 |
| <b>Figura 4.14</b> – Calibração em “descontínuo” do biossensor piezoelétrico onde se mostra a resposta típica obtida em cada ensaio, realizado em triplicado, para diferentes soluções padrão de antígeno. ....  | 83 |
| <b>Figura 4.15</b> – Calibração em “descontínuo” do biossensor piezoelétrico desenvolvido efetuada com soluções de antígeno com diferentes concentrações e onde cada ponto traduz a média de três medições replicadas ( $n=3$ ). ....  | 84 |
| <b>Figura 4.16</b> – Esquema ilustrativo das medições efetuadas em contínuo onde se pretende demonstrar as variações de frequência adicionais decorrentes das sucessivas concentrações de antígeno admitidas ao sistema de fluxo e consideradas como as respetivas respostas analíticas. Mostram-se, apenas como exemplo, três concentrações de antígeno onde, $CAg\ 3 > CAg\ 2 > CAg\ 1$ .....  | 86 |
| <b>Figura 4.17</b> – Sensograma resultante da calibração do biossensor piezoelétrico em “contínuo” evidenciando as variações de frequência para as diferentes concentrações das soluções padrão de antígeno .....  | 86 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 4.18</b> – Calibração em “contínuo” do biossensor piezoelétrico desenvolvido efetuada com soluções de antigénio com diferentes concentrações mostrando-se em inserção a equação da reta de calibração.....  | 87  |
| <b>Figura 4.19</b> – Arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico apenas com uma camada de proteína A e posterior imobilização do elemento de reconhecimento biológico .....  | 88  |
| <b>Figura 4.20</b> – Variação de frequência obtida na análise de uma solução de antigénio como a concentração de 100 mg/mL. utilizando uma arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico apenas com uma camada de proteína A e o elemento de reconhecimento biológico.....   | 89  |
| <b>Figura 4.21</b> – Arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico.....  | 89  |
| <b>Figura 4.22</b> – Variação de frequência obtida na análise de uma solução de antigénio como a concentração de 100 mg/mL. utilizando uma arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico. .... | 90  |
| <b>Figura 4.23</b> – Variação de frequência obtida na análise de uma solução de antigénio como a concentração de 100 mg/mL. utilizando a arquitetura de superfície originalmente otimizada, que inclui a modificação do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e posterior imobilização elemento de reconhecimento biológico .....                                   | 90  |
| <b>Figura 4.24</b> – Comparação dos resultados obtidos com as três arquiteturas testadas para a modificação da superfície do biossensor. ....   | 91  |
| <b>Figura 4.25</b> – Orientação preferencial adquirida pelos anticorpos específicos em resultado da presença de proteína A na imobilização da superfície do sensor piezoelétrico .....  | 92  |
| <b>Figura 4.26</b> – Calibração do biossensor modificado com a nova arquitetura de superfície que inclui uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico.. ....   | 93  |
| <b>Figura 6.1</b> – Nova metodologia para a realização de ensaios com o biossensor visando o aumento da sensibilidade das medidas efetuadas. Aumento de massa expectável da biocamada em face da introdução de nanopartículas de ouro funcionalizadas... ..   | 101 |

## Índice de tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 2.1</b> – Exemplos de moléculas de alcanotóis evidenciado a sua estrutura típica.....   | 27 |
| <b>Tabela 2.2</b> – Características dos principais processos de separação por membranas .....   | 39 |
| <b>Tabela 3.1</b> – Valores utilizados com as diferentes posição de bomba para estabelecer os respectivos caudais. ....   | 45 |
| <b>Tabela 3.2</b> – Notação alternativa para representar as combinações ou testes .....   | 51 |
| <b>Tabela 3.3</b> – Matriz do desenho fatorial $2^3$ considerado visando a otimização da formação da biocamada na superfície do sensor de cristal de quartzo .....  | 52 |
| <b>Tabela 3.4</b> – Preparação dos diferentes padrões para a curva de calibração .....  | 57 |
| <b>Tabela 3.5</b> – Soluções poliméricas e condições de preparação das membranas de acetato de celulose .....   | 60 |
| <b>Tabela 4.1</b> – Resultados obtidos no estudo conducente ao estabelecimento do volume da câmara de fluxo. ....   | 66 |
| <b>Tabela 4.2</b> – Resultados obtidos após a limpeza dos sensores “sujos” com ambos os procedimentos de limpeza. ....  | 67 |
| <b>Tabela 4.3</b> – Medidas da função Kelvin efetuadas na superfície de ouro do sensor não modificado e modificado .....  | 74 |
| <b>Tabela 4.4</b> – Matriz do desenho fatorial: três variáveis independentes e valores experimentais e previstos da variação de frequência.. ....   | 75 |
| <b>Tabela 4.5</b> – Análise estatística de variância (ANOVA) para o modelo do design fatorial proposto....  | 76 |
| <b>Tabela 4.6</b> – Frequências antes e depois da regeneração da superfície do sensor.....  | 82 |
| <b>Tabela 4.7</b> – Concentração das soluções padrão utilizadas na calibração do biossensor desenvolvido. ....  | 83 |
| <b>Tabela 4.8</b> – Figuras de mérito e outras características relativas ao desempenho do biossensor piezoelétrico desenvolvido, tendo por base a realização de uma calibração em “descontínuo”.....  | 84 |
| <b>Tabela 4.9</b> – Parâmetros estatísticos utilizados na determinação dos valores do <i>LOD</i> e <i>LOQ</i> decorrentes da calibração em “descontínuo” efetuada com o biossensor piezoelétrico desenvolvido. ....   | 85 |
| <b>Tabela 4.10</b> – Figuras de mérito e outras características relativas ao desempenho do biossensor piezoelétrico desenvolvido tendo por base a realização de uma calibração em “contínuo”.....   | 87 |
| <b>Tabela 4.11</b> – Figuras de mérito e outras características relativas ao desempenho do biossensor piezoelétrico modificado com a nova arquitetura de superfície e comparação com aquelas obtidas para o dispositivo modificado de acordo com a metodologia inicialmente otimizada. .... | 93 |
| <b>Tabela 4.12</b> – Valores experimentais de concentração de ácido úrico determinados na análise de três amostras de urina fortificadas e comparação com os valores de controlo.....   | 95 |

## Enquadramento do trabalho

---

A monitorização da saúde da população e o diagnóstico precoce de diversas patologias são fatores cruciais para a prevenção e seleção/desenvolvimento de tratamentos mais eficazes. Nesta perspetiva, torna-se importante desenvolver ferramentas e metodologias com a capacidade de diagnóstico precoce e caracterizadas por uma operacionalidade simples, de execução rápida e com baixo custo associado. Estas características são destacadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como objetivos a serem levados em consideração no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico (Merkoçi *et al.* 2021).

O ácido úrico presente na urina ou no soro excretado pelos rins é o produto final do metabolismo da purina e dos seus derivados provenientes do consumo excessivo de carne, peixe ou marisco. O aumento da sua concentração no organismo humano está associado a várias condições médicas como a gota, a hiperuricemia, a insuficiência e a doença cardiovascular. Torna-se, portanto, muito importante a sua monitorização de forma regular. Os métodos comumente utilizados para a deteção de ácido úrico na prática clínica incluem, por exemplo, a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), a espectrofotometria, análises por quimioluminescência, a microscopia e exames imagiológicos. Estas técnicas caracterizam-se por serem morosas, por requerem técnicos especializados e, ainda, por um elevado custo associado. (Yan *et al.*, 2020).

A procura por novas tecnologias alternativas tem envolvido a ciência numa interdisciplinaridade bastante dinâmica e produtiva, integrando o conhecimento de diversas áreas de conhecimento, colmatando as limitações particulares das metodologias tradicionais. A combinação destas tecnologias emergentes com a extensa troca de conhecimento entre as várias áreas, permitiu o desenvolvimento de técnicas mais completas e abrangentes. Nesta perspetiva incluem-se, entre outras ferramentas analíticas, os biossensores. Estes dispositivos analíticos, que produzem um sinal mensurável resultante da interação entre um elemento de reconhecimento biológico ou bioreceptor e o analito através de um transdutor, têm vindo a despertar cada vez mais atenção, encerrando vantagens como a simplicidade de montagem e operação, a elevada sensibilidade e seletividade e o baixo custo associado.

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e montagem de um biossensor piezoelétrico para a determinação precoce do ácido úrico na urina, levando em consideração as características supramencionadas. A metodologia proposta assenta na utilização de um sistema de imunodeteção associada a um processo de transdução

piezoelétrica baseado numa microbalança balança de cristal de quartzo, visando a sinalização analítica do reconhecimento e ligação do ácido úrico (espécie de interesse) ao elemento de conhecimento biológico, que consistiu em anticorpos policlonais de coelho contra o antigénio referido.

## 2.1. Ácido úrico

O ácido úrico (AU) é um composto orgânico com a fórmula química  $C_5H_4N_4O_3$ , cuja a presença no nosso organismo resulta do metabolismo das purinas produzidas no organismo humano (Oliveira e Burini, 2012; Yan *et al.*, 2020), mas também ingeridas através dos alimentos ricos em proteínas. Este composto é formado pelo fígado, a partir de fontes de purinas exógenas (por exemplo, ingestão de carnes vermelhas e marisco) e endógenas (derivadas da morte celular), sendo 70% excretado pelo trato urinário e 30% pelo trato gastrointestinal (Ambrosio *et al.*, 2012). Uma função renal anormal ou um metabolismo excessivo das purinas podem determinar concentrações elevadas de AU no sangue (hiperuricemia), em face da superprodução ou remoção insuficiente do composto da corrente sanguínea (Oliveira e Burini, 2012). A remoção insuficiente é a causa mais frequente de hiperuricemia e está associada a 90% de todos os casos desta patologia (Bai *et al.*, 2017). Embora a hiperuricemia esteja associada a várias condições de saúde, como a doença cardíaca, a insuficiência renal, a leucemia ou a síndrome de *Lesch Nyhan*, a condição mais prevalente é a gota úrica, que consiste numa forma de artrite inflamatória.

A gota úrica, comumente designada apenas por gota, é caracterizada por dor intensa nas articulações ou, em estados mais avançados, pela erosão óssea e destruição articular. Esta condição inflamatória é desencadeada por depósito de cristais de monourato de sódio, semelhantes a agulhas, nos espaços sinoviais das articulações (Falohun e McShane, 2020), afetando cerca de 1-2% dos adultos em países desenvolvidos (Oliveira e Burini, 2012). Para além do tipo de alimentação parece existir, ainda, alguma predisposição hereditária para esta patologia. Os principais sintomas são a dor, o inchaço e a dificuldade em movimentar as articulações.

Do ponto de vista epidemiológico, os valores de referência para o ácido úrico no sangue situam-se entre 3,4 e 7,0 mg/dL, no caso do homem e entre 2,4 e 6,0 mg/dL no caso da mulher (Cardoso *et al.*, 2005). Na urina o seu valor varia entre 250 e 750 mg/24h (Ratautaite *et al.*, 2021).

Existem diferentes doenças com sintomas idênticos à gota. Por esse motivo, um diagnóstico correto é crucial, sendo, também, o histórico clínico um fator bastante importante ('Gota, CUF'). Assim, a determinação precoce do AU em amostras biológicas é desejável,

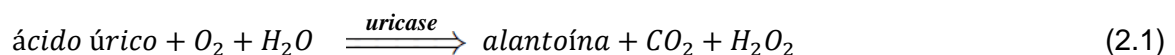
podendo constituir um indicador fundamental para a deteção atempada da doença (Bai *et al.*, 2017).

O diagnóstico de gota é tipicamente efetuado através da identificação da presença de cristais de monourato de sódio em estruturas articulares, recorrendo à microscopia de luz polarizada, com medição da percentagem de birrefringência. Este diagnóstico pode ser complementado com exames imagiológicos como a radiografia, a ecografia, a tomografia axial computadorizada ou a ressonância magnética. Exames complementares incluem, ainda, a uricémia e a uricosúria. As técnicas referidas caracterizam-se por serem de difícil execução e interpretação, por exibirem um tempo global de análise elevado e por serem bastante onerosas.

Neste âmbito, os biossensores têm vindo a receber particular atenção exibindo vantagens associadas a uma montagem simples, a uma facilidade de miniaturização, uma elevada sensibilidade e seletividade e um baixo custo associado (Yan *et al.*, 2020). Nesta perspetiva, o presente trabalho versa o desenvolvimento de um biossensor com transdução piezoelétrica, que se pensa poder vir a constituir uma alternativa viável a estas técnicas mais tradicionais.

## 2.2. Técnicas utilizadas na determinação do ácido úrico

Em termos históricos, o primeiro método desenvolvido para a análise de ácido úrico no sangue foi introduzido por *Offer* em 1894. Este método era baseado na oxidação química do ácido úrico a alantoína, com redução do ácido fosfotúngstico a um cromóforo de cor azul de tungstênio que era determinado espectralmente. A absorvância medida entre 660 e 720 nm era proporcional à concentração do ácido úrico. No entanto, este método apresentava vários problemas, especialmente o de interferências devido a outras espécies capazes de absorver na mesma gama de comprimento de onda ou à turvação provocada pela matriz da amostra biológica (Erden e Kiliç, 2013). Uma abordagem mais seletiva incluiu o uso da enzima uricase ou urato oxidase (EC 1.7.3.3), que catalisa a oxidação do ácido úrico com a produção da alantoína, peróxido de hidrogénio e dióxido de carbono, conforme expressa a seguinte equação (2.1):



Em 1941, *Bulger* e *Johns* introduziram outro método para a determinação de ácido úrico também com uso da enzima uricase. Este método baseava-se na medição da variação da absorvância de uma amostra de AU a 290 nm antes e após a conversão/oxidação pela enzima uricase permitindo, assim, a determinação da concentração original desta espécie. Embora esteja comercialmente disponível, a sua aplicação é limitada devido ao custo da enzima

uricase, tornando-se um fator limitante (Erden e Kiliç, 2013; Parthasarathy e Vivekanandan, 2018).g

Métodos alternativos para determinação de ácido úrico surgiram desde então e várias técnicas, ainda atualmente utilizadas no diagnóstico clínico desta espécie, como a espectrofotometria ou a cromatografia líquida de alto desempenho foram relatadas (Erden e Kiliç, 2013).

Vários sensores eletroquímicos usando elétrodos de platina modificados com filmes semipermeáveis (Hoshi *et al.*, 2003); nanotubos de ouro (Wang *et al.*, 2007) ou carbono vítreo modificado com diversos polímeros (Revin e John, 2011) foram, também, desenvolvidos para a determinação de ácido úrico. Estas metodologias eletroquímicas exibem, tipicamente, elevada sensibilidade, resposta rápida e baixo custo associado. No entanto, o ácido úrico e o ácido ascórbico comumente coexistem em fluidos biológicos humanos, principalmente no sangue e urina e o principal problema com a determinação eletroquímica de ácido úrico prede-se com a proximidade dos potenciais de oxidação de ambas as espécies, o que resulta numa resposta sobreposta com baixa seletividade (Erden e Kiliç, 2013). No entanto, a seletividade e também a sensibilidade dos métodos eletroquímicos para a determinação do ácido úrico, puderam ser otimizadas com recurso à utilização de enzimas como elemento de reconhecimento. Os biossensores eletroquímicos desenvolvidos com base neste racional analítico mostraram-se como uma ferramenta interessante em termos de análise de amostras biológicas para a determinação de AU.

Com efeito, desde o trabalho de *Clark e Lyons* em 1962, com o desenvolvimento do primeiro biossensor para a determinação da glucose no sangue, que os biossensores eletroquímicos, que utilizam enzimas como elemento de reconhecimento biológico, têm constituído uma área de investigação e desenvolvimento permanentes, uma vez que têm uma capacidade única de reconhecer moléculas-alvo com rapidez, sensibilidade e seletividade bastante significativas, mesmo em amostras reais de matriz complexa (Y. Liu *et al.*, 2013).

Relativamente à utilização particular de um biossensor na determinação de ácido úrico, salienta-se o trabalho de *Moraes, et al.* (2007) que exploraram a técnica de camada por camada para imobilizar a enzima uricase em substratos de óxido de índio dopado com estanho e revestidos, posteriormente, com uma camada de Azul da Prússia. As camadas de uricase foram alternadas com polietilenoimina ou policloreto de dialildimetilamónio, e as biocamadas resultantes foram usadas na montagem de biossensores amperométricos para a determinação do ácido úrico.

*Ahuja et al.* (2010) descreveram um biossensor amperométrico para a quantificação de ácido úrico em solução aquosa. A superfície de uma placa de vidro revestida com óxido de índio dopado com estanho foi modificada pela formação de uma monocamada automontada de 3-aminopropiltrióxissilano, que permitiu a imobilização subsequente de enzima uricase

por meio de uma ligação amida utilizando bis(sulfosuccinimidil) suberato como reagente de reticulação. Como resposta analítica mediu-se a corrente elétrica em função da concentração de ácido úrico, com aplicação de uma diferença de potencial (d.d.p) de +0,26 V conjugado com  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  como marcador redox.

Ani Mulyasuryani *et al.* (2011) desenvolveram um biossensor condutimétrico enzimático para a detecção do AU. A uricase utilizada foi isolada de *Candida utilis* e imobilizada na superfície de um eletrodo de platina modificado com biocelulose. A aplicação do biossensor na determinação de ácido úrico em soro humano permitiu a obtenção de resultados favoravelmente comparáveis com os obtidos em laboratórios médicos.

O trabalho de Y. Liu *et al.* (2013) conduziu a um método simples e de fácil imobilização da uricase em superestruturas de nanopartículas de ouro (NPsAu) e sua aplicação na construção de um biossensor amperométrico para determinação de ácido úrico em amostras de sangue. O desempenho do biossensor apresentou uma elevada sensibilidade e reprodutibilidade de  $108 \text{ mM}^{-1}/\text{cm}^{-2}$  num tempo de resposta inferior a 4s.

Ghosh *et al.* (2015) apresentaram um biossensor eletroquímico para a determinação de ácido úrico no sangue usando ferroceno encapsulado pela uricase seguido da sua imobilização com uma membrana de nafion na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. O uso deste sistema de detecção em amostras de sangue exibiu um limite de detecção de 230 nM em comparação com o método de referência colorimétrico (Bera *et al.*, 2011). Além disso, mostrou excelente seletividade para o AU na presença de agentes interferentes, como o ácido ascórbico, a glicose ou a xantina.

É importante referir que os dispositivos mencionados acima representam apenas uma parte de diversos biossensores descritos na literatura para a detecção do ácido úrico sendo, na sua maioria, dispositivos eletroquímicos. Ainda assim, as suas aplicações em amostras biológicas apresentam, no entanto, algumas limitações.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho versou o desenvolvimento de um biossensor para a determinação do ácido úrico em amostras biológicas, nomeadamente em urina com recurso a uma transdução do tipo piezoelétrica, visando a otimização de parâmetros analíticos relacionados com a análise referida, incluindo a sensibilidade, a seletividade e os limites de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*), o intervalo de resposta linear, entre outros.

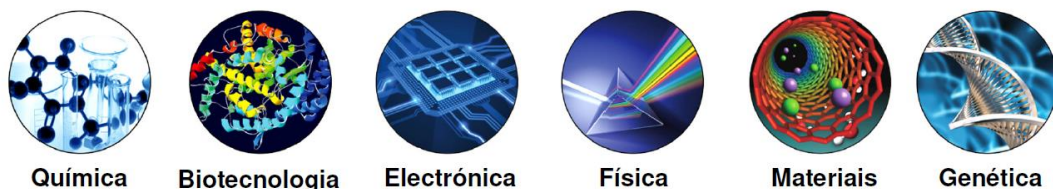
Com efeito, uma revisão bibliográfica revelou que, atualmente, ainda não existe nenhum trabalho publicado que utilize a transdução piezoelétrica para a determinação deste tipo de metabolito, tornando, nesta perspetiva, este trabalho pioneiro e, de certa forma, inovador. Pretende, assim, desenvolver-se um biossensor que assente numa metodologia que se caracterize por ser de fácil operação, resposta rápida, reutilizável e com um custo de utilização reduzido, o que possa traduzir-se, também, em vantagens significativas relativamente a

algumas metodologias já desenvolvidas. Salienta-se, ainda, a possibilidade de determinação direta do ácido úrico sem recurso a marcadores da reação de reconhecimento molecular, como os do tipo ótico, ou enzimático ou redox, o que tornaria a aplicação bastante mais onerosa. No dispositivo desenvolvido foi utilizado como elemento de reconhecimento biológico um anticorpo policlonal (pAbs, do inglês *Polyclonal Antibodies*) contra o ácido úrico, otimizando a utilização do dispositivo em amostras reais de matriz complexas, como por exemplo, em amostras biológicas.

Tendo em conta que o objetivo do trabalho se prende com o desenvolvimento de um biossensor, será dedicada uma secção especial a este tipo de tecnologia onde serão abordadas as principais características relacionadas com a construção do mesmo, bem como os diferentes tipos de traduções e metodologias de imobilização do elemento de reconhecimento biológico.

### 2.3. Biossensores

Atualmente, o desenvolvimento de biossensores é uma área multidisciplinar em forte crescimento, que envolve o conhecimento e competências de áreas tão distintas como a biotecnologia, a genética, a química e a física, a ciência dos materiais ou a eletrónica (figura 2.1), numa perspetiva de complemento mútuo e satisfação das necessidades e limitações de cada uma (Lowe, 2008; Malhotra e Chaubey, 2003).

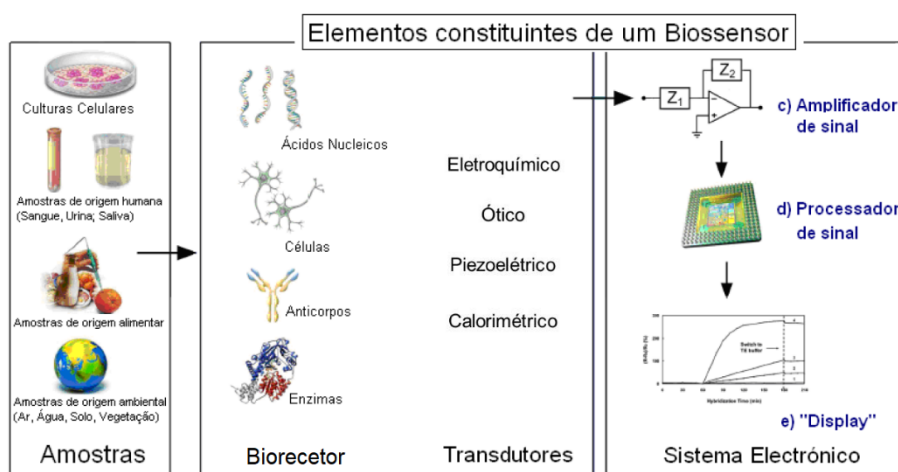


**Figura 2.1** - Áreas do conhecimento tipicamente envolvidos no estudo e desenvolvimento de biossensores, evidenciado a multidisciplinaridade desta área de investigação.

Os biossensores são ferramentas analíticas com aplicações em diversos campos, nomeadamente, no controlo da qualidade alimentar, no diagnóstico médico, na monitorização ambiental e em aplicações militares como, por exemplo, o combate ao terrorismo (Burcu e Kemal, 2015; Mehrotra, 2015). Verifica-se que é na área biomédica que o desenvolvimento de biossensores tem encontrado maior expressão, versando a monitorização contínua de parâmetros, como a concentração de glucose, colesterol, lactato e outros metabolitos no sangue, suor ou saliva (Narwal *et al.*, 2019; Rathee *et al.*, 2016; Sabu *et al.* 2019), o diagnóstico precoce de doenças cancerígenas (Cesewski e Johnson, 2020) ou neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (Yang *et al.*, 2020) ou a deteção de

microorganismos patogénicos em amostras biológicas (Cesewski e Johnson, 2020). O sucesso dos biossensores na área biomédica perspectiva que estes dispositivos serão, num futuro próximo, uma ferramenta indispensável na monitorização clínica da saúde das pessoas e também no diagnóstico precoce de diversas patologias. (Metkar e Girigoswami, 2019). Ao longo dos anos, têm sido feitos esforços para tornar estes sistemas em tecnologias *point-of-care*, de modo a aumentar a eficiência, portabilidade e simplicidade das análises (Malhotra e Chaubey, 2003).

A definição de biossensor foi convencionada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e refere que um biossensor pode ser considerado como um “dispositivo analítico que incorpora um elemento reconhecimento biológico (ERB) que reconhece e interage com a molécula alvo ou analito presente numa amostra e, por meio do transdutor, este evento de biorreconhecimento é transduzido num sinal elétrico discreto ou contínuo, diretamente proporcional à quantidade de analito na amostra” (Naranjo e Aguilar, 2019). Assim, um biossensor é constituído, essencialmente, por um elemento de reconhecimento biológico ou bioreceptor e por um elemento transdutor (figura 2.2).



**Figura 2.2** - Principais elementos que constituem um biossensor. Adaptada de Thangamani *et al.*, 2017

Um biossensor deve ser claramente diferenciado de um sistema bioanalítico ou bioprocesso, que requer sucessivas etapas de processamento incluindo a adição de reagentes (Koyun *et al.*, 2012). Com efeito, os instrumentos analíticos que não incorporem um elemento de reconhecimento biológico não podem ser considerados biossensores, mesmo se aplicados na análise de amostras biológicas. Além do mais, um biossensor deve ser um dispositivo sem reagente, ou seja, a adição de reagentes específicos não deve acontecer além da relacionada com a disponibilização da amostra a ser analisada (Monteiro e Almeida, 2019). O próprio dispositivo já incorpora os reagentes e elementos necessários para a análise, nomeadamente, o bioreceptor e o elemento de transdução.

O primeiro trabalho na área dos biossensores deve-se a *Clark e Lyons (1962)*, com descrição do primeiro dispositivo para determinação de glucose no sangue. Este dispositivo de 1ª geração constitui a base para aquele que é hoje o biossensor mais utilizado, designadamente, o medidor pessoal de glucose no sangue. Desde então, diversas melhorias foram efetuadas, e apenas em 1987 foi introduzido no mercado o primeiro medidor de glucose pessoal pela empresa “*Medisense*” (*Matthews et al., 1987*). Salienta-se, ainda, em termos de biossensores comerciais de sucesso significativo, o desenvolvimento posterior do teste de gravidez (*T. Lee, 2008*) e do dispositivo para medição do colesterol (*Arya et al., 2008*).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento de reconhecimento biológico, o tipo de transdução do sinal ou uma combinação de ambos.

### **2.3.1. Elemento de reconhecimento biológico**

A principal característica de um biossensor prende-se com o elemento de reconhecimento que neste tipo de sensores é um sistema biológico ou bioreceptor, cujas características naturais e interação específica com a espécie alvo são responsáveis pela elevada especificidade e seletividade, tipicamente exibidas por estes dispositivos. De um modo geral, para a escolha do elemento de reconhecimento biológico deve levar-se em consideração a natureza do analito, a sua concentração na amostra, a presença ou ausência de substâncias interferentes, assim como outras condições inerentes à análise, nomeadamente, a temperatura e o pH do meio reacional (*Lowe, 2008*).

Dependendo do tipo de elemento de reconhecimento biológico utilizado, os biossensores podem ser divididos em dois grupos: biossensores catalíticos e não catalíticos ou de afinidade.

Os biossensores catalíticos usam, predominantemente, enzimas como o elemento de reconhecimento biológico, sendo que neste caso, o mecanismo de reconhecimento molecular assenta numa reação bioquímica catalisada por este tipo de bioreceptor. A enzima utiliza a sua seletividade para se ligar a um substrato específico e catalisar a sua conversão em produtos. A reação catalisada possibilita a produção de um sinal por parte do transdutor, que pode ser baseado quer nos produtos da reação que vão sendo formados, quer nos reagentes que vão sendo consumindo (*Luppa et al., 2001; Patel et al., 2010*). Os biossensores catalíticos podem, ainda, utilizar como ERB, células inteiras ou tecidos biológicos, sendo ambos os sistemas considerados como fontes de enzimas, com um mecanismo de funcionamento semelhante ao descrito anteriormente.

Os biossensores não catalíticos ou de afinidade são baseados na interação (ou reconhecimento) por afinidade específica com formação de um biocomplexo entre o bioreceptor e o analito. Os elementos de reconhecimento biológico tipicamente utilizados neste tipo de biossensores incluem anticorpos e cadeias simples de ácidos nucleicos que reconhecem,

respetivamente, antigénios e sequências nucleotídicas complementares (Luppa *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2010). Contrariamente aos biossensores catalíticos, não existe conversão/consumo do analito, logo a composição química da amostra mantém-se inalterada e, desta forma, a amostra pode ser reutilizada para novos ensaios com a mesma metodologia, ou com outra diferente, com vista à validação dos resultados obtidos.

Os biossensores podem, ainda, ser designados pela natureza do processo e de acordo com o seu componente biológico. Serão, por exemplo, biossensores enzimáticos quando utilizam uma enzima como bioreceptor, imunossensores quando utilizam anticorpos ou genossensores quando utilizam cadeias de ácidos nucleicos (Pejcic *et al.*, 2006).

Tendo em conta que o objetivo do presente trabalho se prende com o desenvolvimento de um imunossensor piezoelétrico para a determinação do ácido úrico em amostras de urina, o ponto seguinte aborda com mais algum pormenor este tipo de dispositivo.

### **2.3.1.1. Imunossensor**

Os imunossensores têm-se tornado cada vez mais populares e utilizados devido ao seu excelente desempenho analítico em termos de seletividade e sensibilidade. Adicionalmente, os últimos avanços na áreas da eletrónica e dos nanomateriais têm ainda permitido a miniaturização destes dispositivos sem comprometer o seu desempenho analítico (Lim e Ahmed, 2019).

Os imunossensores são dispositivos analíticos que podem ser utilizados, essencialmente, para a determinação de macromoléculas, como por exemplo, proteínas, assim como de diversas outras espécies de interesse e microrganismos patogénicos. Os imunossensores utilizam anticorpos, como elemento de biorreconhecimento, cuja especificidade e seletividade otimizam significativamente a performance analítica destes dispositivos. Embora os imunossensores, por norma, contenham anticorpos imobilizados e sejam capazes de reconhecer antigénios, a reação oposta também é possível. Isso significa que o imunossensor pode ser construído utilizando um antigénio imobilizado como ERB e ser utilizado para o reconhecimento de um anticorpo específico (Pohanka, 2018).

A função primária de um sistema imunológico é reconhecer e identificar todas as células e moléculas como parte do mecanismo de defesa e classificá-las como prejudiciais ou não prejudiciais.

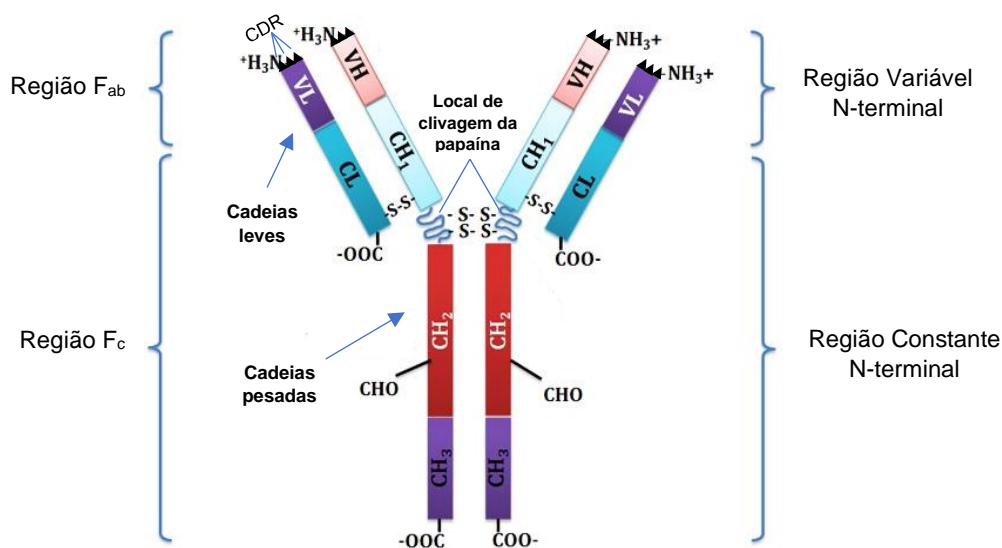
Os anticorpos são glicoproteínas segregadas pelos linfócitos B do sistema imunitário, que reconhecem e se ligam a um determinado antigénio (invasor estranho), geralmente a uma proteína exógena, desencadeando uma resposta imunitária (Glick *et al.*, 2009). A região específica do antigénio reconhecida pelo anticorpo é denominado por epítopo ou determinante antigénico e vai ligar-se à uma região da imunoglobulina designada por paratopo.

Os anticorpos pertencem à família das imunoglobulinas (Ig) e estão entre os componentes proteicos mais abundantes no sangue, constituindo cerca de 20% da proteína total no plasma. A unidade estrutural básica de uma molécula de anticorpo em forma de Y, consiste em quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves (L) (cada uma contendo cerca de 220 aminoácidos) e duas cadeias pesadas (H) (cada uma contendo geralmente cerca de 440 aminoácidos) idênticas, que estão ligadas por ligação dissulfeto (S-S) e ponte de dissulfureto (Alberts *et al.*, 2008).

A nível funcional possuem duas regiões principais, a variável e a constante, sendo a primeira a responsável pelo reconhecimento do antígeno e a segunda possui propriedades efetoras. O domínio variável confere especificidade ao anticorpo, dada a diversidade das sequências aminoacídicas da região variável das cadeias leves e das cadeias pesadas.

Em cada região variável existem três sub-regiões variáveis (hipervariáveis), ou regiões determinantes de complementaridade (CDR, do inglês *Complementarity Determining Region*) que correspondem ao centro de ligação ao antígeno. Esta ligação é estabelecida por ligações electrostáticas, pontes de hidrogénio, forças de *van der Waals* ou forças hidrofóbicas (Arosa *et al.*, 2012).

A estrutura geral de um anticorpo encontra-se representada na figura 2.3. As moléculas de anticorpos podem ser digeridas por proteases. Quando a digestão é efetuada pela papaína com uma protease obtém-se um fragmento de ligação ao antígeno (Fab) que inclui as extremidades variáveis do anticorpo e um fragmento cristalizável bem conservado (Fc). Quando a digestão é feita pela pepsina, é produzido um fragmento designado por  $F(ab')_2$ , onde os dois braços do anticorpo permanecem unidos, e o restante é clivado em vários fragmentos menores (Lee *et al.*, 2013).



**Figura 2.3** - Estrutura geral de um anticorpo.

O anticorpo liga-se ao antígeno alvo com alta afinidade e, portanto, é capaz de detetar um determinado analito mesmo na presença de substâncias interferentes. Os anticorpos, dependendo da especificidade de ligação ao epítipo, podem ser classificados como policlonais ou monoclonais (Karunakaran *et al.*, 2015).

Os anticorpos policlonais são sintetizados pelo sistema imunitário de animais e, portanto, são produzidos anticorpos em várias células B. Consequentemente, o antígeno pode ser reconhecido de várias formas, isto é, estes anticorpos reconhecem vários locais da proteína. São altamente sensíveis, mas menos específicos, uma vez que podem reconhecer epítopos diferentes, sujeitando-os a reatividade cruzada.

Os anticorpos monoclonais são idênticos aos policlonais, pois são produzidos a partir da mesma linhagem de células B, mas só reconhecem um local da proteína, tornando-os altamente específicos. Devido à sua especificidade, os anticorpos monoclonais são excelentes como anticorpo primário em imunoenaios, ou até mesmo para detetar antígenos específicos na presença de moléculas interferentes (Karunakaran *et al.*, 2015). Porém, a sua produção é mais onerosa e complexa, comparativamente à dos anticorpos policlonais que são de fácil reprodução em laboratório (Tohill, 2009).

Um biossensor baseado no conceito de imunologia, também conhecido como imunossensor, utiliza o anticorpo (Ab, do inglês *Antibody*) ou fragmentos como bioreceptor para o reconhecimento molecular específico de antígeno (Ag, do inglês *Antigen*), ou seja, analítico e, subsequentemente, formar um imunocomplexo estável (AbAg) (equação 2.2). O imunocomplexo é determinado e medido pelo acoplamento dessa reação à superfície de um transdutor (Lim e Ahmed, 2019).

Os imunoenaios estão entre as técnicas analíticas mais específicas, fornecendo limites de deteção extremamente baixos, podendo ser usados para as mais variadas substâncias.



Idealmente, um imunossensor deve ser desenvolvido tendo por base as seguintes premissas: (i) capacidade de identificar antígenos alvo rapidamente; (ii) capacidade de gerar imunocomplexos sem a necessidade de adicionar reagentes suplementares; (iii) capacidade de dar resultados com alta reprodutibilidade; e (iv) capacidade de detetar facilmente o alvo em amostras reais (Lim e Ahmed, 2019).

Nos imunoenaios, a deteção do analito alvo pode ser feita de forma direta, observando a formação de imunocomplexos sem recurso a marcador, ou indireta, recorrendo a um marcador, por exemplo, fluorocromos ou nanopartículas de ouro para observar um evento de ligação.

Nas últimas três décadas, o uso do conceito imunológico em biossensores produziu resultados importantes e interessantes. É comumente usado em vários setores industriais (como agricultura e indústrias farmacêuticas e alimentares), análises e diagnósticos clínicos, análises forenses, controlo de doenças epidémicas e programas de prevenção (Lim e Ahmed, 2019).

Os imunossensores são dispositivos que se caracterizam por apresentarem, adicionalmente, elevada exatidão, precisão e baixo custo associado. Face ao exposto, ao longo dos anos, vários têm sido os trabalhos publicados sobre a utilização de imunossensores, nomeadamente, na área de biomédica, para a determinação de diversas patologias/metabolitos. Se seguida serão apresentados alguns exemplos de imunossensores até agora desenvolvidos.

Uma aplicação interessante é a determinação da gonadotrofina coriónica humana (hCG) por um imunossensor amperométrico, descrito por Chetcuti *et al.*, 1999. Os autores utilizaram Nafion, para imobilizar anticorpos monoclonais anti-hCG num eletrodo de carbono vítreo.

Chou *et al.*, (2004) desenvolveram um novo imunossensor de ferritina humana usando Ab anti-ferritina humana, imobilizados no disco de ouro de uma microbalança de cristal de quartzo.

