

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANA HERCÍLIA MAGALHÃES NUNES MAPA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO UTILIZANDO
ÁCIDO 4-HIDROXIBENZÓICO PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR GSTM3
VISANDO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE CÂNCER DE PRÓSTATA

PATOS DE MINAS - MG

ABRIL 2025

ANA HERCÍLIA MAGALHÃES NUNES MAPA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO UTILIZANDO
ÁCIDO 4-HIDROXIBENZÓICO PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR GSTM3
VISANDO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE CÂNCER DE PROSTA**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

Prof. Dr. Diego Leoni Franco

PATOS DE MINAS – MG

ABRIL 2025

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA HERCÍLIA MAGALHÃES NUNES MAPA

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico utilizando ácido 4-hidroxibenzóico para detecção do biomarcador GSTM3 visando diagnóstico precoce de câncer de próstata

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Diego Leoni Franco – UFU
Presidente

Profa. Dra. Claudilene Ribeiro Chaves – UFU
Membro

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – UFU
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia

Patos de Minas, 24 de abril de 2025

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo mais comum de carcinoma entre homens, frequentemente é diagnosticado tardiamente devido à evolução assintomática. Atualmente, o sistema de saúde oferece técnicas invasivas e demoradas para detecção como, o exame de toque e a dosagem do antígeno específico da próstata, metodologias que apresentam limitações como falsos positivos gerados por outras doenças benignas. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas metodologias para se ter um método rápido e pouco invasivo para diagnóstico discriminatório da doença. A pesquisa objetivava o desenvolvimento de um eletrodo de carbono de grafite de lapiseira polimerizado com ácido 4-hidróxibenzóico para imobilizar o anti-GSTM3, para detectar o biomarcador de câncer de próstata GSTM3. O estudo foi realizado em uma célula eletroquímica conectada a um potenciostato, possuindo como eletrodo de referência o Ag/AgCl e um contra eletrodo de platina. Eletrodos de trabalho foram modificados através da polimerização do monômero 4-hidróxibenzóico por meio de voltametria cíclica, com posterior avaliação por espectroscopia de impedância eletroquímica. Depois, ocorreu a imobilização do anticorpo anti-GSTM3 seguida da detecção em amostras clínicas de soro contendo GSTM3. Por fim, parâmetros do biossensor foram otimizados e foi realizado o limite de diluição. Foi obtido êxito na modificação dos eletrodos de carbono de grafite de lapiseira, sendo possível imobilizar o anticorpo sobre o polímero por ligação covalente, mostrando que a matriz é eficiente na construção deste tipo de biossensor. Em amostras clínicas o sistema se mostrou eficiente para a detecção do antígeno, possuindo um limite de diluição de 1:1280. Desta forma, o eletrodo de carbono de grafite de lapiseira modificado se demonstra eficaz em formar interações com as moléculas do anticorpo, configurando uma plataforma eficiente para detecção do biomarcador GSTM3.

Palavras-chave: Diagnóstico. Eletroquímica. ECGL. GSTM3. Imunossensor

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common type of carcinoma among men, often diagnosed late due to its asymptomatic progression. Currently, the healthcare system offers invasive and time-consuming detection techniques such as the digital rectal exam and prostate-specific antigen testing, methodologies that present limitations like false positives caused by other benign conditions. Therefore, it is necessary to develop new methodologies to obtain a rapid and minimally invasive method for discriminatory diagnosis of the disease. The research aimed to develop a pencil graphite electrode polymerized with 4-hydroxybenzoic acid to immobilize anti-GSTM3 for detecting the prostate cancer biomarker GSTM3. The study was conducted in an electrochemical cell connected to a potentiostat, having Ag/AgCl as reference electrode and a platinum counter electrode. Working electrodes were modified through polymerization of the 4-hydroxybenzoic acid monomer via cyclic voltammetry, with subsequent evaluation by electrochemical impedance spectroscopy. Afterwards, immobilization of the anti-GSTM3 antibody was performed followed by detection in clinical serum samples containing GSTM3. Finally, biosensor parameters were optimized and the dilution limit was determined. The modification of the pencil graphite electrodes was successful, allowing the antibody to be immobilized on the polymer through covalent bonding, showing that the matrix is efficient in constructing this type of biosensor. In clinical samples, the system proved efficient for antigen detection, having a dilution limit of 1:1280. Thus, the modified pencil graphite electrode proves effective in forming interactions with antibody molecules, constituting an efficient platform for detection of the GSTM3 biomarker.

Keywords: Diagnosis. Electrochemistry. GSTM3. PGE. Immunosensor

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ω : ohm
Ab: anticorpos
Ag/AgCl: prata recoberto por uma camada de cloreto de prata
AMACR: enzima alfa-metilacil-CoA recemase
ADT: terapia de privação de androgênio
CP: câncer de próstata
CTCs: células tumorais circulantes
DRE: toque Retal
ECGL: eletrodo de carbono de grafite de lapiseira
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilamonipropil)carbodiimida
EIE: espectroscopia de impedância eletroquímica
GSTs: Glutathione S-transferase
GSH: Glutathione
GSTM3: Glutathione S-transferase mu-3
KCl: Cloreto de potássio
LOD: limite de detecção
MES: tampão ácido 2-etanossulfônico
mM: milimolar
 μ M: micromolar
NHS: sulfo- *N* -hidroxissuccinimida NHS
PBS: tampão fosfato-salino
PC: polímeros condutores
PSA: antígeno prostático específico
Pt: platina
Phi: teste do índice de saúde da próstata
PAP: fosfatase ácida prostática
PCA3: antígeno 3 do câncer de próstata
PSMA: antígenos da membrana específico da próstata
Rct: resistência à transferência de carga
RNA: ácido ribonucleico
RM: ressonância magnética
SNPs: polimorfismos de nucleotídeo único
TNM: tumor primário, linfonodo regional e metástase a distância
TMPRSS2-ERG: fusão gênica da protease transmembrana induzida por andrógeno, serina 2
TP :trans perineal
TR: transretal
TRUS: ultrassonografia transretal
US: ultrassonografia retal
VC: voltametria cíclica
4-HB: ácido 4-hidroxibenzoico; ácido para-hidroxibenzoico; PHBA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático de um biossensor	12
Figura 2- Representação das configurações possíveis de um imunossensor. (A) o anticorpo é imobilizado sobre o transdutor capturando o antígeno e em (B) o antígeno é imobilizado sobre o transdutor capturando o anticorpo.....	16
Figura 3- Representação da estrutura química do ácido 4-hidroxibenzoico.....	20
Figura 4- Fotografia da célula eletroquímica utilizada com seus respectivos eletrodos-referência com fita em azul, de trabalho ao centro e contra eletrodo ao fundo	21
Figura 5- A) Voltamograma padrão em ECGL sem modificação em solução (K ₃ Fe(CN) ₆) em KCl 5,0 mM (B) VC em solução HClO ₄ 0,5M	27
Figura 6- Diagrama de Nyquist para eletrodo ECGL sem modificação em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl 0,5 M.....	29
Figura 7- Circuito de Randles para ECGL sem modificação em K ₃ Fe (CN) ₆ 5,0 mM em KCl 0,5 M	29
Figura 8- 1ª varredura da VC em solução de 4-HB 5,0 mM em HClO ₄ 0,5 M	30
Figura 9- Três varreduras da VC em solução de 4-HB 5 mM em HClO ₄ 0,5 M.....	31
Figura 10- 30 varreduras da VC na solução de 4-HB 5,0 mM em HClO ₄ 0,5 M	32
Figura 11- VC na solução de (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl 0,5 M.....	33
Figura 12- VC na solução de HClO ₄ 0,5 M	33
Figura 13- Diagrama de Nyquist para eletrodo ECGL sem modificação em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl 0,5 M. Curvas em preto do eletrodo sem modificação e curvas em vermelho do eletrodo modificado com o polímero.....	34
Figura 14- Diagrama de Nyquist em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl 0,5 M. ECGL (preto), ECGL/4HB (vermelho), ECGL/4HB/Anti-GSTM3 (amarelo) e ECGL/4HB/Anti-GSTM3/GSTM3 (azul).	36
Figura 15- Dados de R _{ct} vs. Tempo de imobilização obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl para vários tempos de imobilização do anti-GSTM3 no sistema ECGL/4HB/Anti-GSTM3.....	38
Figura 16- Dados de R _{ct} vs. Tempo de imobilização obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl para vários tempos de imobilização da glicina. Os dados foram obtidos no sistema ECGL/4HB/Anti-GSTM3. A barra em azul escuro representa a mesma resposta padrão obtida anteriormente sem a glicina a título de comparação	39
Figura 17- Dados de R _{ct} vs. Tempo de imobilização obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl para vários tempos de imobilização do GSTM3.	40
Figura 18- Dados de R _{ct} vs. Diluição do soro obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em (K ₃ Fe(CN) ₆) 5,0 mM em KCl para várias diluições das amostras de soro contendo o biomarcador GSTM3.	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 Câncer de Próstata	9
2.2 Biossensor	11
2.3 Imunossensor	14
2.4 Biomarcador	17
2.5 Polímeros condutores	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 Geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Soluções	24
4.2 Célula Eletroquímica	24
4.2 Preparo e modificação dos eletrodos de trabalho	24
4.3 Detecção do GSTM3 em amostras clínicas	25
4.4 Análise de dados	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de trabalho sem modificação	26
5.2 Polimerização do ácido 4-hidroxibenzoico	29
5.3 Caracterização do eletrodo de trabalho	32
5.3 Avaliação do biossensor	34
5.4 Otimizações do imunossensor	36
5.5 Limite de diluição	40
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CP) representa um significativo desafio para a saúde pública global, com aproximadamente 1,4 milhões de novos casos diagnosticados anualmente. No Brasil, milhares de cirurgias são realizadas todos os anos para tratar a neoplasia (INCA, 2023). Sua origem está na combinação das susceptibilidades das linhas germinativas, mutações somáticas e fatores micro e macro ambientais (SANDHU et al., 2021).

A detecção precoce é dificultada pelo fato de o câncer ser frequentemente assintomático em estágios iniciais. Os métodos de diagnósticos atuais, que são amplamente utilizados como toque retal e dosagem do antígeno prostático específico (PSA) apresentam limitações significativas, inclusive falsos positivos. Neste contexto, destaca-se a busca por biomarcadores mais específicos e sensíveis, bem como por tecnologias inovadoras de detecção nas pesquisas científicas (KHAN et al., 2022).

Assim sendo, os biossensores emergem como uma promissora alternativa tecnológica. De acordo com a IUPAC (1992), esses dispositivos combinam elementos biológicos de reconhecimento com transdutores que convertem interações bioquímicas em sinais mensuráveis. Entre as diversas classes de biossensores, os imunossensores eletroquímicos tem se mostrado relevantes para o diagnóstico do CP, oferecendo vantagens como alta sensibilidade, portabilidade e baixo custo (VINOD; SADANANDAN; RAJAMANI, 2024).

Desta forma, atualmente busca-se solucionar os desafios associados a detecção precoce do CP visando a pesquisa, desenvolvimento e implementação de técnicas menos invasivas. Para isso, é necessário a utilização de novos biomarcadores, que são reconhecidos como ferramentas valiosas para a detecção precoce e estadiamento correto do pré-tratamento (TAO et al., 2013). Assim, torna-se vital o desenvolvimento de um novo imunossensor para detecção de um desses biomarcadores do CP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de Próstata

Câncer, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a denominação dada a um

“grande grupo de doenças que podem começar em quase qualquer órgão ou tecido do corpo quando células anormais crescem descontroladamente, vão além de seus limites usuais para invadir partes adjacentes do corpo e/ou se espalham para outros órgãos” (WHO, 2022). Essa classificação abrangente do grupo é subdividida em denominações específicas conforme a porção originária do crescimento celular desenfreado.

Dentre esses, o CP destaca-se mundialmente como segundo carcinoma mais diagnosticado e causa de morte entre homens (BRYAN et al., 2024), liderando as estatísticas de mortalidade masculina em 48 países (SUNG et al., 2021). No Brasil, em 2023, foram realizadas 233.090 cirurgias para tratar o CP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024). O risco de desenvolver este tipo de câncer aumenta com o avanço da idade, sendo que a idade média de diagnóstico é aos 66 anos (RAWLA, 2019). Correlaciona-se o tratamento e a detecção precoce em homens assintomáticos com a diminuição, desde 1990, das taxas de mortalidade por CP em países de alta renda (BRAY et al., 2024), sugerindo que a facilitação de métodos de detecção precoce poderia gerar impacto similar nas taxas dos países de baixa renda. Evidências indicam que as disparidades nas práticas de diagnóstico seja o maior contribuidor para variações globais de incidência deste câncer (SUNG et al., 2021).

Na maioria dos casos, o CP se caracteriza como uma enfermidade silenciosa, com manifestações clínicas evidentes apenas em estágios avançados quando já está ocorrendo a metástase, podendo nesta fase causar dor óssea, dificuldade de deambulação por dor, anemia e caquexia (INCA, 2023). Embora existam diversos testes para identificação do carcinoma no paciente, a detecção precoce normalmente emprega o exame de toque retal (DRE) onde um médico avalia com os dedos o tamanho e possíveis anormalidades na próstata (SEKHOACHA et al., 2022) associado ao teste que mede os níveis plasmáticos do antígeno prostático específico (PSA), considerando valores acima de 4 ng/ml como anômalos (RAWLA, 2019). Entretanto, ambos os exames possuem limitações para identificar corretamente alterações decorrentes do CP, uma vez que doenças benignas, como infecção do trato urinário, hipertrofia prostática benigna e prostatite também interferem no resultado destes exames (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2021). Neste contexto, a biópsia tecidual – que realiza análise microscópica da morfologia celular – permanece como o padrão-ouro para confirmação diagnóstica da doença (RAWLA, 2019). O procedimento pode ser realizado por duas vias principais: via transretal (TR) ou via trans perineal (TP), ambas guiadas por métodos de imagem como ultrassonografia retal (US) ou ressonância magnética (RM) (DROST et al., 2019).