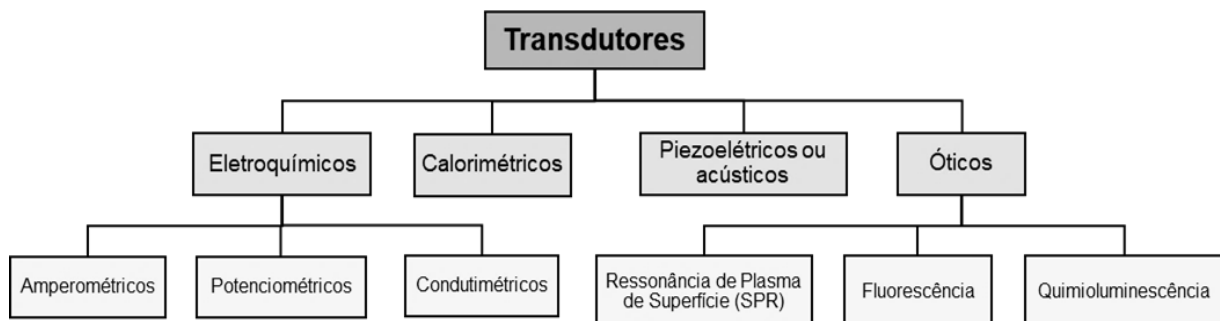
Liang *et al.* (2004) desenvolveram um imunossensor potenciométrico para a determinação do antigénio do cancro de mama (CA15-3), utilizando glutaraldeído para imobilizar o Ab CA15-3 num filme sol-gel funcional.

Al-Khafaji *et al.* (2012) desenvolveram uma abordagem simples e sensível para a deteção do recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). O ensaio proposto é baseado num formato de sanduíche, no qual um anticorpo monoclonal primário anti-HER2 é acoplado a esferas magnéticas modificadas com proteína A. As esferas modificadas são então utilizadas para capturar a proteína da solução de amostra e o ensaio em sanduíche é realizado pela adição de um anticorpo policlonal anti-HER2 secundário marcado com biotina. O conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina foi então adicionado para monitorizar a reação de afinidade. O imunossensor desenvolvido apresentou resultados bastante satisfatórios e promissores para uma aplicação em contexto real.

### **2.3.2. Transdutor**

O transdutor é um elemento integrante de um biossensor, cuja função é de converter o resultado da interação entre o ERB e a espécie de interesse numa resposta mensurável com “formato” analítico adequado. Nas últimas décadas, tem vindo a verificar-se o desenvolvimento de diversas técnicas de transdução possibilitando também o desenvolvimento de novas arquiteturas de biossensores com diferentes metodologias e

possibilidades mais alargadas de deteção e quantificação de espécies de interesse. A figura 2.4 mostra os tipos de transdução tipicamente utilizados na montagem de um biossensor assim como a classificação ou designação dos dispositivos em função do tipo de transdutor que utiliza.



**Figura 2.4** - Classificação do biossensor baseado nos diferentes tipos de transdutores.

Os transdutores eletroquímicos são os mais amplamente utilizados na tecnologia dos biossensores tendo em conta, designadamente, a possibilidade de miniaturização que oferecem, sobretudo em face do tipo de materiais envolvidos na sua montagem permitindo, inclusivamente, o desenvolvimento de dispositivos implantáveis, como por exemplo o medidor de glucose pessoal (Tothill, 2009).

No entanto, recentemente, os transdutores óticos e piezoelétricos têm também vindo a ganhar uma maior notoriedade e a sua utilização está em grande expansão com aplicações práticas (Pirzada e Altintas, 2020; Lemana e Sabahudin, 2017).

Tendo em conta o objetivo do presente trabalho será dada maior atenção aos transdutores piezoelétricos, considerando, também, as características principais dos restantes tipos de transdutores.

### **2.3.2.1. Transdutores eletroquímicos**

Os biossensores com transdução eletroquímica são os biossensores mais amplamente investigados e utilizados, cujos princípios operacionais dependem das propriedades eletroquímicas do analito e do transdutor. Estes transdutores detetam e medem alterações eletroquímicas que ocorrem na sua superfície onde o ERB é tipicamente imobilizado em resultado da interação que este estabelece com o analito.

A vantagem dos biossensores montados com este tipo de transdução prende-se com a simplicidade de operação, o baixo custo associado e a variedade de materiais disponíveis para o efeito. Adicionalmente, diversos tipos de materiais e nanomateriais tipicamente utilizados como transdutores eletroquímicos permitem uma fácil miniaturização dos

dispositivos, visando a fabricação de biossensores implantáveis (Patel *et al.*, 2016). Os transdutores eletroquímicos englobam os do tipo amperométrico, potenciométrico e condutimétrico, cujas principais características se descrevem a seguir.

#### **2.3.2.1.1. Transdutores amperométricos**

A transdução amperométrica envolve a produção de uma corrente elétrica em resultado da ocorrência de uma reação da oxidação ou redução de uma espécie eletroativa envolvida no processo de reconhecimento molecular. A força eletromotriz para a reação de transferência de elétrons das espécies eletroativas resulta da aplicação de uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho (tipicamente o transdutor) e um eletrodo de referência. A corrente obtida, proporcional à concentração da espécie de interesse, é uma medida da velocidade de transferência de elétrons entre o analito e o transdutor, e ao mesmo tempo um indicador da ocorrência do processo de reconhecimento molecular (Lim e Ahmed, 2017; Karunakaran *et al.*, 2015). Os materiais de eletrodo tipicamente utilizados neste tipo de aplicação incluem a plantina, o carbono vítreo, o ouro, o grafeno, os nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas.

Este tipo de transdução permite uma resposta rápida, sensível, com uma precisão significativa e para um intervalo de resposta linear relativamente alargado. No entanto, a seletividade pode ser por vezes comprometida, em face das interferências de outras substâncias eletroativas presentes na amostra com potenciais redox semelhantes ao da espécie de interesse (Naresh e Lee, 2021).

#### **2.3.2.1.2. Transdutores potenciométricos**

A transdução potenciométrica envolve a medição de uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência, quando a corrente elétrica é nula (corrente zero) que é função da variação da concentração de espécies iónicas na amostra. Na realidade, esta diferença de potencial traduz a acumulação ou depleção de espécie com carga tipicamente iões, em resultado da reação de reconhecimento molecular.

O transdutor pode ser um eletrodo seletivos de iões (ISE, do inglês *Ion-Selective Electrode*) que é um sensor eletroquímico baseado em filmes finos ou membranas seletivas na superfície das quais é imobilizado o ERB (Thévenot *et al.*, 2001). A diferença de potencial resultante, no caso de um ISE, é linearmente dependente do logaritmo da atividade do ião alvo na amostra de acordo com uma equação formalmente idêntica à equação de Nernst (equação 2.3) (Faridbod *et al.*, 2010).

$$E = K \pm \left( \frac{2.303 RT}{nF} \right) \log C \quad (2.3)$$

onde, K corresponde ao termo constante, S o declive experimental da “equação de Nernst”, que teoricamente tem um valor igual a 59,2mV e que permite avaliar a performance analítica do transdutor, ou seja, do ISE, C é a concentração do ião a que o transdutor “responde”, n é o número de oxidação do ião, F é a constante de *Faraday*, R corresponde à constante universal dos gases e T à temperatura.

Os elétrodos seletivos de iões mais utilizados como transdutores potenciométricos incluem os de H<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, NH<sup>4+</sup> ou de gases (ESG) como o CO<sub>2</sub>, o NH<sub>3</sub> ou o O<sub>2</sub>.

### 2.3.2.1.3. Transdutores condutimétricos

Neste tipo de transdução é medida a variação de condutividade ou condutância da amostra, função da variação da concentração de espécies com carga, tipicamente espécies iónicas. Normalmente, um transdutor condutimétrico consiste em dois elétrodos de metal separados por uma certa distância entre os quais é aplicada uma corrente alternada. A condutividade medida resulta do somatório da mobilidade adquirida pelos iões presentes entre os elétrodos, em função da perturbação aplicada. Esta resposta analítica depende, entre outros fatores, da concentração da espécie iónica.

Quando o processo de reconhecimento molecular produz iões ou eletrões, a condutividade ou resistividade da solução é alterada e essa alteração é medida pelo transdutor condutimétrico adequado (Mohanty e Kougianos, 2006).

As principais vantagens do transdutor condutimétrico prende-se com a não exigência do elétrodo de referência, o baixo custo associado e a possibilidade de miniaturização (Karunakaran *et al.*, 2015). As medições de condutância apresentam uma sensibilidade relativamente elevada, permitindo, também, a obtenção de limites de deteção baixos (tipicamente inferior a 10<sup>-4</sup> M) (Mohanty e Kougianos, 2006).

### 2.3.2.2. Transdutores óticos

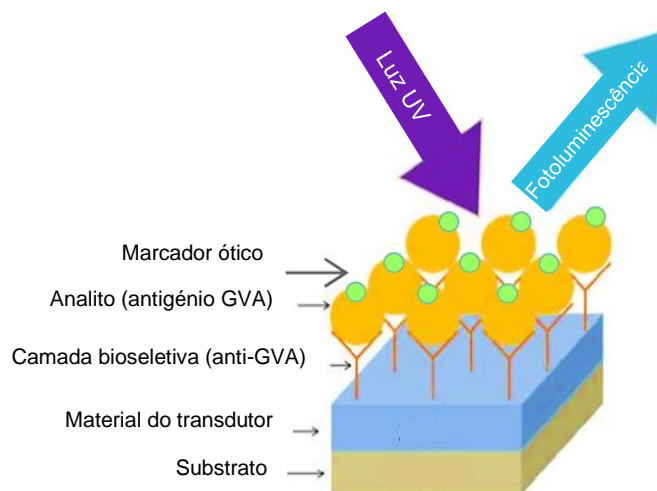
O processo de transdução ótica efetua-se com base na medição da alteração do valor de determinados parâmetros óticos de um feixe de radiação (quando este atravessa a biocamada), tais como a intensidade de luz absorvida/emitada, a frequência, o plano de polarização, entre outros, decorrente do processo de reconhecimento molecular. A luz num dispositivo ótico, é direcionada para a superfície de deteção (biocamada) através de uma fibra ótica e as alterações experimentais pelo feixe de reação são medidas por um detetor,

sinalizando as alterações físicas ou químicas que ocorrem ao nível da biocamada em resultado do processo de reconhecimento molecular.

A aproximação mais comum inclui, tipicamente, a medição da intensidade de radiação absorvida (absorvância) ou emitida (fluorescência).

Uma desvantagem significativa deste tipo de transdutores, prende-se com o facto de não poderem ser miniaturizados facilmente em face dos equipamentos óticos e espectrofotométricos envolvidos no processo de transdução do sinal, que resulta de interação entre o ERB e o analito.

Este tipo de transdução pode ser efetuado indiretamente e, neste caso, para deteção dos eventos de ligação e reconhecimento molecular torna-se necessário recorrer à utilização de marcadores de reação, como por exemplo cromóforos ou fluoróforos (figura 2.5). Os métodos indiretos envolvem um mecanismo de medição e análise mais complexo, com custos associados mais elevados, em função de introdução de espécies, designadamente, os marcadores de reação de reconhecimento biológico.



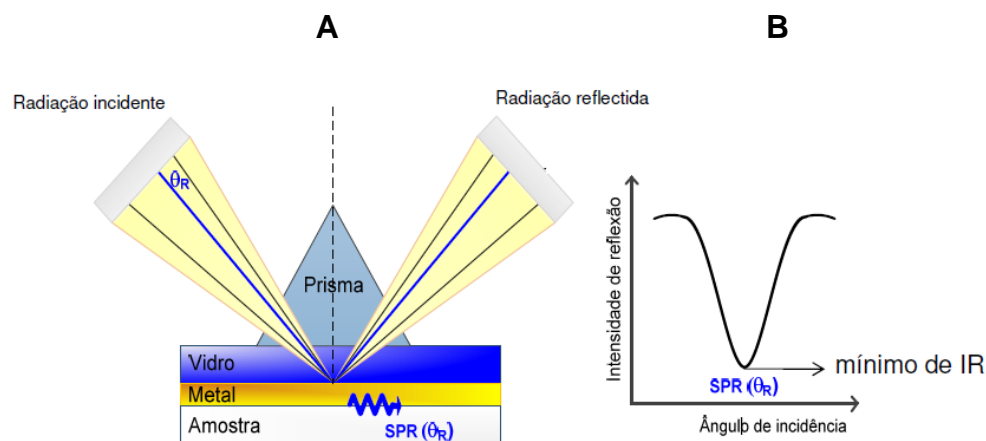
**Figura 2.5** - Esquema representativo da transdução ótica com recurso a um marcador.  
 Adaptada de Tereshchenko *et al.*, 2017.

A transdução ótica pode ainda ser efetuada diretamente sem recorrer à utilização destes marcadores. (Saylan *et al.*, 2019). Um exemplo típico da deteção direta inclui a que se baseia na ressonância do plasmão de superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*). Neste tipo de transdução é utilizado um feixe de radiação eletromagnética para monitorização direta de alterações nas propriedades físicas da biocamada (designadamente a variação da densidade ótica e do índice de refração), decorrentes da interação com o analito de interesse.

Um plasmão de superfície pode ser entendido como uma onda eletromagnética que se propaga ao longo da superfície de uma camada fina de um metal. Este conceito assenta no facto de os eletrões livres de um metal poderem ser considerados como uma solução destas partículas de elevada densidade (plasma). A excitação do plasmão de superfície é baseada

no efeito de reflexão interna total de um feixe de luz, quando este incide numa camada de metal (tipicamente de ouro) localizada entre um sensor de vidro e um meio externo. A imobilização do ERB é efetuada na superfície metálica, ficando em contacto com a amostra (meio externo). Um feixe de luz monocromática polarizada é focado por intermédio do prisma na parte inferior do filme metálico, num intervalo de valores de ângulo de incidência ( $\theta$ ) passíveis de provocar reflexão interna. A cada um dos ângulos de incidência corresponde um determinado ângulo de reflexão interna. A um determinado valor de ângulo de incidência do feixe de luz, a excitação do plasmão de superfície é promovida pela absorção de fótons da radiação pelos eletrões do metal. O efeito resultante (a ressonância do plasmão de superfície) conduz a um valor mínimo de intensidade da luz refletida (IR). O ângulo de incidência que promove a excitação do plasmão de superfície é designado por ângulo de ressonância ( $\theta_R$ ). O perfil de variação da intensidade da radiação refletida internamente em função do valor do ângulo de incidência exibirá um mínimo de intensidade, quando o ângulo de incidência corresponder ao ângulo de ressonância. Para ângulos superiores ao ângulo de ressonância o fenómeno ótico deixa de se observar e a intensidade da radiação refletida volta a aumentar (Silva, 2016).

A figura 2.6 mostra o princípio de funcionamento da ressonância do plasma de superfície, onde se pode observar também o perfil de variação da intensidade da radiação refletida internamente com o ângulo de incidência.



**Figura 2.6** – (A) Princípio de funcionamento de um transdutor do tipo SPR; (B) Perfil de variação da intensidade da radiação refletida em função do ângulo da radiação incidente.

O valor do ângulo de ressonância, além de depender do comprimento de onda da radiação utilizada, é extremamente sensível a alterações das propriedades do meio adjacente à superfície metálica, em particular do índice de refração. Mantendo o comprimento de onda da radiação constante, a variação do valor do ângulo de ressonância (e consequentemente do

mínimo de intensidade observado) dependerá apenas da variação do índice de refração à superfície do filme metálico. Assim, se este parâmetro sofrer alguma alteração (quando a espécie de interesse se liga ao ERB e faz variar a densidade ótica e o índice de refração da biocamada) será necessário proceder a uma compensação do ângulo de incidência para que a excitação do plasmão de superfície ocorra.

### 2.3.2.3. Transdutores piezoelétricos

Os transdutores piezoelétricos, à semelhança dos transdutores do tipo SPR, também permitem a determinação da espécie de interesse sem recurso a marcadores da reação de reconhecimento molecular. Neste tipo de dispositivo, o elemento de reconhecimento biológico é imobilizado na superfície de um material piezoelétrico, geralmente um cristal de quartzo revestido em ambas as superfícies, com elétrodos de ouro.

O termo "piezoelétrico" é derivado da palavra grega "*piezen*" que significa "pressionar". Os primeiros estudos sobre a piezoelectricidade foram realizados em 1880 por *Jacques e Pierre Curie*, que observaram que uma tensão mecânica aplicada às superfícies de vários cristais causava o estabelecimento de uma diferença de potencial elétrico através do cristal, cuja magnitude era proporcional à tensão aplicada. Além do mais, verificaram também que o efeito piezoelétrico inverso no qual era aplicada uma tensão através desses cristais, determinavam uma deformação mecânica correspondente. A aplicação de um campo elétrico alternado através do substrato de um cristal piezoelétrico origina num movimento vibracional ou oscilatório no cristal, resultando na geração de ondas estacionárias acústicas com uma frequência de vibração característica (frequência nativa) (Tombelli *et al.*, 2005).

São diversos os fatores que afetam a frequência nativa do cristal, nomeadamente, a espessura do *wafers* (disco do cristal), a composição química do cristal, a sua forma e a sua massa. Os materiais piezoelétricos mais utilizados incluem o quartzo, o niobato de lítio ( $\text{LiNbO}_3$ ) ou o tantalato de lítio ( $\text{LiTaO}_3$ ). Estes apresentam propriedades eletroacústicas adequadas, assim como, excelentes propriedades mecânicas. São também quimicamente estáveis e podem operar a temperaturas elevadas. Na maioria das aplicações ao nível dos biossensores, e em face das suas características, o material mais frequentemente utilizado como transdutor piezoelétrico é o quartzo (Lec, 2001).

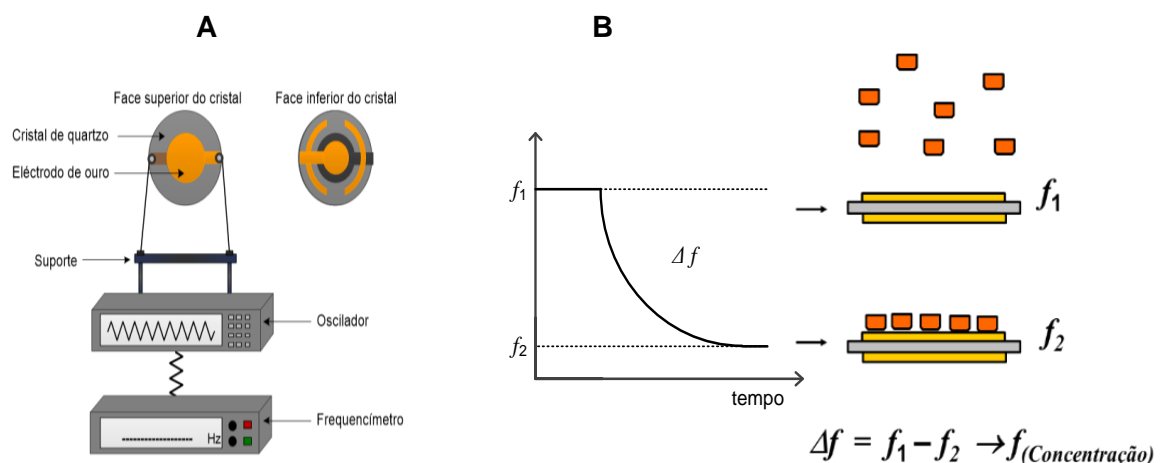
O princípio de funcionamento é o seguinte: o material piezoelétrico é deformado pela tensão alternada aplicada entre dois elétrodos (tipicamente de ouro) fixos em lados opostos, experimenta oscilações mecânicas, cuja frequência das oscilações é medida por um frequencímetro. Quando uma espécie de interesse se liga à superfície do cristal, mais precisamente ao ERB imobilizado na superfície do eletrodo de ouro, o aumento de massa

resultante determina uma diminuição na frequência de vibração do respetivo sensor piezoelétrico (Pohanka, 2018).

A maioria dos transdutores piezoelétricos utilizam microbalanças de cristal de quartzo (QCM, do inglês *Quartz Crystal Microbalance*) que permitem detetar as variações de massa na biocamada e a correspondente variação da frequência de vibração do cristal piezoelétrico. Este tipo de transdutor é bastante utilizado na construção de imunossensores e também de sensores que utilizam cadeias simples de ácidos nucleicos como ERB, sinalizando, respetivamente, a ligação de um anticorpo de interesse ou de uma sequência nucleotídica alvo.

A figura 2.7A mostra um esquema de uma QCM com os principais elementos que constituem o sistema sensor. A variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo ao longo do tempo, em função do estabelecimento de uma bioreação de interesse na superfície do eléctrodo e da conseqüente variação de massa, conduz à obtenção de um perfil semelhante ao representado na figura 2.7B. Durante o evento de biorreconhecimento e ligação do analito ao bioreceptor, a massa efetiva na superfície do cristal de Quartzo aumenta causando uma diminuição na frequência de oscilação do cristal, proporcional à concentração de espécie de interesse que se liga ao ERB.

Este tipo de transdução permite a deteção e sinalização da espécie de interesse diretamente sem recurso à utilização de marcadores de reação e em tempo real. Por outro lado, considerando que a QCM é um sensor de massa, a adsorção não específica de outras espécies presentes na amostra à superfície do dispositivo pode constituir uma interferência importante.



**Figura 2.7** - Representação esquemática de uma Balança de Cristal de Quartzo.

### **2.3.3. Metodologias de imobilização do elemento de reconhecimento biológico**

Uma etapa fundamental no desenvolvimento de um biossensor, visando um bom desempenho analítico global, prende-se com a imobilização do elemento de reconhecimentos biológico. É essencial que a metodologia de imobilização utilizada permita que a estrutura do ERB seja mantida de forma a preservar a sua função e atividade biológicas após a imobilização e durante a utilização do dispositivo (Sassolas *et al.*, 2012). Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens. A escolha da técnica mais adequada deve ser efetuada tendo em conta vários fatores, tais como, a natureza do elemento de reconhecimento biológico, o material do transdutor, o tipo de transdução e as condições reacionais (como, por exemplo, a agitação da amostra, o regime de fluxo utilizado ou a temperatura e o pH da amostra a analisar).

Os processos de imobilização de biomoléculas na superfície do transdutor podem dividir-se em dois métodos: imobilização física (reversível) e imobilização química (irreversível). Os métodos físicos que incluem, por exemplo, a adsorção física, o encapsulamento em géis ou a imobilização em matrizes poliméricas são de simples execução, mas as interações entre as biomoléculas e o suporte são relativamente fracas, podendo levar à sua lixiviação. Os métodos químicos são relativamente mais complexos e morosos, no entanto devido à formação de ligações covalentes entre as biomoléculas e a superfície do transdutor, a estabilidade do ERB imobilizado é, geralmente, maior do que a obtida com os métodos físicos (Susanto *et al.*, 2013). De um ponto de vista mais abrangente, as técnicas de imobilização de biomoléculas mais comumente utilizadas na construção de biossensores são a adsorção física, a ligação covalente, a ligação covalente cruzada, o encapsulamento e o confinamento em filmes ou membranas poliméricas.

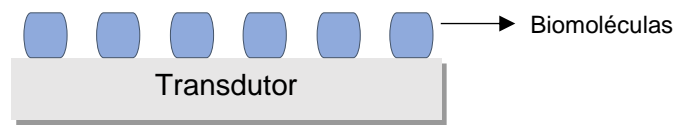
#### **2.3.3.1. Adsorção física**

A adsorção física é o método mais simples utilizado na imobilização de moléculas biológicas. Nesta metodologia o ERB é imobilizado na superfície do transdutor por ligações não covalentes, incluindo força de *van der Waals*, interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogénio, que promovem a adsorção do biomaterial à superfície do transdutor.

Consiste na aplicação de uma gota de solução contendo o ERB na superfície do transdutor seguida de evaporação até à secura. O material biológico não adsorvido, é posteriormente removido através da lavagem do transdutor com uma solução adequada.

Os materiais tipicamente utilizados como suportes para adsorção física incluem a sílica, o acetato de celulose, a alumina ( $Al_2O_3$ ), o carvão ativado, o vidro, a hidroxiapatite, os nanotubos de carbono, as nanopartículas de ouro ou polímeros sintéticos.

Este método é de execução simples e rápida, não recorre à funcionalização da superfície do transdutor e geralmente apresenta um baixo custo associado. No entanto, verifica-se um controlo difícil da intensidade das interações entre o ERB e a superfície do transdutor, isto é, se estas forem demasiado fortes poderá observar-se uma alteração na estrutura e função biológica do bioreceptor, se forem demasiado fracas poderá haver lugar à desadsorção (lixiviação) prematura do ERB. É geralmente a metodologia utilizada em ensaios ou estudos preliminares que envolvam o desenvolvimento de um biossensor para determinada aplicação. A figura 2.8 mostra um esquema que traduz a imobilização do ERB por adsorção física.

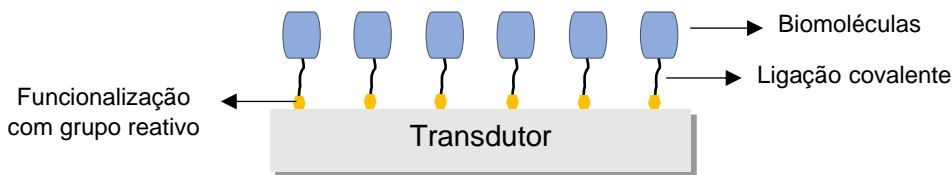


**Figura 2.8** - Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por adsorção física

### 2.3.3.2. Ligação covalente

Esta é a metodologia de imobilização mais utilizada na qual o ERB é imobilizado por meio de uma ligação covalente estabelecida entre as biomoléculas e grupos reativos existentes na superfície do transdutor (Naresh e Lee, 2021). A ligação das biomoléculas ao transdutor é geralmente realizada após a funcionalização inicial da sua superfície, que consiste na introdução de grupos reativos específicos que permitam a posterior ligação covalente do ERB. Tipicamente, a superfície do transdutor pode ser funcionalizada com grupos amina ( $-NH_2$ ), carboxílico ( $-COOH$ ), carbonilo ( $-CO$ ), tiol ( $-SH$ ), fenol ( $C_6H_5OH$ ) ou hidroxilo ( $-OH$ ), aos quais os materiais biológicos se podem ligar. Desta forma é também possível aumentar a reatividade e a biocompatibilidade de materiais inertes, visando a imobilização de diversos tipos de biomoléculas.

Comparativamente à adsorção física, verifica-se que a ligação covalente apresenta vantagens importantes, nomeadamente a nível da distribuição uniforme e da orientação do ERB na superfície do transdutor, bem como da reprodutibilidade do processo de imobilização. Pode, ainda, diminuir ou eliminar alguns problemas que se verificam em outras metodologias de imobilização tais como a instabilidade, a lixiviação, a agregação ou a inativação biológica de biomoléculas. Contudo, a funcionalização da superfície do transdutor previamente à imobilização das biomoléculas, aumenta a complexidade, a morosidade e os custos associados ao procedimento (Monošík, *et al.*, 2012; Sassolas *et al.*, 2012). A figura 2.9 esquematiza a imobilização do ERB de um transdutor por ligação covalente.

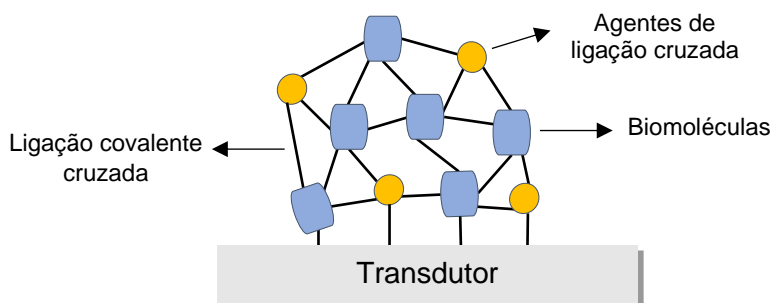


**Figura 2.9** - Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por ligação covalente

### 2.3.3.3. Ligação covalente cruzada

A ligação covalente cruzada, também designada por *cross-linking* ou reticulação, consiste na utilização de agentes de ligação cruzada que atuam como um ligante para imobilizar biomoléculas em agregados reticulados 3D na superfície do transdutor. O agente de ligação cruzada mais frequentemente utilizado é o glutaraldeído (GA) com a fórmula química  $C_5H_8O_2$ . O processo de imobilização inicia-se com a ligação entre os grupos carbonilo eletrófilos do GA e os grupos nucleófilos, amina, tiol ou imidazol das proteínas. A ligação dos aglomerados formados ao transdutor é garantida por uma nova interação entre os grupos carbonilos do GA que ficaram por reagir e grupos reativos existentes na superfície do transdutor.

A utilização de GA como agente de ligação cruzada apresenta algumas desvantagens, uma vez que uma elevada concentração de GA pode conduzir a alterações conformacionais das biomoléculas comprometendo a sua função biológica. No caso de células inteiras, a utilização de concentrações elevadas de GA pode determinar o aumento da espessura da parede celular, o que coloca em causa a difusão de espécies de interesse. Ainda assim, uma biocamada constituída por biomoléculas imobilizadas com recurso à utilização de GA ou outros agentes de ligação cruzada apresenta tipicamente uma elevada estabilidade mecânica, assim como uma orientação adequada e uma distribuição uniforme do ERB (Monošík *et al.*, 2012). A figura 2.10 ilustra o processo de imobilização por ligação covalente cruzada.



**Figura 2.10** - Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por ligação covalente cruzada

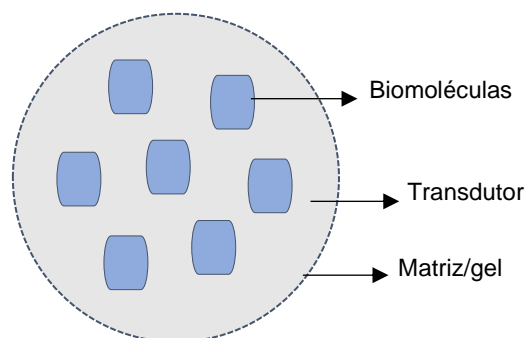
#### 2.3.3.4. Encapsulamento

Este tipo de imobilização é um método físico no qual o ERB é encapsulado numa matriz permeável ou gel. Existem diversos tipos de matrizes ou géis que podem ser utilizados para encapsulamento de moléculas biológicas, no entanto a mais popular é aquela que resulta dos processos sol-gel.

Tipicamente, o processo sol-gel consiste na síntese da matriz por transição de um sistema Sol para um sistema Gel. O termo Sol é utilizado para definir uma solução de partículas precursoras do gel (tipicamente de sílica) num solvente e o Gel a estrutura tridimensional que resulta da aglomeração dessas partículas, contendo fase líquida nos seus interstícios.

O procedimento inclui a adição do ERB à solução inicial do precursor (Sol), conduzindo ao seu encapsulamento nos poros da matriz formada (Gel). O processo sol-gel pode ser realizado à temperatura ambiente, minimizando a possibilidade de desnaturação das biomoléculas. A obtenção de matrizes porosas através desta metodologia com controlo fino do tamanhos dos poros reproduzíveis, ainda parece constituir uma limitação importante inerente ao procedimento.

O facto da matriz porosa obtida ser transparente, constitui uma vantagem significativa enquanto procedimento de imobilização quando a transdução utilizada for do tipo ótico. Adicionalmente, problemas como limitações de difusão dentro da rede porosa, fragilidade da matriz ou baixa reprodutibilidade no procedimento de preparação são aspetos que devem ainda serem estudados e otimizados (Monošík *et al.*, 2012). A figura 2.11 apresenta um esquema representativo do processo da imobilização por encapsulamento.



**Figura 2.11** - Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por encapsulamento

#### 2.3.3.5. Confinamento no interior de uma matriz polimérica

Neste tipo de imobilização, o ERB é confinado fisicamente (não por ligação covalente ou outra) no interior de uma matriz polimérica, a partir de uma solução contendo o respetivo

monómero e o ERB. Os materiais poliméricos utilizados podem ser de origem natural ou sintéticos.

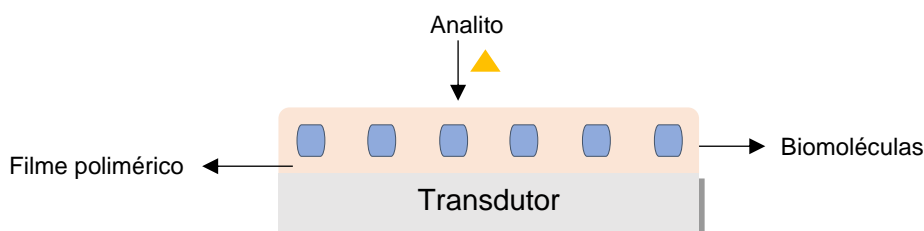
Os polímeros naturais apresentam como principal vantagem a biocompatibilidade com as biomoléculas imobilizadas. Contudo, são mais suscetíveis à ação de microrganismos. Estes incluem a celulose, o dextrano, o quitosano, o amido, a agarose ou a carragenina.

Os polímeros sintéticos apresentam, face aos polímeros naturais, uma menor biocompatibilidade em relação às moléculas biológicas. No entanto, é possível adequar as propriedades físico-químicas e morfológicas às diversas aplicações, para além da menor suscetibilidade a microrganismos. Alguns exemplos de polímeros sintéticos incluem o poliestireno, a poliácridamida, a poliácridonitrilo, o poliuretano, o policarbonato ou a polianilina.

O procedimento inclui a obtenção de um filme polimérico na superfície do transdutor com o ERB confinado no interior, a partir de uma solução contendo o monómero e o ERB.

Em termos gerais, este tipo de imobilização apresenta como principal desvantagem a dificuldade em controlar a porosidade do filme. Uma baixa porosidade poderá conduzir a problemas de difusão da espécie de interesse, por outro lado, uma elevada porosidade poderá resultar na lixiviação do ERB.

A figura 2.12 apresenta um esquema representativo do processo da imobilização por confinamento no interior de uma matriz polimérica.



**Figura 2.12** - Imobilização do ERB na superfície de um transdutor por confinamento no interior de uma matriz polimérica

### 2.3.3.6. Monocamadas automontadas

Tendo em conta que no presente trabalho se procedeu, principalmente, à imobilização de anticorpos na superfície de um eletrodo de ouro com recurso à utilização de monocamadas automontadas, foi decidido abordar esta temática um pouco mais pormenorizadamente.

Com efeito, uma variedade de métodos para imobilização de anticorpos encontra-se descrita na literatura, verificando-se que a imobilização por adsorção física e ligação covalente têm sido amplamente utilizadas devido à sua simplicidade e baixo custo associado (Luppa *et al.*, 2001; Nisnevitch e Firer, 2001; Shen *et al.*, 2017; Tsugimura *et al.*, 2017; Yamazoe, 2019). Porém, em ambas as metodologias os anticorpos imobilizados apresentam, tipicamente, uma

orientação algo aleatória, o que resulta na diminuição da capacidade de ligação ao antigénio. Desta forma, quer a sensibilidade do imunossensor como o seu desempenho analítico global são fortemente comprometidos.

Um anticorpo é considerado adequadamente orientado e perfeitamente ativo quando a sua região Fc, que não tem afinidade de ligação ao antigénio, se encontra imobilizada na superfície de um transdutor ao invés dos locais de ligação ao antigénio (região Fab). Assim, a correta orientação do anticorpo é fundamental para garantir a atividade adequada do local de ligação do antigénio (Shanehbandi *et al.*, 2017; Yamazoe, 2019).

Neste sentido é fundamental a seleção/desenvolvimento de um método de imobilização adequado, visando a otimização do desempenho global do imunossensor. Várias metodologias têm sido propostas sendo uma das mais frequentemente utilizadas aquela que recorre precisamente à utilização de monocamadas automontadas (SAM, do inglês *Self-Assembled Monolayers*) (Hnaien *et al.*, 2008; Taheri *et al.*, 2016; Tsugimura *et al.*, 2017; Cetin *et al.*, 2020).

Com efeito, desta forma, é possível proceder à imobilização de anticorpos na superfície de um transdutor com um nível de orientação e distribuição significativamente elevadas.

O uso de monocamadas automontadas em várias áreas de investigação está em forte crescimento, em particular na área dos biossensores onde se aplicam as SAM como uma camada de interface entre a superfície de substrato e uma solução para a imobilização moléculas biológicas de forma mais adequada (Chou *et al.*, 2004), nomeadamente em termos da sua organização, orientação e homogeneidade, entre outros aspetos.

As SAM são camadas monomoleculares que apresentam uma alta organização, com uma espessura típica de 1 a 3 nm e são formadas espontaneamente na superfície de diversos materiais, como por exemplo, o ouro, prata e a platina.

Os alcanotióis são o grupo de moléculas mais utilizadas na formação de SAM na superfície de ouro, devido à forte interação química entre o átomo de enxofre do grupo tiol (-SH) e a superfície de ouro (Ferreira *et al.*, 2008; Freire *et al.*, 2003). Alguns exemplos deste tipo de moléculas apresentam-se na tabela 2.1.

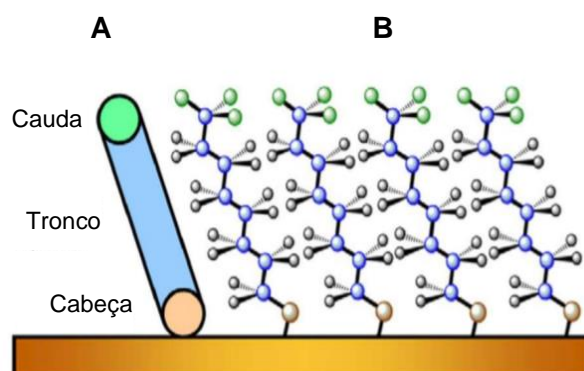
**Tabela 2.1** - Exemplos de moléculas de alcanotóis evidenciado a sua estrutura típica.

| Grupo funcional da cabeça | Estrutura típica                | Designação          |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------|
| -OH                       | <chem>HS(CH2)10OH</chem>        | Hidroxi-alcanotiol  |
| -FRC *                    | <chem>HS(CH2)10Fc</chem>        | Ferrocenoalcanotiol |
| -NH <sub>2</sub>          | <chem>HS(CH2)10NH2 · HCl</chem> | Aminoalcanotiol     |
| -COOH                     | <chem>HS(CH2)10COOH</chem>      | Carboxialcanotiol   |

\*Ferroceno

A estrutura típica de um alcanotiol consiste, tipicamente, em três partes principais (Figura 2.13a):

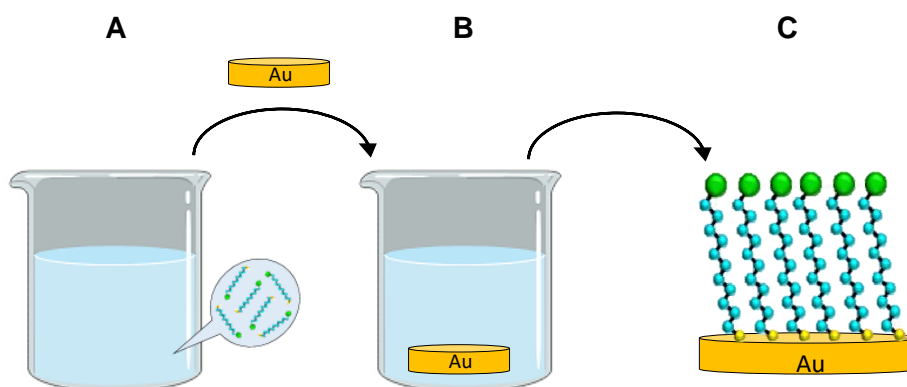
- A **cabeça de enxofre**, constituída por um grupo tiol (-SH) com elevada afinidade para ligação com metais como o ouro;
- A **cadeia de carbono** (de comprimento variável), que estabiliza o SAM através de ligações *Van der Waals* entre cadeias de carbono “vizinhas”;
- O **grupo funcional terminal** como por exemplo o hidroxilo (-OH), o carboxilo (-COOH), o ferroceno (Fc), ou o grupo amina (-NH<sub>2</sub>) que estabelece a ligação com diversos tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, designadamente, enzimas e anticorpos.