Posteriormente ocorre o estadiamento da doença em estágios, de I ao IV, por meio da combinação do sistema TNM com a escala de Gleason, um procedimento crucial para orientar médicos quanto as opções terapêuticas cabíveis (INCA, 2023). O TNM avalia a extensão do tumor primário (T1-T4), presença de linfonodos regionais (N0-N1) e a metástase à distância (M0-M1) (LEENDERS et al., 2020). Simultaneamente, a escala de Gleason faz uma graduação da agressividade histopatológica em grupos de grau de 1 a 5 (SAOUD et al., 2020).

A busca por métodos mais precisos de diagnóstico e estadiamento do CP tem impulsionado avanços significativos. Nos métodos por imagem, uma nova abordagem chamada de biópsia prostática por fusão de imagem inovou combinando a precisão da indicação de áreas com anomalia da RM com a orientação para coleta de amostras da ultrassonografia transretal (TRUS), aumentando a detecção de tumores de alto grau pela biópsia (AHDOOTA et al., 2020). Uma segunda abordagem é a busca pela integração de inteligência artificial com a RM, para auxílio na seleção das áreas de biópsia (NCI, 2024). Outra técnica que começa a ser utilizada para estadiamento durante o tratamento é a tomografia por emissão de pósitrons (PET) empregando marcadores moleculares como Fluciclovina F^{18} , Fluoreto de sódio F^{18} , colina C^{11} , antígenos da membrana específico da próstata (PSMA) como o ^{68}Ga -PSMA-11, ^{18}F -DCFPyl e o ^{18}F -rhPSMA-7.3. Além disso, o PSMA-PET também pode ser usado para detectar micro carcinoma e indicar se o tratamento com radiofármacos que possuem o PSMA como alvo são adequados (ACS, 2025).

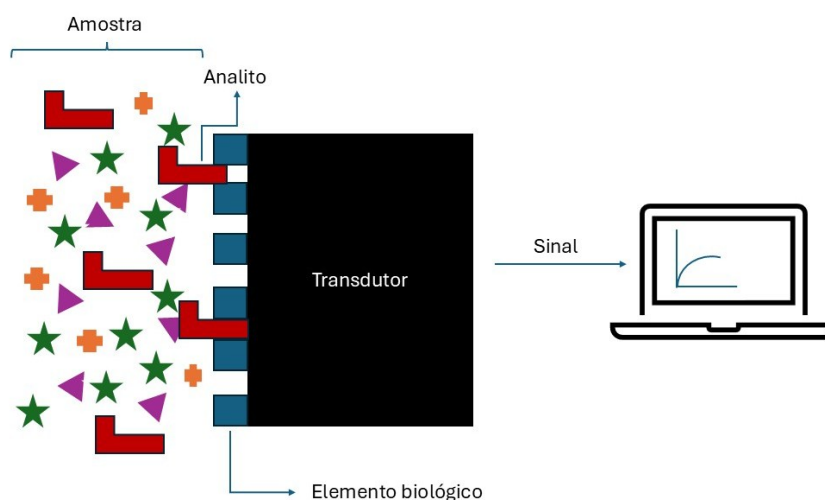
Paralelamente na área de ensaios, novos testes de medição de marcadores de calicreínas estão sendo desenvolvidos como o teste do índice de saúde da próstata (Phi) – que combina por uma fórmula os resultados do PSA total, PSA livre e [-2]proPSA – e o score 4k – que combina PSA total, PSA intacto, hK2, idade do paciente e os resultados do DRE – buscando reduzir procedimentos invasivos desnecessários. Outra frente de pesquisas é o desenvolvimento de exames de urina baseados na presença de biomarcadores como PCA3, TMPRSS2:ERG e o SelectMDX, para diagnóstico e a indicação da necessidade da biópsia (BOTT et al., 2021). Além disso, recentes avanços nas pesquisas de biossensores como plataforma para detecção de biomarcadores do CP apontam para um futuro promissor de diagnósticos precisos com melhor desempenho no monitoramento e minimamente invasivos (NAKHJAVANI et al., 2023).

2.2 Biossensor

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) biossensores são “dispositivos que utilizam reações bioquímica específicas, intermediadas por enzimas isoladas,

sistemas imunológicos, tecidos, organelas ou células para detectar compostos químicos, geralmente, por sinais elétricos, térmicos ou ópticos” (PAC, 1992, p.148). Sua arquitetura básica é composta de três partes principais: 1) elemento biológico, capaz de interagir com o analito de interesse; 2) o transdutor, que transforma a interação gerada em sinal elétrico; e 3) o sistema eletrônico, que processa e exibe a leitura desse sinal (**Figura 1**).

Figura 1- Desenho esquemático de um biossensor



Fonte: Autora, 2025

O desempenho desses dispositivos é avaliado por alguns parâmetros como estabilidade – consistência do sinal ao longo do tempo; sensibilidade analítica – o quanto uma pequena quantidade de amostra positiva altera o sinal mensurável; seletividade – razão entre a sensibilidade medida para o analito e a sensibilidade de uma substância interferente; confiabilidade – um sinal de resposta diretamente relacionado à concentração do analito; limite de detecção (LOD) – menor concentração mensurável de analito; reprodutibilidade - medida da dispersão de uma série de resultados; tempo de vida útil – tempo máximo de durabilidade operacional sem decaimento da resposta; tempo de resposta – tempo necessário para atingir 90% da resposta; e rendimento da amostra (THÉVENOT et al., 2001; PAN et al., 2017).

Esses parâmetros podem estar diretamente vinculados ao tipo de transdutor empregado no biossensor. Os transdutores, responsáveis pela conversão da reação ou interação a nível bioquímico em sinal mensurável, classificam-se em pelo menos quatro categorias principais (presentes na maioria dos estudos encontrados na literatura), conforme o princípio físico da detecção: Eletroquímicos, quando monitoram variações nas propriedades elétricas – corrente, potencial ou impedância – decorrentes de reações que produzem ou consomem elétrons ou íons;

Ópticos, quando a variação na luz (fótons) são os tipos sinal traduzido (MONOSÍK et al., 2012); Piezoelétricos quando detectam alterações em propriedades mecânicas como massa ou viscosidade por meio de cristais; Termométricos, devido ao fato de qualquer reação/interação ocorre de modo endotérmico ou exotérmico, resultando em variações de temperatura (TOTHILL, 2001).

Independentemente do princípio de transdução utilizado, para se ter um biossensor eficiente e estável o elemento biológico precisa ser imobilizado de forma adequada sobre a superfície do transdutor. Os métodos de imobilização utilizados podem ser divididos entre físicos e químicos. Os métodos físicos caracterizam-se pela formação de ligações fracas, como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio entre o elemento biológico e o transdutor. Por outro lado, os métodos químicos formam ligações fortes como ligações covalentes e iônicas entre o elemento biológico e o transdutor (PRABHAKAR et al., 2025).

Dentre os métodos físicos de imobilização, a adsorção é a técnica mais simples. Ela combina a formação de interações fracas com propriedades intrínsecas de adsorção do material do transdutor. Outro método físico é o encapsulamento, no qual uma membrana inerte aprisiona o elemento biológico no transdutor, podendo ser por meio da formação da matriz ao redor do elemento biológico ou aprisionamento dele na matriz porosa do material. Por fim, existe o aprisionamento, realizado por meio da deposição sobre o eletrodo de uma solução feita do material polimérico e do elemento biológico (MONOSIK et al., 2012).

Entre os métodos químicos, temos o *cross linking* onde um agente bifuncional forma ligações covalentes entre duas ou mais moléculas criando assim uma rede com os elementos biológicos. Outra técnica é a ligação covalente, na qual a superfície do eletrodo é alterada com grupos funcionais reativos passíveis de formarem ligações covalentes com grupamentos presentes no elemento biológico (KOYUN et al., 2012).

Após a escolha do método de imobilização mais adequado ao sistema em questão, se faz necessário a seleção do tipo de elemento biológico a ser empregado na arquitetura do biossensor, uma etapa determinante para o desempenho final do dispositivo, influenciando a especificidade e sensibilidade do biossensor (SANTORO, K.; RICCIARDI, C., 2015). Diferentes classes de moléculas podem ser utilizadas, como as enzimas, anticorpos, células, aptâmeros ou ácidos nucleicos. Esses elementos podem atuar por princípios catalíticos, ou seja, quando ocorre o biorreconhecimento, gera-se um novo produto por meio da reação bioquímica. Podem atuar por afinidade, quando a interação ocorre sem a produção de subprodutos, mas sim,

pelo estabelecimento de uma ligação irreversível entre o analito e o elemento biológico (NARESH; LEE, 2021).

Essa diversidade molecular, associada a princípios de reconhecimento, permite adaptar biossensores conforme a aplicação desejada. Na indústria de alimentos, esses dispositivos garantem controle de qualidade, monitoram patógenos e ajudam no processamento dos alimentos. Na área médica, destacam-se no diagnóstico de doenças, monitoramento de metabolitos importantes e detecção rápida de biomarcadores. Aplicações militares incluem a identificação de agentes de guerra biológica, enquanto no setor ambiental auxiliam na detecção de poluentes e monitoramento da qualidade do ar (AYDIN et al., 2019; MEHROTRA, 2016). Essa versatilidade torna os biossensores ferramentas indispensáveis em múltiplos setores estratégicos da sociedade.

A versatilidade de aplicações é resultado direto da diversidade de possibilidades de construção de um biossensor, desde sistemas genéricos até plataformas altamente especializadas. Neste contexto, os imunossensores surgem como uma classe de biossensores, caracterizados pelo uso de anticorpos ou antígenos como elementos biológicos de reconhecimento. Esses elementos possuem especificidades intrínsecas que podem ser combinadas com diferentes métodos de transdução para formar variados dispositivos seletivos, os tornando vantajosos para aplicações que demandam muita precisão analítica.

2.3 Imunossensor

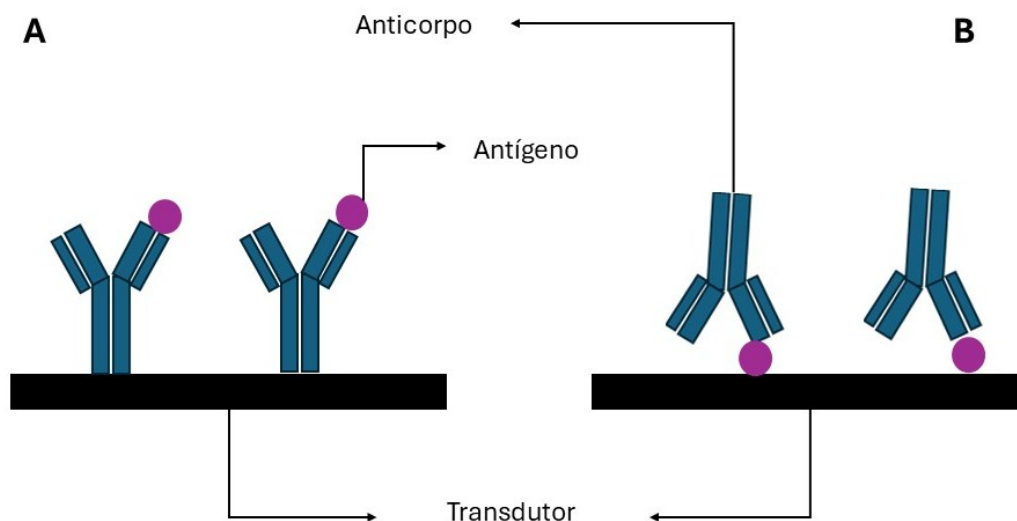
Os anticorpos (Abs; Ab), são moléculas proteicas produzidas pelo sistema imunológico de vertebrados por linfócitos B, quando exposto a organismos estranhos e toxinas. Essas proteínas apresentam estrutura em formato de “Y” com dois sítios de ligação idênticos (parátomos) que se ligam especificadamente a moléculas alvo, denominadas antígenos, e complementarmente a uma pequena porção da superfície antigênica, denominada epítopo (ALBERTS et al., 2017). Os antígenos são um grupo diversificado de moléculas, desde macromoléculas como proteínas, ácido nucleico, glicoproteínas, até substâncias com baixo peso molecular como aptenos. Independentemente do tipo, todas compartilham como característica estrutural a presença de no mínimo um epítopo, podendo ser lineares – formados por resíduos de aminoácidos adjacentes – ou conformacionais formados pelos dobramentos tridimensionais que faz a justaposição de resíduos de aminoácidos (ABBAS et al., 2019; FELDKAMP; CAREY, 1996; JU et al., 2017). Quando uma ou outra destas estruturas são acopladas a um transdutor forma-se um imunossensor, classificado segundo Gizeli e Lowe (1996, p.66), como

“um dispositivo analítico que detecta a ligação de um antígeno ao seu anticorpo específico, acoplando a reação imunoquímica à superfície de um dispositivo conhecido como transdutor”. Atualmente, esses dispositivos são amplamente utilizados para análises de proteínas em pesquisas biológicas e testes clínicos (ZHANG et al., 2019).