**Figura 2.13** – (A) Estrutura típica de um alcanotiol, (B) Estrutura típica de uma monocamada automontada. Adaptada de Srisombat *et al.*, 2011.

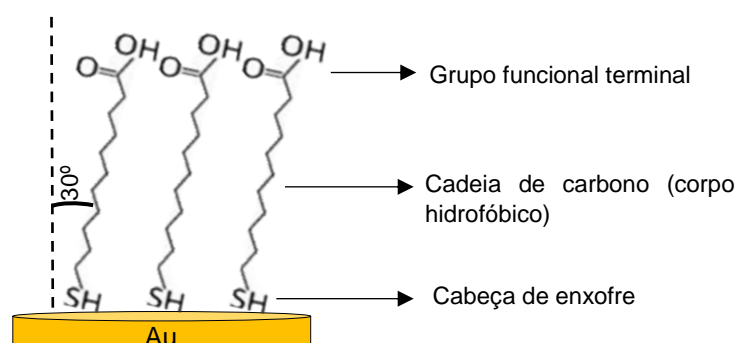
Deve salientar-se a elevada versatilidade inerente à utilização de alcanotóis na formação de SAMs, resultantes dos diferentes grupos funcionais que a molécula pode apresentar, permitindo a ligação a diversos outros tipos de moléculas.

A formação de uma monocamada numa superfície de ouro é um processo espontâneo do ponto de vista termodinâmico. Um esquema simplificado da formação de uma monocamada automontada é mostrado na figura 2.14. Quando uma superfície de ouro é imersa numa solução de um dado alcanotiol, as moléculas começam a ligar-se ao substrato, formando uma ligação Au-S. À medida que o número de ligação Au-S aumenta, as interações intermoleculares entre cada molécula *Van der Waals* de alcanotiol originam uma SAM fortemente orientada e com uma densidade elevada (Love *et al*, 2005).



**Figura 2.14** - Esquema simplificado da formação de uma monocamada automontada (SAM) numa superfície de ouro. Solução contendo o derivado de tiol (A); a superfície de ouro é imersa na solução de derivado de tiol (B); os tióis começam a estabelecer ligação com a superfície de ouro originando a ligação de Au-S (C).

Na figura 2.15 apresenta-se um exemplo da formação da SAM utilizada neste trabalho, constituída por uma molécula cujo grupo funcional terminal é o grupo carboxilo.



**Figura 2.15** – Monocamada automontada formada a partir de um alcanotiol com grupo carboxilo como grupo funcional terminal, evidenciado a ligação do grupo de tiol à superfície de ouro, através do átomo de enxofre.

Uma estrutura bem ordenada obtém-se, tipicamente, em resultado de uma ligação adequada entre os alcanotióis, por norma com uma inclinação de 20° a 30° em relação à normal da superfície, e a superfície do substrato de ouro (Freire *et al.*, 2003). Porém, o arranjo geral e a ligação das SAMs em superfícies de ouro dependem de vários fatores, incluindo o comprimento das cadeias de carbono, a natureza e a distância entre os grupos funcionais terminais, o tempo de imersão e a morfologia do substrato (Bhattarai *et al.*, 2017).

Algumas vantagens inerentes à utilização de SAMs prendem-se com fatores como a simplicidade de preparação, a estabilidade e reprodutibilidade da monocamada formada assim como a possibilidade de sua caracterização utilizando diversas técnicas como, por exemplo, a espectrofotometria.

Os alcanotióis funcionais podem ainda ser modificados adicionalmente com vista à possibilidade de ligação de outras moléculas de interesse, como por exemplo, moléculas biológicas. No caso particular do alcanotiol utilizado no presente, o grupo carboxilo, que constitui a cabeça da molécula, pode ser modificado, com vista à obtenção de ésteres ativados, utilizando como agentes de ativação o 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e o N-Hidroxisuccinimida (NHS). Estes grupos éster ativados permitem a ligação de proteínas, como por exemplo anticorpos. Esta metodologia permite uma orientação muito significativa dos anticorpos. No entanto, esta orientação pode ainda ser otimizada com recurso à utilização adicional da proteína A (PrA).

A proteína A é uma proteína da parede celular, presente na maioria das espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus*, com um peso molecular de 50kDa. Tem sido extensivamente estudada como proteína de ligação a anticorpos, devido à sua afinidade natural pela região Fc das moléculas de imunoglobulina de muitas espécies de mamíferos. Desta forma, promove-se uma orientação mais favorável do anticorpo, com a exposição preferencial da região Fab, aumentando assim, o número de sítios ativos da molécula para a ligação do anticorpo (Babacan *et al.*, 2000).

## **2.4. Características ideais de um biossensor**

Tal como para qualquer outro sensor ou sistema analítico é extremamente importante caracterizar o desempenho analítico de um biossensor nas suas aplicações. Desta forma, conhecendo o modo como diversos parâmetros operacionais e experimentais condicionam o comportamento do dispositivo, torna-se crucial proceder à sua otimização, melhorando a performance analítica global que pode ser caracterizada, designadamente, pela seletividade, intervalo de resposta linear, sensibilidade, limite de deteção e limite de quantificação, precisão e exatidão e o tempo de resposta, entre outros. Nos pontos seguintes serão apresentados os significados de cada parâmetro de forma mais pormenorizada.

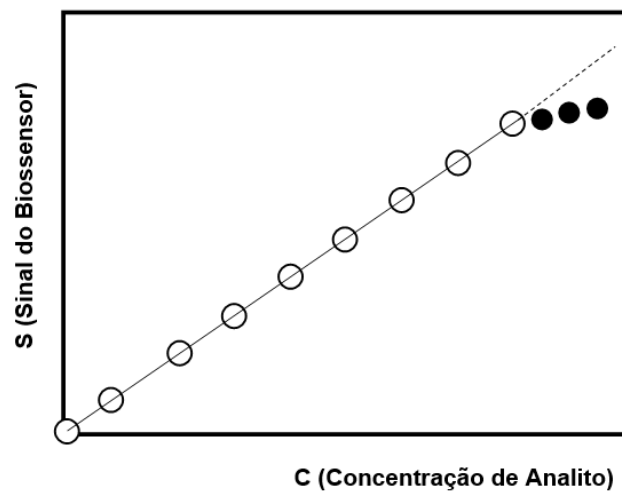
### 2.4.1. Seletividade

Segundo a IUPAC a seletividade refere-se à capacidade que um método analítico exibe para determinar um dado analito numa dada mistura ou matriz sem interferências de outros componentes presentes de comportamento semelhante (McNaught e Wilkinson, 2012).

A seletividade de um biossensor para um determinado analito é determinada, essencialmente, pelo elemento de reconhecimento biológico utilizado. Uma forma de melhorar a seletividade deste tipo de dispositivo passa pelo tratamento prévio da amostra a analisar, reduzindo a carga de interferência presente.

### 2.4.2. Intervalo de resposta linear

Um biossensor deverá, tanto quanto possível, apresentar um intervalo alargado de concentrações em relação ao qual o dispositivo apresenta uma dependência ou resposta linear. Porém, este intervalo pode ser intencionalmente limitado em função do comportamento do sistema em estudo, permitindo apenas a existência de uma região de resposta linear reduzida, fora da qual este tipo de comportamento não se verifica (figura 2.16) (Silva, 2016).



**Figura 2.16** – Representação de um intervalo de resposta linear de um biossensor (reta a cheio).  
Retirada de Silva, 2016.

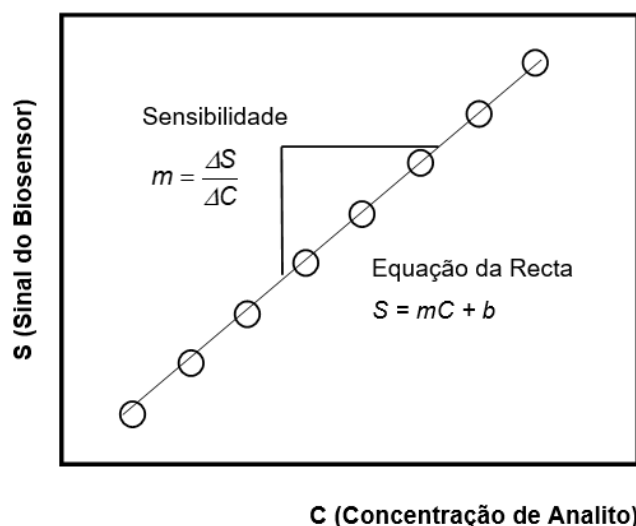
O biossensor não necessita necessariamente de exibir um comportamento linear em todo o intervalo de concentrações para que seja útil e aplicável. O intervalo de resposta linear é ainda caracterizado por exibir uma sensibilidade que pode ser considerada constante (Silva, 2016).

### 2.4.3. Sensibilidade

A sensibilidade é normalmente definida como a variação na magnitude do sinal de saída do biossensor em resultado da alteração da concentração da espécie química de interesse. Se a relação entre a resposta do biossensor e a concentração for linear, então a sensibilidade pode ser estimada pelo declive da reta que traduz essa relação (figura 2.17).

Existem inúmeros fatores que têm influência na sensibilidade efetiva de um determinado biossensor face a um determinado analito. Estes incluem, as dimensões do próprio biossensor, a espessura da camada biorecetora, o transporte de massa para a zona biossensível (junto do transdutor), a diminuição da atividade do sistema biológico com o tempo, entre outros.

Idealmente, a sensibilidade de um biossensor deve, tanto quanto possível, manter-se constante durante o seu tempo de vida útil e ser suficientemente elevada, visando a deteção e determinação de concentrações vestigiais da espécie de interesse (Silva, 2016).



**Figura 2.17** – Determinação da sensibilidade dada pelo declive da reta que traduz a relação linear entre a resposta do biossensor e a concentração do analito. Retirada de Silva, 2016.

### 2.4.4. Limite de deteção e limite de quantificação

O limite de deteção (LOD, do inglês *Limit of detection*) corresponde a um valor de concentração do analito que produz um sinal analítico significativamente diferente do sinal da solução em branco (matriz de composição idêntica à amostra exceptuando o analito). Na realidade representa a menor concentração de analito presente numa amostra que pode ser detetada, (mas não necessariamente quantificada) com precisão e exatidão adequadas e estatisticamente diferente do branco.

Embora o limite de detecção esteja sujeito a alguma variabilidade, o modelo proposto pela IUPAC é o que reúne algum consenso (equação 2.4):

$$\text{LOD} = \bar{X}_b + K_d S_b \quad (2.4)$$

onde  $\bar{x}_b$  é a média das medições efetuadas à solução do branco,  $K_d$  uma constante que assume o valor 3 ou 6 de acordo com as recomendações do método e escolhido tendo em conta o grau de confiança pretendido na determinação do limite de detecção e  $S_b$  o desvio padrão da solução do branco (McNaught e Wilkinson, 2012).

Uma vez que o limite de detecção corresponde a um valor de concentração efetivamente detetado, mas cujo método analítico poderá não conseguir quantificar, é frequente definir um limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*). Este pode ser entendido como o valor de concentração mais baixo que consegue ser determinado pelo método analítico com precisão e exatidão adequadas. O cálculo do limite de quantificação pode ser feito recorrendo à equação (2.5):

$$\text{LOQ} = \bar{X}_b + K_q S_b \quad (2.5)$$

onde  $K_q$  pode assumir os valores 10 ou 20 (quando se pretende expressar o limite de quantificação com um grau de confiança de 95% e 99%, respetivamente), os restantes parâmetros já foram referidos anteriormente (Silva, 2016).

#### 2.4.5. Precisão e exatidão

A precisão ou repetibilidade de um biossensor mede o grau de concordância de um conjunto de medições repetidas, obtidas nas mesmas condições analíticas.

A precisão é, tipicamente, estimada pelo desvio padrão (equação 2.6) dos conjuntos das medições repetidas efetuadas. Este parâmetro pode ainda ser expresso em termos de percentagem através do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) (equação 2.7).

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.6)$$

$$\text{RSD} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2.7)$$

onde  $x_i$  corresponde ao valor médio,  $\bar{x}$  à média do conjunto das medições repetidas e  $n$  ao número de medições efetuadas.

A exatidão de um biossensor mede o “afastamento” do valor experimental obtido, por exemplo, de uma concentração, relativamente ao valor teórico ou esperado. Este parâmetro é, tipicamente, avaliado pelo erro absoluto (equação 2.8) ou pelo erro relativo (equação 2.9).

$$E_a = x_i - x_t \quad (2.8)$$

onde  $x_i$  é o valor obtido e  $x_t$  o valor esperado ou teórico.

$$E_r = \frac{x_i - x_t}{x_t} \times 100\% \quad (2.9)$$

Os parâmetros desta equação têm o significado já referido.

#### **2.4.6. Tempo de resposta**

O tempo de resposta de um biossensor ( $T_{90\%}$ ) é definido como o período necessário para que o valor do sinal de resposta atinja 90% do seu valor máximo. Fatores como a arquitetura do biossensor, o seu procedimento de construção, o processo de imobilização do bioreceptor, o transdutor usado e a frequência de utilização. Por outro lado, a influência de parâmetros como a concentração do analito, o tempo de contacto do ERB com a amostra, a temperatura, o pH e composição da matriz também devem ser considerados (Silva, 2016).

### **2.5. Técnicas de caracterização microscópicas**

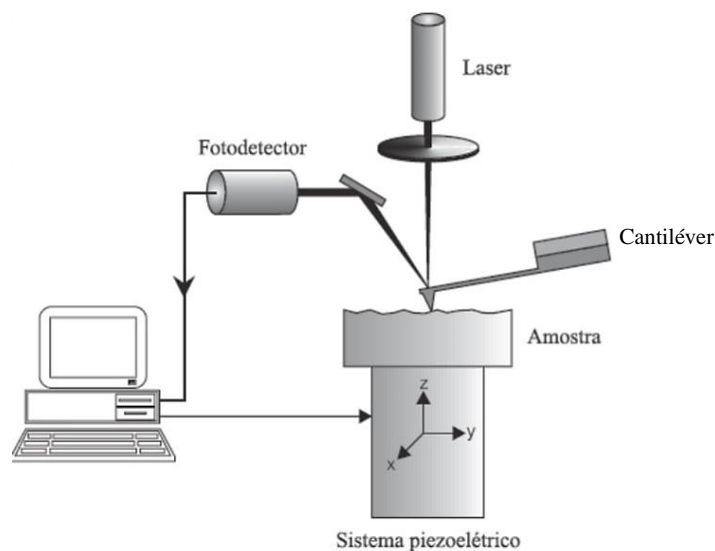
No presente trabalho procedeu-se à caracterização de superfície do transdutor piezoelétrico, após a sua modificação com uma monocamada automontada seguida da ligação do ERB, com o objetivo de confirmar a presença desta biocamada. Para o efeito recorreu-se à microscopia de força atómica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*).

#### **2.5.1. Microscopia de força atómica**

A microscopia de força atómica é uma das técnicas mais importantes para estudos morfológicos em diversas áreas desde a eletrónica à biomédica, incluindo ainda a química e física ou biologia, entre outros (Marrese *et al.*, 2017; Scott e Bhushan, 2003).

A AFM foi introduzida pela primeira vez em 1986 por Rohrer e Binnig (Binnig, Quate, e Gerber, 1986) na sequência da invenção do microscópio de efeito de túnel (STM, do inglês *Scanning Tunneling Microscope*) (Raposo *et al.*, 2007) e tem sido utilizada como uma ferramenta poderosa e indispensável para caracterização de diversos tipos de superfícies, especialmente à nanoescala (Shi *et al.*, 2020).

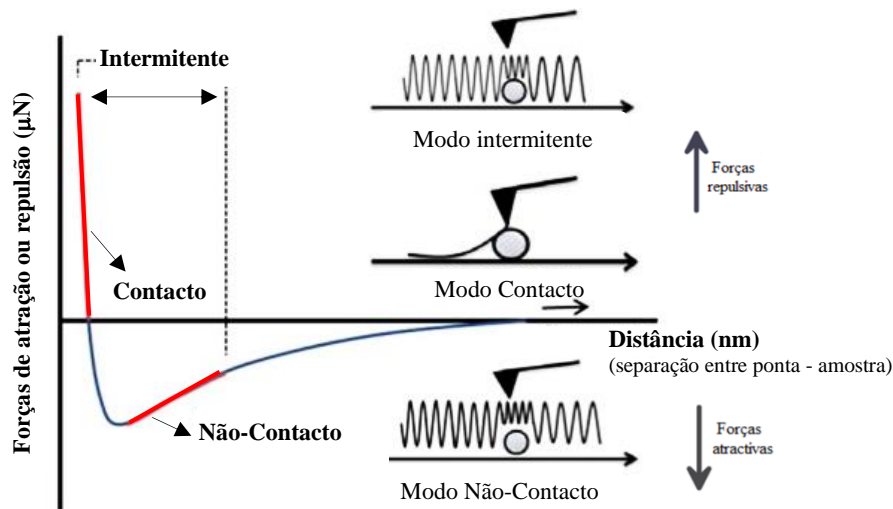
Em termos da sua constituição, o microscópio de força atômica inclui um cantiléver flexível (sonda com uma ponta fina presa à sua haste) cuja ponta, geralmente de silício ou nitreto de silício “percorre” ou mapeia a superfície da amostra, efetuando a sua digitalização (scanner piezoelétrico). A posição da ponta, que reflete a interação ponta-superfície, é monitorizada pela deflexão (resultante de forças atrativas e repulsivas geradas pela interação amostra-ponta) de um feixe de laser que incide no cantiléver e que por sua vez é medido por um fotodíodo sensível à sua posição. O fotodíodo é um detetor que gera um sinal elétrico, sendo que a topografia da amostra é obtida pela análise e processamento desse mesmo sinal. Um computador e um sistema eletrônico de aquisição de dados registam a posição do cantiléver (Z) em cada ponto (X,Y) da superfície digitalizada (Barattin e Voyer, 2008; Variola, 2015). A figura 2.18 mostra um esquema simplificado de um microscópio de força atômica (Barattin e Voyer, 2008).



**Figura 2.18** - Esquema simplificado dos elementos que constituem um AFM. Adaptada de Barattin e Voyer, 2008.

A AFM pode operar em três modos diferentes, dependendo da força que resulta da interação entre a ponta e a superfície da amostra em estudo. O modo de contacto funciona na presença de forças constantemente repulsivas em que a ponta está em contacto contínuo com a superfície, sendo muito sensível a cada pequena mudança na sua morfologia. O modo de não contacto funciona na presença de forças atrativas na ponta do cantiléver determinando a sua vibração. As variações da frequência de ressonância do cantiléver são, então, utilizadas para gerar imagens. No modo intermitente (ou *tapping*) o cantiléver vibra perto de sua frequência ressonante, de forma a tocar levemente a amostra.

Para todos os modos de operação, as imagens podem ser reconstruídas, registrando todas as interações que ocorrem durante o varrimento da superfície da amostra pela ponta do cantiléver (Marrese *et al.*, 2017) (figura 2.19).



**Figura 2.19** - Curva de separação ponta-amostra ilustrando os principais modos de caracterização de uma superfície por AFM. Adaptada de Marrese *et al.*, 2017.

Durante a aquisição da imagem topográfica, a interação entre a ponta do cantiléver e a superfície da amostra depende da distância entre ambas. Quando a distância é relativamente grande, a força de atração entre a ponta e a superfície é fraca. À medida que esta diminui e a ponta se aproxima da superfície, a atração aumenta até uma distância suficientemente próxima que determine a prevalência de forças repulsivas. Geralmente as topografias são obtidas mantendo a magnitude das interações constante durante o varrimento de superfície pela ponta do cantiléver, tanto no modo de contato (direto) como no modo intermitente. No modo de contato, o desgaste da ponta ocorre facilmente em resultado do efeito abrasivo promovido pela superfície, o que pode levar à contaminação da amostra e a danos na sua superfície.

Neste trabalho, todas as medições foram realizadas no modo não contacto de forma a evitar danos na superfície estudada.

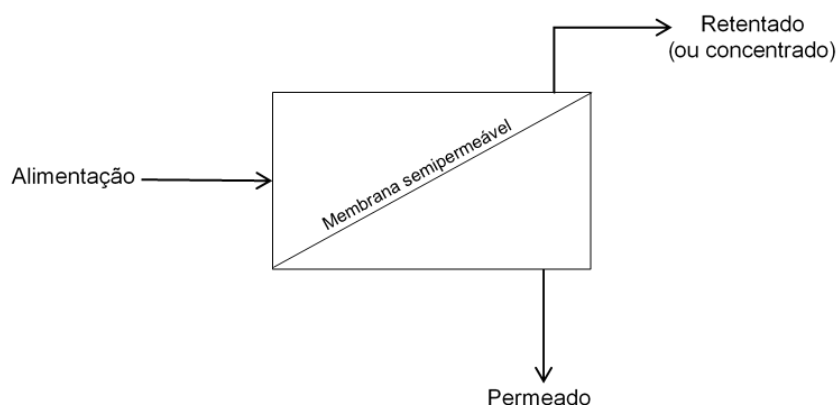
## 2.6. Filtração com membranas poliméricas

O tratamento e purificação das amostras analisadas no presente trabalho foi efetuada, essencialmente, por filtração com recurso a membranas poliméricas de acetato de celulose.

A tecnologia de membranas é uma área em permanente desenvolvimento, desempenhando um papel fundamental em diversos processos, incluindo aplicações na área

da biotecnologia, designadamente na remoção de espécies interferência visando a purificação de amostras, na área da biomédica, por exemplo, na hemodiálise e na construção de pulmões artificiais, em aplicações industriais ao nível do processamento de águas residuais e para consumo humano e também na indústria alimentar.

Os processos de membrana são, essencialmente, técnicas de separação físico-químicas que baseiam o seu mecanismo de separação na diferença de permeabilidade de um suporte físico (membrana) face a diferentes espécies presentes num dado meio líquido ou gasoso (Crittenden *et al.*, 2012 e Tchobanoglous, 2012). Enquanto peça central de todo o processo, a membrana é considerada uma barreira semipermeável fina, tipicamente um material sintético com menos de 1 mm de espessura, com características altamente especializadas e que envolve a passagem de uma única corrente de alimentação, que a separa em duas novas correntes individuais, tendo em conta o tamanho das entidades a filtrar (Crittenden *et al.*, 2012). Um esquema simplificado deste processo é representado na figura 2.20.



**Figura 2.20** - Processo básico por filtração por membrana. Adaptada de Crittenden *et al.*, 2012.

A corrente constituída pelos componentes com a capacidade de atravessar a membrana sem serem retidos, é designada por permeado. Aquela que contém os componentes incapazes de atravessá-la é designada por retentado ou concentrado. Quer o concentrado quer a corrente de permeado podem constituir o produto final do processo de separação (Mulder, 1996). A diferença de pressão entre a alimentação e a corrente do permeado constitui a força motriz dos processos de separação por membranas. Contrariamente aos restantes tipos de filtração, a filtração com recurso a membranas tem a capacidade de funcionar com fluxos de alimentação de gás ou líquido.

O desempenho ou eficiência de uma determinada membrana é determinado por dois parâmetros: a seletividade e o fluxo através da membrana. O último, frequentemente designado por fluxo ou taxa de permeação é definido como o volume que flui através da

membrana por unidade de área e tempo (Mulder, 1996). A seletividade traduz a capacidade que uma membrana tem em conseguir rejeitar, preferencialmente, um determinado soluto (Silva, 2018).

Algumas vantagens inerentes a este tipo de processo incluem o baixo consumo de energia, a simplicidade do processo, a elevada seletividade e a possibilidade de separação sem recurso a aditivos, temperaturas elevadas ou alterações de fase (Mulder, 1996).

### **2.6.1. Classificação das membranas**

As membranas podem ser classificadas de acordo com o tipo de material, o tipo de estrutura ou morfologia e o tipo de processos de fabrico. Com efeito, o desempenho da membrana é fortemente afetado pelas propriedades físicas e químicas do material que a constitui. O material de membrana ideal é aquele que permite um fluxo de filtração elevado sem colmatação ou incrustação (ver ponto 2.6.2) e é fisicamente durável, quimicamente estável e resistente, não biodegradável e económico (Crittenden *et al.*, 2012).

Assim, relativamente ao tipo de material, as membranas dividem-se em três grupos: membranas sintéticas, inorgânicas e orgânicas.

As membranas sintéticas são membranas que derivam de materiais como a poliamida (PA), o poliácridonitrilo (PAN), a polissulfona (PS) ou o polipropileno (PP).

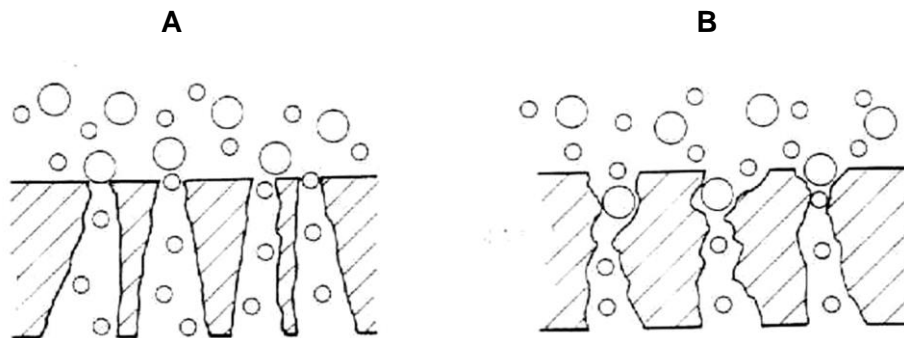
As membranas inorgânicas incluem materiais como, por exemplo, o vidro poroso, a grafite ou a porcelana.

As membranas orgânicas ou naturais são geralmente constituídas por materiais poliméricos, sendo o mais frequentemente utilizado o acetato de celulose (AC). As membranas orgânicas são relativamente baratas, fáceis de fabricar e estão disponíveis numa ampla variedade de tamanhos de poro. No entanto, estas têm vindo a perder alguma preferência na sua utilização devido a uma maior suscetibilidade face à degradação microbiológica e ainda devido ao declínio gradual do fluxo resultante da colmatação quando o processo decorre a temperaturas superiores a 30°C (Crittenden *et al.*, 2012).

Do ponto de vista estrutural, as membranas podem ser simétricas (figura 2.21a) ou assimétricas (figura 2.21b) (Mulder, 1996).

As membranas simétricas são constituídas por um único tipo de material e o tamanho do poro não varia ao longo da membrana. Por outro lado, nas membranas assimétricas os poros diferem de tamanho ao longo da profundidade. Por sua vez, estas podem ser integrais quando constituídas pelo mesmo material ou compostas, quando constituídas por materiais diferentes quer na camada ativa (face da membrana que interage com a alimentação e onde os componentes ficam retidos) quer na camada suporte.

As membranas assimétricas ocupam hoje um lugar de relevo na tecnologia de separação por membranas devido ao facto de associarem a elevada capacidade de permeação a um elevado coeficiente de rejeição (propensão de um determinado soluto em passar ou não através da membrana) e ainda a uma elevada resistência mecânica. Ao contrário das estruturas simétricas que atuam como filtros e retêm partículas nos seus poros podendo originar colmatação e um conseqüente decréscimo de fluxo, as membranas assimétricas atuam como filtros que retêm as partículas à superfície evitando, assim, esse tipo de efeito.



**Figura 2.21** - Representação esquemática da estrutura e modo de funcionamento das membranas assimétricas (A) e simétricas (B).

Existem diversos tipos de processos de separação utilizados no âmbito da filtração com recurso a membranas. Estes são definidos tendo por base o tamanho do poro e a aplicação (Cui e Muralidhara, 2010). Todavia, o mais relevante para a classificação dos diferentes tipos de processos prende-se com a força exercida para que o permeado tenha a capacidade de atravessar a membrana. Existem diferentes tipos de forças motrizes, sendo aquela mais utilizada a resultante da aplicação de uma pressão superior à pressão atmosférica. Existem quatro tipos de processos em que a força motriz utilizada é a pressão. Na tabela 2.2 são apresentadas as características mais relevantes dos diferentes processos de separação, nomeadamente o tipo de membrana, a força motriz, o método de separação, o tamanho de poro, assim como alguns exemplos da sua aplicabilidade.

**Tabela 2.2** - Características dos principais processos de separação por membranas

| Processo de separação | Tipo de membrana           | Força motriz            | Método de separação               | Tamanho do poro ( $\mu\text{m}$ ) | Aplicação   |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Microfiltração (MF)   | Microporosa                | Pressão<br>0,1 – 1 bar  | Filtração                         | 0,1 - 100                         | Esterilização,<br>Clarificação,<br>purificação.   |
| Ultrafiltração (UF)   | Assimétrica<br>Microporosa | Pressão<br>0,5 – 5 bar  | Filtração                         | 0,002 – 0,1                       | Separação de<br>macromoléculas<br>em solução  |
| Nanofiltração (NF)    | Assimétrica<br>Filme denso | Pressão<br>10 – 40 bar  | Filtração/<br>Solução/<br>Difusão | 0,0001 - 0,001                    | Separação parcial<br>de sais e solutos<br>orgânicos com<br>menos de 1000<br>Dalton (Da) |
| Osmose Inversa (OI)   | Assimétrica<br>Filme denso | Pressão<br>20 – 100 bar | Solução/<br>Difusão               | Filme denso                       | Separação de sais<br>e microsolutos   |

Para a filtração das amostras de urina, utilizaram-se duas membranas de ultrafiltração com diferentes tamanhos de poro, preparadas através do método de inversão de fases.

O método de inversão de fases foi desenvolvido por *Kunst e Sourirajan* (1974) e consiste na preparação da solução polimérica que constituirá a membrana e na sua deposição sobre uma placa de vidro com controlo da evaporação de solvente. Posteriormente procede-se à precipitação do filme polimérico num banho de coagulação (*Ismail et al.*, 2019; *Zare e Kargari*, 2018), visando a obtenção da membrana de ultrafiltração com o tamanho de poro pretendido.

A ultrafiltração foi introduzida pela primeira vez por *Benchold* em 1907 (*Al Aani et al.*, 2020) e opera a média/baixa pressão com fluxo tangencial, isto é, o fluxo da alimentação passa paralelamente à superfície da membrana, e é usada para remover sólidos suspensos e solutos com um peso molecular superior a 1000 Da. Ao contrário das gorduras, polissacarídeos e proteínas de massa molecular mais elevada, os açúcares, os sais, os peptídeos de pequenas dimensões e os ácido orgânicos têm a capacidade de atravessar as membranas de ultrafiltração.

### 2.6.2. Limitações inerentes à utilização de membranas de filtração

O principal problema associado à utilização de membranas em processo de filtração prende-se com a ocorrência do efeito de processo de colmatação e polarização de concentração.

A colmatação é um processo no qual as substâncias dissolvidas ou suspensas são depositadas na superfície externa da membrana, o que reduz a sua área ativa da membrana,

resultando numa diminuição do fluxo e desempenho da membrana em resultado do “entupimento” dos poros.

A polarização de concentração refere-se ao acúmulo reversível de moléculas rejeitadas perto da superfície da membrana. Esse processo ocorre porque os componentes da alimentação permeiam a velocidades diferentes, formando um gradiente de concentração na fase fluida adjacente à membrana. Este fenómeno pode ser minimizado alterando as condições de operação do sistema, com vista à dispersão dos solutos retidos (Khulbe *et al.*,2008).

Neste capítulo, descrevem-se todos os aspetos de natureza experimental, respeitantes às diversas fases relacionadas com o desenvolvimento do biossensor piezoelétrico para a deteção e quantificação de ácido úrico em amostras biológicas, designadamente em urina. Serão considerados vários materiais e equipamentos envolvidos, assim como os reagentes e procedimentos específicos necessários para a preparação de soluções e/ou substratos.

O estudo inicial prendeu-se com a caracterização do sistema de fluxo utilizado no “*setup*” experimental, permitindo a realização de análises em contínuo e em tempo real. Posteriormente, efetuaram-se alguns ensaios preliminares visando a imobilização do elemento de reconhecimento biológico (anticorpos policlonais específicos contra o ácido úrico) na superfície do sensor piezoelétrico (cristal de quartzo recoberto com elétrodos de ouro), procedendo-se, ainda, nesta fase, a uma caracterização da superfície modificada do sensor, com recurso a técnicas microscópicas. Seguiu-se um estudo de delineamento e planeamento experimental visando a otimização das condições experimentais de formação da biocamada na superfície do sensor de quartzo e, conseqüentemente, da imobilização do elemento de reconhecimento biológico. Desta forma, procurou garantir-se, ainda, a melhor sensibilidade possível para as medições efetuadas com o biossensor desenvolvido, assim como a otimização dos restantes parâmetros analíticos relacionados com o desempenho do dispositivo. De seguida, efetuou-se uma primeira calibração do biossensor com amostras de antigénio com diferentes concentrações, preparadas com diferentes diluições do reagente comercial.

Por fim, foram realizados testes adicionais para uma otimização adicional da sensibilidade do dispositivo e, conseqüentemente, do seu limite de deteção e limite de quantificação. Os dados experimentais obtidos no presente estudo foram tratados estatisticamente visando a apresentação dos resultados finais dotados com a melhor robustez e qualidade possível. Neste sentido, sempre que possível, procedeu-se à realização de medições repetidas, considerando nestes casos um número de observações,  $n$ , igual a 3, sendo os resultados finais apresentados a média dessas medições. Idealmente dever-se-ia proceder à realização de, pelo menos, 5 ensaios, mas a decisão relativa a este número de replicados prendeu-se com o facto de os reagentes serem bastantes onerosos e de se dispor de quantidades diminutas dos mesmos.

### 3.1. Reagentes, materiais e equipamento

Os reagentes químicos, os materiais e equipamentos utilizados no presente trabalho descrevem-se nos pontos seguintes.

#### Reagentes

- Na preparação das soluções de antígeno comercial foi utilizado o Tampão Fosfato Salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) 10mM, pH=7,4, preparado com cloreto de sódio (NaCl) 137mM, Panreac, cloreto de potássio (KCl) 2,7mM, Panreac, hidrogenofosfato dissódico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 10mM, Fischer, dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,8mM, Fisher;
- O banho de ultrassom para a limpeza de superfície de ouro do sensor piezoelétrico foi preparado com 2-propanol (álcool isopropílico) ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ), Honeywell;
- A solução de alcanotiol para formação da monocamada automontada (SAM, do inglês *Self Assembled Monolayer*), do na superfície do eletrodo de ouro foi preparada com Ácido 11-mercaptoundecanóico ( $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$ ), MUA, Endeavour Chemicals, em etanol absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), Fisher;
- Para a ativação do alcanotiol da monocamada automontada foi preparada uma solução contendo os agentes de ativação 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida ( $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ ), EDC e N-Hidroxisuccinimida ( $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$ ), NHS, ambos da Roth, em água ultrapura (Mili-Q) com uma resistividade de 18.2 mΩ a 25°C;
- Anticorpo policlonal contra o ácido úrico desenvolvido em coelho, Advance Target System, ATSBio chemicals;
- As diluições de antígeno (ácido úrico conjugado com Albumina de Soro Bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumine*)), com uma concentração 1μg/mL, Advance Target System, ATSBio chemicals, foram preparadas com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*);
- As soluções de proteína A preparadas com proteína A recombinante de *Staphylococcus aureus*, Sino biological Inc, foram utilizadas visando uma orientação mais adequada aos anticorpos policlonais contra o ácido úrico imobilizados na superfície do transdutor piezoelétrico. Estas foram preparadas com recurso a tampão de acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) 0,1M, pH=5,5: acetato de sódio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ ) 82,03g/mol, Sigma, ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 60,05g/mol, Riedel-de Haën;
- A preparação da solução de gelatina 1% (m/v), VWR Chemicals, em água ultrapura foi utilizada para bloquear as ligações não específicas do antígeno;

- Para a preparação das membranas de ultrafiltração com diferentes tamanhos de poros foram utilizados Acetato de celulose, Sigma, acetona comercial ( $C_3H_6O$ ), formamida ( $CH_3NO$ ), ambos Scharlau;
- Para a regeneração da biocamada na superfície do sensor foi preparada uma solução de hidróxido de sódio (NaCl), 50mM, Scharlau.

## **Amostras analisadas**

As amostras analisadas consistiram em amostras de urina humana fortificadas com diferentes concentrações de antígeno comercial e purificadas com recurso a ultrafiltração com membranas poliméricas semipermeáveis de acetato de celulose.

## **Materiais**

Os materiais de maior relevância envolvidos no desenvolvimento de presente trabalho foram os seguintes:

- Quartzo e ouro que em conjunto constituem o sensor piezoelétrico utilizado como transdutor do biossensor desenvolvido, adquiridos à OpenQCM.

## **Principais equipamentos**

Para o desenvolvimento do presente trabalho foi utilizado o seguinte equipamento:

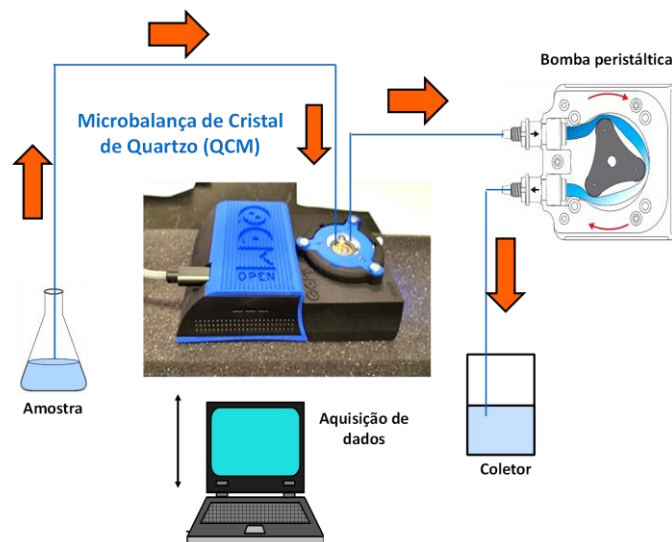
- Bomba peristáltica, Marca Gilson, Modelo MINIPULS 3. O sistema de fluxo utilizado no presente trabalho visou, fundamentalmente, a possibilidade de realização dos diversos ensaios em contínuo, com aquisição de dados em tempo real, através do *software* adequado;
- Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM, do inglês *Quartz Cristal Microbalance*), da marca openQCM e modelo Wi2, controlada por *software* GUI v.1.1. A microbalança de cristal de quartzo contém um módulo constituído por uma célula ou câmara de fluxo, que acolhe o sensor de cristal de quartzo e que se encontra coberta por uma janela que permite a entrada e saída em contínuo dos reagentes, assegurada pela bomba peristáltica. Adicionalmente a este sistema, encontra-se acoplado um frequencímetro que permite medir a variação de vibração do sensor piezoelétrico;
- Sensores de cristal de quartzo de 10 MHz de frequência nativa e diâmetro de 14mm, particularmente adequados para o uso em biossensores para análise de amostras líquidas;

## Software

A execução do planeamento experimental delineado para otimização das condições de modificação da superfície do sensor piezoelétrico foi efetuada com recurso ao programa informático Design Expert versão 13.01.0.

### 3.2. Montagem experimental

A montagem experimental utilizada na realização dos diversos ensaios de otimização do desempenho analítico do biossensor desenvolvido, assim como na análise das amostras de urina, mostra-se na figura 3.1.



**Figura 3.1** - Montagem experimental utilizada para a realização dos ensaios com o biossensor piezoelétrico desenvolvido: Sistema de fluxo constituído por uma bomba peristáltica, uma microbalança de cristal de quartzo e por um sistema de aquisição de dados.

A bomba peristáltica incluída permitiu a entrada e saída controlada do reagentes no módulo do sensor piezoelétrico (figura 3.2). A microbalança de cristal de quartzo em conjunto com o frequencímetro acoplado, permitiu medir a variação da frequência de vibração do sensor piezoelétrico decorrente da variação de massa da biocamada imobilizada na sua superfície, em resultado da ligação do antigénio ao elemento de reconhecimento biológico.

A figura 3.2 mostra com mais pormenor os componentes de microbalança de cristal de quartzo.

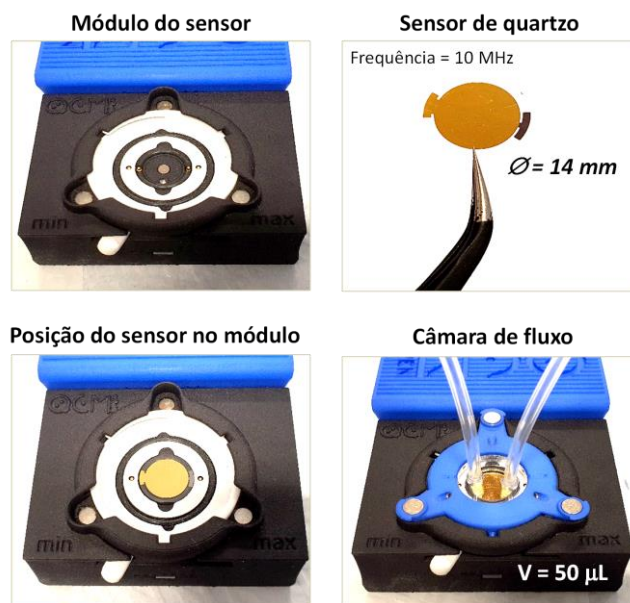


Figura 3.2 - Componentes da microbalança de cristal de quartzo.

### 3.3. Caracterização do sistema de fluxo

No que concerne à caracterização do sistema de fluxo, verificou-se ser importante determinar o volume da câmara de fluxo de modo a otimizar também o volume de reagentes a utilizar em cada ensaio, minimizando assim o desperdício dos mesmos. Para o efeito começou por efetuar-se a calibração da bomba peristáltica estabelecendo o valor dos caudais,  $Q$  ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ), permitidos. A tabela 3.1 apresenta os valores utilizados para este estudo.

Tabela 3.1 - Valores utilizados com as diferentes posições de bomba para estabelecer os respetivos caudais.

|                  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Posição de bomba | 0,05 | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 | 0,40 | 0,45 | 0,50 | 0,55 | 0,60 | 0,65 | 0,70 | 0,75 | 0,80 | 0,85 | 0,90 | 0,95 | 1,00 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|

Uma vez estabelecida a calibração da bomba peristáltica, procedeu-se à determinação do volume da câmara de fluxo visando o conhecimento do volume máximo suportado pela mesma e, conseqüentemente, a otimização do volume dos reagentes a utilizar em cada ensaio. Para este estudo consideraram-se os caudais médios obtidos em 3 posições da bomba peristáltica, nomeadamente no limite inferior do intervalo de caudais, no meio do intervalo e no limite superior do mesmo. As posições selecionadas foram as seguintes: 0,10; 0,60 e 0,90, cujas respetivos caudais e tempo de enchimento da câmara de reação permitiram determinar o seu volume.

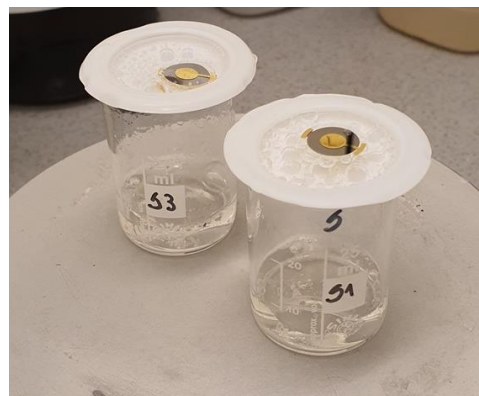
### **3.4. Preparação da superfície do sensor piezoelétrico para imobilização do bioreceptor**

Dado que as superfícies metálicas têm tendência a adsorver naturalmente materiais orgânicos, a sua limpeza é uma etapa crucial visando a eliminação de qualquer impureza ou contaminantes que possa comprometer o processo de formação da monocamada. Desta forma, antes da formação da monocamada, procedeu-se à limpeza da superfície do eletrodo de ouro recorrendo a dois métodos indicados pelo fabricante: limpeza com ultrassons e limpeza com uma mistura química.

Procurou-se, desta forma, selecionar e otimizar o procedimento de limpeza mais eficaz, mas também menos moroso e envolvendo menos reagentes. Neste sentido, de acordo com informação constante da literatura (Hnaïen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2019), conforme as indicações do fabricante dos sensores utilizados (<https://openqcm.com/>) e também de acordo com alguns aspetos relacionados com as características do eletrodo de ouro, nomeadamente a sua área, foi decidido efetuar diversos ensaios.

Assim, neste estudo procedeu-se à limpeza da superfície do sensor com recurso, por um lado a tecnologia de ultrassons, utilizando o álcool isopropílico como solvente de limpeza e por outro recorrendo a uma mistura oxidante aquecida constituída por peróxido de hidrogénio e amónia. O equipamento e/ou as montagens experimentais envolvidas em ambas as metodologias são apresentadas na figura 3.3.

Os procedimentos de limpeza da superfície do sensor de ouro do cristal piezoelétrico descritos na figura 3.3 foram testados em diversos sensores intencionalmente “sujos”. Comparando a eficácia das duas metodologias testadas, e face aos resultados obtidos (ver secção 4.2), optou-se por proceder à limpeza da superfície de ouro dos sensores de cristal de quartzo apenas com recurso à metodologia baseada na tecnologia de ultrassons.



- |   |  |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colocar o sensor em 10 mL de álcool isopropílico;</li> <li>2. Limpar com ultrassons durante 15 min;</li> <li>3. Renovar o solvente de limpeza;</li> <li>4. Repetir o ciclo de limpeza com ultrassons;</li> <li>5. Secar sob uma corrente de azoto.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colocar o sensor numa mistura de peróxido de hidrogénio (30%), amónia (25%) e água ultrapura, numa proporção 5:1:1, a 75°C durante 5 min;</li> <li>2. Lavar abundantemente com água ultrapura;</li> <li>3. Secar sob uma corrente de azoto;</li> <li>4. lavar com etanol absoluto;</li> <li>5. Secar novamente sob uma corrente de azoto.</li> </ol> |
|---|--|

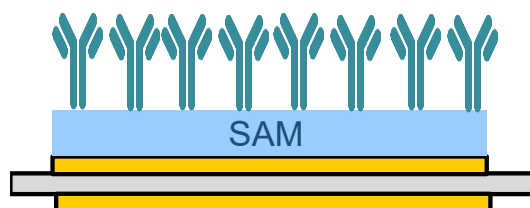
**Figura 3.3** - Procedimentos testados na limpeza da superfície de ouro do sensor de cristal de quartzo, com vista à imobilização da biocamada contendo o elemento de reconhecimento biológico.

### 3.5. Formação da monocamada automontada e imobilização do bioreceptor: Ensaios preliminares

A fase seguinte do desenvolvimento do trabalho versou a imobilização do elemento de reconhecimento biológico ou bioreceptor, que é, efetivamente, uma das mais importantes no desenvolvimento e montagem de um biossensor. Com efeito, a performance analítica global do dispositivo é fortemente dependente de uma imobilização adequada deste elemento. Apenas um correto procedimento de imobilização permitirá a manutenção da integridade estrutural da biomolécula imobilizada e, conseqüentemente, da sua função biológica. Neste sentido é absolutamente fundamental a otimização deste procedimento. Como já era esperado, esta fase do trabalho foi aquela que se revestiu de maiores dificuldades técnicas e científicas e mais morosa, mas sem dúvida a mais desafiante também.

Os ensaios preliminares neste âmbito foram conduzidos tendo por base a adequação da informação constante da literatura ao caso particular do biossensor desenvolvido, nomeadamente tendo em conta as dimensões do sensor piezoelétrico utilizado, cujo diâmetro é de 14 mm. Para o efeito recorreu-se à modificação da superfície de ouro do transdutor com uma SAM de MUA, seguida da ativação dos grupos carboxílicos deste tiol com os agentes

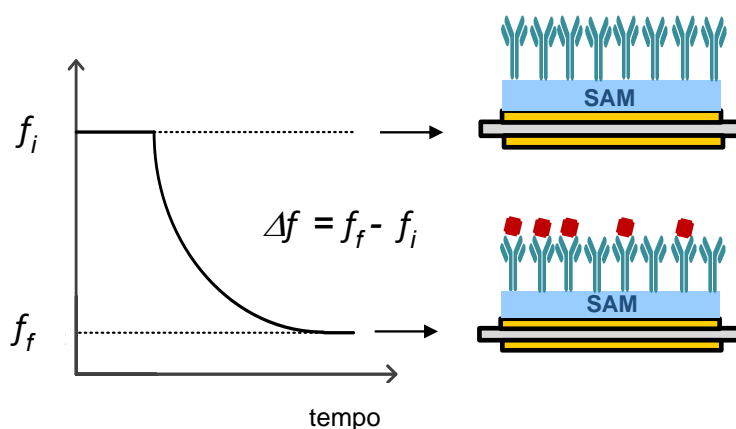
EDC e NHS. A fase seguinte consistiu na imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico, os quais se ligam aos grupos carboxílicos previamente ativados. Por fim, testou-se esta biocamada no reconhecimento e ligação ao antigénio. A figura 3.4 mostra um esquema genérico da modificação da superfície do sensor piezoelétrico com formação da biocamada contendo o elemento de reconhecimento biológico imobilizado, que foi utilizada na montagem do biossensor para realização dos ensaios preliminares.



**Figura 3.4** - Esquema genérico da modificação do sensor piezoelétrico utilizada nos ensaios preliminares.

A sinalização do reconhecimento do antigénio pelos anticorpos imobilizados foi efetuada com base na medição da variação de frequência entre aquela correspondente ao sensor piezoelétrico modificado com a biocamada, contendo o bioreceptor e aquela decorrente do reconhecimento e ligação do antigénio. Com efeito, foi considerada a frequência inicial da medição ( $f_i$ ), aquela resultante apenas da presença da biocamada na superfície do cristal de quartzo e a frequência final ( $f_f$ ), aquela observada após a ligação do antigénio, decorrente do enchimento da câmara de reação com uma solução contendo o analito (preparada com tampão fosfatos salino, PBS) e após um período de incubação.

Um esquema genérico da resposta analítica considerada no ensaio descrito, mostra-se na figura 3.5.



**Figura 3.5** - Resposta analítica inicialmente considerada para o biossensor desenvolvido.

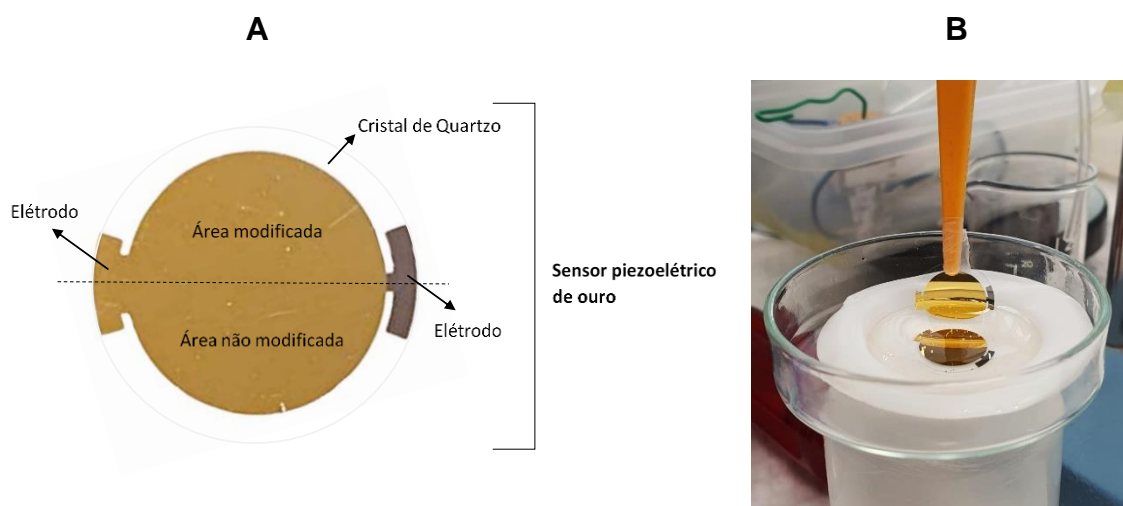
Nesta fase preliminar mediu-se ainda a frequência exibida pelo sistema de medição, após remoção de todo o PBS da câmara de reação, permanecendo apenas o sensor piezoelétrico modificado com a biocamada e o antigénio ligado ao elemento de reconhecimento biológico.

Por fim realizou-se um teste em que se pretendeu observar o comportamento e resposta do biossensor para soluções de antigénio preparadas com diferentes concentrações. Assim, efetuaram-se três diluições da solução comercial do analito com PBS, D1, D2 e D3, considerando que  $D1 > D2 > D3$  e mediram-se as respetivas frequências finais.

Os resultados e comportamento do sistema e do biossensor exibidos nestes ensaios preliminares foram comparados e observadas as conclusões e medidas consideradas importantes para restante trabalho ainda a desenvolver.

### 3.6. Caracterização da superfície modificada do sensor piezoelétrico por Microscopia de Força atómica

De modo a confirmar, em definitivo, a modificação da superfície do sensor piezoelétrico e a formação da respetiva biocamada, procedeu-se à sua caracterização com recurso à Microscopia de Força Atómica (AFM). Para este estudo efetuou-se a modificação de metade da área do elétrodo de ouro que recobre o cristal piezoelétrico, mantendo a outra metade “despida”, ou seja, sem modificação. A figura 3.6A mostra o esquema da metodologia de modificação de um sensor para o efeito de caracterização microscópica por AFM e a figura 3.6B uma foto real da montagem utilizada.



**Figura 3.6 - (A)** Esquema da modificação do sensor piezoelétrico para a caracterização por AFM. **(B)** Foto real da montagem efetuada.

A caracterização do sensor por AFM incluiu a obtenção de imagens de topografia e imagens de fase com diferentes resoluções, nomeadamente,  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  e  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ . A figura 3.10 mostra uma imagem do microscópio de força atômica da *CS Instruments*.



**Figura 3.7** - Microscópio de força atômica utilizado na aquisição de imagens da superfície do sensor piezoelétrico. Retirado de Pereira, 2019.

### **3.7. Planeamento experimental para otimização dos parâmetros intervenientes na imobilização do bioreceptor**

Uma vez comprovada a modificação da superfície do sensor, efetuou-se um planeamento experimental visando a otimização das condições de formação da biocamada e imobilização do elemento de reconhecimento biológico, nomeadamente no que se refere à concentração dos reagentes químicos e biomoléculas envolvidas.

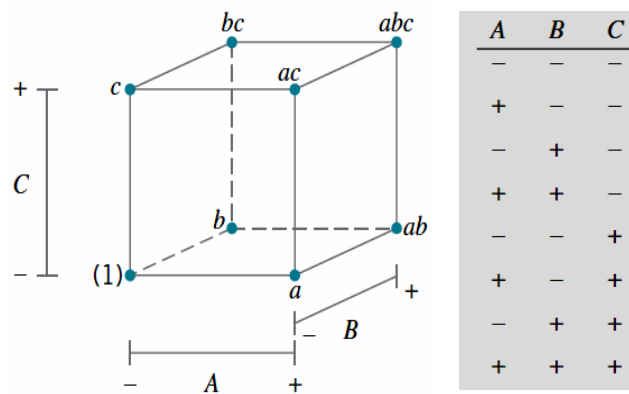
Tendo em conta que para a modificação do sensor comporta, principalmente, 3 fatores, ou seja, a concentração de MUA, a concentração relativa dos agentes de ativação EDC/NHS e a concentração/diluição do anticorpo específico contra o ácido úrico, foi decidido implementar e conduzir um delineamento experimental baseado num desenho fatorial do tipo  $2^3$ . Este tipo de planeamento considera a existência de 3 fatores ou parâmetros experimentais, em que a cada um são atribuídos 2 níveis que se considera terem efeito na medida analítica efetuada (o alto (+) e o baixo (-)). Assim, o planeamento experimental estabelece um conjunto de combinações possíveis para os fatores e níveis em estudo, permitindo, com base nos resultados obtidos, perceber qual ou quais exercem, efetivamente, influência na formação da biocamada e, por consequência, a resposta do dispositivo. Ou seja, permite estabelecer quais os seus efeitos na variação de frequência (resposta dada pelo biossensor).

O desenho fatorial estatístico fornece o mínimo número de experiências necessárias para avaliar em simultâneo, os efeitos de múltiplas variáveis e as suas interações, na resposta em análise (Montgomery, 2009; Shalabh, 2009).

Em termos concretos, o desenho fatorial  $2^3$  determina o estabelecimento de 8 combinações ou testes possíveis, ou seja:

→ 3 fatores A, B e C cada um com 2 níveis cada ( $a=2$ ,  $b=2$  e  $c=2$ )  $\Rightarrow 2 \times 2 \times 2$  (ou  $2^3$ ) = 8 combinações ou testes possíveis (abc).

A representação geométrica do desenho fatorial, assim como a matriz de testes ou desenho mostram-se na figura 3.8.



**Figura 3.8** - Geometria do desenho fatorial.

Os sinais positivos (+) e negativos (-) que se representam na matriz de testes, codificam para cada fator, os níveis alto e baixo, respetivamente.

Como se depreende, da observação da figura 3.8, as 8 combinações ou testes possíveis formam os vértices do cubo da representação geométrica, de acordo com o código apresentado na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Notação alternativa para representar as combinações ou testes.

| Combinação | Código   |
|------------|--|
| (1)        | Ambos os fatores A, B e C estão no nível baixo |
| a          | A está no nível alto e B e C no nível baixo    |
| b          | B está no nível alto e A e C no nível baixo    |
| ab         | A e B estão no nível alto e C no nível baixo   |
| c          | C está no nível alto e A e B no nível baixo    |
| ac         | A e C estão no nível alto e B no nível baixo   |
| bc         | B e C estão no nível alto e A no nível baixo   |
| abc        | Todos os fatores, A, B e C estão no nível alto |

Na tabela 3.3 mostra-se, de uma forma mais objetiva, o desenho fatorial considerado, tendo em conta os fatores envolvidos na modificação da superfície do sensor, assim como os níveis que foram atribuídos a cada um. Sublinha-se que, no planeamento experimental delineado, a concentração de MUA, [MUA] (com um nível baixo de 5mM e um nível alto de 10mM) e a concentração de EDC, [EDC] (com um nível baixo de 200mM e um nível alto de 400 mM) consideraram-se como variáveis numéricas e a diluição do anticorpo (com um nível baixo de 1:1000 e um nível alto de 1:500), como variável categórica. A relação entre a concentração relativa dos agentes de ativação, EDC/NHS, foi de 4, tendo sido mantida constante. A diversos ensaios envolvidos na execução do planeamento experimental, foi sempre utilizada uma solução de antigénio com a concentração de 100 mg/mL.

**Tabela 3.3** – Matriz do desenho fatorial  $2^3$  considerado visando a otimização da formação da biocamada na superfície do sensor de cristal de quartzo.

| Teste | A<br>[MUA] | B<br>[EDC/NHS] | C<br>(Anticorpo) | A<br>[MUA] (mM) | B<br>[EDC/NHS] (mM) | C<br>Diluição do anticorpo |
|-------|------------|----------------|------------------|-----------------|---------------------|----------------------------|
| 1     | -          | -              | -                | 5               | 200/50              | 1:1000                     |
| 2     | +          | -              | -                | 10              | 200/50              | 1:1000                     |
| 3     | -          | +              | -                | 5               | 400/100             | 1:1000                     |
| 4     | +          | +              | -                | 10              | 400/100             | 1:1000                     |
| 5     | -          | -              | +                | 5               | 200/50              | 1:500                      |
| 6     | +          | -              | +                | 10              | 200/50              | 1:500                      |
| 7     | -          | +              | +                | 5               | 400/100             | 1:500                      |
| 8     | +          | +              | +                | 10              | 400/100             | 1:500                      |

A matriz do desenho fatorial apresentada na tabela 3.3. foi efetuada com recurso ao *software Design Expert* versão 13.01.0. e os dados obtidos foram ajustados à equação do modelo fatorial, que apresenta a forma da equação 3.1: (Montgomery 2009; Shalabh, 2009)

$$y = \beta_0 + \beta_{AX}X_A + \beta_{BX}X_B + \beta_{CX}X_C + \beta_{ABX}X_A X_B + \beta_{ACX}X_A X_C + \beta_{BCX}X_B X_C + \beta_{ABCX}X_A X_B X_C \quad (3.1)$$

onde o  $y$  corresponde à resposta prevista para o modelo, designadamente a variação de frequência ( $\Delta f$ ; Hz), sendo o  $\beta_0$  a média de todas as respostas, os  $\beta$  os coeficientes de regressão e os  $X$  as variáveis em estudo.

Após a análise dos resultados obtidos através do planeamento experimental, foi selecionada a combinação dos níveis dos fatores envolvidos mais adequada para a modificação da superfície do sensor piezoelétrico e formação da biocamada. Essa combinação passou a ser a aquela utilizada em todos os ensaios os ensaios subsequentes.

Em seguida, serão apresentadas todas as etapas desenvolvidas relacionadas com a modificação da superfície do sensor, de uma forma pormenorizada e de acordo com a sua

sequência, onde serão referidos os períodos e temperaturas envolvidos em cada uma. Estes parâmetros, por limitação do desenho fatorial 2<sup>3</sup>, não foram incluídos no modelo, tendo sido considerados os valores típicos referidos na literatura e/ou adaptados (Susmel *et al.*, 2003; Hnaien *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020), nomeadamente às dimensões do cristal piezoelétrico utilizado.

### 3.7.1. Funcionalização da superfície de ouro

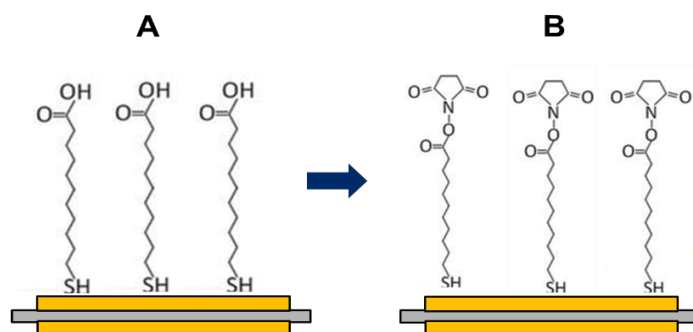
Neste ponto, assim como nos seguintes, descrevem-se, de uma forma mais pormenorizada, as diferentes etapas inerentes à modificação da superfície do sensor piezoelétrico para formação da biocamada contendo, evidentemente, o elemento de reconhecimento biológico imobilizado, ou seja, os anticorpos específicos contra o ácido úrico.

Assim, inicialmente e após a limpeza da superfície do sensor em banho de ultrassons, este foi imerso numa solução de MUA preparada em etanol absoluto (com a concentração otimizada no planeamento experimental), *overnight*, à temperatura ambiente para a formação da SAM de tiol na superfície do ouro. Posteriormente, as moléculas do alcanotiol não ligadas à superfície do ouro foram removidas por lavagem com etanol absoluto, seguido de secagem com N<sub>2</sub>. De modo a converter os grupos carboxilo terminais em grupos éster ativos, o sensor modificado foi incubado por um período de, aproximadamente, 1h, à temperatura ambiente, numa mistura aquosa preparada de fresco com H<sub>2</sub>O milli-Q, contendo os agentes de ativação EDC e NHS (com a relação de concentrações igualmente otimizadas).

As ligações éster e amida são grupos amplamente utilizados para modificações de superfície e imobilização de anticorpos. Neste caso, uma monocamada com um grupo carboxilo na extremidade é ativado por conversão no éster ativo. Esses derivados de ácido ativados reagem com aminas para formar amidas (Samanta e Sarkar, 2011). Isto é, os grupos carboxilos da monocamada automontada foram ativados por EDC, formando um intermediário, o-acilisourea, um produto químico altamente reativo. O intermediário é instável em solução aquosa e não possui tempo de “vida” suficiente para o procedimento de conjugação em duas etapas. No entanto, na presença de N-hidroxisuccinimida (NHS) é formado um éster ativo mais estável de NHS. O éster ativo sofre reação de substituição nucleofílica com os grupos amina dos anticorpos, resultando na formação de uma ligação amida. (Asiaei *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2004).

Após 1h de incubação, o sensor foi enxaguado com água milli-Q e seco com N<sub>2</sub>.

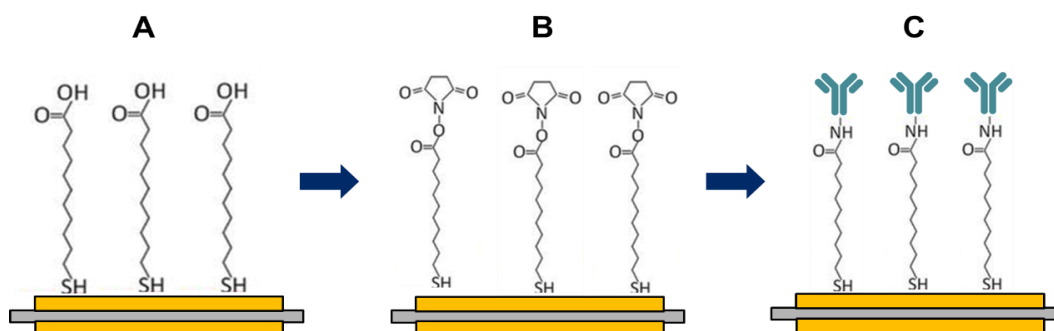
A ativação dos grupos carboxilo da SAM com os ligantes EDC e NHS está ilustrada na figura 3.9.



**Figura 3.9 - (A)** Formação de uma monocamada automontada de MUA na superfície do eletrodo de ouro, **(B)** Ativação dos grupos carboxilo do MUA com EDC e NHS, formando grupos éster ativados.

### 3.7.2. Imobilização do elemento de reconhecimento biológico.

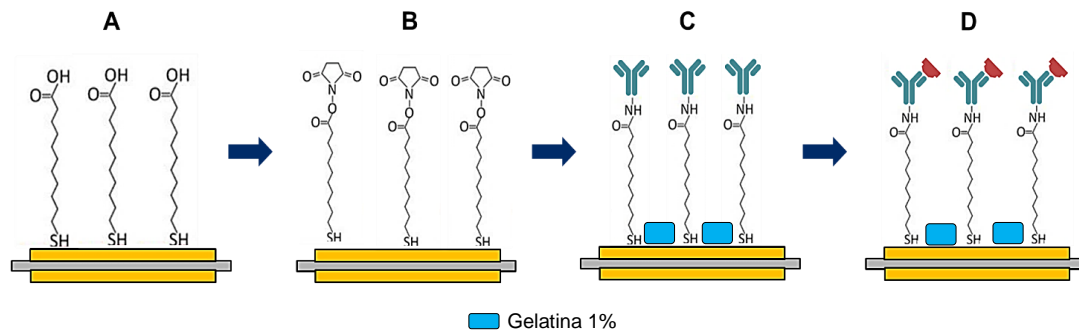
O procedimento para a imobilização do bioreceptor consistiu na adição de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução do anticorpo específico contra o ácido úrico (com a diluição otimizada no planeamento experimental), à temperatura ambiente, à monocamada previamente formada, permitindo o estabelecimento de uma ligação amida entre os grupos amina dos anticorpos e os grupos carboxilo ativados anteriormente, durante 2h (figura 3.10). Os anticorpos em excesso não ligados, foram removidos por lavagem com PBS e água milli-Q e o sensor foi seco com  $\text{N}_2$ .



**Figura 3.10 - (A)** Formação de uma monocamada automontada de (MUA) na superfície do eletrodo de ouro, **(B)** Ativação dos grupos carboxílico do MUA com EDC e NHS, **(C)** Imobilização do anticorpo policlonal contra o ácido úrico.

### 3.7.3. Reconhecimento e ligação do antígeno

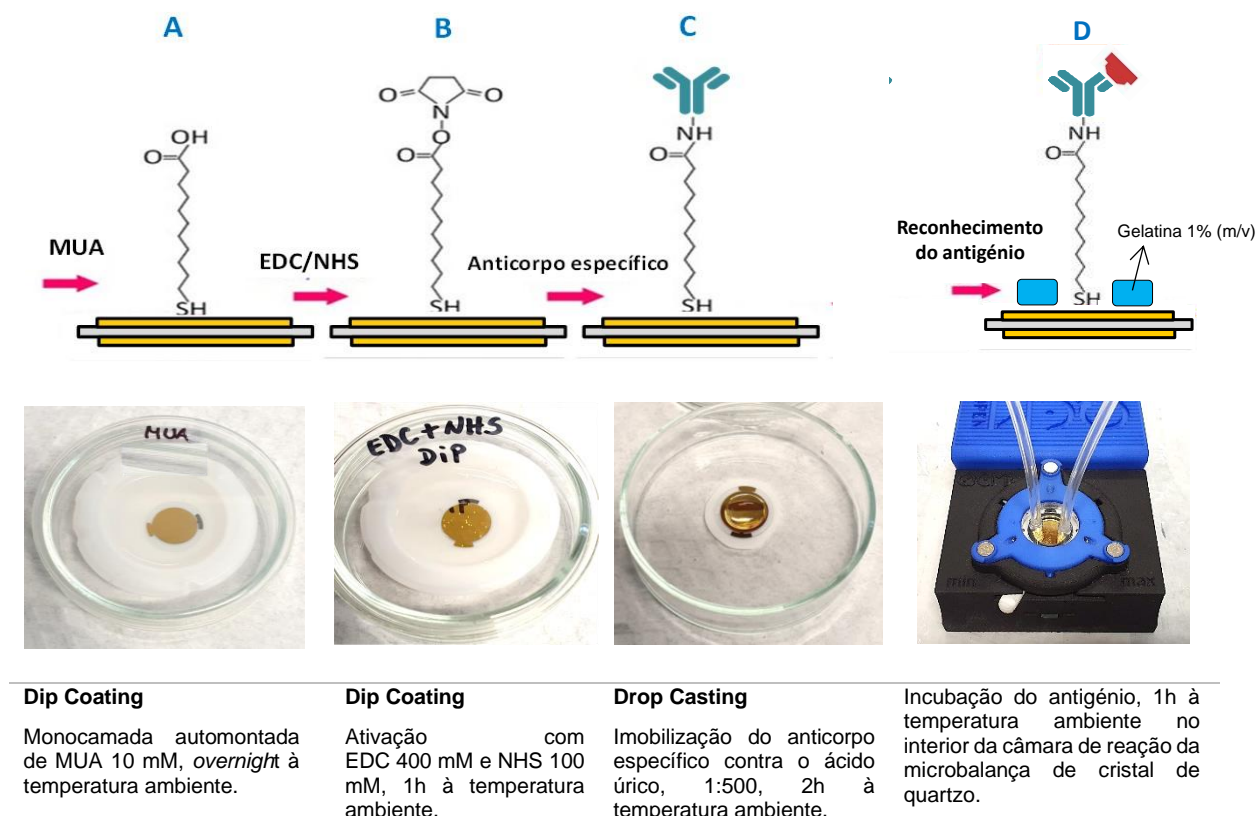
Após a imobilização do elemento de reconhecimento biológico, procedeu-se à adição de 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de gelatina 1% (m/v), para bloquear as ligações não específicas, sobre a superfície do sensor piezoelétrico com o anticorpo previamente imobilizado, seguida da solução de antígeno (50  $\mu\text{L}$  durante 60 minutos). A figura 3.11 mostra esta etapa adicional referente ao reconhecimento e ligação do antígeno ao bioreceptor.



**Figura 3.11** - (A) Formação de uma monocamada automontada de (MUA), (B) Ativação dos grupos carboxilo do MUA com EDC e NHS, (C) Imobilização do anticorpo policlonal contra o ácido úrico, (D) Reconhecimento e ligação do antígeno (ácido úrico).

A figura 3.12 resume e apresenta pictoricamente o conjunto de procedimentos experimentais executados nas diversas etapas da modificação otimizada da superfície do sensor piezoelétrico, bem como diversas outras consideradas para o efeito. Evidencia-se, nas etapas A e B, a modificação da superfície do sensor com uma monocamada automontada de MUA, seguida da ativação com EDC e NHS, em ambas as etapas por imersão deste elemento em soluções dos reagentes referidos (*Dip Coating*).

Por seu lado, na etapa C, a imobilização do anticorpo específico contra o ácido úrico foi efetuada por *Drop Casting*, tal como o bloqueio de interações não específicas com a solução de gelatina 1 % (m/v). Refira-se que o processo de modificação da superfície do sensor e formação da biocamada foi efetuada “fora” da câmara de reação da microbalança de cristal de quartzo. A incubação do antígeno, por sua vez, foi conduzida já no interior deste módulo tal como se mostra na etapa D da figura 3.12.



**Figura 3.12** - Procedimento experimental executado nas diversas etapas de modificação da superfície do sensor piezoelétrico, visando a formação da biocamada com ERB imobilizado para o reconhecimento e ligação do antígeno na etapa D.

### 3.7.4. Regeneração da superfície do sensor

Nesta fase do trabalho testou-se a possibilidade de regeneração da biocamada formada visando a reutilização do biossensor. Desta forma, a superfície do sensor foi tratada com NaOH 1M durante 5 minutos. Perspetivou-se que, durante esta fase, o antígeno seria removido mantendo o elemento de reconhecimento biológico e a restante biocamada, com possível reutilização para novo ensaio. Neste estudo, observou-se a variação de frequência de vibração do sensor piezoelétrico antes da ligação do antígeno, ou seja, apenas com a biocamada contendo o elemento de reconhecimento biológico e após regeneração, isto é, após o tratamento da superfície com NaOH 1M posteriormente à ligação do analito.

Pelo facto de os resultados não terem ido de encontro ao que teria sido perspetivado (ver ponto 4.7 do capítulo dos resultados experimentais e discussão) foi decidido que a superfície do sensor teria que ser funcionalizada a cada ensaio.

### 3.8. Calibração do biossensor piezoelétrico

Uma vez otimizadas as condições de modificação da superfície do sensor e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico, decorrente do planeamento experimental executado, procedeu-se à calibração do dispositivo desenvolvido, que expressa a relação entre a variação de frequência de vibração do cristal piezoelétrico e diversas soluções de antigénio com diferentes concentrações.

Assim, para a calibração do dispositivo foram utilizadas 8 soluções padrão de antigénio, preparadas a partir da solução de antigénio comercial, com um intervalo de concentração entre 10 µg/mL e 500 µg/mL. As soluções padrão de antigénio foram preparadas em PBS e incubadas no interior da câmara de reação da microbalança de cristal de quartzo, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. A tabela 3.4 mostra a metodologia seguida na preparação das diferentes soluções padrões de antigénio.

É de salientar que a escolhas das concentrações foi feita tendo por base os valores de referência do ácido úrico na urina. Segundo Ratautaite *et al.*, 2021 os valores normais variam de 250 a 750 mg/24 horas, ou seja, 1,48 a 4,43 mmol/24 horas, considerando um volume diário de urina de 1,5L. Nesse sentido preparou-se um intervalo de concentrações que abrangesse esses valores.

**Tabela 3.4** - Preparação dos diferentes padrões para a curva de calibração

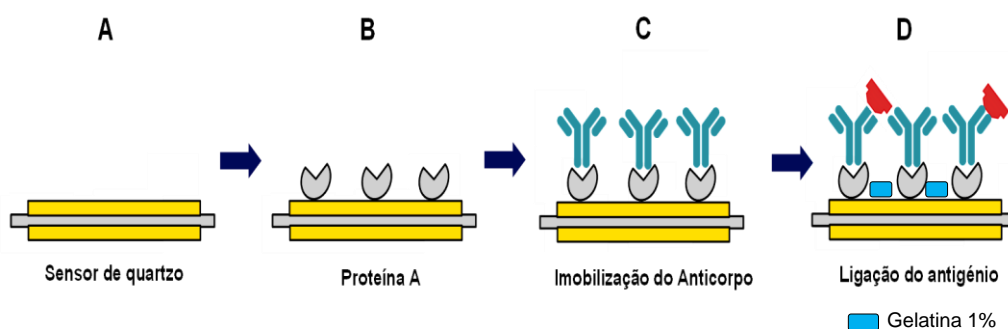
| Padrões | Concentração (µg/mL) | Volume final (µL) | Diluição da solução comercial | Volume da solução antigénio comercial (µL) | Volume PBS (µL) |
|---------|----------------------|-------------------|-------------------------------|--|-----------------|
| 1       | 10                   | 100               | 1:100                         | 1,0  | 99,0            |
| 2       | 25                   | 100               | 1:40                          | 2,5  | 97,5            |
| 3       | 50                   | 100               | 1:20                          | 5,0  | 95,0            |
| 4       | 100                  | 50                | 1:10                          | 5,0  | 45,0            |
| 5       | 200                  | 50                | 1:5                           | 10,0                                       | 40,0            |
| 6       | 300                  | 50                | 1:3,3                         | 15,0                                       | 35,0            |
| 7       | 400                  | 50                | 1:2,5                         | 20,0                                       | 30,0            |
| 8       | 500                  | 50                | 1:2                           | 25,0                                       | 25,0            |

### 3.9. Estudo de diferentes arquiteturas de superfície para imobilização do bioreceptor

Nesta etapa do trabalho testaram-se novas metodologias de imobilização do elemento de reconhecimento biológico, determinando novas arquiteturas de superfície na formação da biocamada. O principal objetivo deste estudo prendeu-se com a otimização adicional da performance analítica do dispositivo, nomeadamente em termos da sensibilidade da resposta produzida.