A ligação específica antígeno-anticorpo confere aos imunossensores duas características fundamentais: alta seletividade, decorrentes da elevada afinidade com a proteína alvo, e elevada sensibilidade, permitindo detectar moléculas alvo em faixas de concentração de picomolar e nanomolar (ROBINSON; JUSKA; O’RIORDAN, 2023). Os anticorpos fabricados que podem ser utilizados no desenvolvimento de um biossensor podem ser divididos em três tipos: i) os policlonais, produzidos em animais imunizados contra o antígeno de escolha, quando o soro é extraído e purificado. Esta forma de produção gera anticorpos por um variado grupo de células plasmáticas, que podem reconhecer compostos alvo de diferentes regiões moleculares por isso, são capazes de apresentar reatividade cruzada (SANTORO; RICCIARDI, 2015; SINGH et al., 2020); ii) monoclonais, formados por uma única célula clone resultante de um hibridoma de linfócitos B com células de mieloma. Destacam-se por sua especificidade absoluta para um único epítopo (SINGH et al., 2020) e; iii) anticorpos recombinantes, produzidos pela engenharia genética de genes dos anticorpos para produção de imunoglobulinas de alta afinidade e funcionalidade otimizada em sistemas celulares como bactérias e leveduras (SANTORO; RICCIARDI, 2015; ZENG; SHEN; MERNAUGH, 2012). Como observado por Zeng, Shen e Mernaugh (2012), esses anticorpos podem ser projetados para se auto-montarem na superfície do transdutor “em alta densidade e corretamente orientados para aumentar a atividade de ligação ao antígeno e a sensibilidade, especificidade e estabilidade do ensaio”.

A construção do imunossensor pode adotar duas configurações distintas. Na primeira abordagem, antígenos são imobilizados na superfície do transdutor para capturar anticorpos livres na amostra, ilustrado pela **Figura 2B**. Na segunda configuração, imobiliza-se os anticorpos para detectar antígenos na matriz amostral, representado pela **Figura 2A** (AIZAWA, 1994). Este princípio fundamenta o *ensaio Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) do tipo sanduíche. Assim, um Abs primário imobilizado na placa captura o antígeno, que é então reconhecido por um Ab secundário conjugado com marcador enzimático ou radiomarcador gerando sinal proporcional a concentração do analito (ABBAS et al., 2019).

Figura 2 - Representação das configurações possíveis de um imunossensor. (A) o anticorpo é imobilizado sobre o transdutor capturando o antígeno e em (B) o antígeno é imobilizado sobre o transdutor capturando o anticorpo



Fonte: Autora, 2025

Quanto aos princípios de detecção, os imunossensores podem ser subdivididos em ópticos, calorimétricos, de variação de massa ou eletroquímicos, como já mencionados. Os imunossensores eletroquímicos usufruem da corrente elétrica gerada pela ligação antígeno-anticorpo para detectar e quantificar o analito, podendo medir variações no potencial, corrente, concentração iônica, condutância, capacitância ou impedância (FELIX; ANGNES, 2018). Segundo Zhang et al (2021), a pesquisa nessa área concentra-se em duas frentes principais: o desenvolvimento de novas interfaces de imobilização de biocomponentes para melhorar a carga e a bioatividade do anticorpo na interface de detecção e a criação de técnicas inovadoras para amplificação do sinal imunorreativo, visando maior sensibilidade.

Os imunossensores eletroquímicos apresentam ampla aplicabilidade em diversos setores da sociedade. Na indústria alimentícia, são frequentemente empregados para detecção de patógenos como *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. No âmbito ambiental, destacam-se como ferramentas de monitoramento de contaminação por herbicidas como Picloram, Diuron, 2,4-D, Endosulfan (FELIZ; ANGNES, 2018). Contudo, nas últimas décadas, sua

principal aplicação tem sido no diagnóstico clínico, onde se consolidam como alternativa vantajosa perante os métodos clássicos, principalmente por permitirem análises em dispositivos *point of care* (HOLFORD et al., 2012). Eles oferecem como vantagens: o baixo custo de fabricação, portabilidade, alta sensibilidade, rapidez na resposta e precisão analítica. Em contraste, os imunoenaios clássicos demandam uma instrumentação cara, exigem protocolos complexos de pré-tratamento das amostras e necessitam de profissionais altamente especializados para realizá-los (JUSTINO et al., 2016).

Atualmente, o câncer destaca-se como uma das patologias mais investigadas na área do diagnóstico clínico. Nesse contexto, os imunossensores eletroquímicos tem sido amplamente empregados na detecção de biomarcadores tumorais (JUSTINO et al., 2016). Especificamente para o CP, é encontrado na literatura diversos dispositivos em estudo, em sua maioria com ênfase na identificação do PSA. Li et al (2011), por exemplo, criaram um imunossensor amperométrico para identificação do PSA, alterando a superfície do eletrodo de trabalho com grafeno-hexacianoferrato de cobalto, conseguindo um LOD de $0,01 \text{ ng.ml}^{-1}$. Porém, como já explanado em tópicos anteriores, os testes de PSA apresentam limitações devido a ocorrência de falsos positivos (SANDHU et al., 2021), o que tem direcionado as pesquisas recentes para a identificação de outros biomarcadores (SCHUMACHER et al., 2018). Diante deste cenário, torna-se necessário esforços no desenvolvimento de métodos de identificação desses novos biomarcadores para detecção rápida do CP. Os imunossensores eletroquímicos emergem como uma alternativa promissora.

2.4 Biomarcador

Os biomarcadores desempenham um papel crucial em procedimentos diagnósticos, estadiamento, avaliação da agressividade da doença e monitoramento terapêutico no CP (SEKHOACHA et al., 2022). Segundo Schumacher et. al (2018), são poucos os fatores de risco genético que estão estabelecidos para o CP, embora muitos estudos venham sendo conduzidos para elucidar as particularidades moleculares da doença. Apesar disso, diferentemente de outros carcinomas, o CP já utilizava biomarcadores desde a década de 1930, com a identificação da relação de alta concentração da fosfatase ácida prostática (PAP) e casos metastáticos. A partir da década de 1980, o PSA começa a substituí-lo e, progressivamente, novos biomarcadores foram identificados e usados como: o antígeno 3 do câncer de próstata (PCA3), a fusão gênica da protease transmembrana induzida por andrógeno, serina 2 (TMPRS2-ERG), a enzima alfa-

metilacil-CoA recemase (AMACR), depois os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e, por fim, as células tumorais circulantes (CTCs) vêm sendo investigadas e utilizadas como biomarcadores (PRENSNER et al., 2012).

Dentre os diversos biomarcadores estudados, podemos ressaltar a família de enzimas Glutathione S-transferase (GSTs) que atuam na desintoxicação de Fase II, catalisam a conjugação de glutathione (GSH) a diversos xenobióticos, incluindo carcinógenos produzidos pelas oxigenases de função mista do citocromo P450 (MCILWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006; PATSKOVSKY et al., 1999). Essa atividade garante às GSTs uma função protetora na célula contra o estresse ambiental e oxidativo, sendo que estudos demonstram a superexpressão das isoenzimas da família em células tumorais resistentes a quimioterápicos, o que acelera a desintoxicação dos substratos das drogas (MCILWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006).

Particularmente, a glutathione S-transferase mu-3 (GSTM3) está envolvida na progressão e desenvolvimento de muitos tipos de câncer. Ela possui um *locus* com dois alelos (A e B), sendo que o alelo GSTM3*B contém uma deleção de três pares de base no íntron 6, criando um sítio de reconhecimento para o fator de transcrição Yin Yang 1 (YY1) que se relaciona com o GSTM1. Esse fator de transcrição é um dedo de zinco, regulando a transcrição no metabolismo de carcinógenos (INSKIP et al., 1995; FLANAGAN, 1995). Outra característica importante da GSTM3 é que ela compartilha 70% da sua sequência de aminoácidos com outras isoformas da classe um, mas menos de 35% com as classes alfa, pi ou teta, sugerindo que exerce uma função na desintoxicação de compostos carcinogênicos (PATSKOVSKY et al., 1999).

A distribuição dos polimorfismos da GSTM3 varia entre grupos étnicos: populações caucasianas e asiáticas apresentam maior prevalência do genótipo selvagem homozigoto GSTM3*A, enquanto populações africanas observa-se com maior frequência o genótipo GSTM3*B (WANG et al., 2020).

Embora os estudos sobre o papel da GSTM3 no CP sejam menos numerosos que para outras GSTs, pesquisas revelam sua importância. Shiota et al. (2017) investigaram a influência do polimorfismo das enzimas antioxidantes na eficácia de terapias com privação de andrógenos (ADT) conseguindo caracterizar o polimorfismo genético em GSTM3 rs7483 como um biomarcador para eficácia da terapia de privação de androgênio, ou seja, este polimorfismo se relaciona com um risco de progressão em homens com CP tratados com ADT. Ma et al. (2019), pesquisaram a interação entre ácido ribonucleico (RNAs) mensageiros e microRNAs e vias de sinalização associada a metástase do CP, identificando oito pares de miRNA-mRNA e seis vias de sinalização oncológica. Dentre elas, foi identificado que a regulação negativa entre hsa-miR-92b-5p e GSTM3 não é observada em células de CP altamente invasivas com tratamento de

cisplatina, indicando que a superexpressão do GSTM3 está associada com a quimiorresistência a platina do CP em metástase. Além disso, Wang et al. (2020), fizeram uma revisão sobre a função e o polimorfismo do GSTM3 no câncer e congregaram informações sobre como a mutação do GSTM3 aumenta o risco de formação de CP, dentre as informações se destaca que os genótipos GSTM3*AB e GSTM3*BB participaram da evolução de CP na população indiana, o polimorfismo aumenta o risco para fumantes e consumidores de álcool, genótipo GSTM3*BB tem até cinco vezes mais chance de desenvolver o CP.

Diante destas evidências, a GSTM3 se caracteriza como relevante biomarcador para a medicina de precisão no CP, permitindo estadiamento com seleção de tratamentos mais adequados para cada perfil de paciente.

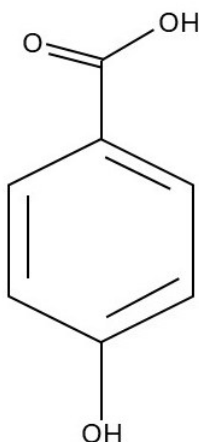
2.5 Polímeros condutores

Os polímeros condutores (PC) são compostos orgânicos capazes de transportar cargas elétricas devido à sobreposição de orbitais moleculares que são parcialmente preenchidos, o que permite a movimentação dos elétrons. Essa estrutura confere seus elétrons ligações tipo π , fornecendo propriedades como condutividade elétrica, transições ópticas de baixa energia, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica. Características que os tornaram atrativos para o desenvolvimento de biossensores com transdutores de sinal amplificado (GERARD et al., 2002).

Dentre os polímeros condutores existem os polímeros biodegradáveis, que são originados de recursos naturais. Eles podem ser sintetizados por quatro vias: extração direta de biomassa, produção por microrganismos, síntese química utilizando monômeros agrícolas ou a partir de monômeros obtidos de recursos fósseis. (DESHMUKH et al., 2017)

O ácido 4-hidroxibenzoico ou ácido para-hidroxibenzoico (4-HB; PHBA) representa um importante biopolímero produzido naturalmente por *Echerichia coli*. Quimicamente, trata-se de um derivado do ácido benzoico que possui uma substituição por hidroxila no carbono 4, como demonstrado na **Figura 3**. Além de suas aplicações tradicionais como aromatizante e conservante alimentar, o 4-HB tem se mostrado promissor para construção de biossensores devido a sua versatilidade química (NCBI, 2025).

Figura 3- Representação da estrutura química do ácido 4-hidroxibenzoico



Fonte: Autora, 2025

A polimerização eletroquímica do 4-HB oferece possibilidades para funcionalização de eletrodos, fornecendo aos dispositivos vantagens como aumento da área superficial, flexibilidade, sensibilidade e a possibilidade da formação de filmes estáveis e reprodutíveis. (FERREIRA et al., 2011).

Na seleção de matérias para eletrodos, o carbono se destaca por suas propriedades únicas, apresentando-se em três formas alotrópicas: grafite, diamante e carbono amorfo (ZHANG et al., 2021). O grafite, em particular, tem se mostrado atrativa para biossensores eletroquímicos devido à sua condutividade elétrica, dimensões minúsculas, baixo custo, baixa corrente de fundo, ubiquidade e elevada sensibilidade, além de possuir uma área de superfície eletroativa adaptável (TORRINHA et al., 2018; CHAUDHARY et al., 2023).

Um trabalho relevante na área foi desenvolvido por Silva et al (2020), que criaram um biossensor eletroquímico combinando as qualidades da polimerização com 4-HB com as propriedades do grafite. Os pesquisadores demonstraram a possibilidade do polímero de ser usado como substrato para imobilização de biomoléculas, utilizando o grupo carboxila livre do anel aromático para formar ligação covalente com grupos amino presentes na enzima fosfatase por meio de uma reação de acilação nucleofílica.