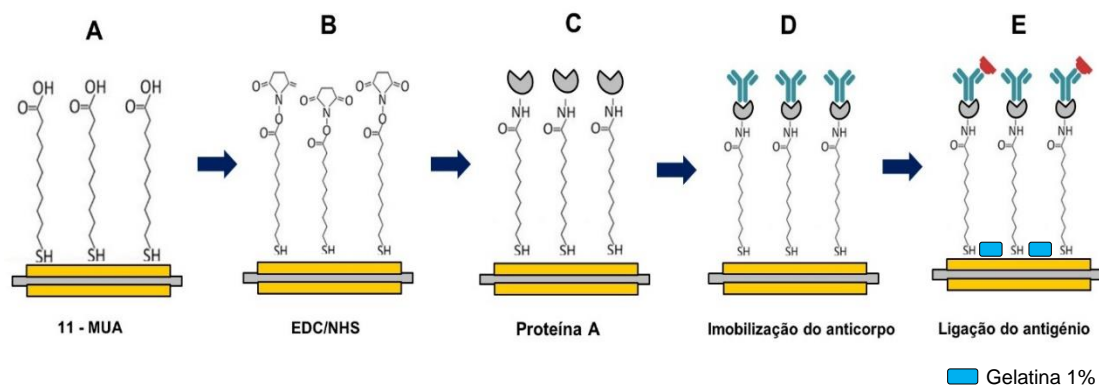
Com efeito, a ligação dos grupos carboxilo ativados do MUA ao anticorpo específico não se verifica em nenhum ponto ou região específica. Desta forma, a orientação adquirida pelos anticorpos poderá apresentar um grau de aleatoriedade importante com influência na resposta final do biossensor. Neste sentido decidiu testar-se a utilização da Proteína A na modificação da superfície do sensor piezoelétrico, uma vez que esta se liga à região constante do anticorpo conferindo-lhe uma orientação homogênea e mais adequada (Shanehbandi *et al.*, 2017).

Começou por simplificar-se a arquitetura de superfície procedendo à modificação do cristal piezoelétrico apenas com proteína A. A sequência de formação da biocamada é apresentada na figura 3.13.



**Figura 3.13** - Modificação da superfície de ouro que recobre o cristal de quartzo: **(A)** Superfície de ouro despida; **(B)** Modificação com proteína A; **(C)** Imobilização do elemento de reconhecimento biológico **(D)** Reconhecimento e ligação do antígeno.

A metodologia seguinte incluiu a modificação da superfície com MUA, seguida de ativação com EDC e NHS e introdução adicional da proteína A, previamente à imobilização do anticorpo. A figura 3.14 ilustra o procedimento considerado nesta nova arquitetura.



**Figura 3.14** - Modificação da superfície de ouro que recobre o cristal de quartzo: **(A)** Formação de uma monocamada automontada de MUA; **(B)** Ativação dos grupos carboxilo do MUA com EDC e NHS; **(C)** Ligação da proteína A; **(D)** Imobilização do elemento de reconhecimento biológico; **(E)** Reconhecimento e ligação do antígeno.

À semelhança dos ensaios anteriores, também no caso dos sensores modificados de acordo com as novas metodologias que se mostram na figura 3.13 e 3.14, se procedeu à medição de frequência de vibração do cristal piezoelétrico após a formação da biocamada e após a ligação do anticorpo. A respetiva diferença ou variação de frequência foi também considerada a resposta analítica final. Os resultados obtidos com os sensores modificados com estas novas arquiteturas de superfície foram comparados com aqueles decorrentes dos ensaios efetuados com o dispositivo modificado de acordo com a metodologia inicialmente otimizada. Neste âmbito, tendo em conta os resultados observados, procedeu-se também à calibração do biossensor montado com recurso à metodologia de modificação de superfície que se mostra na figura 3.14. Este estudo foi efetuado de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.8.

### **3.10. Determinação do ácido úrico em amostras de urina com o biossensor desenvolvido**

Para verificar a aplicabilidade do biossensor em amostras biológicas foi utilizada uma amostra de urina. Uma vez que esta é uma amostra real de matriz complexa, com um conteúdo significativo de possíveis interferentes, procedeu-se à sua purificação por ultrafiltração com recurso a membranas poliméricas de acetato de celulose que assumiram o papel de filtros de permeabilidade seletiva, permitindo a remoção de contaminantes presentes na amostra, melhorando assim a seletividade do biossensor.

#### **3.10.1. Preparação das membranas de ultrafiltração para purificação das amostras de urina**

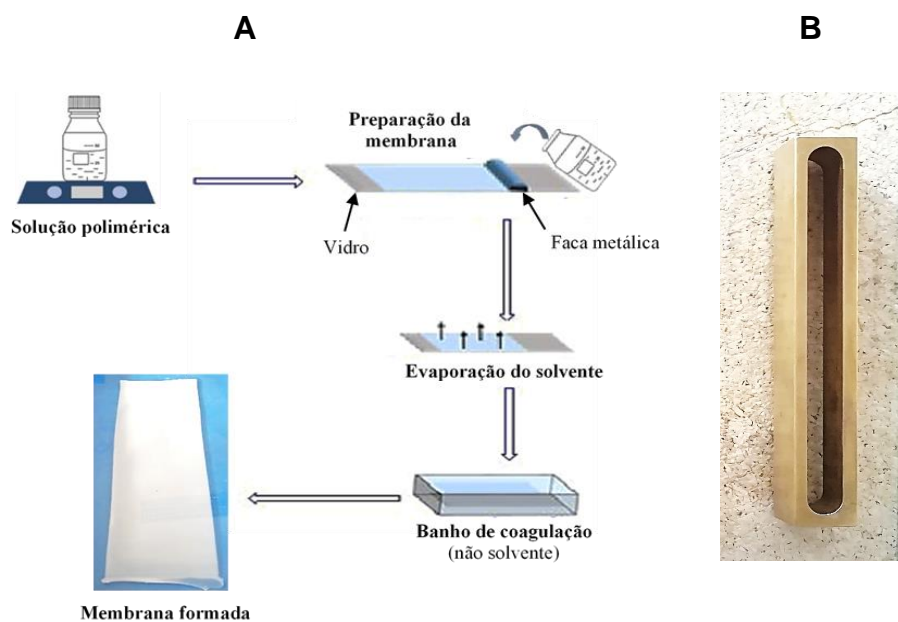
Foram preparados dois tipos de membranas de acetato de celulose com tamanho de poros diferentes, através do método de inversão de fases. Para tal, para 100g de solução polimérica, as quantidades de acetato de celulose (AC), acetona e formamida a pesar são as indicadas na tabela 3.5 em função da membrana pretendia.

As quantidades utilizadas dependeram da porosidade desejada, isto é, quanto maior for a variação da concentração de formamida na solução polimérica de acetato de celulose/formamida/acetona, maior será o tamanho do poro da membrana.

**Tabela 3.5** - Soluções poliméricas e condições de preparação das membranas de acetato de celulose.

|                                   | Membrana polimérica<br>1         | Membrana polimérica<br>2 |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| <b>Solução polimérica (% m/m)</b> |                                  |                          |
| Acetato de celulose               | 17,0                             | 17,0                     |
| Acetona                           | 61,0                             | 56,0                     |
| Formamida                         | 22,0                             | 27,0                     |
| <b>Condições de preparação</b>    |                                  |                          |
| Temperatura da solução (°C)       | 20 - 25                          | 20 - 25                  |
| Tempo de evaporação (min)         | 0,5                              | 0,5                      |
| Meio de coagulação (1-2h)         | Água (0-3°C) para todos os casos |                          |

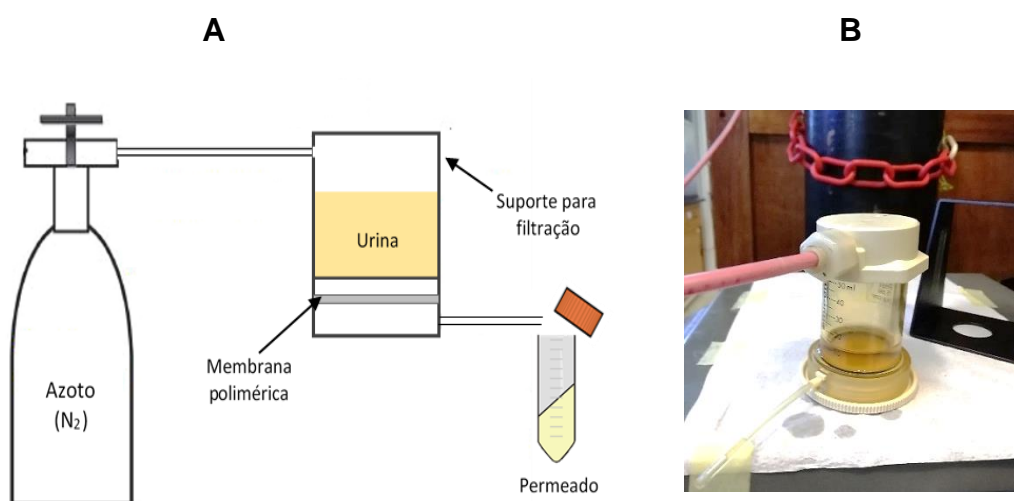
Todos os componentes da solução foram pesados num frasco rolhado, previamente limpo e seco, pela seguinte ordem: acetato de celulose (polímero), formamida (promotor de poro) e acetona (solvente). O frasco foi vedado com parafilme de forma a evitar a evaporação da acetona e colocado num agitador, à temperatura ambiente, durante aproximadamente 24 horas, resultando numa solução homogénea, límpida e viscosa. Uma vez retirada da agitação, a solução foi manuseada cuidadosamente, sem agitar, para evitar a formação de bolhas de ar, dado que estas provocam irregularidades indesejáveis na membrana. Posto isto, iniciou-se a preparação efetiva da membrana com auxílio de uma faca metálica com uma ranhura calibrada (0,25mm) e um vidro retangular. Colocou-se a faca na extremidade superior do vidro, previamente limpo com acetona, com a ranhura calibrada virada para baixo e para o exterior, e encheu-se o seu interior com a solução polimérica com a quantidade suficiente para cobrir o vidro e, perpendicularmente, deslizou-se sobre o vidro a uma velocidade constante. Logo após o “deslizamento”, observou-se 30 segundos de evaporação e introduziu-se o vidro com o filme polimérico, de imediato e cuidadosamente, num recipiente com o meio de coagulação constituído por água desionizada e gelo para manter a temperatura entre 0°C e 3°C. Após a solidificação do filme polimérico e, conseqüentemente, do desenvolvimento da membrana, este foi retirado do vidro e procedeu-se à identificação da face ativa da membrana. As membranas preparadas foram mantidas numa solução aquosa até à sua utilização. A figura 3.15 ilustra a preparação das membranas de ultrafiltração de acetato de celulose pelo processo de inversão de fases.



**Figura 3.15** – (A) Esquema representativo do processo de inversão de fases utilizado para a preparação das membranas de ultrafiltração de acetato de celulose, (B) Faca utilizada na preparação das membranas.

### 3.10.2. Ultrafiltração

A filtração da amostra biológica de urina foi realizada sob pressão utilizando azoto. O suporte para a ultrafiltração foi ligado a uma coluna de azoto e o permeado foi recolhido num tubo *Falcon*. A pressão transmembranar utilizada variou entre 0 e 4 bar e foi controlada por regulador de pressão. Um esquema do sistema de ultrafiltração é mostrado na Fig. 3.16. O permeado resultante contendo a urina purificada foi posteriormente utilizado para os ensaios de determinação de ácido úrico.



**Figura 3.16** – (A) Esquema representativo do processo de ultrafiltração (B) Foto real do suporte para a ultrafiltração, contendo uma amostra de urina em processo de purificação/filtração.

### **3.10.3. Determinação de ácido úrico em amostra de urina**

Como referido anteriormente, com o intuito de avaliar o comportamento do biossensor num contexto mais real, foram efetuados ensaios para a determinação da concentração de ácido úrico em amostras de urina fortificadas com a solução de antigénio comercial. Para o efeito, prepararam-se três amostras de urina filtrada e fortificada com a solução comercial de antigénio, com concentrações de 20,0 µg/mL, 75,0 µg/mL e 150,0 µg/mL em ácido úrico e pH=7,4. A razão para esta fortificação das amostras prende-se com o facto de o ácido úrico em si não ser uma espécie imunogénica e como tal necessitar de ser conjugado como uma proteína, como por exemplo a BSA, tal como acontece justamente com a solução comercial de antigénio. Nesta fase considerou-se ainda, o desenvolvimento de uma metodologia visando a conjugação de ácido úrico com esta ou outra proteína, que permitisse a modificação do ácido úrico presente nas amostras de urina. No entanto, face à previsível morosidade deste processo e tendo em conta a limitação de tempo nesta fase de desenvolvimento do trabalho, optou-se por não o fazer e proceder à fortificação das amostras de urina com a solução comercial de antigénio, o que possibilitou igualmente demonstrar a aplicabilidade do biossensor desenvolvido na determinação de ácido úrico neste tipo de amostras.

A quantificação dos valores de concentração de ácido úrico referidos, foi efetuada utilizando a equação da reta de calibração resultante da calibração efetuada ao biossensor e que se descreve no ponto 3.8. Os valores experimentais de concentração de ácido úrico obtidos para ambas as amostras de urina foram comparados com os valores de referência resultantes da sua fortificação. Com este propósito, efetuou-se a determinação dos respetivos erros relativos que permitem estimar a exatidão dos resultados obtidos com o biossensor, nas análises da amostra de urina.

## Resultados experimentais e discussão

---

Neste capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados experimentais obtidos nas diversas fases do trabalho relacionadas com o desenvolvimento do biossensor piezoelétrico para a deteção e quantificação de ácido úrico em urina. Em termos genéricos, estes versarão inicialmente a caracterização do sistema de fluxo utilizado no “*setup*” experimental, visando por um lado o conhecimento e controlo dos caudais admitidos à câmara de reação, assim como o volume deste elemento e por outro o funcionamento adequado de todo o sistema.

Apresentar-se-ão os resultados relacionados com a otimização e seleção do procedimento de limpeza da superfície do elétrodo de ouro do sensor piezoelétrico, com vista à sua modificação com a biocamada de interesse. Sequencialmente, e de modo a comprovar que a modificação da superfície do transdutor como os reagentes considerados para o efeito, será apresentado o resultado decorrente da caracterização microscópica da superfície do sensor piezoelétrico, através da Microscopia de Força Atómica. Serão discutidos os resultados relacionados com a otimização dos parâmetros envolvidos na constituição da biocamada, incluindo os reagentes a utilizar, a sua concentração, os períodos de reação envolvidos, entre outros. Neste âmbito, apresentar-se-ão os resultados e conclusões retiradas da elaboração de um design experimental delineado para o efeito. Os resultados relacionados com uma otimização mais fina de alguns parâmetros envolvidos no processo de modificação da superfície do sensor piezoelétrico e também da resposta analítica final do biossensor, que se decidiu realizar, serão também apresentados.

Comparar-se-ão também os resultados decorrentes de diferentes metodologias utilizadas para a modificação da superfície do sensor piezoelétrico, que resultaram em diferentes arquiteturas do dispositivo biossensor em si, designadamente no que concerne à sensibilidade da resposta analítica. Com base nas diferentes arquiteturas então consideradas, apresentar-se-ão para todos os casos as respetivas calibrações dos biossensores resultantes, assim como as principais figuras de mérito que caracterizam o seu desempenho analítico. Os resultados obtidos serão comparados e discutidos. Neste âmbito serão discutidas as razões que presidiram às metodologias consideradas e utilizadas.

Por fim, serão apresentados os resultados decorrentes da análise das amostras de urina, com os biossensores desenvolvidos, comparando os resultados obtidos e estimando a sua exatidão relativamente ao valor de referência que resultou da fortificação das mesmas com a solução comercial de antigénio.

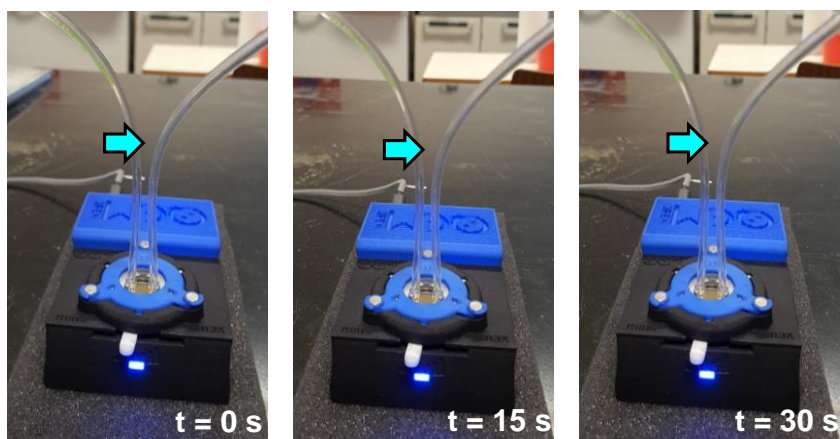
#### 4.1. Caracterização e otimização do funcionamento do sistema de fluxo

A necessidade de otimização prévia do sistema de fluxo utilizado no “*setup*” experimental foi uma etapa fundamental no desenvolvimento do trabalho, tendo em conta a realização de análises em contínuo e em tempo real previstas. Considerando o sistema de medição do biossensor piezoelétrico, constituído, globalmente, por uma bomba peristáltica, pela microbalança de cristal de quartzo e por um sistema de aquisição de dados dedicado, esta caracterização inicial incidiu, em particular, sobre o funcionamento da bomba peristáltica. Com efeito, tendo em conta que a quantidade dos reagentes envolvidos no processo de análise, em particular dos imunoreagentes, era bastante diminuta e sendo os mesmos bastante onerosos, considerou-se ser fundamental um conhecimento mais preciso de alguns parâmetros característicos deste sistema de fluxo. Particular atenção recaiu sobre os caudais debitados pela bomba peristáltica, de modo a adequá-los com mais rigor a cada um dos reagentes necessários, na perspetiva da minimização do seu consumo e também do custo global associado ao seu funcionamento.

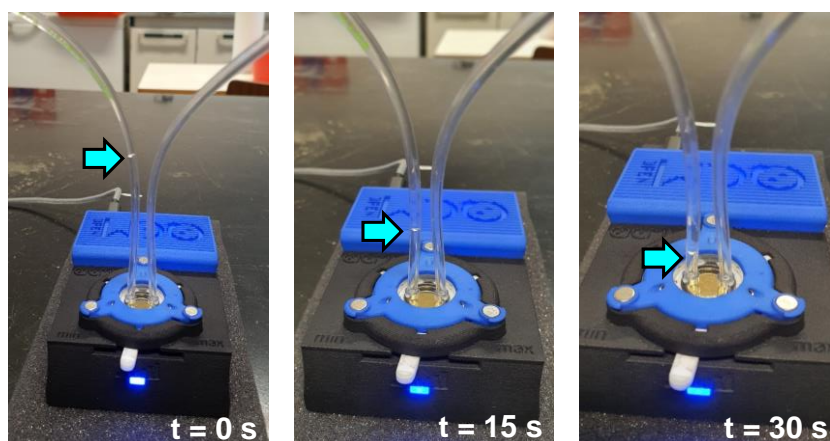
Um dos desafios iniciais prendeu-se com a garantia da estanquidade do sistema de fluxo. Apenas desta forma foi possível garantir em cada ensaio realizado, um controlo rigoroso dos caudais impostos pela bomba ao sistema em si, minimizando também o consumo de reagentes. A situação ótima para esta condição foi atingida quando se observou a manutenção do nível dos reagentes no interior do sistema de fluxo com a bomba peristáltica parada. A figura 4.1 mostra uma sequência de imagens que ilustram a situação ideal de operacionalidade do sistema de fluxo, assim como um conjunto de imagens relativas a uma situação contrária.

Ainda no que concerne à caracterização do sistema de fluxo, verificou-se ser importante o conhecimento do volume da câmara de reação, de modo a otimizar também o volume de reagentes a utilizar em cada ensaio, minimizando assim o desperdício dos mesmos. Para o efeito começou por efetuar-se a calibração da bomba peristáltica estabelecendo o valor dos caudais,  $Q$  ( $\mu\text{L min}^{-1}$ ), permitidos. Os valores dos caudais médios obtidos para cada posição da bomba e o respetivo gráfico de calibração mostram-se na figura 4.2.

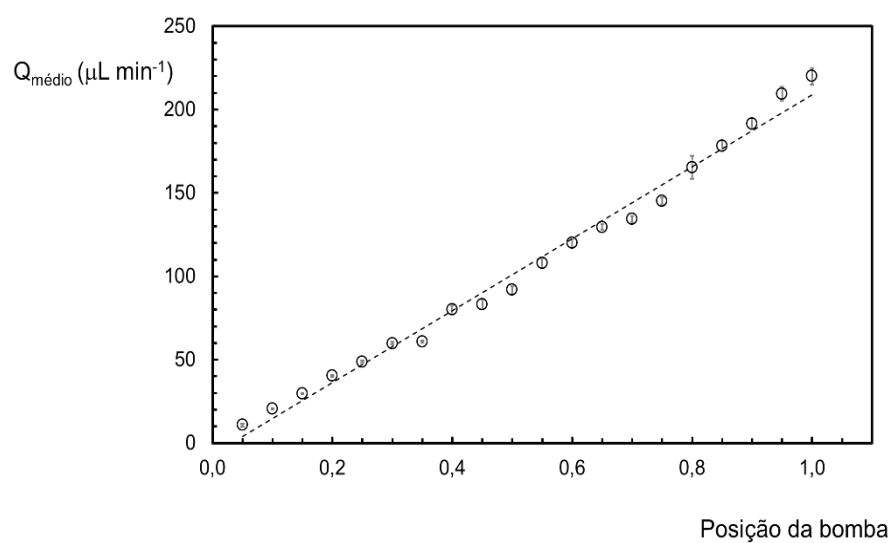
### Câmara de fluxo estanque



### Câmara de fluxo não estanque



**Figura 4.1** - Sequência de imagens que mostram o caso em que o sistema de fluxo se encontra completamente estanque e também o caso indesejável em que o nível de reagente varia com o tempo.



**Figura 4.2** - Calibração da bomba peristáltica utilizando o valor médio dos caudais ( $n=3$ ) registados para cada posição.

Uma vez estabelecida a calibração da bomba peristáltica, procedeu-se à determinação do volume da câmara de fluxo visando o conhecimento do volume máximo suportado pela mesma. Para este estudo consideraram-se os caudais médios obtidos em 3 posições da bomba peristáltica. Os resultados obtidos mostram-se na tabela 4.1, concluindo-se que a câmara de fluxo apresenta um volume de  $49,8 \pm 1,7$  mL, ou seja, aproximadamente 50 mL.

**Tabela 4.1** - Resultados obtidos no estudo conducente ao estabelecimento do volume da câmara de fluxo.

| Posição da bomba | Caudal médio, $Q_{\text{médio}}$<br>( $\mu\text{L min}^{-1}$ ) | Tempo de enchimento da<br>câmara de fluxo<br>(min) | Volume da câmara de fluxo<br>(mL)                  |
|------------------|--|--|--|
| 0,1              | 21,0   | 2,35   | 49,4   |
| 0,1              | 21,0   | 2,32   | 48,7   |
| 0,6              | 120,0  | 0,42   | 50,4   |
| 0,6              | 120,0  | 0,41   | 49,2   |
| 0,9              | 195,0  | 0,26   | 50,7   |
| 0,9              | 195,0  | 0,26   | 50,7   |
|                  |  |  | <b>Volume médio = <math>49,8 \pm 1,7</math> mL</b> |

## 4.2. Preparação da superfície do sensor para a imobilização do bioreceptor

As condições da superfície do sensor de cristal de quartzo para efeitos da formação da biocamada com imobilização do elemento de reconhecimento biológico ou bioreceptor, constituiu um aspeto fundamental que foi tido em conta no desenvolvimento e montagem do biossensor piezoelétrico. Com efeito, considerando que no presente estudo a superfície do sensor ou transdutor piezoelétrico é constituída por um elétrodo de ouro, efetuaram-se diversos ensaios com vista à seleção do procedimento de limpeza a utilizar no tratamento da superfície deste material. Assim, procurou-se, desta forma, otimizar o procedimento de limpeza e selecionar o mais eficaz, mas também menos moroso e envolvendo menos reagentes. Utilizaram-se, efetivamente, duas metodologias baseadas em diferentes princípios. Uma destas metodologias consistiu na preparação da superfície do sensor com recurso a ultrassons, utilizando o álcool isopropílico como solvente de limpeza. Numa outra abordagem utilizou-se uma mistura de peróxido de hidrogénio e amónia aquecida a uma temperatura adequada para a limpeza da superfície do sensor.

Ambos os procedimentos de limpeza da superfície do sensor piezoelétrico foram testados em dois sensores diferentes (A e B), intencionalmente “sujos” através de uma manipulação direta da sua superfície. Após este procedimento, mediu-se a frequência de ressonância inicial do cristal de quartzo, ou seja, do sensor “sujo” e após cada procedimento de limpeza. A variação de frequência obtida com ambas as metodologias de tratamento de superfície e com ambos os sensores A e B, permitiu concluir acerca do procedimento mais eficaz para o efeito

e, assim, selecionar aquele a ser utilizado em todo o trabalho subsequente. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 4.2

**Tabela 4.2** - Resultados obtidos após a limpeza dos sensores “sujos” com ambos os procedimentos de limpeza.

| Sensor |                              | Frequência inicial do sensor (Hz) | Frequência após limpeza (Hz) | Variação de frequência (Hz) | Variação de frequência média (Hz) |
|--------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| A      | Limpeza com ultrassons       | 10006858,0                        | 10007091,0                   | 233,0                       | 234,0                             |
| B      | Limpeza com ultrassons       | 10004798,1                        | 10004563,1                   | 235,0                       |                                   |
| A      | Limpeza com mistura oxidante | 10006566,0                        | 10006795,1                   | 229,1                       | 225,1                             |
| B      | Limpeza com mistura oxidante | 10004278,0                        | 10004499,0                   | 221,0                       |                                   |

Os resultados que se mostram na tabela 4.2. correspondem aos melhores resultados obtidos após a realização de diversos ensaios com diferentes condições inerentes a cada uma das metodologias estudadas.

Como se pode observar através da tabela 4.2, para ambos os sensores A e B, os resultados obtidos com a limpeza com ultrassons caracterizam-se pela obtenção de uma variação de frequência mais elevada. Esta observação significa que a metodologia foi mais eficaz na remoção da “sujidade” existente na superfície do sensor, permitindo um aumento mais significativo na sua frequência de ressonância e logo uma maior diferença para a situação inicial. A esta observação, não é alheio o facto de a limpeza com ultrassons, utilizando ondas ultrassónicas que se propagam e são transferidas para o solvente de limpeza em contacto com a superfície a ser limpa, originar um fenómeno designado por cavitação, através do qual são criadas milhares de bolhas de ar microscópicas geradas pelo contacto entre o solvente e a referida superfície. No caso presente, estas bolhas ao penetrar na superfície de ouro submersa, contendo sujidade, permitiram a remoção dessas impurezas de um modo mais eficaz que o observado para a outra metodologia testada.

No caso particular da utilização da mistura oxidante, verificou-se, ainda, que durante os ensaios subsequentes com os sensores submetidos a esta metodologia de limpeza deixavam, frequentemente, de exibir a sua frequência nativa, passando esta a ser de 0,0 Hz. Este facto poderá, eventualmente, resultar da sensibilidade do material de que é constituído o sensor face à natureza dos reagentes químicos envolvidos no procedimento de limpeza.

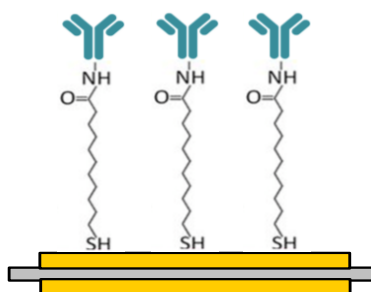
Assim, tendo em conta os resultados obtidos com a metodologia baseada em ultrassons e a observação relatada anteriormente, decorrente da utilização da mistura oxidante, optou-se por proceder à limpeza da superfície de ouro dos sensores de cristal de quartzo em todos os

ensaios subseqüente, apenas com recurso à metodologia baseada na tecnologia de ultrassons, utilizando como solvente de limpeza o álcool isopropílico.

#### 4.3. Formação da monocamada automontada e imobilização do bioreceptor: Ensaio preliminares

Nesta fase do desenvolvimento do trabalho procederam-se a diversos estudos visando estabelecimento de um procedimento/metodologia de imobilização do elemento de reconhecimento biológico do biossensor piezoelétrico, tendo em conta a otimização da performance analítica global do dispositivo.

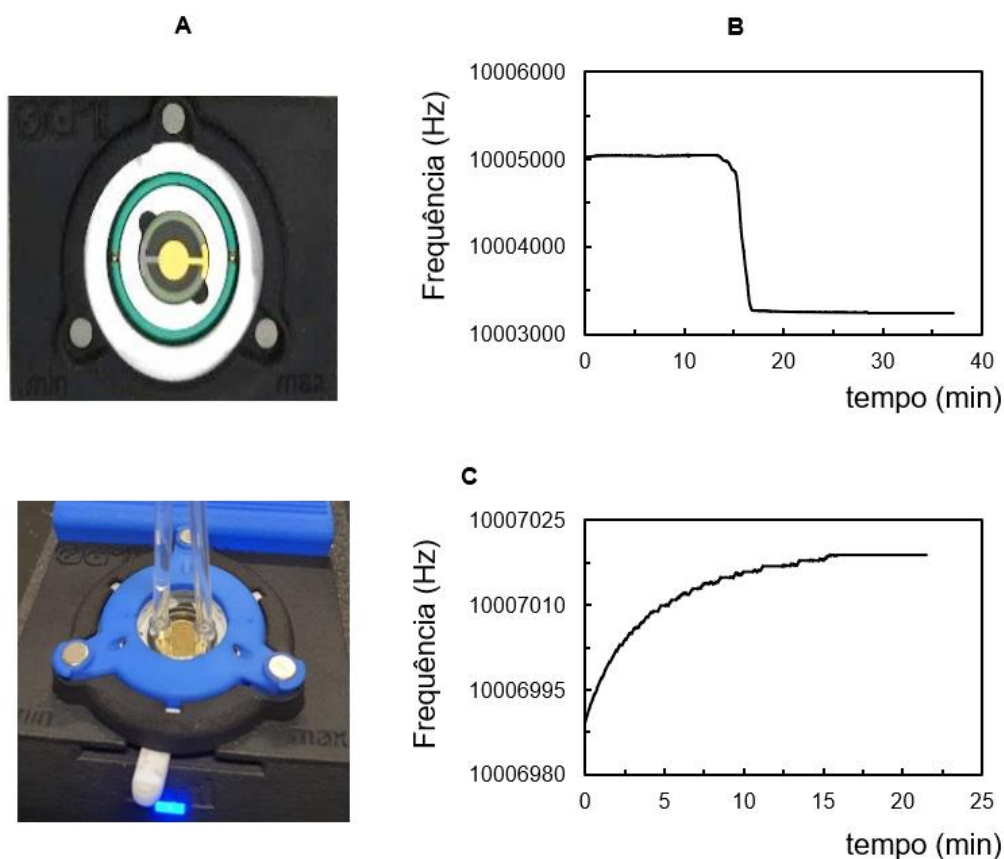
Inicialmente foram realizados alguns ensaios preliminares de acordo com informação recolhida na literatura (Hnaien *et al.*, 2008; Chunta *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2019; Shanehbandi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2020) que procurou, sempre, adequar-se ao dispositivo a desenvolver. Neste em particular foi tido em conta, sobretudo, o diâmetro do elétrodo de ouro (14 mm) que recobre a superfície do sensor piezoelétrico e sobre a qual se iria proceder à formação da biocamada e imobilização do elemento de reconhecimento biológico. Nestes ensaios preliminares, a superfície do elétrodo de ouro foi modificada com uma monocamada automontada de MUA ativada com EDC e NHS, ao que se seguiu a imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico de acordo com o esquema genérico que se mostra na figura 4.3.



**Figura 4.3** – Esquema simplificado da arquitetura de superfície que caracteriza o biossensor utilizado nos ensaios iniciais.

Com a modificação da superfície do sensor piezoelétrico efetuada de acordo com o esquema que se mostra na figura 4.3, procederam-se a alguns testes iniciais que visaram a observação e registo da resposta de todo o sistema de medição, incluindo o sistema de fluxo e, evidentemente, o transdutor piezoelétrico constituído pelo cristal de quartzo recoberto pelo elétrodo de ouro modificado e pela microbalança de cristal de quartzo. Num destes ensaios procedeu-se ao preenchimento da câmara de reação do sistema de medição (figura 4.4A) com uma solução de antigénio preparada em PBS observando a respetiva variação de frequência de vibração do sensor piezoelétrico. Tal como esperado, sobretudo em face da

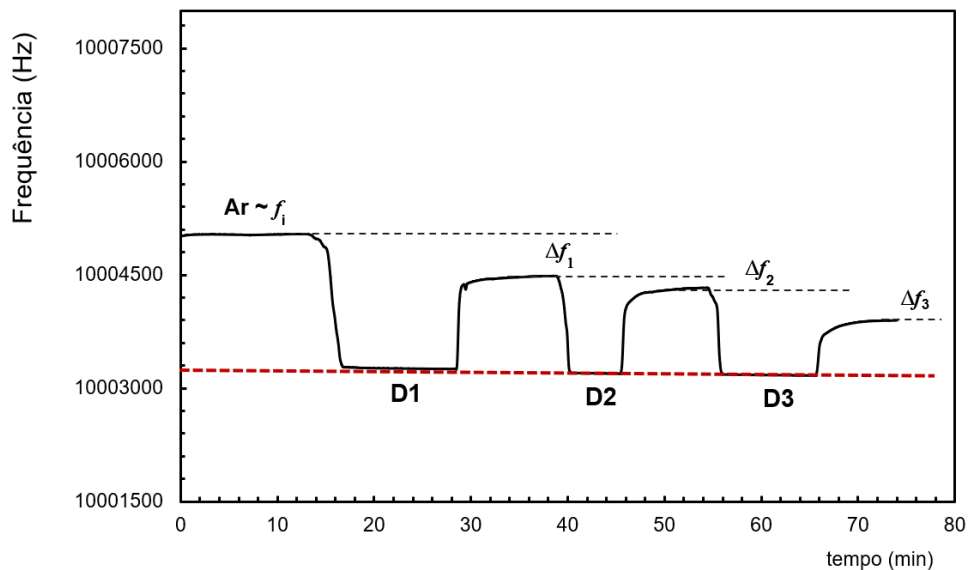
elevada quantidade de solvente, observou-se um decréscimo acentuado deste parâmetro, de acordo como se mostra na figura 4.4B. Na figura 4.4C observa-se o resultado de um ensaio que traduz a estabilização da frequência de vibração do sensor piezoelétrico quando se remove o tampão PBS da câmara de reação, após o reconhecimento e ligação do antigénio aos anticorpos imobilizados. As figuras 4.4B e 4.4C, evidenciam, ainda, o período tipicamente necessário para se verificar a estabilização da frequência de ressonância do cristal piezoelétrico modificado em ambos os tipos de teste efetuados.



**Figura 4.4** - Resposta analítica do sistema de medição onde se mostra: **(A)** câmara de reação a ser preenchida com solução de antigénio; **(B)** diminuição da frequência de vibração do sensor piezoelétrico em resultado do preenchimento da câmara de reação com a solução de antigénio preparada em PBS; **(C)** estabilização da frequência de vibração do sensor após reconhecimento e ligação do antigénio.

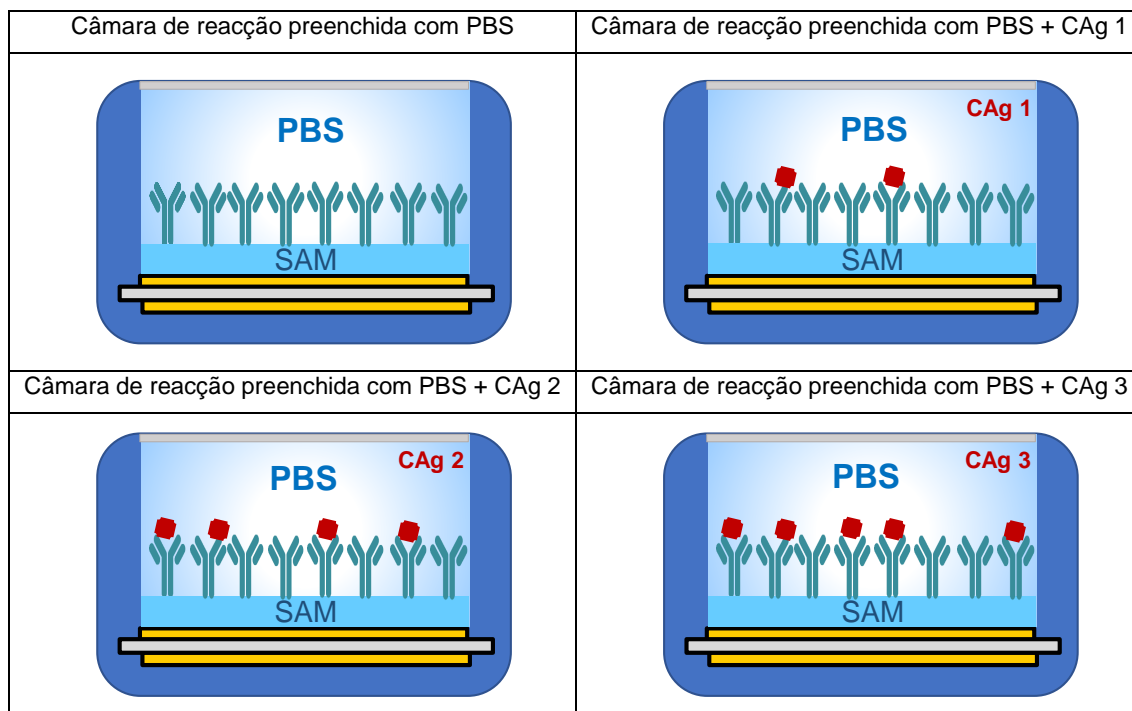
Ainda durante esta fase preliminar do trabalho, pretendeu estudar-se a resposta do biossensor montado com o transdutor modificado de acordo com o descrito no ponto 3.5, a soluções de antigénio com diferentes concentrações. Para o efeito prepararam-se diluições sucessivas da solução comercial de antigénio ( $D1 > D2 > D3$ ) e mediram-se as respetivas frequências finais ( $f_f$ ) decorrentes do enchimento da câmara de reação com uma solução contendo o analito e após um período de incubação. Como resultado final, consideraram-se as variações de frequência medidas em relação à frequência inicial da medição ( $f_i$ ), resultante

apenas da presença da biocamada na superfície do cristal de quartzo. O resultado deste ensaio mostra-se na figura 4.5.