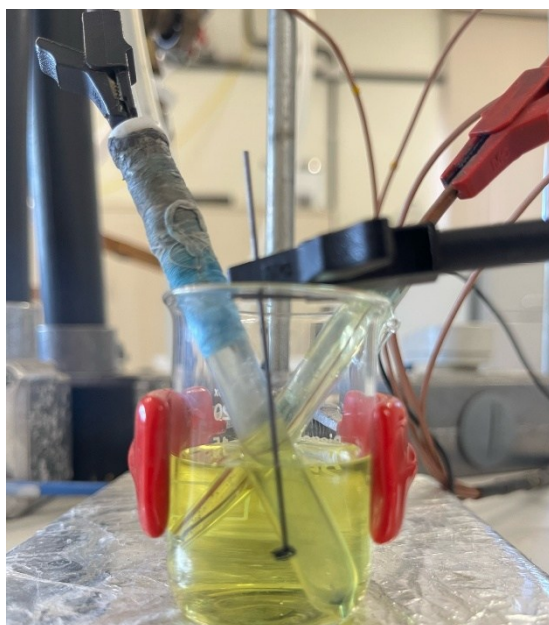
Com base nos fundamentos expostos, torna-se interessante a construção de um eletrodo de grafite alternativo, usando o mesmo princípio para imobilização do anti-GSTM3 para desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico como metodologia alternativa de detecção de biomarcador do CP. Uma abordagem que combina as vantagens dos materiais carbonáceos

com a versatilidade do 4-HB, oferecendo potencial de desenvolvimento de um dispositivo de detecção sensível e específico.

2.6 Construção e caracterização de um biossensor

Para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico é necessário entender os princípios que regem as células eletroquímicas e suas técnicas de caracterização. A célula eletroquímica padrão é composta por três eletrodos principais: 1) o eletrodo de trabalho – onde ocorrem as reações de interesse; 2) o eletrodo de referência – que mantém um potencial constante para calibração; 3) o contra eletrodo – que completa o circuito elétrico. Essa configuração de três eletrodos permite controlar com precisão o potencial aplicado e medir acuradamente as correntes geradas durante as reações eletroquímicas dentro da célula. (BARD; FAULKNER, 2001).

Figura 4- Fotografia da célula eletroquímica utilizada com seus respectivos eletrodos- referência com fita em azul, de trabalho ao centro e contra eletrodo ao fundo



Fonte: Autora, 2025

Entre as técnicas de caracterização aplicáveis à célula eletroquímica, destaca-se a voltametria cíclica (VC), que investiga processos redox em superfícies eletródicas. Esta técnica registra simultaneamente a corrente que circula pelo circuito e examina o potencial entre dois

valores de limites de potenciais, gerando assim, gráficos de corrente como função do potencial chamados de voltamogramas. Esses gráficos fornecem dados de alguns parâmetros como potencial, altura da corrente, largura e formato do pico dos processos redox das reações da célula eletroquímica (CLIMENT; FELIU, 2018). Esses voltamogramas permitem identificar potenciais de oxidação e redução, avaliar reversibilidade das reações e monitorar modificações na superfície do eletrodo de trabalho, sendo particularmente úteis para acompanhar processos como polimerização e imobilização de biomoléculas (FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2020).

Esses fenômenos são possíveis devido à existência de uma barreira para transferência de carga entre o eletrodo e a solução na célula eletroquímica. A transferência de carga apenas acontece quando alguma molécula da solução é reduzida ou oxidada, resultando sobre o eletrodo o desenvolvimento de uma carga de superfície. O valor da diferença de potencial gerado entre eletrodo e solução nesses sistemas é fornecido pela equação de Nernst (FRANKLIN et al., 2016):

$$E = E^{\circ} - \left(\frac{0,059}{n}\right) \log Q$$

Em que:

E = Potencial de uma célula

E°= Potencial padrão

n = Número de elétrons da reação

Q = Coeficiente de atividade das espécies envolvidas na reação

Complementarmente, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) oferece uma caracterização mais detalhada sobre a interface eletrodo/solução na célula eletroquímica. Nesta técnica aplica-se um sinal sinusoidal à célula eletroquímica em uma faixa de frequências. Paralelamente, se mede a corrente varrendo a faixa de frequência no sentido das maiores até as menores frequências, região onde acontece a impedância de Warburg (RIBEIRO, 2020). A interpretação da técnica é feita através do diagrama de Nyquist, um gráfico com um semicírculo na área de alta frequência e uma reta com inclinação aproximada de 45° na área de baixa frequência. A análise quantitativa desses dados é realizada através de modelagem por circuitos equivalentes, sendo o circuito de Randles o mais comum para estudos de descrição de sistemas com eletrodos sólidos em soluções aquosas. Este circuito fornece parâmetros importantes sobre o eletrodo de trabalho: componentes da resistência da solução (Rs); resistência à transferência

de carga (R_{ct}); capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) e resistência de Warburg (Z_w) (LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023).

No contexto do desenvolvimento de biossensores pertencentes a classe dos imunossensores essas técnicas eletroquímicas permitem otimizar os processos de fabricação do dispositivo e validar sua sensibilidade através da correlação entre sinais eletroquímicos e concentrações do biomarcador alvo, sendo fundamentais para garantir reprodutibilidade e eficácia diagnóstica (BARD; FAULKNER, 2001; FELIX; ANGNES, 2018; THÉVENOT et al., 2001). A integração desses fundamentos eletroquímicos com conhecimentos sobre biomarcadores e materiais condutores formam a base teórica para o desenvolvimento de um imunossensor inovador para detecção do GSTM3, um biomarcador promissor para o CP.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico utilizando eletrodo de carbono de grafite de lapiseira, modificado por polimerização do ácido 4-hidroxienzoico para imobilizar o anti-GSTM3.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a interação entre o eletrodo de grafite polimerizado com o ácido 4-hidroxienzoico e o anticorpo anti-GSTM3;
- Otimizar os parâmetros operacionais do biossensor;
- Avaliar a resposta do eletrodo em amostras clínicas de pacientes com câncer de próstata;
- Determinar o limite de detecção (LOD) do biossensor para o biomarcador GSTM3.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Eletroanalítica Aplicada à Biotecnologia e Engenharia de Alimentos (LEABE) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no campus Patos de Minas.

4.1 Soluções

As soluções utilizadas foram:

- Ácido perclórico HClO_4 0,5 M;
- Ácido 4-hidroxibenzóico (4-HB) 5,0 mM em HClO_4 0,5 M;
- Anticorpo monoclonal (Anti-GSTM3);
- Cloreto de potássio (KCl) 0,5 M;
- 1-etil-3-(3-dimetilamonipropil)carbodiimida EDC ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$) 0,05 M e sulfo- *N* -hidroxissuccinimida NHS ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$) 0,016 M em tampão MES 0,10 M;
- Ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 5,0 mM em KCl 0,5 M;
- Glicina ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) 50 mM em tampão fosfato-salino (PBS);
- Tampão ácido 2-etanossulfônico (MES) 0,10 M: MES ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$) 0,10 M em solução aquosa contendo hidróxido de sódio (NaOH) 0,02 M;
- Tampão PBS 1x.

4.2 Célula Eletroquímica

A célula eletroquímica utilizada foi composta por três eletrodos: um eletrodo referência constituído de Ag/AgCl/KCl 3,0 M, um contra eletrodo de Platina (Pt) e o eletrodo de carbono de grafite de lapiseira (ECGLs) de espessura 0,9 mm e dureza HB. Ela foi empregada em conjunto com um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT204 com o software NOVA 2.1.0.

Todos os experimentos com ECGLs na célula eletroquímica seguiram a padronização de imersão 1,00 cm dos eletrodos de grafite nos eletrólitos suportes, garantindo a exposição da mesma área para modificação e análise.

4.2 Preparo e modificação dos eletrodos de trabalho

Os ECGLs foram submetidos a um processo de limpeza mecânica, onde foram polidos com uma lixa d'água na granulometria 400 para remoção da sua cera superficial, uma substância que é adicionada ao final da fabricação para preenchimento de poros no material (TORRINHA et al., 2018). Em seguida, foram levados ao ultrassom para serem lavados com água deionizada por 10 minutos.

Posteriormente, os eletrodos foram pré-tratados para se ter ao longo do experimento uma garantia de qualidade com uma linha de base estável (NEZHADALI; MEHRI; SHADMEHRI, 2018). Assim, os ECGLs foram submetidos a três varreduras VC na solução de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) 5,0 mM em KCl 0,5 M, seguido por três varreduras na solução de ácido perclórico 0,1 M. Logo após, se sucedeu a polimerização com a solução de 4-HB 5 mM em $HClO_4$ 0,5 M aplicando VC por 30 ciclos para fazer alteração da superfície dos grafites. Depois foi aplicado novamente três ciclos de varredura na solução de $HClO_4$ para obtenção de padrões posteriores a polimerização.

Imediatamente após, os eletrodos foram lavados com água deionizada e submersões em solução de EDC/NHS em tampão MES 0,10 M por 30 min, retirados e lavados com água deionizada e inseridos por 3 horas em 15 μ l do anti-GSTM3 contidos em uma ponteira de micropipeta com a ponta oclusada por um pedaço de borracha branca. O EDC/NHS auxilia o grupo carboxílico do eletrodo modificado com 4-HB a ficar livre e se ligar por ligação covalente no grupo amina do anticorpo (KHASHAYAR et al., 2017). Para evitar ligações não específicas os ECGLs modificados foram submersos em solução de glicina 50 mM em PBS 1x por 5 min, hidrolisando o NHS não reagido.

Ao longo do desenvolvimento do biossensor, o eletrodo sem modificação, o eletrodo modificado com ácido 4-hidroxibenzóico e o eletrodo modificado com 4-HB/anti-GSTM3 passaram por medidas de EIE em solução de ($K_3Fe(CN)_6$) 5,0 mM em KCl 0,5 M para obtenção e monitoramento de modificações na superfície do eletrodo de trabalho gerando informações sobre as mudanças na impedância do circuito eletroquímico possibilitando a diferenciação entre eletrodos modificados e não modificados (DAVID; POPA; BULEANDRA, 2017). Além disso, os procedimentos descritos são referentes à metodologia final de construção do imunossensor, que foi otimizado quanto ao tempo de incubação com o anticorpo, tempo de exposição da glicina, tempo na resposta ao antígeno e melhor método para obstrução da ponta da ponteira.

4.3 Detecção do GSTM3 em amostras clínicas

Amostras sorológicas de indivíduos diagnosticados com câncer de próstata foram obtidas com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa como consta no parecer de número 4.100.044. Neste trabalho foram manuseadas amostras dos seguintes códigos: Cap 589265, Cap 165458 e Cap 139124.

Assim, depois do tempo de submersão na solução contendo glicina, os eletrodos modificados (biossensor), 4-HB/Anti-GSTM3, foram imersos em 15 μ l de antígeno por 3 horas. Subsequentemente, EIE foi aplicada em célula eletroquímica com solução de $(K_3Fe(CN)_6)$ 5,0 mM em KCl 0,5 M para detecção final.

4.4 Análise de dados

Analizou-se os dados gerados por voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica com o software Origin 2018. O Software NOVA foi a ferramenta escolhida para produzir o circuito de Randles para análise do diagrama de Nyquist.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

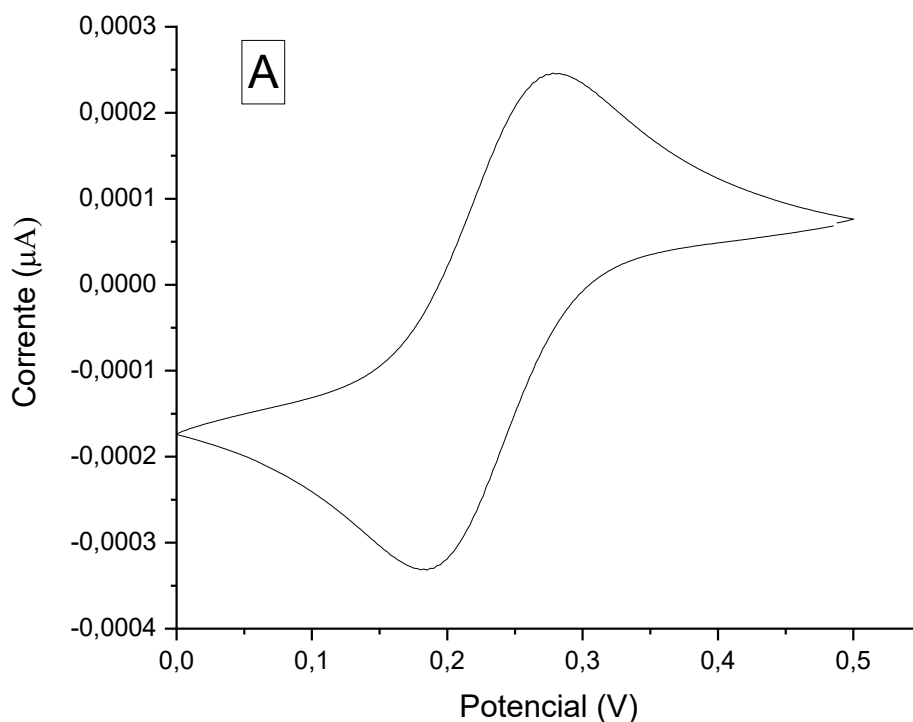
5.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de trabalho sem modificação

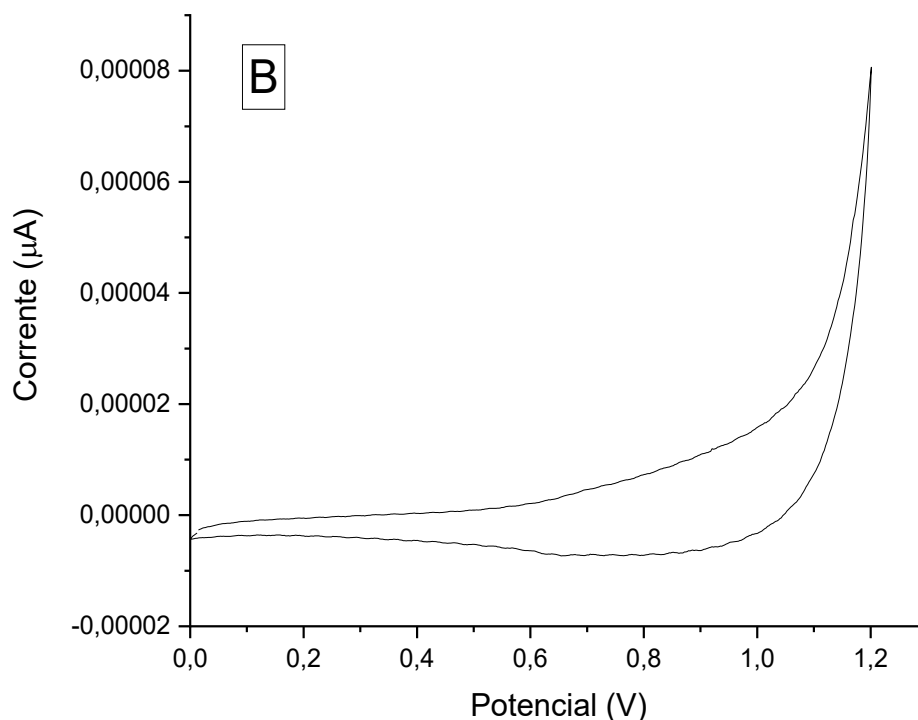
Todas as etapas de construção dos ECGLs foram monitoradas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, técnicas consolidadas para realização de caracterização de sistemas eletroquímicos.

No presente estudo foi usado como eletrólito suporte $K_3Fe(CN)_6$, ele atua na célula eletroquímica como uma sonda aniônica (pelos ânions cianeto) fornecendo ao sistema de pares redox Fe^{3+}/Fe^{2+} (BAJPAI; AKIEN; TOGHILL, 2024). Na **Figura 5A** pode-se observar o voltamograma do eletrodo de grafite de lapiseira sem modificação. Nota-se a formação de picos de oxidação e redução referentes às duas espécies mencionadas. O voltamograma possibilita a caracterização detalhada e quantitativa da reação, as varreduras no sentido positivo e negativo informam sobre a reversibilidade do processo e os potenciais de oxidação e redução das espécies analisadas (BATISTA et al., 2020). Desta forma, com a **Figura 5A** podemos atestar que a reversibilidade esperada do sistema para o eletrólito suporte ocorreu. Os picos estreito de

oxidação a +0,28V e de redução -0,195V ($\Delta E = 85$ mV) estão dentro do desejado ($\Delta E < 100$ mV) para um sistema reversível, sem apresentar nenhuma interferência de outras espécies redox contaminantes na solução, nos eletrodos ou na célula eletroquímica. Na **Figura 5B** o voltamograma da solução de HClO_4 não forma picos de oxidação e redução na região de polimerização confirmando que o ECGL, o ácido perclórico, a água deionizada e a célula estão livres de qualquer contaminante.

Figura 5- A) Voltamograma padrão em ECGL sem modificação em solução ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) em KCl 5,0 mM (B) VC em solução HClO_4 0,5M



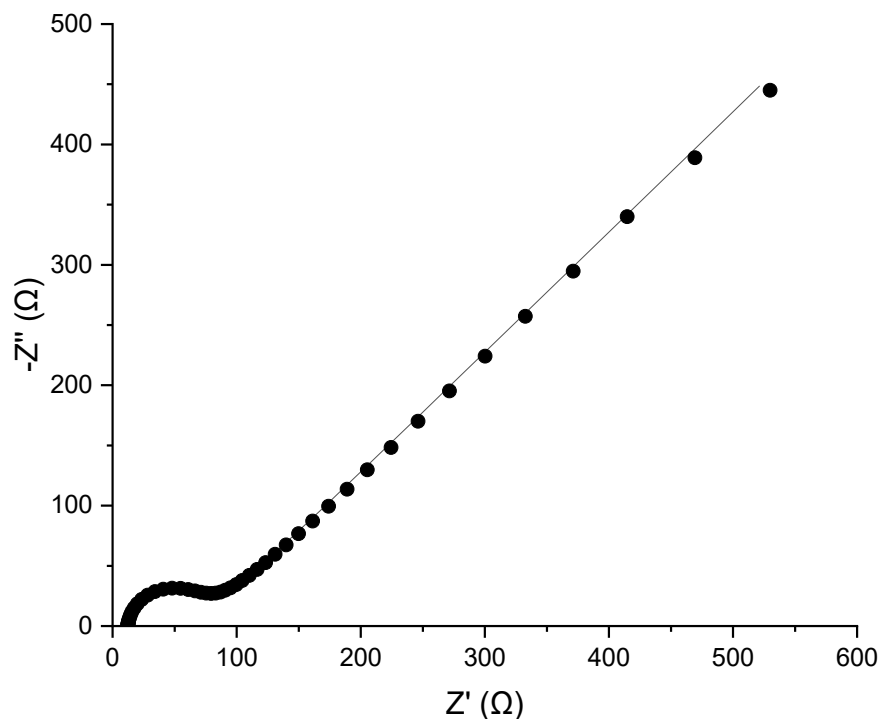


Fonte: Autora, 2025

A fim de se ter uma avaliação robusta sobre o eletrodo de trabalho foi utilizado a espectroscopia de impedância eletroquímica. Esta técnica torna possível a demonstração da mudança na resistência de transferência de carga que ocorre na superfície do eletrodo de grafite (RIBEIRO; SOUZA; ABRANTES, 2015) fornecendo desta forma informações mais detalhadas sobre a interface eletrodo/solução. A interpretação da técnica se dá pelo diagrama de Nyquist, observado no **Figura 6**. Esse resultado pode ser interpretado através do circuito de Randles, representado pela **Figura 7**. Nela identifica-se parâmetros do eletrodo de trabalho sem modificação (LAZANAS; PRODROMIDIS, 2023).

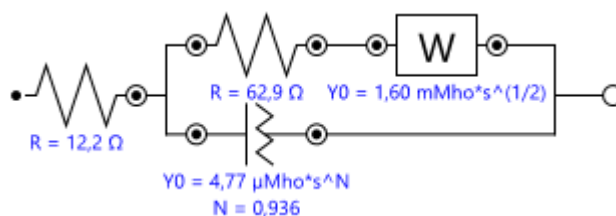
O semicírculo do ECGL sem modificação representado na **Figura 6** apresenta um Rct de 62,8 Ω com confiabilidade no dado de $X^2 = 0,0029631$. Silva et al. (2020) encontrou um valor diferente para o Rct de um ECGL. Comparando os valores, constata-se um aumento na resistência de 14,2 Ω . Mesmo assim, o Rct baixo ainda é um valor aceitável indicando uma superfície limpa e eletroquimicamente ativa (FISCHER et al., 2009; SILVA et al., 2020) e as diferenças podem ter sido devido a operadores diferentes e lotes diferentes do grafite de lapiseira. Um dos pontos mais importantes nesse caso é a baixa resistência da solução, que esteve em 12,24 Ω , excelente para um eletrodo não metálico feito de carbono grafite.

Figura 6- Diagrama de Nyquist para eletrodo ECGL sem modificação em $(K_3Fe(CN)_6)$ 5,0 mM em KCl 0,5 M



Fonte: Autora, 2025

Figura 7 - Circuito de Randles para ECGL sem modificação em $K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mM em KCl 0,5 M



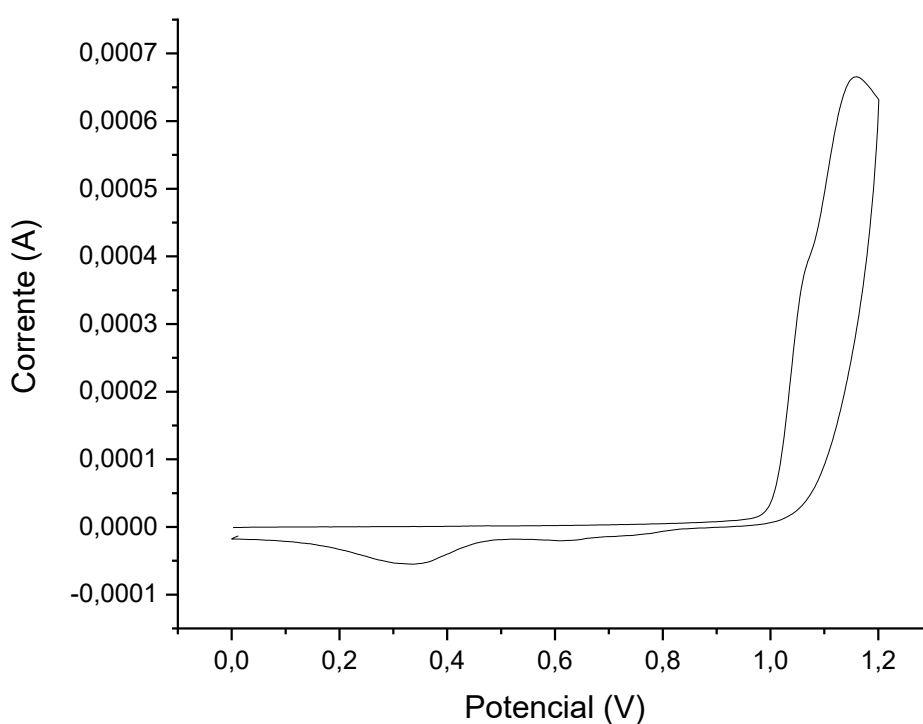
Fonte: Autora, 2025

5.2 Polimerização do ácido 4-hidroxibenzoico

A formação do filme polimérico foi monitorada por voltametria cíclica. Na representação da primeira varredura demonstrada na **Figura 8**, observa-se em +1,2 V a formação de um pico anódico, associado à oxidação do ácido 4-hidroxibenzoico, sem a presença de um pico catódico correspondente. Esse comportamento é característico de processos eletroquímicos irreversíveis (IMRAN; MANIKANDAN; DHARUMAN, 2015). Em potenciais de -0,35 V e -0,6 V foram registrados picos catódicos. Após três ciclos, notou-se a

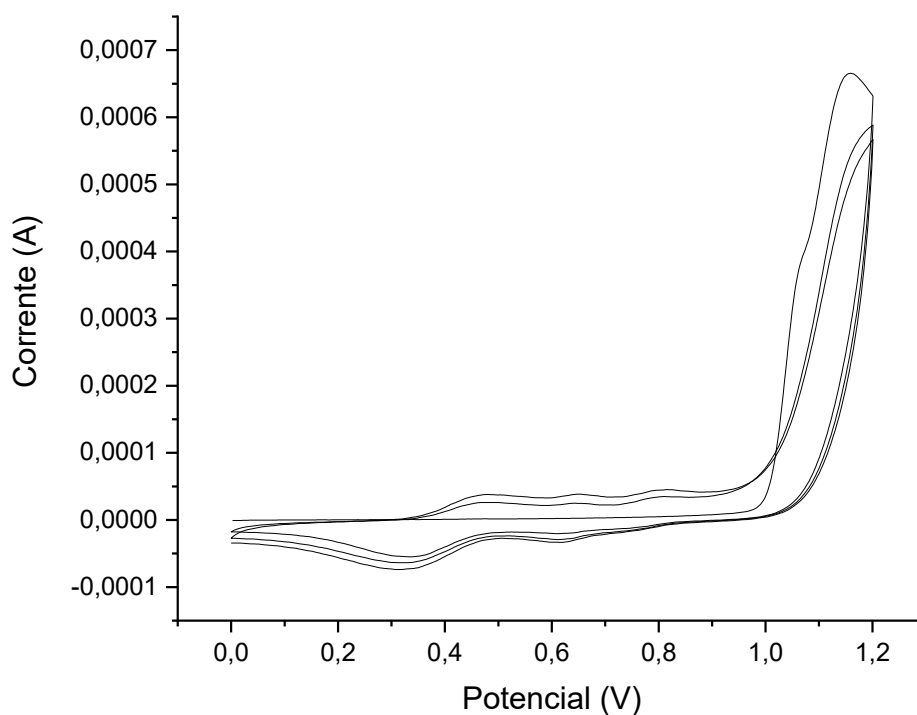
formação de dois picos anódicos em +0,5V e +0,8V, indicando a estabilização do filme polimérico como demonstrado pela **Figura 9**. Todos os valores obtidos para redução e oxidação estão em consonância com resultados de outras pesquisas, sendo possível correlacioná-los com o mecanismo de polimerização ECE em que o monômero sofre oxidação no anodo, produzindo cátions radicais instáveis que reagem com outra molécula formando um dímero mais estável sofrendo oxidação em um potencial menor (SILVA et al., 2020).

Figura 8- 1ª varredura da VC em solução de 4-HB 5,0 mM em HClO₄ 0,5 M



Fonte: Autora, 2025

Figura 9- Três varreduras da VC em solução de 4-HB 5 mM em HClO₄ 0,5 M

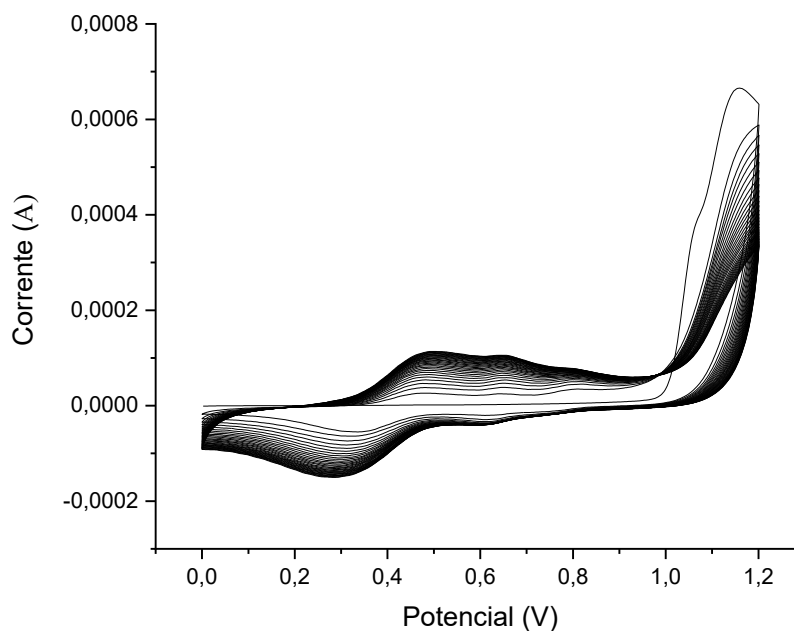


Fonte: Autora, 2025

Verifica-se pela **Figura 10** a estabilidade do filme após múltiplas varreduras com a presença dos picos +0,5V e +0,8V, após 30 varreduras. Também foi notória a redução do pico anódico +1,2V conforme o número de varreduras aumentava indicando diminuição da área eletroquimicamente ativa pela formação do polímero sobre o ECGL (SPOSITO et al., 2022).