**Figura 4.5** – Sensograma que esquematiza a resposta preliminar obtida para diferentes diluições de antigénio e a resposta analítica final, considerada para os ensaios subsequentes efetuados com o biossensor piezoelétrico desenvolvido.

Como se pode observar na figura 4.5 e, tendo em conta que as soluções de antigénio (entendido neste âmbito como o soluto destas misturas) foram tipicamente preparadas em tampão PBS (entendido neste âmbito como o solvente destas misturas), verificou-se, em termos práticos, que a frequência medida quando a câmara de reação era preenchida com as soluções de antigénio com diferentes diluições (linha tracejada a cor vermelha) era praticamente a mesma, ou seja, a variação deste parâmetro, mostrou-se praticamente inexistente para as diferentes concentrações de antigénio. Com efeito, pensou-se que esta observação relacionada com a sensibilidade diminuta das medições, se prendeu com a presença de uma elevada quantidade relativa do solvente da solução de antigénio (designadamente o tampão PBS), o qual, preenchendo totalmente a câmara de reação, não permitiu a observação de uma variação adicional da frequência de vibração do cristal piezoelétrico em conformidade com as sucessivas concentrações de antigénio/soluto presente. A figura 4.6 pretende ilustrar o efeito descrito anteriormente.



**Figura 4.6** – Esquema que traduz um corte transversal da câmara de reacção, onde se pretende evidenciar a relação quantitativa entre o solvente (PBS) e soluto (antigénio, Ag) e o efeito quase exclusivo que o primeiro, face à sua elevada quantidade relativa em todas as soluções, exerce na variação de frequência de vibração do cristal piezoelétrico. Mostram-se, como exemplo, três concentrações de antigénio onde,  $CAg\ 3 > CAg\ 2 > CAg\ 1$ .

Neste sentido, optou por considerar-se, como resposta final da medição, a frequência de vibração do cristal piezoelétrico após a remoção total do tampão PBS da câmara de reacção, que se seguiu ao período de incubação do antigénio considerado para reconhecimento e ligação por parte do anticorpo específico. A frequência inicial da medição, manteve-se como aquela associada à vibração do sensor piezoelétrico, relativa à presença de apenas da biocamada na superfície do cristal de quartzo (vibração do sensor “ao ar”).

A figura 4.5, além de traduzir a limitação observada, mostra, em função dessa mesma limitação, a resposta final considerada para todos os ensaios realizados. Com efeito, evidencia-se a frequência de vibração inicial ( $f_i$ ) e as variações de frequências ( $\Delta f_1$ ,  $\Delta f_2$  e  $\Delta f_3$ ) obtidas para as concentrações crescentes de antigénio, após o respetivo período de incubação e remoção do tampão PBS da câmara de reacção.

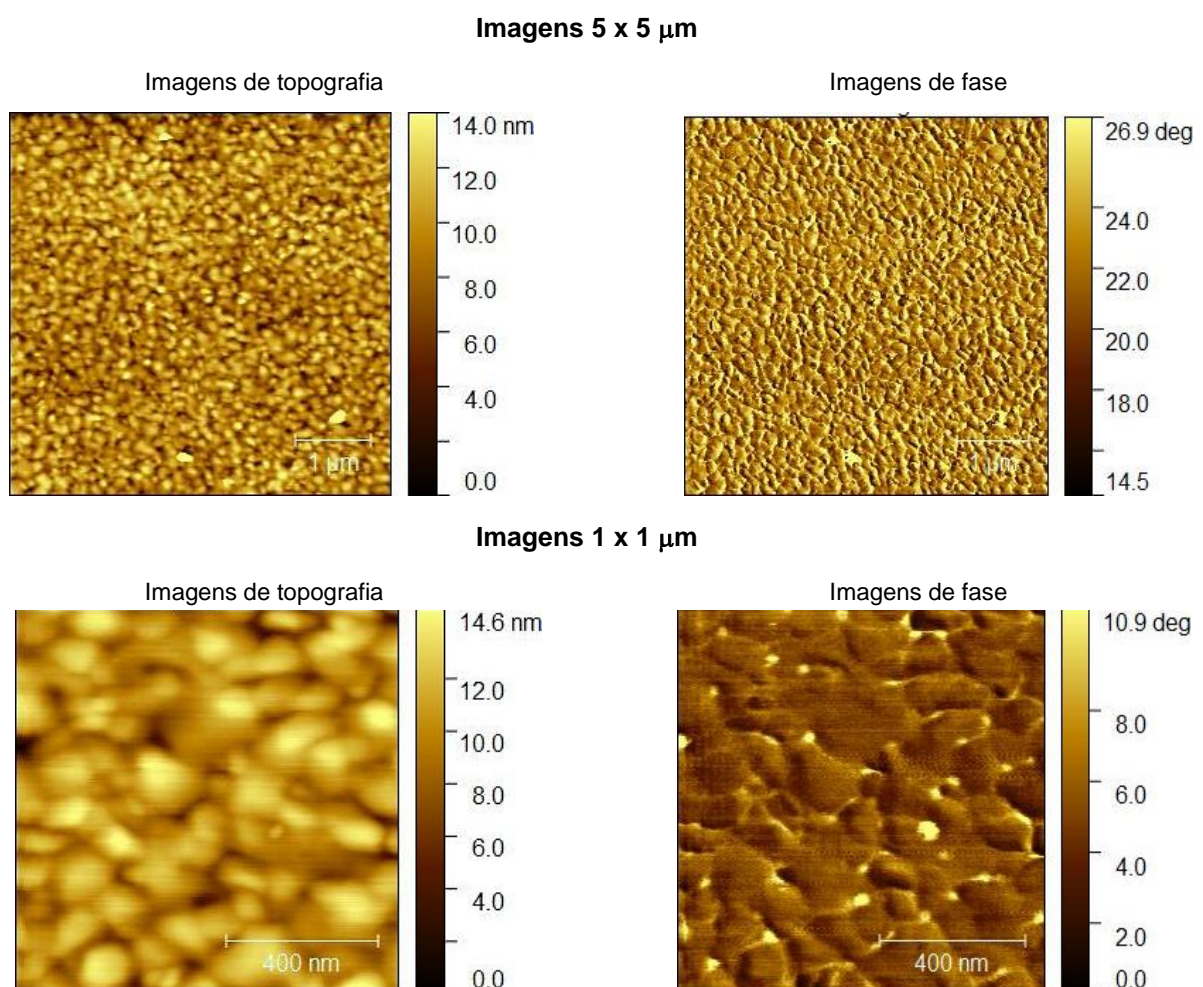
#### 4.4. Caracterização da superfície do sensor piezoelétrico por Microscopia de Força Atómica

Os ensaios iniciais realizados nas condições descritas mostraram-se, no entanto, algo inconsistentes, designadamente ao nível da sua reprodutibilidade. Nesta fase do trabalho colocou-se a hipótese da inconsistência observada se poder dever, por um lado, à

necessidade de otimizar as condições de formação/constituição da biocamada, ou por outro à possibilidade de esta não estar a ser formada de todo na superfície do sensor. Assim, antes de proceder à otimização das condições de imobilização do bioreceptor, procurou garantir-se que efetivamente a biocamada estaria a ser formada com a consequente e necessária modificação da superfície do sensor. Neste sentido, e considerando que seria a melhor tecnologia para o efeito, recorreu-se a técnicas de caracterização microscópica, em particular a Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*).

Para este estudo efetuou-se a modificação de metade da área do elétrodo de ouro que recobre o cristal piezoelétrico, mantendo a outra metade “despida”, ou seja, sem modificação. Efetuou-se a caracterização do sensor “despido” ou não modificado e compararam-se os resultados obtidos com aqueles decorrentes da caracterização de ambas as superfícies.

A caracterização efetuada por AFM, utilizando diferentes resoluções e com obtenção de diferentes tipos de imagem, mostra-se nas figuras 4.7 e 4.8. A primeira diz respeito à caracterização da superfície “despida” do sensor e a segunda à da superfície modificada.

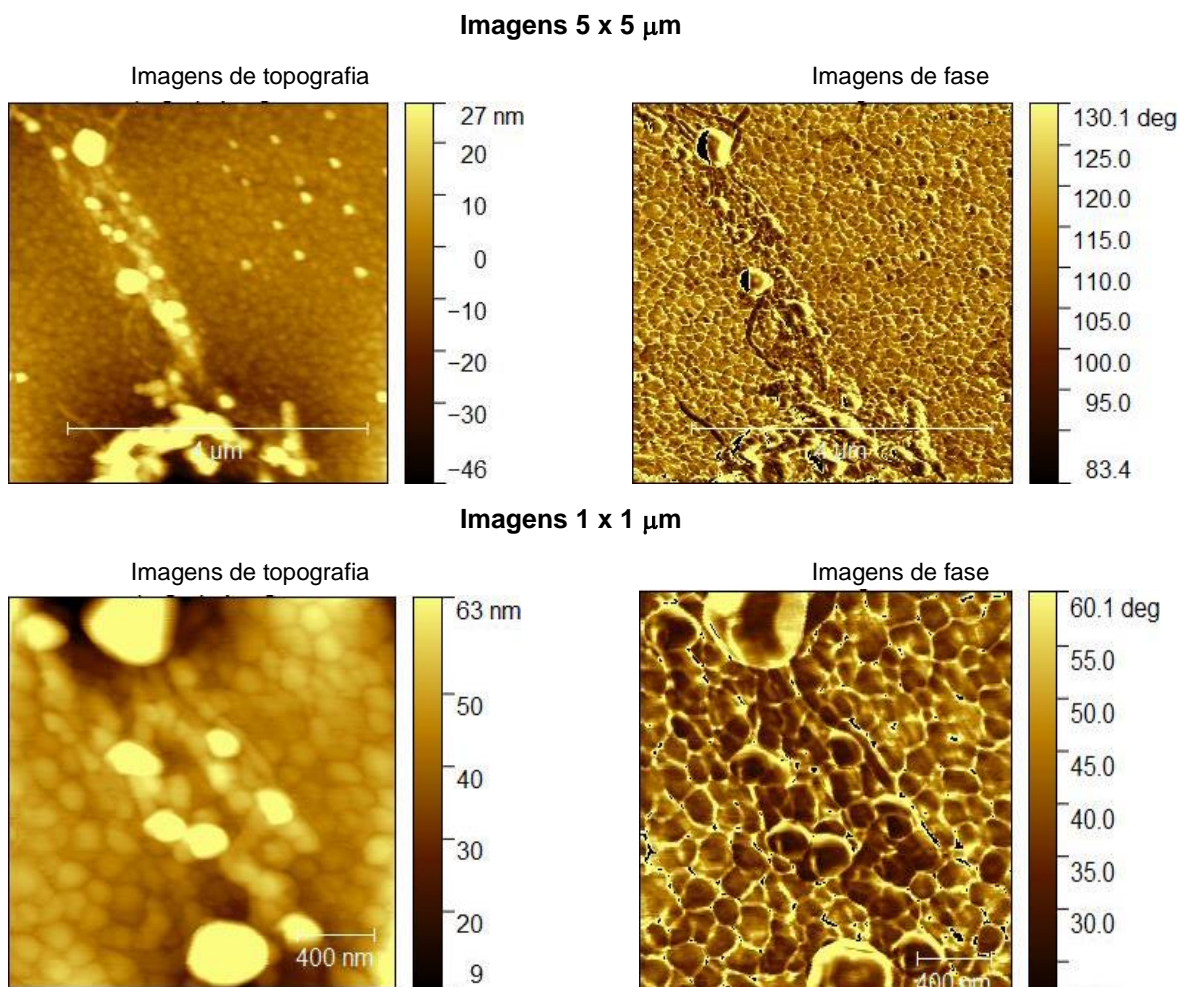


**Figura 4.7** – Caracterização por AFM da superfície de ouro do sensor “despido” ou não modificado.

Como se pode observar na figura 4.7 e em ambas as resoluções de imagem, quer as imagens de topografia quer as imagens de fase, revelam uma superfície do ouro homogênea, sem a presença de estruturas adicionais, características apenas da presença do material de que é constituído o sensor, ou seja, do ouro e, portanto, de uma superfície não modificada.

Por outro lado, a caracterização da superfície do sensor modificada que se mostra na figura 4.8, revela, quer nas imagens de topografia quer nas imagens de fase, uma heterogeneidade da superfície, reveladora da presença de estruturas elevadas. De acordo ainda com a análise efetuada, estas estruturas serão indicadoras da presença de proteínas, designadamente do anticorpo específico ligado à monocamada automontada de MUA.

Deste modo, os resultados decorrentes da caracterização da superfície do sensor piezoelétrico por AFM permitiram assumir uma formação bem-sucedida da biocamada contendo o elemento de reconhecimento biológico imobilizado, ou seja, dos anticorpos específicos contra o ácido úrico).



**Figura 4.8** – Caracterização por AFM da superfície de ouro do sensor modificado.

As considerações assumidas, tendo por base a caracterização da superfície do sensor efetuada por AFM, foram validadas através de medidas da função Kelvin. A AFM com sonda de Kelvin é um método sem contato e não destrutivo utilizado para medir a diferença de potencial de contato (CPD, do inglês *Contact Potential Difference*) entre a superfície de ouro do sensor e a amostra, fornecendo um mecanismo de contraste relacionado com as propriedades elétricas da superfície da amostra (Bastidas *et al.*, 2011).

No caso presente, as medidas foram igualmente realizadas na superfície do sensor não modificado e na superfície do sensor modificado. O resultado esperado seria uma diminuição da diferença CPD na superfície modificada, em resultado da presença de uma “camada” adicional com efeito “isolante” (ou seja, da biocamada) face à superfície do sensor não modificado. Com efeito, os resultados obtidos corroboraram o esperado e mostram-se na tabela 4.3.

**Tabela 4.3** - Medidas da função Kelvin efetuadas na superfície de ouro do sensor não modificado e modificado.

| Condições da superfície de ouro | Diferença de Potencial de Contacto (meV) |
|---------------------------------|--|
| Sensor não modificado           | 190                                      |
| Sensor modificado               | 120                                      |

#### **4.5. Planeamento experimental para otimização dos parâmetros intervenientes na imobilização do bioreceptor**

Após a identificação dos principais parâmetros intervenientes nas condições de formação da biocamada e imobilização do elemento de reconhecimento biológico do biossensor em estudo, foi efetuado um planeamento experimental segundo um design fatorial completo  $2^3$ , num total de oito ensaios em duplicado, de forma a otimizar o processo referido, nomeadamente no que se refere à concentração dos reagentes químicos e biomoléculas envolvidas.

A seleção de um desenho fatorial do tipo  $2^3$  teve em conta o facto de a modificação da superfície do sensor, com formação da biocamada, ser efetuada com utilização de três reagentes, designadamente o MUA, o EDC/NHS e o anticorpo específico contra o ácido úrico. Os fatores, a sua categoria e os respetivos níveis considerados no delineamento do modelo e utilizadas durante a sua execução, assim como o racional do desenho fatorial utilizado, encontram-se descritos e explicados com mais pormenor no ponto 3.7 do capítulo 3 da

presente dissertação. Todos os oito ensaios preconizados pelo modelo foram realizados em duplicado utilizando sempre uma solução de antígeno como uma concentração de 100 µg/mL.

Os dados experimentais obtidos na otimização da variação de frequência, decorrentes da implementação do planejamento experimental, estão apresentados na tabela 4.4, estando indicados as médias dos valores obtidos experimentalmente e os resultados previstos pelo modelo construído. Os resultados que se mostram na tabela, designadamente a variação de frequência,  $\Delta f$  (Hz) para cada um dos oito ensaios, foi medida de acordo com o preconizado no ponto 4.3 do presente capítulo, corroborado pelas figuras 4.5 e 4.6.

**Tabela 4.4** - Matriz do desenho fatorial: três variáveis independentes e valores experimentais e previstos da variação de frequência.

| Teste | [MUA]<br>(mM)<br>(A) | [EDC]<br>(mM)<br>(B) | Diluição do<br>Anticorpo<br>(C) | $\Delta f$<br>(Hz)          |                         |
|-------|----------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
|       |                      |                      |                                 | Resultados<br>Experimentais | Resultados<br>Previstos |
| 1     | 5                    | 200                  | 1:1000                          | 43,50                       | 43,50                   |
| 2     | 10                   | 200                  | 1:1000                          | 189,0                       | 189,0                   |
| 3     | 5                    | 400                  | 1:1000                          | 164,0                       | 133,9                   |
| 4     | 10                   | 400                  | 1:1000                          | 138,5                       | 168,6                   |
| 5     | 5                    | 200                  | 1:500                           | 196,5                       | 226,6                   |
| 6     | 10                   | 200                  | 1:500                           | 252,5                       | 222,4                   |
| 7     | 5                    | 400                  | 1:500                           | 191,0                       | 191,0                   |
| 8     | 10                   | 400                  | 1:500                           | 297,5                       | 297,5                   |

Os efeitos de cada interação variável e multivariáveis, foram obtidos através do *software Design Expert* versão 13.01.0. Com o auxílio desta ferramenta, foi também obtida a equação empírica que caracteriza o modelo previsto e que permite estimar a variação da frequência (equação 4.1):

$$Y = 184,06 + 35,31A + 13,69B + 50,31C - 15,06AB + 5,31AC - 3,81BC + 27,69ABC \quad (4.1)$$

onde, Y é a resposta do modelo, ou seja, a variação de frequência, A a [MUA], B a [EDC] e C a diluição da solução de anticorpo.

Os resultados da tabela anterior revelam que os valores previstos, calculados através do modelo construído, estão de acordo com os valores experimentais. A tabela 4.5 resume a análise de variância ANOVA (do inglês *Analysis Of Variance*) resultante da execução do desenho fatorial e onde se verifica que o resultado do teste F-estatístico, conduziu a um valor de  $F_c = 1227,70$ , indicador de que este modelo é significativo.

**Tabela 4.5** – Análise estatística de variância (ANOVA) para o modelo do design fatorial proposto.

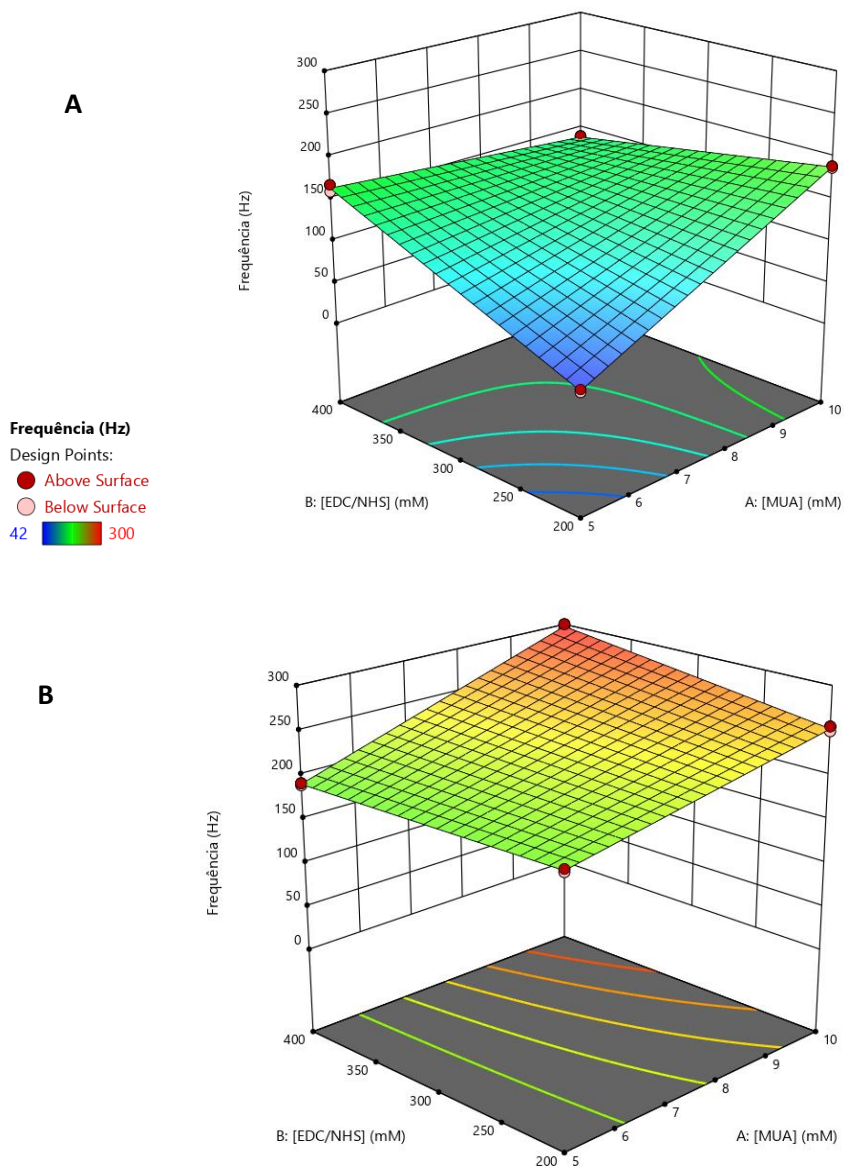
| Fonte de variação | Soma dos quadrados dos desvios (variações) | Graus de Liberdade | Média dos quadrados dos desvios (variância) | Teste F-Estatístico | Valor de p |
|-------------------|--|--------------------|---|---------------------|------------|
| Modelo            | 80030.44                                   | 7                  | 11432.92                                    | 1227.70             | < 0.0001   |
| [MUA] (mM) (A)    | 19951.56                                   | 1                  | 19951.56                                    | 2142.45             | < 0.0001   |
| [EDC] (mM) (B)    | 2997.56                                    | 1                  | 2997.56                                     | 321.89              | < 0.0001   |
| Diluição Ab (C)   | 40501.56                                   | 1                  | 40501.56                                    | 4349.16             | < 0.0001   |
| AB                | 3630.06                                    | 1                  | 3630.06                                     | 389.81              | < 0.0001   |
| AC                | 451.56                                     | 1                  | 451.56                                      | 48.49               | 0.0001     |
| BC                | 232.56                                     | 1                  | 232.56                                      | 24.97               | 0.0011     |
| ABC               | 12265.56                                   | 1                  | 12265.56                                    | 1317.11             | < 0.0001   |
| Residual          | 74.50                                      | 8                  | 9.31  |                     |            |
| Total corrigido   | $91 \times 10^{-2}$                        | 15                 |   |                     |            |

$r^2 = 0,999$ ,  $r^2_{\text{ajustado}} = 0,998$ ,  $r^2_{\text{previsto}} = 0,996$ ; C.V. = 1,16%, *Precisão Adequada* = 117,71, Contribuição de A = 24,91%, Contribuição de B = 3,74%, Contribuição de C = 50,56%.

O baixo coeficiente de variação (CV), igual a 1,16% revelado por este estudo, sugere uma boa precisão e fiabilidade nas experiências realizadas. A "Precisão Adequada" mede a razão entre o sinal e o ruído, sendo uma razão superior a 4 desejável. O valor de razão obtido no modelo proposto foi de 117,71, indicando um sinal adequado e que o modelo pode ser utilizado.

Os valores de  $p < 0,0500$  indicam que os termos do modelo são significativos e, deste modo, todas as variáveis em estudo, designadamente a [MUA] (variável A), a [EDC] (variável B), e a diluição de anticorpo (variável C). As interações multivariáveis são também termos do modelo significativos. Com efeito, pode verificar-se que, o fator que mais contribuiu para o modelo determinado, foi a diluição do anticorpo (50,56%), seguido da [MUA] (24,91%).

A equação 4.1 foi também utilizada na construção de gráficos de superfície de resposta (3D), que se mostram nas figuras 4.9A e 4.9B. As duas variáveis, [MUA] e [EDC], foram representadas em função das duas diluições da solução de anticorpo (nível baixo com a diluição 1:1000 e nível alto com a diluição 1:500), permitindo estimar a variação da frequência, através do modelo proposto.



**Figura 4.9** – Gráficos de superfície de resposta (3D) do modelo desenvolvido, representando a interação das variáveis que afetam a variação da frequência, [MUA] e [EDC] em função da diluição de anticorpo. **(A)** nível baixo da diluição (-), diluição 1:1000; **(B)** nível alto da diluição (+), diluição 1:500.

Através da análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que as condições de formação da biocamada e imobilização do elemento de reconhecimento biológico do biossensor otimizadas, consistem na utilização de uma [MUA] de 10 mM, de uma [EDC] de 400 mM (e, conseqüentemente, uma [NHS] de 100 mM) e uma diluição da solução de anticorpo de 1:500.

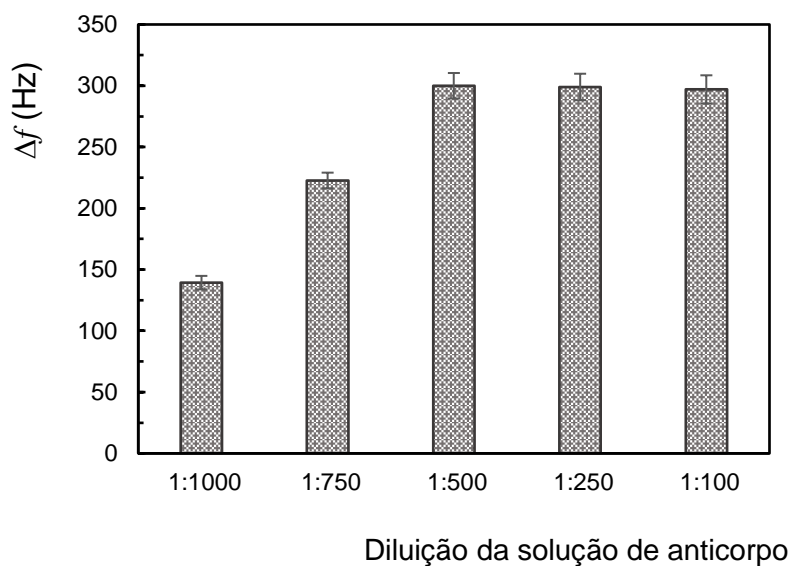
#### **4.6. Otimização da diluição e tempo de incubação da solução de anticorpo e do tempo de incubação do antigénio**

Como se depreende da execução do planeamento experimental com recurso a um desenho fatorial do tipo 2<sup>3</sup>, existem algumas limitações relativamente ao número de fatores (apenas 3) e em particular ao número de níveis (apenas 2). Neste sentido, durante a execução do planeamento experimental, foram considerados para cada etapa relacionada com a formação da biocamada, os períodos ou intervalos de tempo tipicamente referidos na literatura para o efeito. No entanto, em face da importância que se considerou que determinados parâmetros teriam, não só no processo de formação da biocamada, mas sobretudo na performance analítica global do dispositivo, foi decidido efetuar uma otimização mais “fina” a alguns destes parâmetros de modo a comprovar ou otimizar adicionalmente os resultados obtidos no planeamento experimental. Neste sentido, a concentração da solução de anticorpo específico contra o ácido úrico, o tempo ideal de incubação ou imobilização deste imunoreagente na superfície do transdutor e o tempo ideal de incubação do antigénio foram os parâmetros otimizados adicionalmente. Os restantes parâmetros e condições foram aqueles resultantes do planeamento experimental desenvolvido.

Os resultados obtidos nos diversos ensaios de otimização são apresentados nos pontos seguintes.

##### **4.6.1. Otimização da diluição da solução de anticorpo**

A diluição ideal da solução de anticorpo foi avaliada imobilizando diferentes quantidades de anticorpo preparadas a partir de diferentes diluições da solução comercial deste reagente, uma vez que a sua concentração é desconhecida. Assim, utilizaram-se as seguintes diluições: 1:1000; 1:750; 1:500; 1:250; 1:100, incubando-se 50 µL de cada solução, durante 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, em cada ensaio, procedeu-se à incubação de uma solução de antigénio sempre com a mesma concentração (100 µg/mL), durante 60 min, à temperatura ambiente. Mediu-se a variação de frequência resultante em cada ensaio e relacionaram-se os resultados obtidos com a diluição da solução de anticorpo utilizada em cada ensaio. Os resultados obtidos mostram-se na figura 4.10.



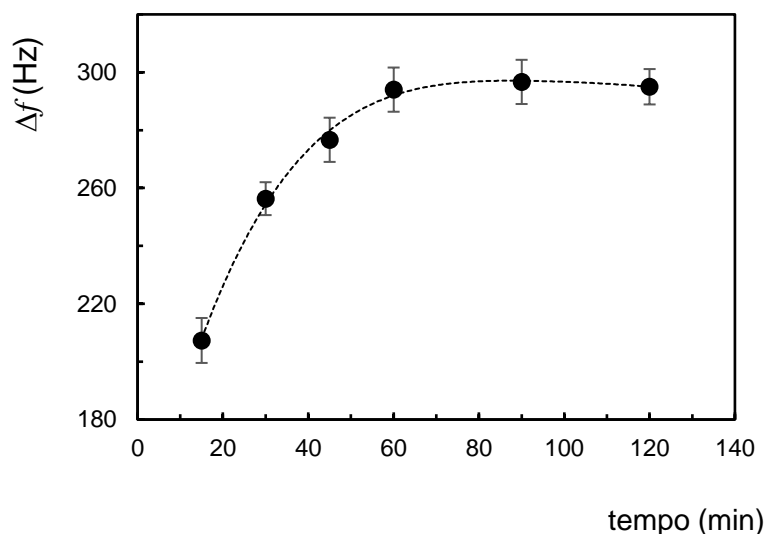
**Figura 4.10** – Otimização da diluição da solução de anticorpo a ser utilizada no procedimento de imobilização do elemento de reconhecimento biológico.

Como se pode observar, com base nos resultados que se mostram na figura 4.10, a resposta analítica aumenta com a concentração de anticorpo presente na solução utilizada para a imobilização deste elemento de reconhecimento. No entanto, este aumento aconteceu até à diluição de 1:500, a partir da qual se observou uma estabilização da resposta analítica. Esta estabilização indica que um aumento adicional da quantidade de anticorpo presente na solução de imobilização não se traduziu, efetivamente, num aumento adicional da variação de frequência. Com efeito, esta observação poderá ser explicada com base na dimensão/área do elétrodo de ouro que recobre a superfície do sensor piezoelétrico que apenas permite a imobilização máxima de uma quantidade de anticorpo presente, por exemplo na solução com a diluição de 1:500. Considera-se que por esta razão, a utilização de uma solução com uma diluição menor, ou seja, com uma concentração mais elevada de anticorpo não se traduziu num aumento da quantidade imobilizada deste bioreceptor e logo no reconhecimento e ligação de uma quantidade mais elevada de antigénio, traduzida por um valor mais elevado da variação de frequência medida.

#### 4.6.2. Otimização do tempo de imobilização do anticorpo

O estudo da resposta do dispositivo em função da variação do tempo de incubação ou imobilização do anticorpo na superfície do sensor piezoelétrico, foi realizado utilizando a diluição da solução deste imunoreagentes otimizada no ponto 4.6.1, ou seja, 1:500. Para o efeito utilizaram-se períodos de incubação do anticorpo entre 15 minutos e 120 minutos.

A figura 4.11 mostra a variação da frequência de vibração do sensor piezoelétrico, obtida para os diferentes tempos de incubação da solução de anticorpo.

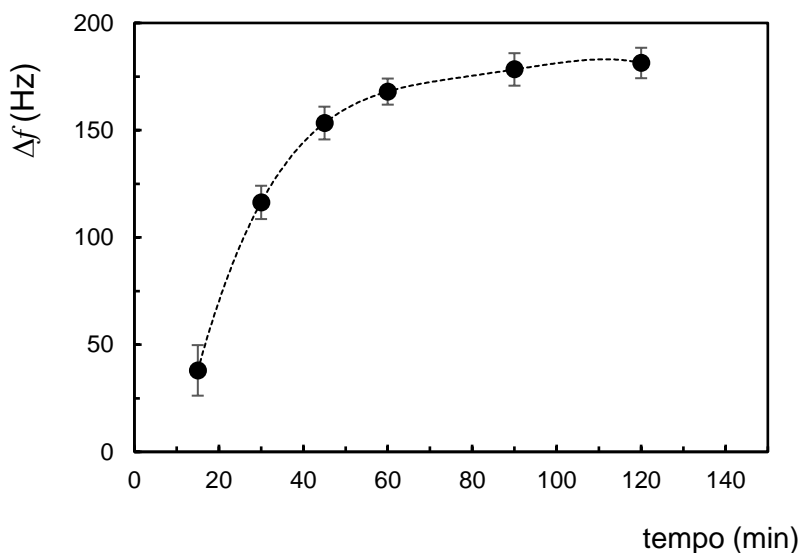


**Figura 4.11** – Otimização do tempo de imobilização do anticorpo na superfície do sensor piezoelétrico.

Como se pode observar com base nos resultados que se mostram na figura 4.11, a resposta analítica aumentou com o tempo de incubação do anticorpo até 60 minutos. Após esse período verificou-se uma estabilização do aumento da frequência de vibração do sensor piezoelétrico, o que significa que o tempo superior a 60 minutos não provocou um aumento adicional da variação de frequência. Assim sendo, considerou-se 60 minutos o tempo ideal de imobilização do anticorpo à superfície do sensor.

#### **4.6.3. Otimização do tempo de imobilização do antigénio**

A otimização do tempo de incubação do antigénio, visando o reconhecimento e ligação ao anticorpo específico imobilizado, foi efetuada utilizando os parâmetros otimizados nos pontos anteriores, ou seja, uma diluição da solução de anticorpo de 1:500 e um tempo de incubação de 60 min. Neste estudo utilizou-se, ainda, uma solução de antigénio com a concentração de 100 $\mu$ g/mL. A resposta do biossensor, ou seja, a variação de frequência de vibração do sensor piezoelétrico em função do tempo de incubação do antigénio mostra-se na figura 4.12.



**Figura 4.12** – Otimização do tempo de incubação da solução de antígeno.

Como se pode observar na figura 4.12 a resposta analítica do dispositivo aumentou com o tempo de incubação do antígeno, até cerca de 40 min. Após este período não se verificou um aumento da frequência de vibração do sensor piezoelétrico de forma significativa que justificasse utilizar um tempo de incubação da solução de antígeno superior.

Assim, o tempo de reação de 40 minutos foi escolhido como o período ideal para o reconhecimento e ligação do antígeno ao anticorpo imobilizado, o que se traduziu, também numa redução do tempo global de análise.

#### 4.7. Regeneração da superfície do sensor

Nesta fase do trabalho, tendo em conta o consumo significativo de reagentes, em particular do anticorpo específico contra o ácido úrico e do antígeno, testou-se a possibilidade de regeneração da biocamada, para reutilização num novo ensaio. Neste sentido ter-se-ia como objetivo a remoção do antígeno ligado ao anticorpo, no final de um dado ensaio, permanecendo apenas a camada de anticorpos específicos imobilizados para reconhecimento e ligação do antígeno num ensaio subsequente.

Nesta perspetiva, efetuou-se um estudo em que no final de um ensaio se introduziu no sistema de fluxo uma solução de NaOH 1M como objetivo de remover o antígeno ligado. Mediu-se a frequência de vibração do sensor piezoelétrico antes da realização deste ensaio, ou seja, antes da ligação do antígeno e após o tratamento da superfície do transdutor com a solução de NaOH 1M. Este teste foi efetuado diversas vezes e um resultado típico mostra-se na tabela 4.6.

**Tabela 4.6** – Frequências antes e depois da regeneração da superfície do sensor.

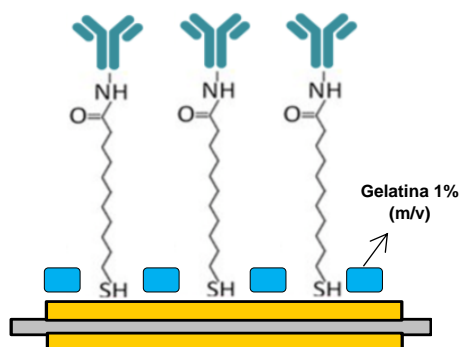
| Frequência inicial do sensor ( $f_i$ ) (Hz) | Frequência final após a regeneração da superfície do sensor ( $f_R$ ) (Hz) | Varição da frequência ( $\Delta f$ ) (Hz) |
|---|--|---|
| 10004659,0                                  | 10004802,0   | 143,0                                     |

Face aos resultados obtidos nos ensaios, conclui-se que a regeneração não foi bem-sucedida, uma vez que após este procedimento, o sensor exibiu uma frequência significativamente mais elevada que a frequência inicialmente medida, o que pode significar que para além de se ter removido o antigénio, parte dos anticorpos foram igualmente removidos da superfície do sensor. Ou seja, apenas com remoção adicional de algum dos componentes da biocamada, para além do antigénio, seria possível o sensor ficar um pouco mais “leve” e como tal exibir em conformidade uma frequência de vibração mais elevada. Assim, considerou-se que o sensor não devia ser utilizado num ensaio subsequente sem nova funcionalização da sua superfície, com formação de uma nova biocamada.

Este estudo foi efetuado já numa fase avançada do desenvolvimento do trabalho em que o tempo disponível já era bastante limitado. Neste sentido, com efeito, considera-se que esta vertente do trabalho não foi suficientemente aprofundada, mas que o será, certamente no trabalho a desenvolver futuramente

#### 4.8. Calibração do biossensor desenvolvido

Após a otimização dos parâmetros de modificação da superfície do sensor com imobilização do elemento de reconhecimento biológico, procedeu-se à calibração do biossensor desenvolvido utilizando a respetiva arquitetura de superfície otimizada que se mostra na figura 4.13. A tabela 4.7 apresenta as diferentes concentrações utilizadas na calibração do biossensor.