Gráfico 1 - 30 varreduras da VC na solução de 4-HB 5,0 mM em HClO₄ 0,5 M

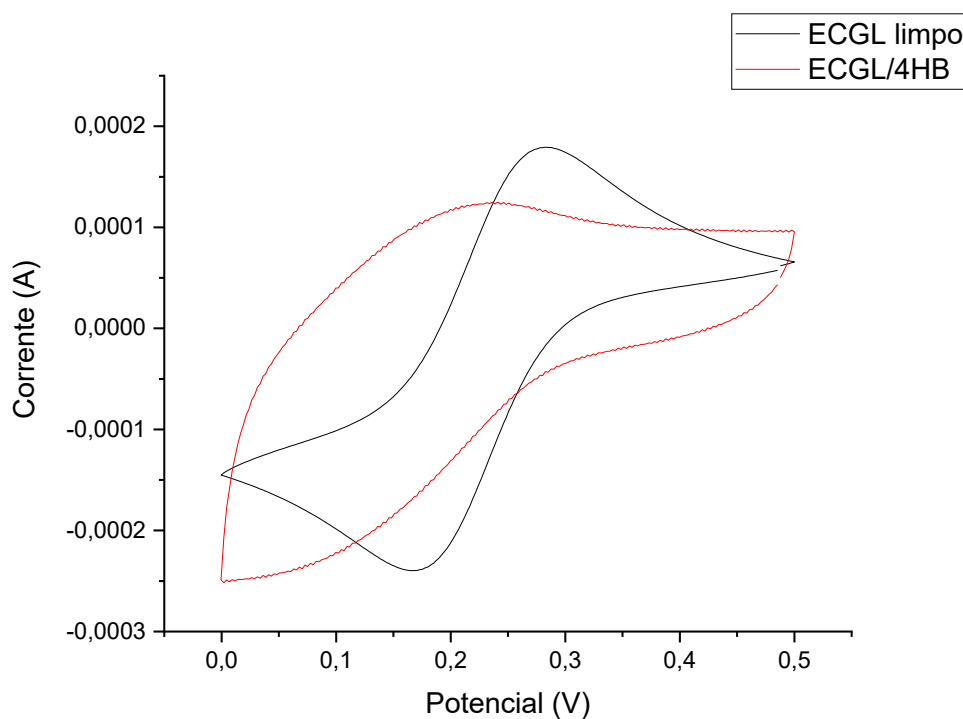
Figura 10- 30 varreduras da VC na solução de 4-HB 5,0 mM em HClO₄ 0,5 M



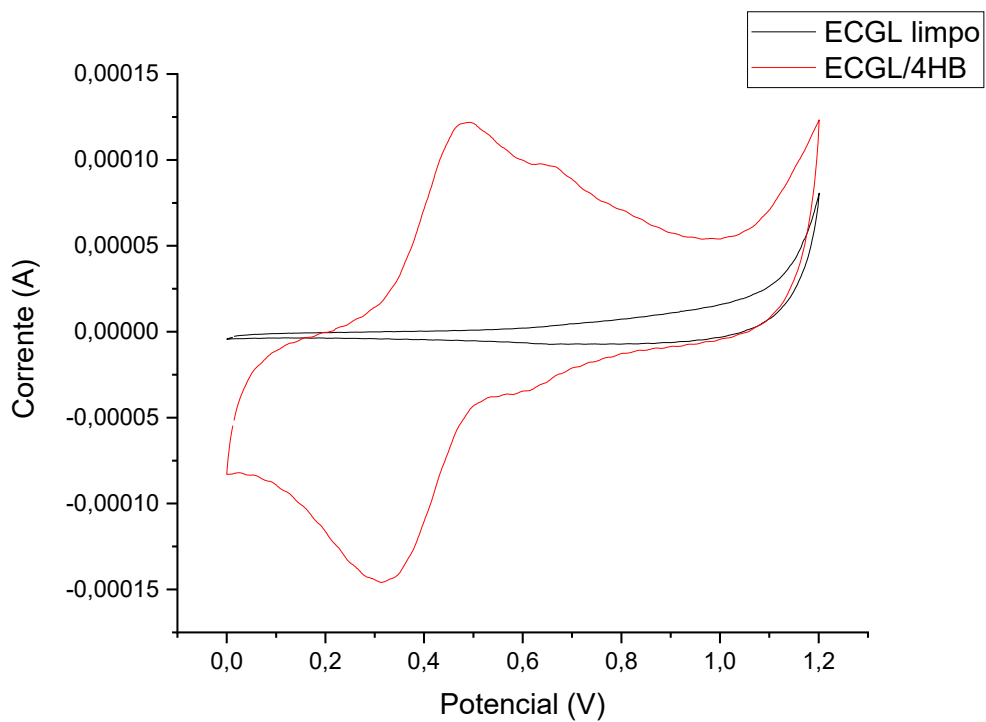
Fonte: Autora, 2025

5.3 Caracterização do eletrodo de trabalho

Durante todo o processo de manufatura do ECGL foi necessário garantir uma padronização. A **Figura 11** e a **Figura 12** apresentam a comparação entre os perfis posteriores à eletropolimerização e os perfis de referência dos eletrodos sem modificação. Na **Figura 11** a comparação usando a solução de ferricianeto de potássio é perceptível a diferença dos voltamogramas, observa-se uma deformação na curva com diminuição da corrente e o deslocamento do pico de oxidação para valores mais catódicos após a polimerização. Na **Figura 12** é possível observar que não existe mais o pico de oxidação do monômero apresentando apenas a presença dos pares redox indicando que o ECGL foi modificado por um filme polimérico.

Figura 11- VC na solução de $(K_3Fe(CN)_6)$ 5,0 mM em KCl 0,5 M

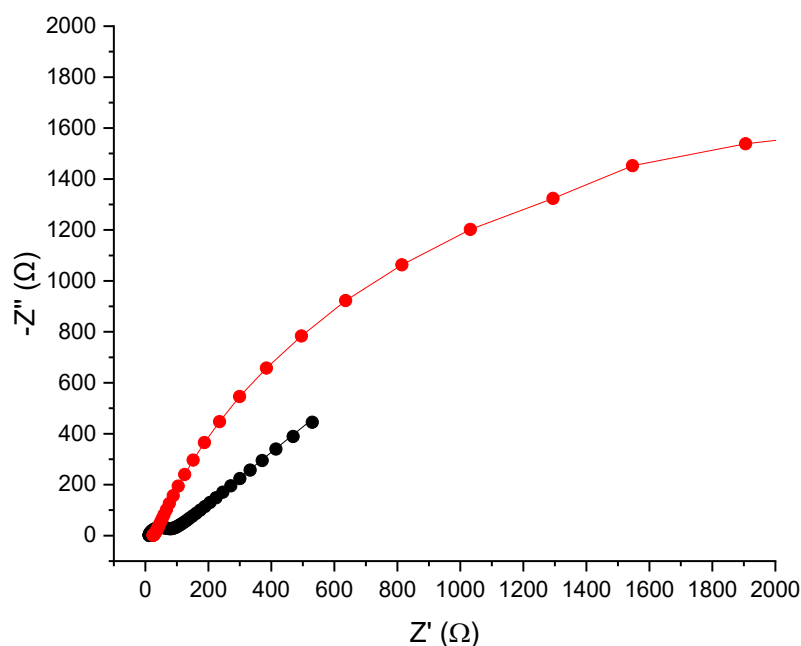
Fonte: Autora, 2025

Figura 12- VC na solução de $HClO_4$ 0,5 M

Fonte: Autora, 2025

As respostas obtidas e apresentadas pelo diagrama de Nyquist na faixa de frequência 1E05 Hz - 0,1Hz, demonstram de forma sistemática as modificações na interfase do eletrodo em cada etapa da sua funcionalização, como representado na **Figura 13**. Para o ECGL sem modificação, observa-se um semicírculo de pequeno diâmetro, característico de uma superfície altamente condutora como discutido anteriormente. Após a polimerização com o ácido 4-hidroxibenzoico, nota-se um aumento significativo na área do semicírculo, resultando em um R_{ct} de 4797,5 Ω . Este aumento indica a formação eficiente do filme polimérico, que representa sobre a superfície do eletrodo de trabalho um componente a mais, formando uma barreira para a interação dos elétrons na superfície do eletrodo com a sonda aniônica (CHAUDHARY et al., 2023).

Figura 13- Diagrama de Nyquist para eletrodo ECGL sem modificação em (K₃Fe(CN)₆) 5,0 mM em KCl 0,5 M. Curvas em preto do eletrodo sem modificação e curvas em vermelho do eletrodo modificado com o polímero



Fonte: Autora, 2025

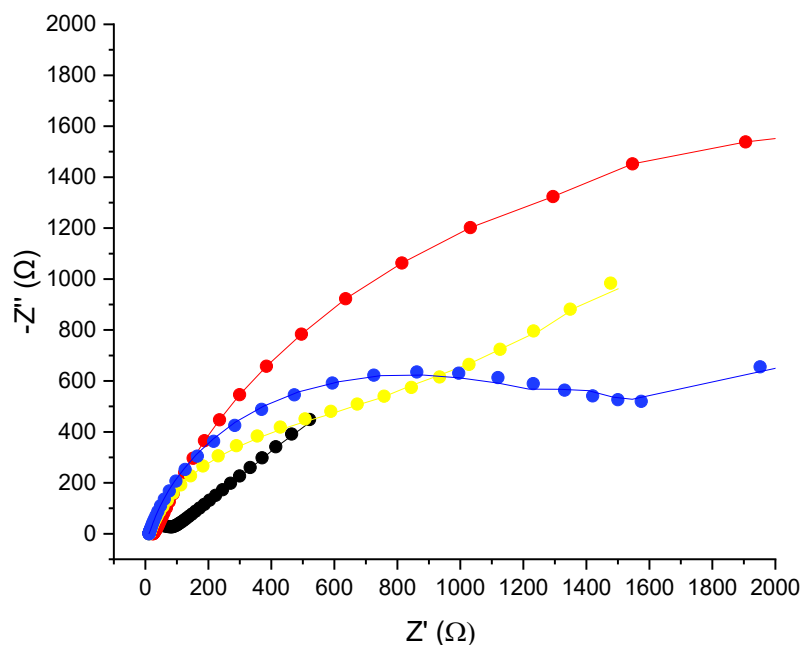
5.3 Avaliação do biossensor

Após o estudo polimérico, os eletrodos modificados foram então ativados com as soluções de EDC/NHS para posterior imobilização do anticorpo. Este sistema se configura como biossensor construído e as análises via EIE foram realizadas neste sistema. A mesma metodologia no sistema foi avaliada na presença de glicina e de amostras de soro contendo o

antígeno via EIE. Todas as informações da construção desses sistemas estão presentes na seção experimental.

Uma análise comparativa incluindo os diagramas do ECGL/4HB/Anti-GSTM3 e ECGL/4HB/Anti-GSTM3/GSTM3 torna evidente que ocorreu uma diminuição da resistência entre o eletrodo polimerizado, representado pela curva em vermelho no **Figura 14**, e o eletrodo com imobilização do Anti-GSTM3, representado pela curva em amarelo. Isto ocorreu devido ao fato do eletrodo modificado somente com o polímero possuir excesso de cargas negativas devido aos grupos ácidos carboxílicos na forma de ânions carboxilatos nas soluções tampão acima de pH 7. Desta forma, na presença de uma sonda aniônica, há uma repulsão eletrostática, que afeta ainda mais a distância do ferricianeto à superfície do eletrodo, aumentando a resistência à transferência de carga. Na presença do anticorpo a resistência diminui, porque os grupos carboxilatos agora estão modificados através de ligação covalente com o anticorpo, removendo o excesso de cargas negativas na superfície, o que, por fim, tende a atrair mais moléculas de ferricianeto à superfície do eletrodo. A presença do antígeno promove novamente um aumento nos valores de resistência (curva amarela para a curva azul) devido ao fato de uma maior quantidade de macromoléculas estarem presentes na superfície do biossensor, novamente dificultando a transferência de cargas. É observável um aumento do R_{ct} para 1495,9 Ω , resultado consistente com uma reação de bloqueio sítios condutores diminuindo a cinética de transferências eletrônica pela formação do complexo imunológico anticorpo-antígeno que apresenta propriedades isolantes (SALIMI et al, 2013).

Figura 14- Diagrama de Nyquist em (K₃Fe(CN)₆) 5,0 mM em KCl 0,5 M. ECGL (preto), ECGL/4HB (vermelho), ECGL/4HB/Anti-GSTM3 (amarelo) e ECGL/4HB/Anti-GSTM3/GSTM3 (azul).