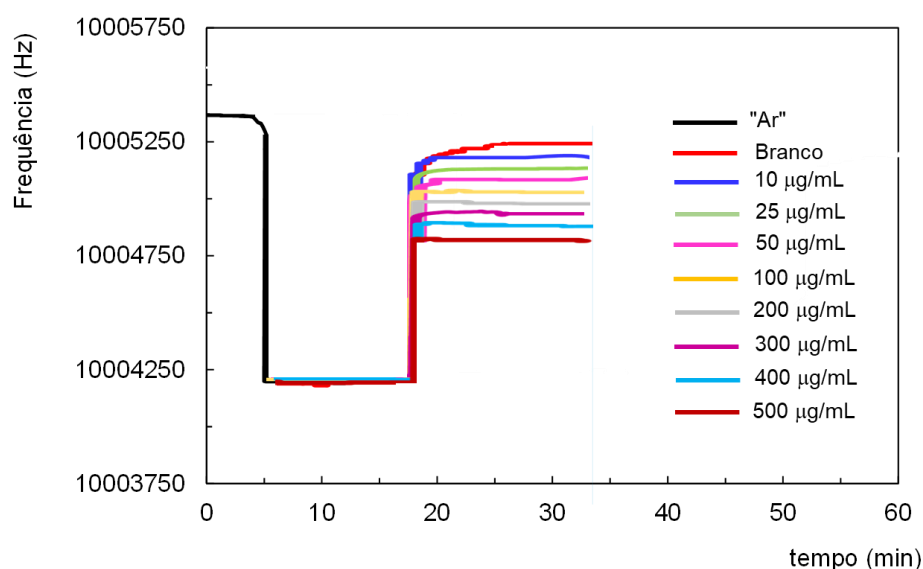


**Figura 4.13** – Arquitetura de superfície do biossensor utilizada na calibração do dispositivo.

**Tabela 4.7-** Concentração das soluções padrão utilizadas na calibração do biossensor desenvolvido.

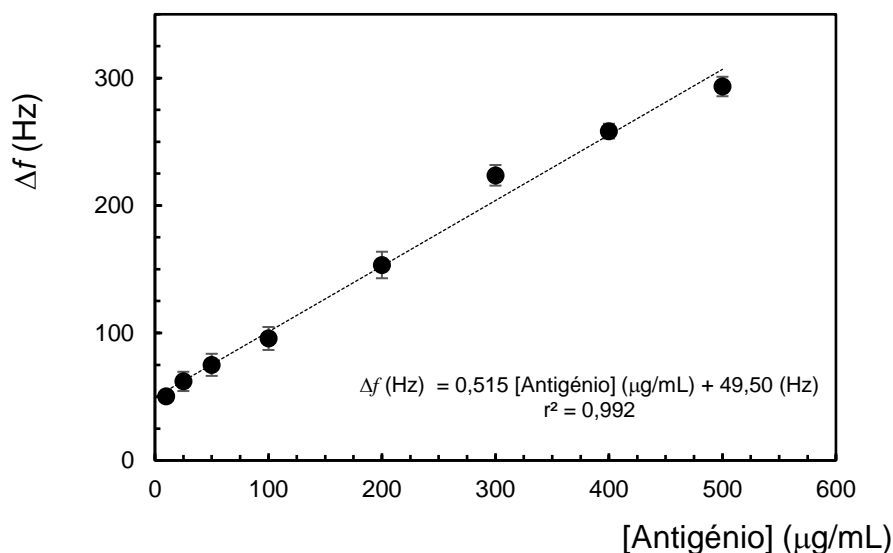
| Padrões | Concentração de antigénio ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|---------|--|
| 1       | 10   |
| 2       | 25   |
| 3       | 50   |
| 4       | 100  |
| 5       | 200  |
| 6       | 300  |
| 7       | 400  |
| 8       | 500  |

No âmbito da calibração do biossensor adotaram-se duas metodologias para o efeito. Numa primeira abordagem procedeu-se à medição da resposta analítica decorrente da análise de cada solução padrão individualmente, podendo passar a designar-se por calibração em “descontínuo”. Neste estudo foram efetuadas medições em triplicado para cada solução padrão. A figura 4.14 mostra um esquema com uma resposta típica (selecionada de cada ensaio em triplicado) para as diferentes soluções de ácido úrico analisadas, cujas concentrações constam igualmente da figura.



**Figura 4.14** – Calibração em “descontínuo” do biossensor piezoelétrico onde se demonstra a resposta típica obtida em cada ensaio, realizado em triplicado, para diferentes soluções padrão de antigénio.

O gráfico de calibração decorrente do ensaio anterior, onde se mostram as barras de erro e que contém em inserção a equação da reta de calibração obtida, apresenta-se na figura 4.15.



**Figura 4.15** – Calibração em “descontínuo” do biossensor piezoelétrico desenvolvido efetuada com soluções de antígeno com diferentes concentrações e onde cada ponto traduz a média de três medições replicadas (n=3).

Com base no estudo que relacionou a variação de frequência de vibração do sensor piezoelétrico para diferentes concentrações de antígeno e que resultou na curva de calibração que se mostra na figura 4.15, foi possível proceder à determinação de diversos parâmetros analíticos ou figuras de mérito que permitem caracterizar o desempenho analítico do biossensor desenvolvido e que se apresentam na tabela 4.8.

**Tabela 4.8** - Figuras de mérito e outras características relativas ao desempenho do biossensor piezoelétrico desenvolvido, tendo por base a realização de uma calibração em “descontínuo”.

| Figuras de mérito                           | Biossensor piezoelétrico<br>Calibração em “descontínuo” |
|---|---|
| Intervalo resposta linear (µg/mL)           | 10 - 500  |
| Sensibilidade (Hz µg <sup>-1</sup> mL)      | 0,515   |
| Coefficiente de correlação                  | 0,992   |
| Limite de deteção (µg/mL)                   | 6,7   |
| Limite de quantificação (µg/mL)             | 18,4  |
| Precisão (RSD médio) (%)                    | 6,2   |
| Tempo de resposta (T <sub>90%</sub> ) (min) | ~ 20  |

A tabela 4.9 mostra, a título de exemplo, os parâmetros utilizados na determinação dos limites de detecção e quantificação que constam da tabela anterior, de acordo com os respectivos modelos preconizados pela IUPAC que, em conjunto com o significado dos diversos parâmetros envolvidos pode ser consultado no ponto 2.4 do capítulo 2 referente à introdução do trabalho.

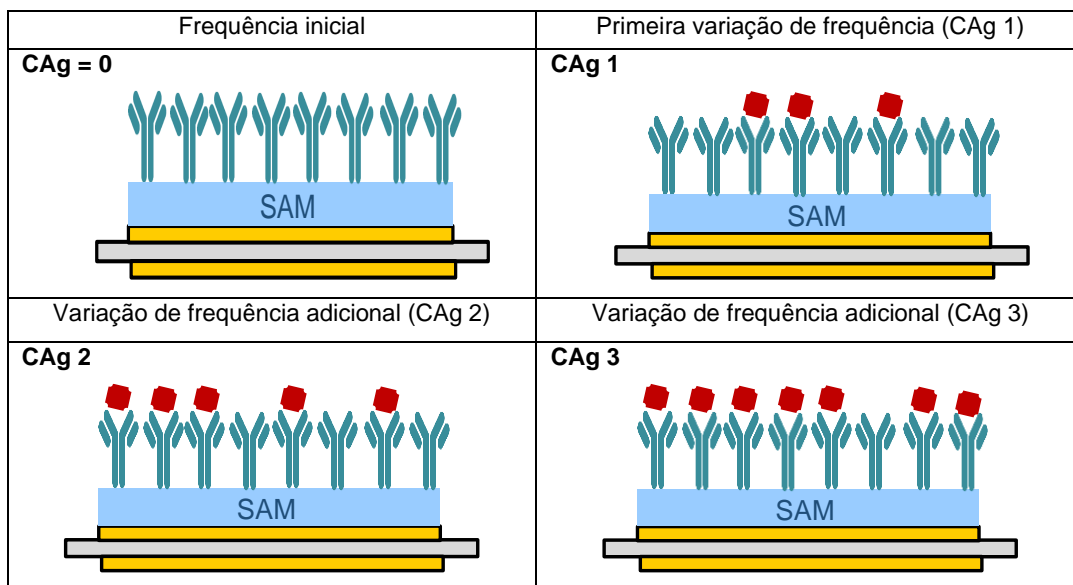
**Tabela 4.9** - Parâmetros estatísticos utilizados na determinação dos valores do *LOD* e *LOQ* decorrentes da calibração em “descontínuo” efetuada com o biossensor piezoelétrico desenvolvido.

| Parâmetros        | $K_d$ | $K_q$ | $\bar{X}_b$<br>(Hz) | $S_b$<br>(Hz) | <i>LOD</i><br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | <i>LOQ</i><br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-------------------|-------|-------|---------------------|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Valor considerado | 3     | 10    | 50,4                | 0,9           | 6,7                                | 18,4                               |

( $n=3$ )

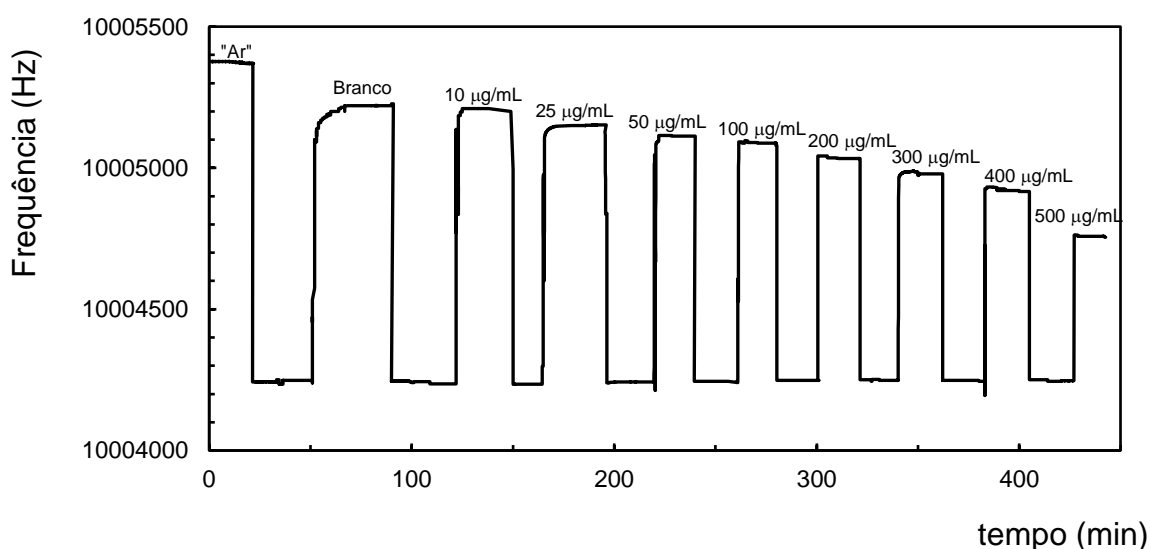
O tempo de resposta do biossensor foi determinado com base a recomendação da IUPAC. Desta forma, observou-se o intervalo de tempo necessário para atingir 90% da resposta final ( $T_{90\%}$ ) e obteve-se um valor de aproximadamente 20 min.

Como facilmente se depreende do que foi descrito anteriormente, com relação à calibração em “descontínuo”, a análise individual de cada solução padrão, com a preparação e modificação da superfície do sensor piezoelétrico em cada ensaio e considerando, inclusivamente, a realização de três medições replicadas, traduziu-se num consumo francamente significativo de tempo, e em particular dos reagentes envolvidos. Neste sentido, decidiu testar-se uma outra abordagem na calibração do biossensor, que se prendeu com a realização da mesma agora em “contínuo”, ou seja, utilizando em toda a calibração o mesmo sensor e medindo as variações adicionais de frequência que se verificaram após cada período de incubação das soluções de antigénio com concentrações sucessivamente mais elevadas. A figura 4.16 pretende ilustrar o racional considerado.



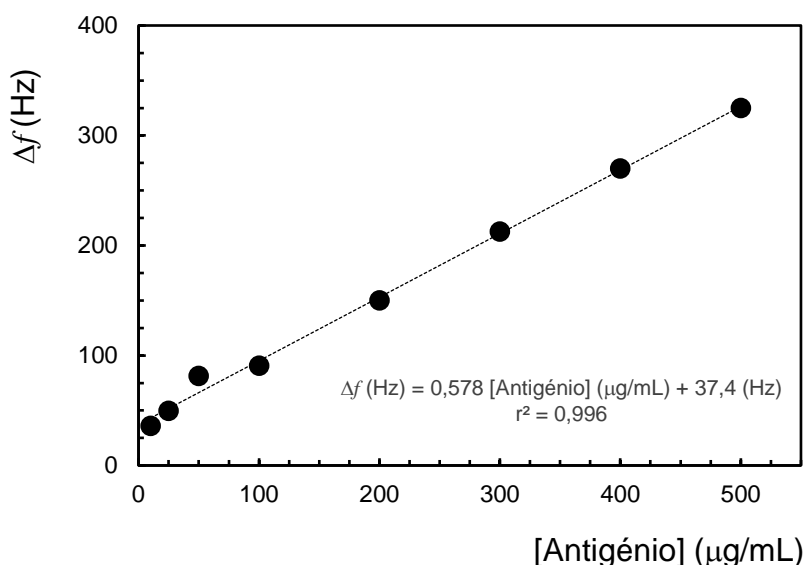
**Figura 4.16** – Esquema ilustrativo das medições efetuadas em contínuo onde se pretende demonstrar as variações de frequência adicionais decorrentes das sucessivas concentrações de antigénio admitidas ao sistema de fluxo e consideradas como as respetivas respostas analíticas. Mostram-se, apenas como exemplo, três concentrações de antigénio onde,  $CAg\ 3 > CAg\ 2 > CAg\ 1$ .

Na figura 4.17 apresenta-se o sensograma resultante da calibração do biossensor piezoelétrico em “contínuo”, onde, à semelhança da figura 4.5, se pode observar uma variação de frequência praticamente inexistente quando a câmara de reação era preenchida com as soluções de antigénio com diferentes concentrações. Por esta razão, e como já tinha sido referido anteriormente, considerou-se como resposta analítica final para cada solução padrão, a variação de frequência adicional do cristal piezoelétrico promovida pela incubação sucessiva das soluções com diferentes concentrações de antigénio.



**Figura 4.17** – Sensograma resultante da calibração do biossensor piezoelétrico em “contínuo” evidenciando as variações de frequência para as diferentes concentrações das soluções padrão de antigénio.

A figura 4.18 mostra o gráfico de calibração resultante onde, pelo facto de a mesma ter sido efetuada em “contínuo” não houve lugar a medição replicadas, e como tal à exibição das barras de erro. Em inserção mostra-se a equação da reta de calibração obtida.



**Figura 4.18** – Calibração em “contínuo” do biossensor piezoelétrico desenvolvido efetuada com soluções de antígeno com diferentes concentrações mostrando-se em inserção a equação da reta de calibração.

Na tabela 4.10 apresentam-se os valores das figuras de mérito determinadas com base na calibração efetuada.

**Tabela 4.10** - Figuras de mérito e outras características relativas ao desempenho do biossensor piezoelétrico desenvolvido tendo por base a realização de uma calibração em “contínuo”.

| Figuras de mérito                           | Biossensor piezoelétrico<br>Calibração em “contínuo” |
|---|--|
| Intervalo resposta linear (µg/mL)           | 10 - 500   |
| Sensibilidade (Hz µg <sup>-1</sup> mL)      | 0,578  |
| Coeficiente de correlação                   | 0,996  |
| Limite de deteção (µg/mL)                   | 5,0  |
| Limite de quantificação (µg/mL)             | 18,0   |
| Precisão (RSD médio) (%)                    | 6,2  |
| Tempo de resposta (T <sub>90%</sub> ) (min) | ~ 20   |

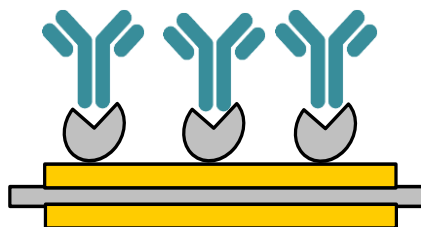
Comparando as figuras de mérito que constam nas tabelas 4.8 e 4.10 para as calibrações executadas em “descontínuo” e em “contínuo”, respetivamente, é possível concluir que ambas as metodologias redundaram num comportamento do sistema relativamente semelhante. No entanto, deve salientar-se que a metodologia de calibração em “contínuo” exhibe, efetivamente,

uma sensibilidade mais elevada ( $0,578 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1}/\text{mL}$ ), bem como um limite de detecção ( $5,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e quantificação mais baixos ( $18,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Neste sentido, e considerando também as limitações relacionadas com o consumo de reagentes e de tempo inerentes à calibração em “descontínuo”, foi decidido proceder à determinação da concentração de ácido úrico nas amostras de urina a analisar, utilizando apenas a reta da calibração efetuada em “contínuo”.

#### 4.9. Modificação da superfície do sensor com diferentes arquiteturas

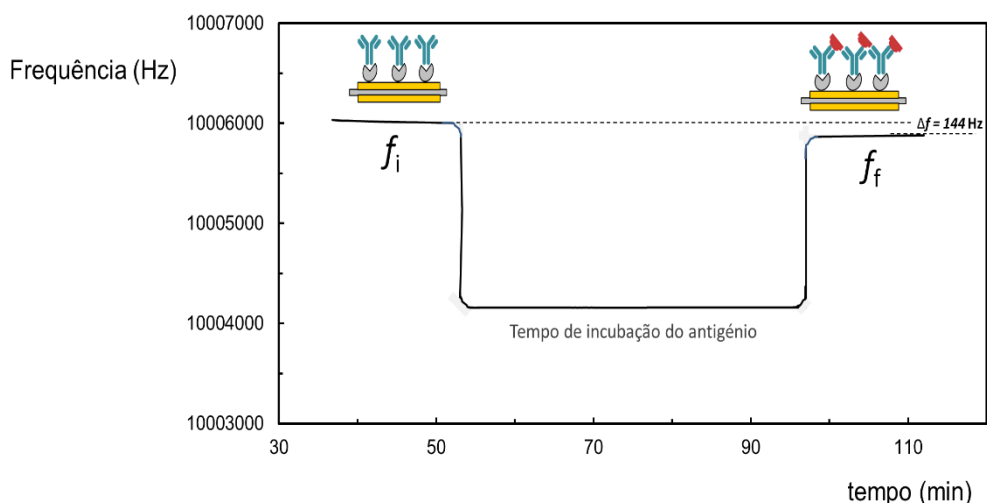
Após a realização de todos os estudos descritos nos pontos anteriores e a respetiva caracterização do desempenho analítico do biossensor piezoelétrico desenvolvido, foi decidido, nesta fase do trabalho, testar diferentes arquiteturas de modificação da superfície do transdutor. Este estudo visou, sobretudo, melhorar a sensibilidade de resposta do dispositivo e, se possível, reduzir o número de reagentes envolvidos, bem como o custo associado.

A primeira abordagem consistiu na simplificação da modificação da superfície do sensor e para o efeito procedeu-se à imobilização de uma primeira camada constituída apenas por proteína A. A esta etapa, seguiu-se a imobilização do elemento de reconhecimento biológico (anticorpos específicos contra o ácido úrico) para posterior reconhecimento e ligação do antigénio. A figura 4.19 mostra a arquitetura final resultante da modificação da superfície do sensor descrita anteriormente.



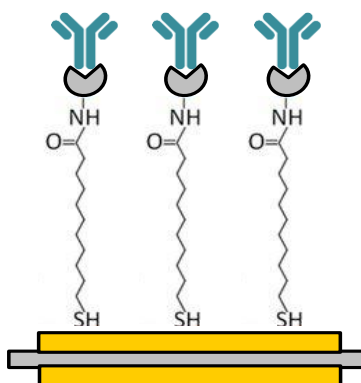
**Figura 4.19** - Arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico apenas com uma camada de proteína A e posterior imobilização do elemento de reconhecimento biológico.

Testou-se o biossensor modificado com a arquitetura de superfície que se mostra na figura anterior, medindo a variação de frequência resultante da análise de uma solução de antigénio com a concentração de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ . O resultado obtido mostra-se na figura 4.20.



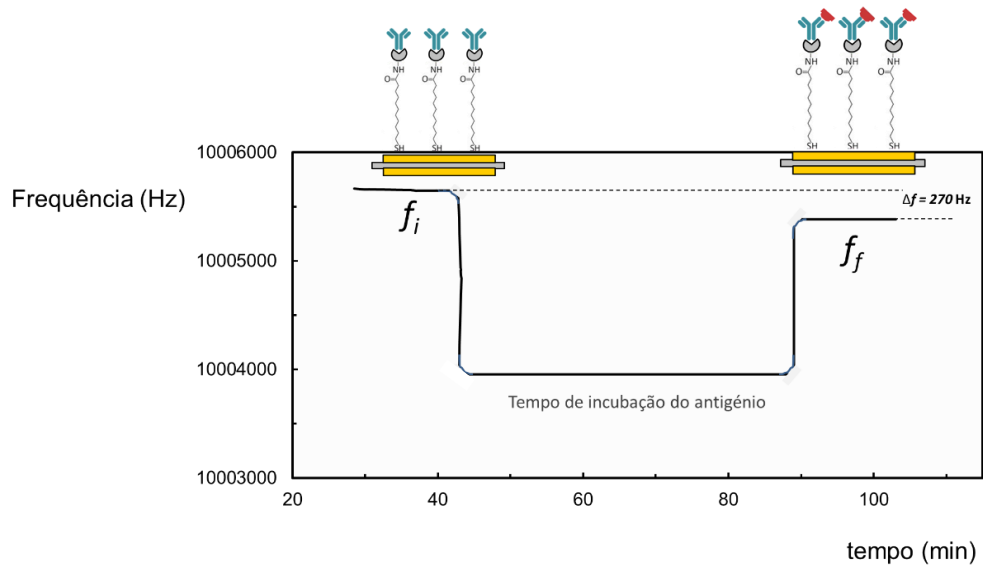
**Figura 4.20** – Variação de frequência obtida na análise de uma solução de antígeno com a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando uma arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico apenas com uma camada de proteína A e o elemento de reconhecimento biológico.

A segunda arquitetura de superfície testada incluiu a modificação inicial da superfície do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS, seguida da introdução adicional da proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização do anticorpo específico contra o ácido úrico. A figura 4.21 mostra a arquitetura final resultante da modificação da superfície do sensor descrita anteriormente.



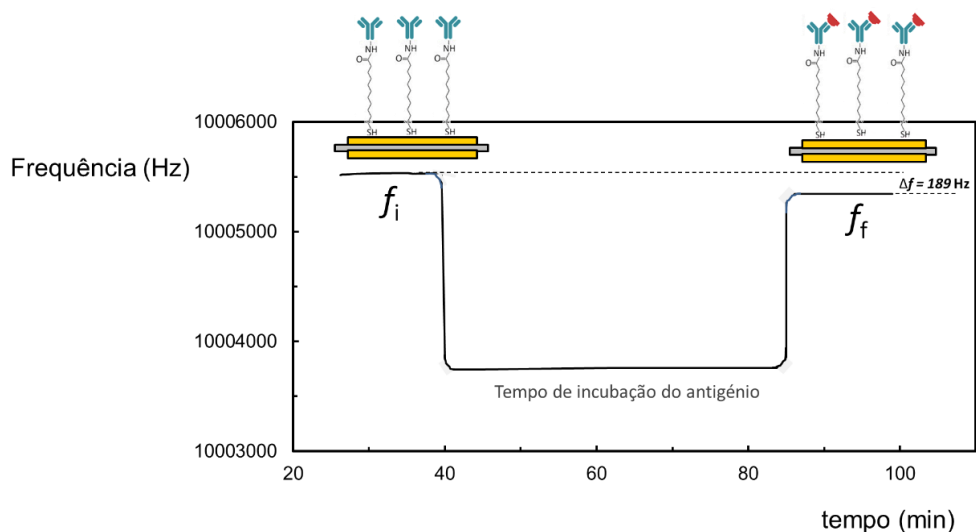
**Figura 4.21** - Arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico

O biossensor modificado com a arquitetura de superfície que se mostra na figura anterior, foi também testado com base na medição da variação de frequência resultante da análise de uma solução de antígeno com a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . O resultado obtido mostra-se na figura 4.22.



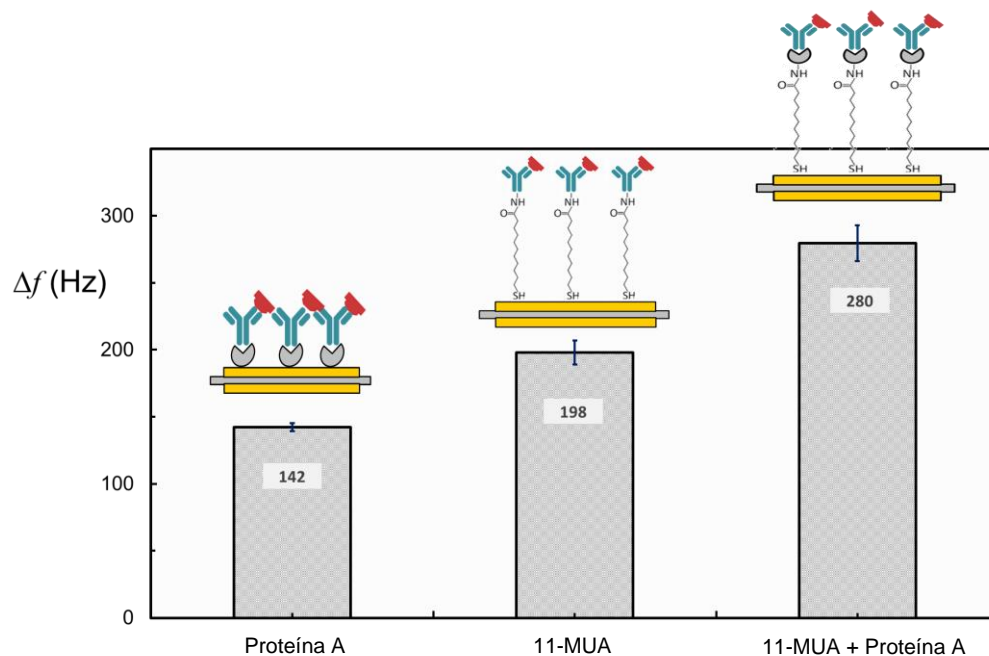
**Figura 4.22** – Variação de frequência obtida na análise de uma solução de antígeno como a concentração de 100 µg/mL, utilizando uma arquitetura de superfície que inclui a modificação do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico.

Os resultados obtidos com os biossensores modificados de acordo com estas novas arquiteturas de superfície, foram comparados com aqueles decorrentes dos ensaios efetuados com o biossensor modificado segundo a metodologia inicialmente otimizada e cuja resposta, utilizando uma solução de antígeno com a concentração de 100 µg/mL, mostra-se na figura 4.23.



**Figura 4.23** – Variação de frequência obtida na análise de uma solução de antígeno como a concentração de 100 µg/mL, utilizando a arquitetura de superfície originalmente otimizada, que inclui a modificação do sensor piezoelétrico com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e posterior imobilização elemento de reconhecimento biológico.

A comparação dos resultados obtidos, com os biossensores modificados com as três arquiteturas de superfície testadas, utilizando sempre uma solução de antígeno com concentração 100 $\mu$ /mL, mostra-se no gráfico da figura 4.24. As barras de erro que são exibidas resultam da realização de medidas replicadas ( $n = 3$ ).

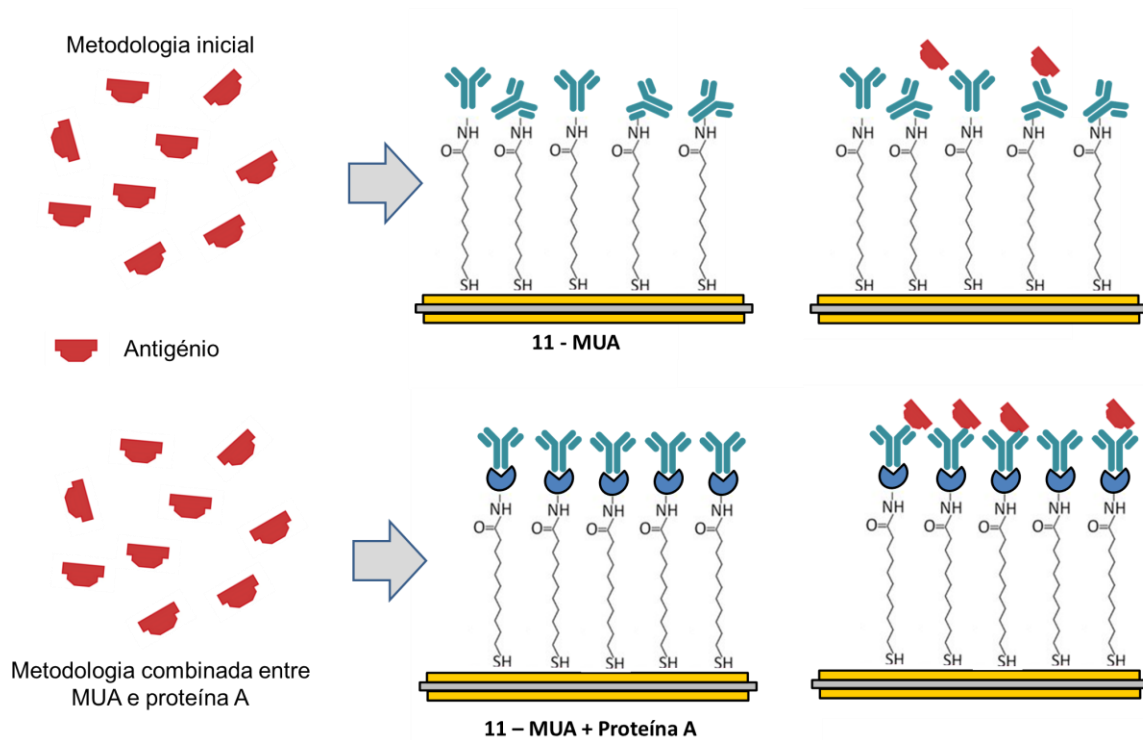


**Figura 4.24** – Comparação dos resultados obtidos com as três arquiteturas testadas para a modificação da superfície do biossensor.

Os resultados que se mostram na figura 4.24 encontram-se de acordo com o esperado. De facto, a sensibilidade mais elevada obteve-se com o biossensor modificado inicialmente com uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS, seguido da introdução adicional da proteína A antes da imobilização do anticorpo específico (figura 4.21).

Esta observação resulta, fundamentalmente, do facto de a proteína A se ligar, tipicamente, à região constante do anticorpo e conferir uma orientação adequada aos anticorpos permitindo, para a mesma concentração de antígeno, o reconhecimento e ligação de um número mais elevado de molécula da espécie de interesse, o que se traduz, com efeito, num aumento da sensibilidade da medida, o que não acontece no caso da metodologia inicialmente otimizada (figura 4.23) onde a ligação dos anticorpos às “âncoras” do MUA ativado determinaram, muito possivelmente, uma ligação do anticorpo com uma orientação mais aleatória e inadequada para posterior ligação do antígeno (Shanehbandi *et al.*, 2017).

A figura 4.25 mostra um esquema elucidativo da explicação apresentada.

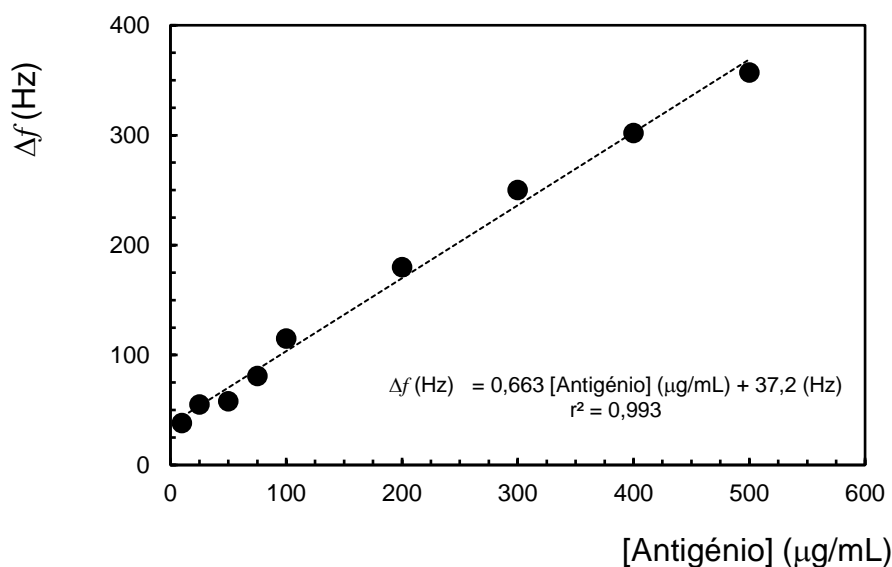


**Figura 4.25** – Orientação preferencial adquirida pelos anticorpos específicos em resultado da presença de proteína A na imobilização da superfície do sensor piezoelétrico.

No caso da arquitetura em que apenas se utilizou uma camada de proteína A diretamente na superfície do ouro, apesar de esta conferir uma orientação mais adequada aos anticorpos, o elemento de reconhecimento biológico ficou mais próximo da superfície do sensor relativamente às outras arquiteturas, que pelo facto de se ter utilizado uma monocamada automontada, permitiu que os anticorpos estivessem mais “afastado” da superfície e, portanto, mais acessíveis para a ligação do antigénio, ao contrário da metodologia só com a proteína A.

Nesta fase do trabalho foi efetuada uma nova calibração do biossensor modificado com uma das novas arquiteturas de superfície, designadamente aquela que exibiu, como resposta analítica, a variação de frequência mais elevada e que se ilustra na figura 4.26. Pelas razões já referidas anteriormente, designadamente as que se referem ao consumo excessivo de reagentes e à limitação de tempo imposta nesta fase terminal do trabalho, a calibração foi efetuada em “contínuo”, de acordo com o procedimento e racional também já referidos anteriormente no ponto 4.8 do presente capítulo.

A figura 4.26 mostra o gráfico de calibração resultante onde, pelo facto de a mesma ter sido efetuada em “contínuo” não houve lugar a medição replicadas e à exibição das respetivas barras de erro. A equação da reta de calibração obtida mostra-se em inserção.



**Figura 4.26** – Calibração do biossensor modificado com a nova arquitetura de superfície que inclui uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico.

Na tabela 4.11 mostram-se os valores das figuras de mérito determinadas com base na calibração efetuada ao biossensor modificado com esta nova arquitetura de superfície, designadamente aquela que incluiu uma monocamada automontada de MUA, ativada com EDC e NHS e incluindo proteína A como estrutura de reconhecimento e imobilização dos anticorpos específicos contra o ácido úrico.

**Tabela 4.11** - Figuras de mérito e outras características relativas ao desempenho do biossensor piezoelétrico modificado com a nova arquitetura de superfície e comparação com aquelas obtidas para o dispositivo modificado de acordo com a metodologia inicialmente otimizada

| Figuras de mérito                           | Biossensor piezoelétrico com nova arquitetura de superfície | Biossensor piezoelétrico com modificação inicial<br>Calibração em “descontínuo” | Biossensor piezoelétrico com modificação inicial<br>Calibração em “contínuo” |
|---|---|---|--|
| Intervalo resposta linear (μg/mL)           | 10 - 500  | 10 - 500  | 10 - 500   |
| Sensibilidade (Hz μg <sup>-1</sup> mL)      | 0,663   | 0,515   | 0,578  |
| Coefficiente de correlação                  | 0,993   | 0,992   | 0,996  |
| Limite de deteção (μg/mL)                   | 4,8   | 6,7   | 5,0  |
| Limite de quantificação (μg/mL)             | 14,5  | 18,4  | 18,0   |
| Precisão (RSD médio) (%)                    | <i>n.d</i>  | 6,2   | 6,2  |
| Tempo de resposta (T <sub>90%</sub> ) (min) | ~ 20  | ~ 20  | ~ 20   |

*n.d.* – não determinado

De acordo com a comparação das figuras de méritos determinadas para os biossensores montados com as diferentes arquiteturas de superfície, que se mostra na tabela anterior (tabela 4.11), é possível verificar que, efetivamente, a introdução da proteína A na arquitetura de superfície do dispositivo permitiu um ligeiro aumento na sensibilidade, o que se traduziu, igualmente, numa diminuição dos limites de deteção e quantificação. A obtenção deste resultado poderá atribuir-se, como já referido anteriormente, à orientação mais adequada dos anticorpos específicos contra o ácido úrico, assegurada pela presença desta proteína.

Conclui-se então que, para este caso em particular, a introdução da proteína A permitiu uma melhoria na resposta analítica do sistema, decorrente, em particular, do melhoramento dos processos de difusão, reconhecimento e ligação do antigénio ao anticorpo específico. No entanto, como se pode também verificar na tabela 4.11, esta melhoria no desempenho analítico do biossensor modificado com a nova arquitetura de superfície foi, de facto, significativa, comparativamente às metodologias entretanto desenvolvidas. Neste sentido, face ao exposto, optou-se por manter a modificação da superfície do sensor piezoelétrico inicialmente otimizada na análise das amostras de urina, sobretudo numa perspetiva da simplicidade do sistema reacional (com a utilização de um menor número de reagentes), da diminuição do tempo global de preparação da superfície do transdutor e também, evidentemente, da diminuição do custo associado à montagem do biossensor.

#### **4.10. Determinação de ácido úrico em amostras de urina**

Na última etapa do presente trabalho, avaliou-se o potencial de aplicação do biossensor piezoelétrico desenvolvido na determinação de ácido úrico em amostras reais biológicas, nomeadamente em urina. Face à limitação de tempo imposta nesta fase de desenvolvimento do trabalho, entendeu-se não ser possível iniciar um novo estudo visando o estabelecimento de uma metodologia para ligação/conjugação de uma proteína, como a BSA, por exemplo, à molécula de ácido úrico (como acontece no reagente comercial) de modo a conferir-lhe a imunogenicidade que a mesma, por si só, não apresenta. Neste sentido optou-se por proceder à fortificação de várias amostras de urina com a solução de antigénio comercial, que permitissem a caracterização do comportamento do biossensor piezoelétrico desenvolvido, em particular na gama de concentrações mais baixas do intervalo de resposta linear exibido pelo mesmo. Foram, assim, preparadas três amostras de urina com as concentrações de 20,0 µg/mL, 75,0 µg/mL e 150,0 µg/mL, previamente purificadas por ultrafiltração, utilizando duas membranas de acetato de celulose. A preparação destas membranas mostra-se na figura 3.15 do capítulo referente aos materiais e métodos. Ainda neste âmbito de preparação das membranas de ultrafiltração, decidiu-se designar-se por membrana 1 aquela com um tamanho de poro menor e por membrana 2 aquela com um tamanho de poro superior.

A quantificação dos valores de concentração de ácido úrico referidos, foi efetuada utilizando a equação da reta de calibração que se mostra em inserção na figura 4.18 Como primeira observação pode referir-se que os valores experimentais determinados para a concentração de ácido úrico nas amostras ultrafiltradas com a membrana 2 (como tamanho de poro maior) foram substancialmente mais elevados que aqueles decorrentes da sua fortificação. Este facto pode ser explicado pela remoção ineficiente de interferentes da amostra de urina após tratamento com a membrana 2, os quais, permanecendo na amostra, poderão ter aumentado significativamente o número de interações não específicas, inclusivamente com a superfície de ouro que recobre o cristal piezoelétrico. Este eventual aumento de massa global experimentada pelo transdutor, traduziu-se, também, em termos práticos, num aumento exacerbado da variação de frequência de vibração do sensor piezoelétrico, conduzindo aos valores de concentração demasiadamente elevados que foram determinados.

Por outro lado, situação descrita anteriormente já não se observou na análise das amostras de urina ultrafiltradas com a membrana 1, cujo tamanho de poro é inferior e, como tal, supostamente mais eficiente na purificação e remoção de interferentes da mesma.

Os valores experimentais de concentração de ácido úrico obtidos para as amostras de urina tratadas com a membrana 1 mostram-se na tabela 4.12. Os valores apresentados correspondem à média de três análises efetuadas. Apresenta-se também, na mesma tabela a comparação dos valores obtidos com as concentrações de controlo resultantes da fortificação das amostras de urina. Para este fim, em particular, procedeu-se à estimativa da exatidão das medidas efetuadas, através da determinação dos respetivos erros relativos.

**Tabela 4.12** – Valores experimentais de concentração de ácido úrico determinados na análise de três amostras de urina fortificadas e comparação com os valores de controlo.

| [Ácido úrico]<br>controlo<br>(µg/mL) | [Ácido úrico]<br>experimental<br>(µg/mL) | Exatidão<br>(Erro Relativo, Er)<br>(%) |
|--------------------------------------|--|--|
| 20,0                                 | 19,7                                     | -1,6                                   |
| 75,0                                 | 77,5                                     | +3,3                                   |
| 150,0                                | 156,9                                    | +4,6                                   |

Os resultados que se mostram na tabela 4.12, traduzem, efetivamente, uma concordância significativa entre os valores de concentração obtidos experimentalmente e os valores de controlo resultantes da fortificação das amostras de urina. Com efeito, salienta-se a exatidão determinada em todos os ensaios (estimada com base nos valores do erro relativo), que se mostrou sempre inferior a 10%, o que se considera, efetivamente, bastante relevante tendo

em conta o facto de se ter analisado uma amostra real de matriz complexa com um sensor cujo elemento de reconhecimento é biológico é o anticorpo.

Deste modo, os resultados que se mostram na tabela 4.12, apesar de terem sido efetuados com amostras fortificadas com o analito, não deixam de abrir excelentes perspetiva relativamente à utilização e aplicabilidade do biossensor piezoelétrico desenvolvido na determinação de ácido úrico em amostras biológicas, como por exemplo a urina.

O presente trabalho visou o desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico para determinação de ácido úrico em amostras biológicas.

Os métodos atualmente utilizados na determinação deste metabolito incluem, sobretudo, técnicas analíticas, microscópicas e de imagem que se caracterizam por serem de elevado custo associado, complexas, demoradas e de necessitarem de profissionais especializados. Nesta perspectiva, as desvantagens anteriormente referidas podem ser suplantadas através da tecnologia dos biossensores, que se caracteriza por ser de simples fabricação, baixo custo associado, tempo de análise reduzido, possível miniaturização dos dispositivos e elevada sensibilidade e seletividade nas medições analíticas, tornando-se uma alternativa promissora às técnicas estabelecidas. Com efeito, considerou-se um imunossensor que utilizasse anticorpos policlonais contra o ácido úrico, combinado com uma transdução piezoelétrica.

A necessidade de otimização prévia do sistema de medida verificou-se, uma vez que o dispositivo produziu resultados em tempo real, designadamente com base na utilização de um sistema de fluxo que esteve em permanente funcionamento durante as medidas efetuadas com o biossensor. Adicionalmente, tendo em conta que as quantidades de imunoreagentes disponíveis era bastante diminuta, e sendo os mesmos bastante onerosos, a otimização de todo o sistema analítico, tornou-se crucial, na perspectiva da minimização do consumo de reagentes. Assim, foram otimizados parâmetros e características do sistema de fluxo tais como: os caudais debitados pela bomba peristáltica, o comprimento das tubagens que conduziram os reagentes à câmara de reação que contém o sensor piezoelétrico ou a determinação do volume da câmara reacional.

No que se refere à preparação da superfície do transdutor (cristal de quartzo de 14 mm de diâmetro e 10 MHz de frequência nativa, recoberto com um eletrodo de ouro em ambas as superfícies) testaram-se duas abordagens de limpeza com o objetivo de selecionar a mais eficaz, menos morosa e que envolvesse menos reagentes. A primeira consistiu numa limpeza baseada em ultrassons e a segunda utilizando uma mistura oxidante aquecida. Tendo em conta os resultados obtidos, optou-se por utilizar a metodologia baseada em tecnologia de ultrassons, cuja eficiência se deveu, em grande medida, à ação mecânica das microbolhas geradas pelo fenómeno da cavitação, na superfície do sensor. Por outro lado, o efeito de supressão da frequência nativa do cristal piezoelétrico, quando sujeito a tratamento com a

mistura oxidante aquecida, ter-se-á devido, provavelmente à ação/efeito dos reagentes envolvidos sobre o material que constitui o transdutor.

Um dos aspetos relacionados com o desenvolvimento do trabalho, que se perspectivava ser mais complexo, mas também mais desafiante, prendeu-se com a imobilização do bioreceptor na superfície do transdutor, cujo procedimento se refletiria significativamente na performance analítica global do dispositivo. Neste âmbito, o recurso à microscopia de força atómica revelou-se fundamental na perspetiva da caracterização da superfície do transdutor e confirmação do sucesso deste procedimento de imobilização do elemento de reconhecimento biológico.

Na perspetiva de otimização dos parâmetros utilizados na formação da biocamada com imobilização do bioreceptor, foi efetuado um planeamento experimental, considerando para o efeito um desenho fatorial do tipo  $2^3$ . Neste estudo, concluiu-se que as condições otimizadas para a formação da biocamada e imobilização do bioreceptor incluíam a utilização de uma [MUA], de uma [EDC] e de uma diluição de anticorpo de 10 mM, 400 mM e 1:500, respetivamente. Adicionalmente, o resultado do planeamento experimental permitiu concluir que todos os fatores envolvidos tinham efeito estatístico na formação da biocamada e imobilização do bioreceptor. Ou seja, as diferenças observada nos resultados, decorrentes da variação destes fatores não se deveram apenas a erros aleatórios inerentes ao procedimento, mas sim à variação efetiva dos seus níveis. Esta observação faz sentido, na medida em que a formação da biocamada é um processo sequencial onde a etapa seguinte é fortemente dependente da anterior. Isto é, os fatores envolvidos neste procedimento, assim como os seus níveis são completamente interdependentes, concorrendo todos com um efeito significativo para o resultado final.

Devido a limitações no número de parâmetros do modelo, não foi possível efetuar a otimização de outros parâmetros, igualmente importantes. Em termos de volumes utilizados na preparação da superfície do sensor, por exemplo, a maior parte das etapas envolveu a imersão do transdutor em soluções dos vários reagentes (*"dip coating"*) ou a deposição de uma gota na sua superfície (*"drop casting"*), não havendo, assim, necessidade de otimização deste parâmetro. No entanto, no que diz respeito ao período de incubação do anticorpo e do antigénio, estes foram alvos de uma otimização mais "fina" posteriormente, uma vez que o modelo não permitiu diretamente.

No que se refere à calibração do dispositivo desenvolvido, deve salientar-se que a metodologia designada neste trabalho por "calibração em descontínuo", apesar de ter exibido, com efeito, figuras de mérito interessantes e comparáveis a outros procedimento neste âmbito, evidenciou, no entanto, desvantagens bastante significativas. Estas prenderam-se sobretudo com o consumo excessivo de reagentes, com a morosidade do procedimento e, evidentemente, com o custo associado ao mesmo. Estas observações, em grande medida,

deveram-se ao facto de não ter sido possível, tendo em conta as limitações de tempo e recursos disponíveis, otimizar uma metodologia de regeneração da biocamada que permitisse apenas remoção do antigénio ligado ao anticorpo após cada ensaio, de modo a reutilizar a mesma biocamada na medição seguinte. Neste sentido, as razões referidas anteriormente presidiram à decisão de proceder à determinação da concentração de ácido úrico em amostras de urina com recurso à equação da reta obtida na calibração do biossensor que neste trabalho se designou por calibração em “contínuo”.

Com o objetivo de aumentar/melhorar a sensibilidade do biossensor e, conseqüentemente, o seu desempenho testou-se a introdução da proteína A recombinante de *Staphylococcus aureus* na constituição da resultando numa biocamada mista. Com efeito, a PrA foi ligada à monocamada automontada de MUA, após ativação dos grupos carboxilos com EDC e NHS, com o objetivo de diminuir o grau de aleatoriedade na orientação do elemento de reconhecimento biológico. Comparando os resultados obtidos com aqueles decorrentes da utilização do biossensor com outras arquiteturas de superfície, verificou-se efetivamente que a utilização da PrA permitiu otimizar parâmetros analíticos relacionados com o desempenho do dispositivo, como a sensibilidade ou os limites de deteção e quantificação. Assim, poder-se-á assumir que de facto a especificidade da ligação desta proteína ao anticorpo, permitiu conferir ao elemento de reconhecimento biológico uma orientação mais adequada e uma distribuição mais uniforme, melhorando os processos de difusão, reconhecimento e ligação do antigénio.

No entanto, na perspetiva de simplificação do sistema reacional, com minimização dos reagentes e etapas envolvidas na montagem do biossensor desenvolvido e conseqüentemente da minimização do custo associado, optou-se por utilizar na análise das amostras de urina o dispositivo modificado sem a introdução da PrA. Esta decisão assentou no facto de que, embora a arquitetura de superfície com a introdução desta proteína tenha conduzido a um melhoramento do desempenho do dispositivo, este não foi marcadamente significativo.

A viabilidade do dispositivo desenvolvido foi comprovada procedendo à determinação do ácido úrico num contexto mais real, com recurso a uma amostra biológica de urina fortificada com a solução de antigénio comercial, previamente purificadas por ultrafiltração com recurso a duas membranas de acetato de celulose com tamanho de poros diferentes. Os resultados obtidos experimentalmente foram validados tendo em conta os valores de controlo resultantes da fortificação das amostras de urina (20 µg/mL, 75 µg/mL e 150 µg/mL). Com efeito, observou-se uma concordância entre os valores experimentais obtidos e os valores de controlo, obtendo-se um erro relativo inferior a 10% em todas as medidas efetuadas o que se traduziu, efetivamente numa exatidão bastante significativa. Esta evidência permitiu concluir

que o biossensor desenvolvido, pode ser utilizado na determinação de ácido úrico em amostras de matrizes mais complexas.

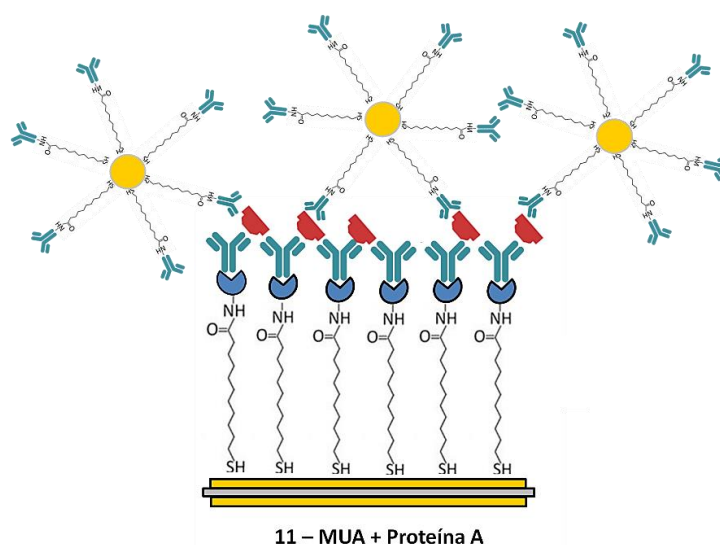
Deste modo, face aos resultados alcançados, considera-se que o objetivo principal desta dissertação foi plenamente alcançado, com o desenvolvimento de um biossensor piezoelétrico, cuja superfície, adequadamente modificada, permitiu o reconhecimento e ligação do antigénio em amostras com diferentes concentrações de ácido úrico, inclusive em amostras biológicas, designadamente em urina.

Assim, considera-se, tendo inclusivamente em conta o título desta dissertação, que o trabalho desenvolvido poderá constituir uma base sólida para o desenvolvimento de um dispositivo analítico a ser utilizado na prevenção e controlo da gota úrica. Com efeito, até à data, e de acordo com a revisão efetuada, o imunossensor desenvolvido é o primeiro biossensor piezoelétrico para deteção e determinação de ácido úrico em amostras biológicas.

Como se depreende do exposto nesta tese, o estudo em causa continua a encarar vários desafios que podem, e devem, ser explorados e aprofundados.

Em particular, face à sensibilidade limitada do elemento de transdução utilizado (designadamente a microbalança de cristal de quartzo) e, tendo em conta que a aquisição de um equipamento desta natureza mais robusto seria bastante oneroso, torna-se importante em trabalhos futuros, proceder à otimização das metodologias de modificação da superfície do sensor e demais procedimentos experimentais relacionados com o processo das medidas analíticas. Desta forma, procurar-se-á melhorar, sobretudo, a sensibilidade na resposta do dispositivo já desenvolvido, de modo a poder implementar os testes com o biossensor piezoelétrico em amostras com concentrações mais reduzidas.

Uma das estratégias futuras, que visa a otimização da sensibilidade de resposta do biossensor desenvolvido, versará a utilização de nanopartículas de ouro funcionalizadas da mesma forma que a superfície do sensor piezoelétrico (figura 6.1). Pretende-se, desta forma, conseguir aumentar a variação de massa global da biocamada e, conseqüentemente, promover uma variação adicional da frequência de ressonância do cristal de quartzo. O aumento na sensibilidade da resposta do dispositivo, que se prevê conseguir com esta estratégia, será bastante interessante, sobretudo para a realização de testes a amostras com concentrações mais reduzidas.



**Figura 6.1** - Nova metodologia para a realização de ensaios com o biossensor visando o aumento da sensibilidade das medidas efetuadas. Aumento de massa expectável da biocamada em face da introdução de nanopartículas de ouro funcionalizadas.

Como se observa na figura 6.1, o objetivo desta nova estratégia incluirá a funcionalização de nanopartículas de ouro com um anticorpo secundário contra o antigénio reconhecido pelo anticorpo primário imobilizado na superfície de ouro do sensor de quartzo, cuja interação determinará um aumento adicional de massa da biocamada e, conseqüentemente, da frequência de vibração do cristal piezoelétrico. Conta-se ainda, com esta metodologia, otimizar diversos parâmetros relacionados com o desempenho analítico do biossensor, nomeadamente em termos do limite de deteção, limite de quantificação, intervalo de resposta linear, tempo de resposta, da precisão ou exatidão.

Outro ponto prende-se com o facto do ácido úrico, por si só, não despoletar uma reação imunológica e, portanto, o antigénio (ácido úrico) utilizado nos ensaios estava comercialmente conjugado com uma proteína, nomeadamente a BSA. Em ensaios futuros, na perspetiva de economizar recursos financeiros, e pelo facto de o reagente comercial ter sido descontinuado, pretende-se desenvolver uma metodologia que permita estabelecer a conjugação do ácido úrico com a BSA ou outra proteína, que garanta a imunogenicidade que o ácido úrico (antigénio) sozinho não garante.

Seria também importante desenvolver estudos no sentido de aprofundar o processo de regeneração da biocamada do sensor. Dentro daquilo que se prevê, uma vez otimizada, se possível, a regeneração da biocamada do sensor com a remoção de apenas o antigénio, ao contrário do que se verificou nos ensaios efetuados, reutilizar o sensor de forma a se realizar a medição de várias amostras sem ter que se recorrer novamente à sua funcionalização. Por outro lado, em vez de se efetuar a calibração do biossensor em modo “contínuo”, tal como aconteceu, fazê-la em modo “descontínuo”, onde se analisa o padrão e de seguida regenera-se a biocamada. Este processo iria permitir ultrapassar as limitações de quantidades disponíveis de reagentes e de limitações de tempo subjacentes a esta dissertação.

Por fim, numa última fase, seria interessante desenvolver um dispositivo de uso pessoal, sem necessidade de se recorrer a um ambiente clínico, visando uma automonitorização.

## Referências bibliográficas

- Ahuja, T., Rajesh, Kumar, D., Tanwar, V. K., Sharma, V., Singh, N., & Biradar, A. M. (2010). An amperometric uric acid biosensor based on Bis[sulfosuccinimidy]l suberate crosslinker/3-aminopropyltriethoxysilane surface modified ITO glass electrode. *Thin Solid Films*, *519*(3), 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/J.TSF.2010.08.056>
- Al-Khafaji, Q. A. M., Harris, M., Tombelli, S., Laschi, S., Turner, A. P. F., Mascini, M., & Marrazza, G. (2012). An Electrochemical Immunoassay for HER2 Detection. *Electroanalysis*, *24*(4), 735–742. <https://doi.org/10.1002/ELAN.201100501>
- Al Aani, S., Mustafa, T. N., & Hilal, N. (2020). Ultrafiltration membranes for wastewater and water process engineering: A comprehensive statistical review over the past decade. *Journal of Water Process Engineering*, *35*, 101241. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2020.101241>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). Molecular Biology of The Cell. In *Molecular Biology of the Cell* (5th editio, pp. 1539–1601). Garland Science, Taylor & Francis Group. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26926/>
- Ambrosio, G., Teixeira, F., & Schor, N. (2012). Uric Acid and Renal Function. In *Diseases of Renal Parenchyma*. InTech. <https://doi.org/10.5772/25904>
- Arya, S. K., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, *23*(7), 1083–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.10.018>
- Asiaei, S., Smith, B., & Nieva, P. (2015). Enhancing conjugation rate of antibodies to carboxylates: Numerical modeling of conjugation kinetics in microfluidic channels and characterization of chemical over-exposure in conventional protocols by quartz crystal microbalance. *Biomicrofluidics*, *9*(6), 064115–064115. <https://doi.org/10.1063/1.4937929>
- Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S., & Rand, A. G. (2000). Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, *15*(11–12), 615–621. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00115-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00115-9)
- Bai, Z., Zhou, C., Xu, H., Wang, G., Pang, H., & Ma, H. (2017). Polyoxometalates-doped Au nanoparticles and reduced graphene oxide: A new material for the detection of uric acid in urine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, *243*, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.159>
- Barattin, R., & Voyer, N. (2008). Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. *Chemical Communications*, (13), 1513–1532. <https://doi.org/10.1039/B614328H>
- Bastidas, D. M., Criado, M., & Bastidas, J.-M. (2011). Methods for analysing nanocoatings and ultra-thin films. *Nanocoatings and Ultra-Thin Films*, 131–156. <https://doi.org/10.1533/9780857094902.1.131>
- Bera, R. K., Anoop, A., & Raj, C. R. (2011). Enzyme-free colorimetric assay of serum uric acid. *Chemical Communications*, *47*(41), 11498–11500. <https://doi.org/10.1039/C1CC13349G>
- Bhattacharai, J. K., Neupane, D., Mikhaylov, V., Demchenko, A. V., & Stine, K. J. (2017). Self-Assembled Monolayers of Carbohydrate Derivatives on Gold Surfaces. *Carbohydrate*. <https://doi.org/10.5772/66194>
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, *56*(9), 930. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Burcu BahadÄ, E., & Kemal Sezgintürk, M. (2015). Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.011>
- Cardoso, A., Branco, J. C., Cruz, J. A. P. S. M., & Costa, M. M. (2005). *REGRAS DE OURO EM REUMATOLOGIA*. Lisboa. Retrieved from <http://www.dgs.pt>
- Cesewski, E., & Johnson, B. N. (2020, July 1). Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112214>

- Cetin, D., Okan, M., Bat, E., & Kulah, H. (2020). A comparative study on EpCAM antibody immobilization on gold surfaces and microfluidic channels for the detection of circulating tumor cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 188, 110808. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2020.110808>
- Chetcuti, A. F., Wong, D. K. Y., & Stuart, M. C. (1999). An indirect perfluorosulfonated ionomer-coated electrochemical immunosensor for the detection of the protein human chorionic gonadotrophin. *Analytical Chemistry*, 71(18), 4088–4094. <https://doi.org/10.1021/AC981216A>
- Chou, S. F., Hsu, W. L., Hwang, J. M., & Chen, C. Y. (2004). Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(9), 999–1005. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2003.09.004>
- Chunta, S., Suk-Anake, J., Chansiri, K., & Promptmas, C. (2014). A piezoelectric-based immunosensor for high density lipoprotein particle measurement. *Analyst*, 139(18), 4586–4592. <https://doi.org/10.1039/C4AN00601A>
- Contreras-Naranjo, J. E., & Aguilar, O. (2019, March 1). Suppressing non-specific binding of proteins onto electrode surfaces in the development of electrochemical immunosensors. *Biosensors*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bios9010015>
- Cui, Z. F. (Zhangfeng), & Muralidhara, H. S. (2010). Membrane technology: a practical guide to membrane technology and applications in food and bioprocessing. *Elsevier*.
- Erden, P. E., & Kiliç, E. (2013). A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. *Talanta*, 107, 312–323. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.01.043>
- Fabio Variola. (2015). Atomic force microscopy in biomaterials surface science. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(5), 2950–2959. <https://doi.org/10.1039/C4CP04427D>
- Falohun, T., & McShane, M. J. (2020). An optical urate biosensor based on urate oxidase and long-lifetime metalloporphyrins. *Sensors (Switzerland)*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/s20040959>
- Faridbod, F., Saboury, A. A., Divsalar, A., Behbehani, G. R., Ganjali, M. R., Faridbod, F., ... Norouzi, P. (2010). A New Approach for Protein Binding Isotherm Analysis by Means of an Electrochemical Microsensor. *Int. J. Electrochem. Sci* (Vol. 5). Retrieved from [www.electrochemsci.org](http://www.electrochemsci.org)
- Fernando A. Arosa, Elsa M. Cardoso, & Francisco C. Pacheco. (2012). *Técnicas de Imunologia* (Edição 2). Lisboa: LIDEL.
- Ferreira, V., Silva F, & Abrantes LM. (2008). Monocamadas Auto-Montadas de Alcanotióis - das Superfícies Planas à estabilização de Nanopartículas de Ouro. *Química*, 111, 37–48. Retrieved from <https://www.spq.pt/magazines/BSPQuimica/640/article/30001465/pdf>
- Freire, R. S., Pessoa, C. A., & Kubota, L. T. (2003). EMPREGO DE MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS. *Quim. Nova*, 26(3), 381–389.
- Ghosh, T., Sarkar, P., & Turner, A. P. F. (2015). A novel third generation uric acid biosensor using uricase electro-activated with ferrocene on a Nafion coated glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 102, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECTCHEM.2014.11.001>
- Glick, B. R., Pasternak, J. J., & Patten, C. L. (2009). *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA* (4th ed). United States: Washington, DC: ASM Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=Wz3CtTBe9aUC>
- Gota | CUF. (n.d.). Retrieved 30 May 2021, from <https://www.cuf.pt/saude-a-z/gota>
- Hnaïen, M., Diouani, M. F., Helali, S., Hafaid, I., Hassen, W. M., Renault, N. J., ... Abdelghani, A. (2008). Immobilization of specific antibody on SAM functionalized gold electrode for rabies virus detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 443–449. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2007.09.018>
- Hoshi, T., Saiki, H., & Anzai, J. I. (2003). Amperometric uric acid sensors based on polyelectrolyte multilayer films. *Talanta*, 61(3), 363–368. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00303-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00303-5)

- Ismail, A. F., Khulbe, K. C., & Matsuura, T. (2019). RO Membrane Preparation. In *Reverse Osmosis* (pp. 25–56). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811468-1.00002-5>
- J. Christopher Love, †, Lara A. Estroff, †, Jennah K. Kriebel, †, Ralph G. Nuzzo, \*, ‡ and, & George M. Whitesides\*, †. (2005). Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews*, *105*(4), 1103–1169. <https://doi.org/10.1021/CR0300789>
- Jiang, K., Schadler, L. S., Siegel, R. W., Zhang, X., Zhang, H., & Terrones, M. (2004). Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation. *Journal of Materials Chemistry*, *14*(1), 37–39. <https://doi.org/10.1039/B310359E>
- John C. Crittenden, R. Rhodes Trussell, David W. Hand, Kerry J. Howe, & George Tchobanoglous. (2012). *MWH's water treatment: principles and design*. (3rd ed.). John Wiley & Sons. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/MWH%27s+Water+Treatment%3A+Principles+and+Design%2C+3rd+Edition-p-9781118103777>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics* (pp. 1–68). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Khulbe, K., C. Feng, C. Y., & Matsuura, T. (2008). *Synthetic Polymeric Membranes*. Springer Science. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73994-4>
- Kim, J. H., Cho, C. H., Ryu, M. Y., Kim, J.-G., Lee, S.-J., Park, T. J., & Park, J. P. (2019). Development of peptide biosensor for the detection of dengue fever biomarker, nonstructural 1. *PLOS ONE*, *14*(9), e0222144. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0222144>
- Koyun, A., Ahlatcolu, E., & Koca, Y. (2012). Biosensors and Their Principles. In *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*. InTech. <https://doi.org/10.5772/48824>
- Lec, R. M. (2001). Piezoelectric biosensors: Recent advances and applications. In *Proceedings of the Annual IEEE International Frequency Control Symposium* (pp. 419–429). IEEE. <https://doi.org/10.1109/freq.2001.956265>
- Lee, J. E., Seo, J. H., Kim, C. S., Kwon, Y., Ha, J. H., Choi, S. S., & Cha, H. J. (2013). A comparative study on antibody immobilization strategies onto solid surface. *Korean Journal of Chemical Engineering* *2013 30:10*, *30*(10), 1934–1938. <https://doi.org/10.1007/S11814-013-0117-5>
- Lee, T. (2008). Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future. *Sensors*, *8*(9), 5535–5559. <https://doi.org/10.3390/s8095535>
- Lemana, S., & Sabahudin, ; Ćordić. (2017). REVIEW OF PIEZOELECTRIC BIOSENSORS IN MEDICINE.
- Liang, R. P., Qiu, J. D., Zou, X. Y., & Cai, P. X. (2004). Breast cancer antigen immunosensor based on the functional sol-gel film. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities*, *25*(3), 425.
- Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2017). CHAPTER 1: Introduction to Food Biosensors. In *Food Chemistry, Function and Analysis* (Vol. 2017-January, pp. 1–21). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781782623908-00001>
- Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2019). CHAPTER 1: Introduction to Immunosensors. In *RSC Detection Science* (Vol. 2019-January, pp. 1–20). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781788016162-00001>
- Liu, Y., Yuan, M., Liu, L., & Guo, R. (2013). A facile electrochemical uricase biosensor designed from gold/amino acid nanocomposites. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *176*, 592–597. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2012.08.058>
- Lowe, C. R. (2008). Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. In *Handbook of Biosensors and Biochips*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470061565.hbb003>

- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001a). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 314(1–2), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00629-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00629-5)
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001b). Immunosensors -Principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 314(1–2), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00629-5](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00629-5)
- M. Raposo, Q.Ferreira, & P.A.ribeiro. (2007). A Guide for Atomic Force Microscopy Analysis of Soft Condensed Matter. *Mod Res Educ Top Microsc*, 758–759. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/237295610\\_A\\_Guide\\_for\\_Atomic\\_Force\\_Microscopy\\_Analysis\\_of\\_Soft\\_Condensed\\_Matter](https://www.researchgate.net/publication/237295610_A_Guide_for_Atomic_Force_Microscopy_Analysis_of_Soft_Condensed_Matter)
- Malhotra, B. D., & Chaubey, A. (2003). Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 91(1–3), 117–127. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00075-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00075-3)
- Marrese, M., Guarino, V., & Ambrosio, L. (2017). Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.3390/JFB8010007>
- Matthews, D. R., Bown, E., Watson, A., Holman, R. R., Steemson, J., Hughes, S., & Scott, D. (1987). PEN-SIZED DIGITAL 30-SECOND BLOOD GLUCOSE METER. *The Lancet*, 329(8536), 778–779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92802-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92802-9)
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (2012). *Compendium of Chemical Terminology-Gold Book*. Iupac (2nd ed). Oxford: Blackwell Scientific Publications. <https://doi.org/10.1351/goldbook>
- Mehrotra, P. (2015). Biosensors and their applications – A review. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Merkoçi, A., Li, C. zhong, Lechuga, L. M., & Ozcan, A. (2021). COVID-19 biosensing technologies. *Biosensors & Bioelectronics*, 178, 113046. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113046>
- Metkar, S. K., & Girigoswami, K. (2019, January 1). Diagnostic biosensors in medicine – A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.029>
- Mohanty, S. P., & Kougiyanos, E. (2006). Biosensors: a tutorial review. *IEEE Potentials*, 25(2), 35–40. <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>
- Monošík, R., Stredanský, M., & Šturdík, E. (n.d.). Biosensors-classification, characterization and new trends. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>
- Monošík, R., Stredanský, M., & Šturdík, E. (2012). Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109–120. <https://doi.org/10.2478/V10188-012-0017-Z>
- Monteiro, T., & Almeida, M. G. (2019, January 2). Electrochemical Enzyme Biosensors Revisited: Old Solutions for New Problems. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1461552>
- Montgomery DC. (2009). Factorial and fractional factorial experiments for process design and improvement. In: Introduction to Statistical Quality Control (6th ed, pp. 549–601). Jefferson City: MO: John Wiley & Sons, Inc.
- Moraes, M. L., Rodrigues Filho, U. P., Oliveira, O. N., & Ferreira, M. (2007). Immobilization of uricase in layer-by-layer films used in amperometric biosensors for uric acid. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 11(11), 1489–1495. <https://doi.org/10.1007/S10008-007-0314-4/FIGURES/6>
- Mulder, M. (1996a). *Basic Principles of Membrane Technology* (2<sup>a</sup> edition). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1766-8>
- Mulder, M. (1996b). Introduction. In Netherlands: Kluwer Academic Publishers (Ed.), *Basic Principles of Membrane Technology* (2<sup>a</sup> ed., pp. 1–21). [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1766-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1766-8_1)
- Naresh, V., & Lee, N. (2021). A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(4), 1–35. <https://doi.org/10.3390/S21041109>

- Narwal, V., Deswal, R., Batra, B., Kalra, V., Hooda, R., Sharma, M., & Rana, J. S. (2019, March 1). Cholesterol biosensors: A review. *Steroids*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.12.003>
- Nisnevitch, M., & Firer, M. A. (2001). The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1–3), 467–480. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00214-7](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00214-7)
- Oliveira, E. P. de, & Burini, R. C. (2012). High plasma uric acid concentration: Causes and consequences. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-12>
- Parthasarathy, P., & Vivekanandan, S. (2018). A comprehensive review on thin film-based nano-biosensor for uric acid determination: Arthritis diagnosis. *World Review of Science, Technology and Sustainable Development*, 14(1), 52–71. <https://doi.org/10.1504/WRSTSD.2018.092824>
- Patel, P. N., Mishra, V., & Mandloi, A. S. (2010). OPTICAL BIOSENSORS: FUNDAMENTALS & TRENDS Address for Correspondence. *Journal of Engineering Research and Studies JERS*, 15–34.
- Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., & Mohapatra, E. (2016). Biosensors in health care: The milestones achieved in their development towards lab-on-chip-analysis. *Biochemistry Research International*. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/3130469>
- Pejic, B., Marco, R. De, & Parkinson, G. (2006). The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. *Analyst*, 131(10), 1079–1090. <https://doi.org/10.1039/B603402K>
- Pereira, T. A. (2019). *Development of a liquid cell to study the release of Brimonidine in real time*. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Retrieved from <https://repositorio.ipl.pt/handle/10400.21/12393>
- Pohanka, M. (2018). Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications. *Materials* 2018, Vol. 11, Page 448, 11(3), 448. <https://doi.org/10.3390/MA11030448>
- Ratautaite, V., Samukaite-Bubniene, U., Plausinaitis, D., Boguzaitė, R., Balciunas, D., Ramanaviciene, A., ... Ramanavicius, A. (2021). Molecular Imprinting Technology for Determination of Uric Acid. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22095032>
- Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., & Singh, S. (2016, March 1). Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.010>
- Revin, S. B., & John, S. A. (2011). Electropolymerization of 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole on glassy carbon electrode and its electrocatalytic activity towards uric acid. *Electrochimica Acta*, 56(24), 8934–8940. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2011.07.125>
- Sabu, C., Henna, T. K., Raphey, V. R., Nivitha, K. P., & Pramod, K. (2019, September 15). Advanced biosensors for glucose and insulin. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.034>
- Samanta, D., & Sarkar, A. (2011). Immobilization of bio-macromolecules on self-assembled monolayers: methods and sensor applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2567–2592. <https://doi.org/10.1039/C0CS00056F>
- Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.09.003>
- Saylan, Y., Erdem, Ö., Ünal, S., & Denizli, A. (2019). An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. *Biosensors*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/BIOS9020065>
- Scott, W. W., & Bhushan, B. (2003). Use of phase imaging in atomic force microscopy for measurement of viscoelastic contrast in polymer nanocomposites and molecularly thick lubricant films. *Ultramicroscopy*, 97(1–4), 151–169. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(03\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(03)00040-8)

- Shalabh HT. (2009). Experimental design in biotechnology and 2k factorial design. In: Statistical Analysis of Designed Experiments (3rd ed, pp. 287–290). New York: Springer.
- Shanehbandi, D., Majidi, J., Kazemi, T., Baradaran, B., Aghebati-Maleki, L., Fathi, F., & Dolatabadi, J. E. N. (2017). Immuno-biosensor for Detection of CD20-Positive Cells Using Surface Plasmon Resonance. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 7(2), 189. <https://doi.org/10.15171/APB.2017.023>
- Shen, M., Rusling, J. F., & Dixit, C. K. (2017). Site-Selective Orientated Immobilization of Antibodies and Conjugates for Immunodiagnosics Development. *Methods (San Diego, Calif.)*, 116, 95. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2016.11.010>
- Shi, X., Qing, W., Marhaba, T., & Zhang, W. (2020). Atomic force microscopy - Scanning electrochemical microscopy (AFM-SECM) for nanoscale topographical and electrochemical characterization: Principles, applications and perspectives. *Electrochimica Acta*, 332, 135472. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2019.135472>
- Silva, D. (2018). *Otimização do fracionamento do efluente da cortiça recorrendo a tecnologia de membranas e estudo dos seus potenciais biológicos*. Instituto Superior De Engenharia de Lisboa.
- Silva, N. (2016). *Desenvolvimento de diversos biosensores para determinação de acrilamida baseados em células inteiras de Pseudomonas aeruginosa: Um estudo comparativo*. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências.
- Srisombat, L., Jamison, A. C., & Lee, T. R. (2011). Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 390(1–3), 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2011.09.020>
- Susanto, H., Samsudin, A. M., Rokhati, N., & Widiyasa, I. N. (2013). Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(6–7), 386–392. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2013.02.005>
- Susmel, S., Guilbault, G. G., & O'Sullivan, C. K. (2003). Demonstration of labelless detection of food pathogens using electrochemical redox probe and screen printed gold electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(7), 881–889. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00214-2)
- Taheri, R. A., Rezayan, A. H., Rahimi, F., Mohammadnejad, J., & Kamali, M. (2016). Development of an immunosensor using oriented immobilized anti-OmpW for sensitive detection of Vibrio cholerae by surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 484–488. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.07.006>
- Tereshchenko, A., Fedorenko, V., Smyntyna, V., Konup, I., Konup, A., Eriksson, M., ... Bechelany, M. (2017). ZnO films formed by atomic layer deposition as an optical biosensor platform for the detection of Grapevine virus A-type proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 763–769. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.09.071>
- Thangamani J., G., Deshmukh, K., Kumar Sadasivuni, K., Chidambaram, K., Basheer Ahamed, M., Ponnamma, D., ... K. Khadheer Pasha, S. (2017). Recent advances in electrochemical biosensor and gas sensors based on graphene and carbon nanotubes (CNT) - A review . *Advanced Materials Letters*, 8(3), 196–205. <https://doi.org/10.5185/AMLETT.2017.7042>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Methods*, 37(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.05.005>
- Tothill, I. E. (2009, February 1). Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.015>
- Tsugimura, K., Ohnuki, H., Wu, H., Endo, H., Tsuya, D., & Izumi, M. (2017). Oriented antibody immobilization on self-assembled monolayers applied as impedance biosensors, 12015. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/924/1/012015>

- Wang, Y. R., Hu, P., Liang, Q. L., Luo, G. A., & Wang, Y. M. (2007). Voltammetric determination of uric acid by using gold nanotubule electrode. *Chinese Chemical Letters*, 18(9), 1111–1114. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2007.07.034>
- Xu, Y., Zhang, Z., Yi, R., Guo, X., & Qi, Z. (2020). Single-layer graphene-based surface plasmon resonance sensor with dynamic evanescent field enhancement for biomarker study. *https://Doi.Org/10.1080/09500340.2020.1759715*, 67(8), 671–681. <https://doi.org/10.1080/09500340.2020.1759715>
- Yamazoe, H. (2019). Antibody immobilization technique using protein film for high stability and orientation control of the immobilized antibody. *Materials Science and Engineering: C*, 100, 209–214. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2019.02.114>
- Yan, Q., Zhi, N., Yang, L., Xu, G., Feng, Q., Zhang, Q., & Sun, S. (2020). A highly sensitive uric acid electrochemical biosensor based on a nano-cube cuprous oxide/ferrocene/uricase modified glassy carbon electrode. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67394-8>
- Yang, X., Li, H., Zhao, X., Liao, W., Zhang, C. X., & Yang, Z. (2020). A novel, label-free liquid crystal biosensor for Parkinson's disease related alpha-synuclein. *Chemical Communications*, 56(40), 5441–5444. <https://doi.org/10.1039/d0cc01025a>
- Zare, S., & Kargari, A. (2018). 4 - Membrane properties in membrane distillation. *Emerging Technologies for Sustainable Desalination Handbook*, 107–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815818-0.00004-7>