Fonte: Autora, 2025

Contrapondo com outros imunossensores eletroquímicos para biomarcadores do câncer de próstata reportados na literatura, os valores de resistência a transferência de carga (R_{ct}) obtidos neste trabalho mostram-se menores. Salimi et al (2013) observaram valores de R_{ct} de 5000 Ω após imobilização do anti-PSA e 7000 Ω na detecção do antígeno, utilizando uma plataforma baseada em nanopartículas de ouro. Kavosi et al (2015) reportaram R_{ct} de 1100 Ω para imobilização do anti-PSA e 2200 Ω após a captura do antígeno, empregando nanocompósitos de grafeno. Os valores mais baixos encontrados no presente estudo 849 Ω após a imobilização do anti-GSTM3 e 1495,9 Ω na detecção do GSTM3 apontam que a configuração criada com ácido 4-hidroxibenzoico proporciona uma interface promissora e mais eficiente para transferência de elétrons.

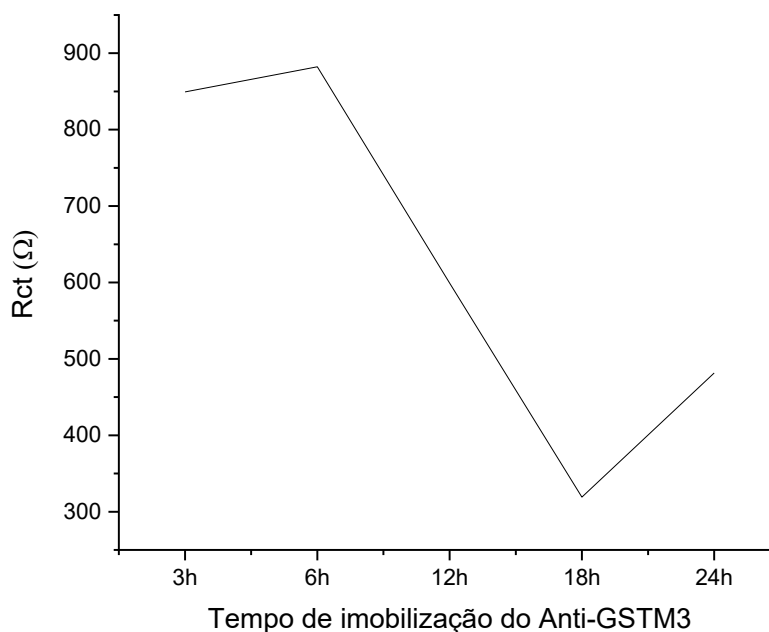
5.4 Otimizações do imunossensor

Com os experimentos da configuração basal do eletrodo realizados e com resultados condizentes com o ideal funcionamento do sistema, experimentos visando a otimização dos resultados foram feitos. Porém, vale ressaltar que não foram realizados em triplicata pela

limitação da disponibilidade de anticorpo para completar todos os experimentos que faltavam e pela quantidade limitada de amostras de soro. Desta forma, apresentamos os dados obtidos de experimentos unitários, mesmo cientes que a triplicata traz mais confiabilidade nos resultados obtidos. Muitos dos experimentos tiveram que ser repetidos para se chegar às conclusões apresentadas e os materiais não foram suficientes para um estudo completo. Porém, a importância do trabalho é válida, pois mostraremos a seguir que o sistema possui todas as condições necessárias para ser utilizado para detecção deste antígeno em amostras clínicas de soro e que os dados apresentados, mesmo não em triplicata são condizentes com o esperado.

O primeiro parâmetro avaliado foi a tentativa de aprimoramento do tempo de imobilização do anticorpo com testes de detecção em diferentes intervalos de tempo: 24 h, 18 h, 12 h, 6 h e 3 h (dados expressos na **Figura 15**). Foi constatado uma relação inversa entre o tempo de imobilização e os valores de R_{cts} gerados. Os menores tempos de 3 h e 6 h apresentaram os maiores valores de resistência 882,16 Ω e 849,33 Ω , respectivamente. Este comportamento pode ser explicado pela dinâmica de ativação dos grupos carboxilas do ácido 4-hidroxibenzoico pelo EDC/NHS, que é mais eficiente em tempos mais curtos e por consequência imobilizando uma densidade maior de anticorpos (HERMANSON, 2013a, 2013b). Isso associado com o notório fato de que a estrutura dos anticorpos é facilmente desnaturada se não respeitadas condições adequadas de armazenamento como temperatura (4°C, -20°C e -80°C) e pH. Assim, em exposições prolongadas às condições de reação pode-se ter desnaturação parcial reduzindo a capacidade de ligação com o antígeno, sendo indicado uma imobilização rápida para preservação melhor das estruturas terciárias dos anticorpos (HERMANSON, 2013b; MA; FÁGÁIN; KENNEDY, 2020). O tempo de 3 h foi escolhido como ótimo por apresentar um valor aproximado do de 6 h e representar um menor tempo para fabricação do biossensor.

Figura 15- Dados de R_{ct} vs. Tempo de imobilização obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em $(K_3Fe(CN)_6)$ 5,0 mM em KCl para vários tempos de imobilização do anti-GSTM3 no sistema ECGL/4HB/Anti-GSTM3.



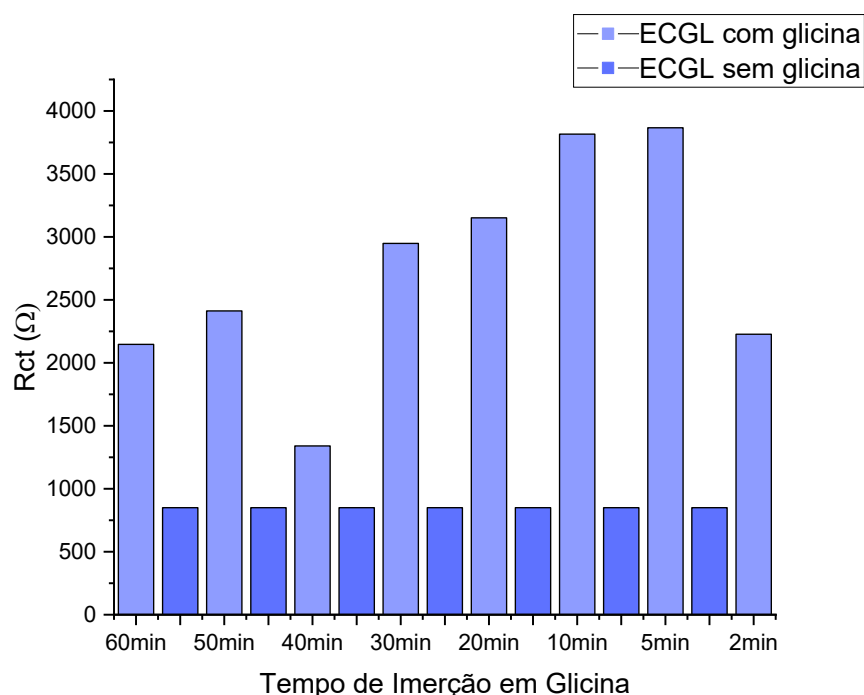
Fonte: Autora, 2025

O segundo parâmetro otimizado foi a especificidade da interação entre ECGL/Anti-GSTM3 e o antígeno GSTM3 em que o antígeno não pudesse ser adsorvido ou interagido com regiões diferentes das que continham o biomaterial. Desta forma, o sistema foi bloqueado com glicina. Para garantir a seletividade do sistema introduziu-se o eletrodo por vários tempos em glicina na concentração de 50 mM em PBS como etapa de bloqueio, visando saturar grupos reativos remanescentes de carboxila do 4HB que não foram conjugados com o Ab. Este procedimento foi importante para minimizar ligações inespecíficas de proteínas presentes na matriz sorológica da amostra. Na **Figura 16** foram realizados testes para reduzir o tempo de 50 min de imersão no bloqueador. Testou-se intervalos decrescentes de tempo: 1h, 50 min, 40 min, 30 min, 20 min, 10 min, 5min e 2 min. Os resultados revelaram que o tempo de 5 min como melhor apresentando um R_{ct} de 3866,8 Ω , desta forma, tivemos uma redução no tempo total do protocolo conseguindo manter a eficiência do bloqueio.

Estes resultados corroboram estudos como o de Silva et al (2024), que observaram tempos curtos de imobilização com bloqueio por glicina em biossensores e o de Williams et al (2006) em estudo para diminuir a ligação inespecífica da insulina IAA em diabetes tipo 1

conseguiram empregando a glicina como pré-tratamento encontrando uma redução de 84% de ligações não específicas.

Figura 16- Dados de R_{ct} vs. Tempo de imobilização obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em $(K_3Fe(CN)_6)$ 5,0 mM em KCl para vários tempos de imobilização da glicina. Os dados foram obtidos no sistema ECGL/4HB/Anti-GSTM3. A barra em azul escuro representa a mesma resposta padrão obtida anteriormente sem a glicina a título de comparação

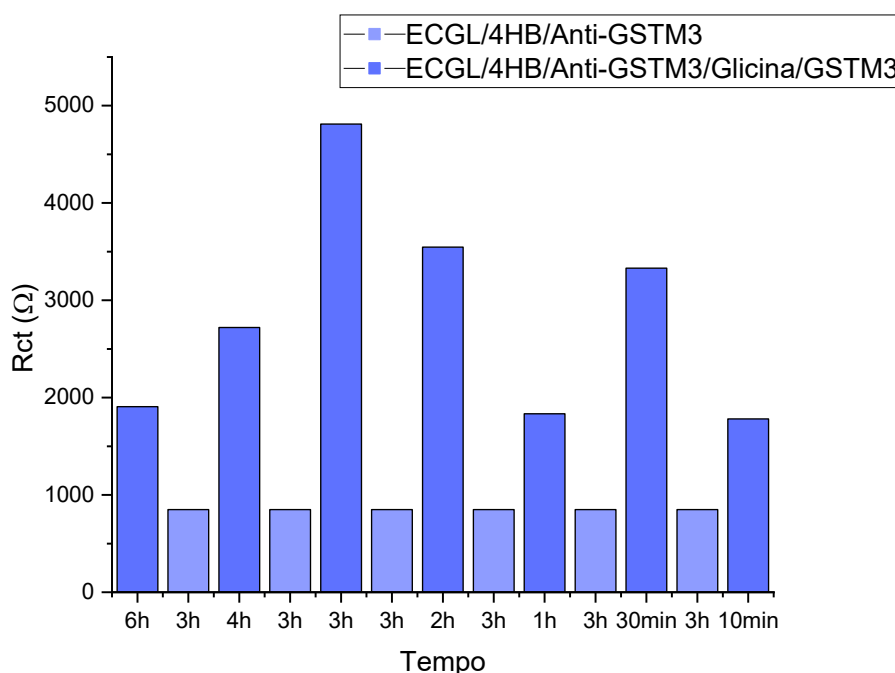


Fonte: Autora, 2025

Por último, buscou-se aprimorar o tempo da imunorreação tentando os intervalos de 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 30 min e 10 min, representados pela **Figura 17**. Embora um dos objetivos fosse o desenvolvimento de um sistema rápido os resultados encontrados demonstram que o tempo de 3 h apresentou a melhor resposta imunológica com R_{ct} de 4811,5 Ω , enquanto tempos menores e maiores mostram eficiências decrescentes. Silva et al (2024) em sistema similar, também encontrou respostas decrescendo ao invés de estabilizadas após o menor tempo com resposta máxima, sugerindo que esta característica possa ser intrínseca a sistemas empregado sendo necessário a realização de novas pesquisas sobre a real explicação. Porém, este decréscimo não é peculiar visto que já foi observado em outro sistema similar. Especula-se que este comportamento possa estar relacionado à necessidade de um tempo mínimo para captura eficiente do antígeno e formação estável do complexo imunológico no ECGL/4HB/Anti-GSTM3. Apesar disso, o tempo de análise de 3 h representa vantagem quando comparado com

o tempo de ensaios clássicos de diagnóstico do câncer de próstata que estão na faixa de 24 h-72 h. Quando comparado com sensores eletroquímicos de *point of care* para PSA demonstra-se inferior no tempo de detecção sendo encontrados na literatura faixa de detecção de 2 h -10 min (GARG et al., 2023) Porém, os resultados são úteis para empregar na triagem de pacientes para poder realizar tratamento com privação de andrógenos e, com um dispositivo portátil e de fácil utilização, de respostas obtidas sem a necessidade de deslocamento a clínicas e hospitais.

Figura 17- Dados de Rct vs. Tempo de imobilização obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em (K₃Fe(CN)₆) 5,0 mM em KCl para vários tempos de imobilização do GSTM3.



Fonte: Autora, 2025

5.5 Limite de diluição

O desempenho do imunossensor foi avaliado em condições ótimas, seguindo em grande parte a metodologia proposta. Uma adaptação foi realizada na etapa de detecção do soro, onde foi empregada uma diluição seriada (1/20 até 1/1280). Como evidenciado na **Figura 18**, observou-se uma redução progressiva dos valores do Rct em função do aumento da diluição do soro contendo o antígeno, demonstrando uma correlação inversa entre eles.

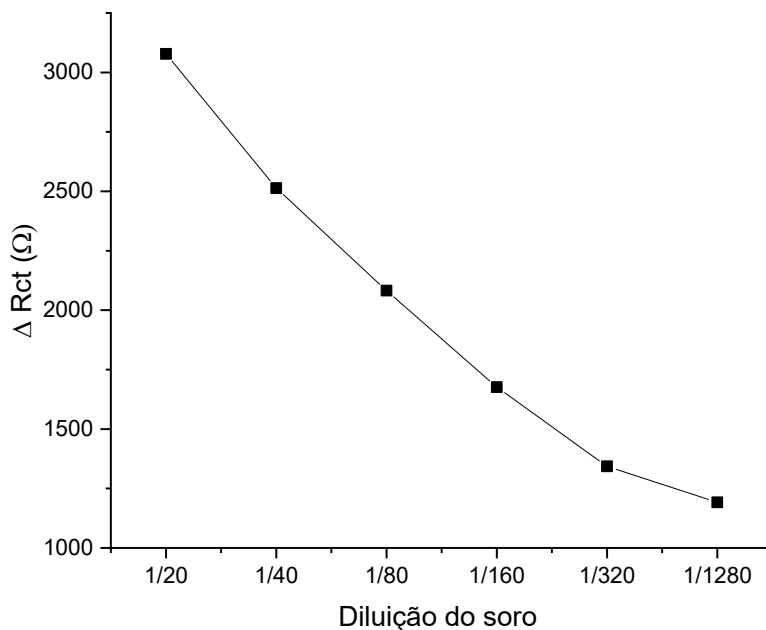
A análise da regressão linear ($\Omega = -381,43 \times \text{diluição} + 3315,9$) gerou um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9716$, uma boa performance analítica do sistema, confirmando que a

variação dos valores é decorrente da variação da concentração do analito, e com boa sensibilidade (-381,43), ou seja, uma queda significativa de resposta analítica frente ao aumento na diluição. O limite de diluição observado para a detecção de GSTM3 pelo ECGL/4HB/Anti-GSTM3 foi até 1:1280, uma excelente resposta, embora a concentração usual de detecção em M ou ng.µL não pudesse ser realizada devido ao desconhecimento da quantificação das amostras clínicas.

Embora a comparação direta com outros sistemas seja limitada devido à ausência de plataformas idênticas na literatura, é possível estabelecer uma confrontação com resultados de imunossensores para outros biomarcadores de CP. Para nanoimunossensores de PSA foi relatado faixas de detecção de 0,1pg/ml até 100ng/ml; para métodos eletroquímicos de EN2 (CV e EIE) foi encontrado dois dispositivos um com LOD 5,62 fM e outro com 38,5 nM; com sistemas multiplex para PSMA/IL6 por CV foi encontrado um dispositivo com LOD de 0,1 ng/ml; em detecções de Glicano PSA por EIE foi encontrado um dispositivo com LOD de 0,64 ng/ml (NASIMI et al., 2023).

Desta forma, mesmo sem a possibilidade de comparação com dados da literatura, o resultado encontrado nesta pesquisa foi particularmente relevante por representar o primeiro biossensor desenvolvido para o GSTM3 em amostras clínicas de soro extremamente diluídas. Porém, para este resultado ficar mais robusto é necessário a realização da triplicata das otimizações. Também, seria possível fazer melhorias como tentar validar o sistema em amostras de soro contendo GSTM3 em todos os estágios do carcinoma, com concentrações conhecidas e fazer a comparação deste resultado empregando teste clássico como PCR quantitativo. Seria interessante aprimorar ainda mais a estrutura do biossensor utilizando outros nanomateriais para tentar chegar a um sistema mais sensível para rastreamento de um tumor pequeno ou nos estágios iniciais de formação (RONKAINEN; OKON, 2014) .

Figura 18- Dados de R_{ct} vs. Diluição do soro obtidos dos diagramas de Nyquist de experimentos realizados em $(K_3Fe(CN)_6)$ 5,0 mM em KCl para várias diluições das amostras de soro contendo o biomarcador GSTM3.



Fonte: Autora, 2025

6. CONCLUSÃO

Por meio desta pesquisa foi possível desenvolver um imunossensor eletroquímico com modificação do ECGL pelo ácido 4-hidroxibenzoico para detecção do biomarcador GSTM3. A caracterização eletroquímica confirmou a eficiência da polimerização do 4-HB pela VC, formando filmes estáveis sobre o ECGL. Também, comprovou a eficácia da imobilização por ligação covalente do Anti- GSTM3 utilizando EDC/NHS.

A análise de EIE demonstrou mudanças significativas na resistência de transferência de carga em cada etapa de modificação do eletrodo de trabalho, com valores de 4797,5 Ω após polimerização, redução para 849 Ω depois da imobilização do anticorpo e aumento para 1495 Ω após formação do complexo imunológico.

A otimização do sistema garantiu o estabelecimento de parâmetros ideais para imobilização do anticorpo e bloqueio dos sítios inespecíficos com glicina, resultando em um dispositivo que, para uso, levaria apenas 3h para detecção do antígeno, um tempo muito menor

em comparação com os métodos clássicos de diagnósticos do CP. O imunossensor apresentou um limite de diluição de 1:1280 para detecção do GSTM3, com correlação linear de 0,9716 entre a resposta eletroquímica e a concentração do soro.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2019.

AHDOOT, M. *et al.* MRI-Targeted, Systematic, and Combined Biopsy for Prostate Cancer Diagnosis. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 10, p. 917–928, 5 mar. 2020. DOI: 10.1056/nejmoa1910038

AIZAWA, M. Immunosensors for Clinical Analysis. **Advances in Clinical Chemistry**, v.31, p. 247–275, 1994. DOI : 10.1016/s0065-2423(08)60337-6

ALBERTS *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

AKBARI, N. S. *et al.* Biosensors for prostate cancer detection. **Trends in Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1248–1267, 2023. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.04.001>

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Tests to Diagnose and Stage Prostate Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>>. Acesso em: 7 abr. 2025.

AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. Advances in electrochemical immunosensors. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 92, p. 1–57, 2019. DOI : 10.1016/bs.acc.2019.04.006

BAJPAI, S.; AKIEN, G. R.; TOGHILL, K. E. An alkaline ferrocyanide non-enzymatic electrochemical sensor for creatinine detection. **Electrochemistry Communications**, v. 158, 2024. DOI : 10.1016/j.elecom.2023.107624

BARD, A. J. .; FAULKNER, L. R. . **Electrochemical methods : fundamentals and applications**. 2 ed. ,John Wiley & Sons, Inc., 2001.

BATISTA , P. D. *et al.* Paper-based electrochemical sensing devices. **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier B.V, v. 89p. 91–137, 2020. DOI : 10.1016/bs.coac.2019.11.001

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6 ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

CHAUDHARY, R. *et al.* HER2 targeted noninvasive immunosensor based on pencil graphite electrode for detection of breast cancer. **Sensors International**, v. 4, 2023. DOI: 10.1016/j.sintl.2023.100238

CLIMENT, V.; FELIU, J. M. Cyclic voltammetry. **Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry**. Elsevier, p. 48–74, 2018.

DAVID, I. G.; POPA, D. E.; BULEANDRA, M. Pencil graphite electrodes: A versatile tool in electroanalysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, p. 1-22, 2017. DOI: 10.1155/2017/1905968

DESHMUKH, K. *et al.* Biopolymer Composites with High Dielectric Performance: Interface Engineering. **Biopolymer Composites in Electronics**. Elsevier Inc., 2017. p. 27–128. DOI : 10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6

DROST, F.J. H. *et al.* Prostate MRI, with or without MRI-targeted biopsy, and systematic biopsy for detecting prostate cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2019, n. 4, 2019. DOI : 10.1002/14651858.cd012663.pub2

FELDKAMP, C. S.; CAREY, J. L. **Immune function and antibody structure**. Immunoassay. San Diego: Academic Press, p. 5–24, 1995.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors : A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**. v.102, p. 470-478, 2018. DOI : 10.1016/j.bios.2017.11.029

FERREIRA, L. F. *et al.* Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1–2, p. 46–52, 2011. DOI : 10.1016/j.matchemphys.2011.03.053

FISCHER, L. M. *et al.* Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, v. 86, n. 4–6, p. 1282–1285, 2009. DOI : 10.1016/j.mee.2008.11.045

FLANAGAN, J. R. Autologous Stimulation of YYi Transcription Factor Expression: Role of an Insulin-like Growth Fador. **Cell Growth & Differentiation**, v. 6, p. 185-186. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cgd/article-pdf/6/2/185/3171875/185.pdf>>

FRANKLIN, R. K. *et al.* **Chemical and Biological Systems**: Chemical Sensing Systems for Liquids. In: Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. Elsevier, 2016. DOI: 10.1016/b978-0-12-803581-8.00549-x

GARG, S. *et al.* Point-of-Care Prostate Specific Antigen Testing: Examining Translational Progress toward Clinical Implementation. **ACS Sensors****American Chemical Society**,v. 8, p. 3643-3658, 2023. DOI : 10.1021/acssensors.3c01402

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**. v. 17, p. 345-359, 2002.

GIZELI, E.; LOWE, C. R. Immunosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 66–71, 1996. DOI : 10.1016/s0958-1669(96)80097-8

HERMANSON, G. T. **Zero-Length Crosslinkers**. In: Bioconjugate Techniques. Elsevier Inc, 2013. cap. 4, p. 259–273. DOI : 10.1016/b978-0-12-382239-0.00004-2

HERMANSON, G. T. **The Reactions of Bioconjugation**. In: Bioconjugate Techniques. Elsevier Inc, 2013. cap. 3, p. 229–258. DOI : 10.1016/b978-0-12-382239-0.00003-0

HERMANSON, G. T. **Antibody Modification and Conjugation**. In: Bioconjugate Techniques. Elsevier Inc, 2013. cap.20 p. 867–920. DOI : 10.1016/b978-0-12-382239-0.00020-0

HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 12–24, 2012. DOI :10.1016/j.bios.2011.10.023

IMRAN, H.; MANIKANDAN, P. N.; DHARUMAN, V. Facile and green synthesis of graphene oxide by electrical exfoliation of pencil graphite and gold nanoparticle for non-enzymatic simultaneous sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **RSC Advances**, v. 5, n. 78, p. 63513–63520, 2015. DOI: 10.1039/c5ra11723b

INCA. **Câncer de próstata**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/prostata>>. Acesso em: 30 mar. 2025.

INSKIP, A. et al. Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*. **ABiochem. J**, v. 312, p. 713-716, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Detecção Precoce do Câncer**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2021.

JU, H.; LAI, G.; YAN, F. **Introduction**. In: Immunosensing for Detection of Protein Biomarkers. Elsevier, 2017. p. 1–30. DOI : 10.1016/b978-0-08-101999-3.00001-3

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; SANTOS, T. A. P. R. **Immunosensors in Clinical Laboratory Diagnostics**. In: Advances in Clinical Chemistry. Academic Press Inc., 2016. v. 73p. 65–108. DOI : 10.1016/bs.acc.2015.10.004

KAVOSI, B. *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 915–923, 2015. DOI : 10.1016/j.bios.2015.07.064

KHAN, R. *et al.* Advances in nanomaterial-based immunosensors for prostate cancer screening. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 155, 2022. DOI : 10.1016/j.bios.2015.07.064

KHASHAYAR, P. *et al.* A highly sensitive electrochemical biosensor based on AuNP-modified gold electrodes for selective determination of serum levels of crosslaps. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, 2017. DOI : 10.1007/s13205-017-0919-y

KOYUN, A.; AHLATCIOĞLU, E.; İPEK, Y. K. **Biosensors and Their Principles**. In Tech. 2012. cap. 4, p. 115–142.

LAZANAS, A. C.; PRODROMIDIS, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. **ACS Measurement Science**, v. 3, p. 162-193, 2023. DOI : 10.1021/acsmeasuresciau.2c00070

LI, T.; YANG, M.; LI, H. Label-free electrochemical detection of cancer marker based on graphene–cobalt hexacyanoferrate nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 50–55, 2011. DOI : 10.1016/j.jelechem.2011.02.009

MA, H. *et al.* Identification of reciprocal microRNA-mRNA pairs associated with metastatic potential disparities in human prostate cancer cells and signaling pathway analysis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 10, p. 17779–17790, 2019.

MA, H.; Ó'FÁGÁIN, C.; O'KENNEDY, R. Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement. **Biochimie**, v.177, p. 213-225, 2020. DOI : 10.1016/j.biochi.2020.08.019

MCILWAIN, C. C.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: Cancer incidence and therapy. **Oncogene**, .v. 25, p. 1639-1648, 2006. DOI : 10.1038/sj.onc.1209373

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, p. 153-159, 2016. DOI : 10.1016/j.jobcr.2015.12.002

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde orienta que a atenção aos sinais e sintomas traz mais benefícios que o rastreamento populacional**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/novembro/saude-orienta-que-a-atencao-aos-sinais-e-sintomas-traz-maisbeneficiosqueorastreamentopopulacional#:~:text=Em%202023%2C%20foram%20realizadas%20233.090,continuidade%20do%20crescimento%20nos%20atendimentos.>>>. Acesso em: 19 jan. 2025.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012. DOI : 10.2478/v10188-012-0017-z

NARESH, V.; LEE, N. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 1109, p. 1-35, 2021. DOI : 10.3390/s21041109

NASIMI, H. *et al.* Protein biomarker detection in prostate cancer: A comprehensive review of electrochemical biosensors. **Sensors and Actuators Report**, v. 6, n.100168, p. 1-13 , 2023. DOI : 10.1016/j.snr.2023.100168

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 135, 4-Hydroxybenzoic acid**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Hydroxybenzoic-acid>>. Acesso em: 5 abr. 2025.

NCI. **Advances in Prostate Cancer Research** . Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/prostate/research>>. Acesso em: 11 abr. 2025.

NEZHADALI, A.; MEHRI, L.; SHADMEHRI, R. Determination of methimazole based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite sensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 85, p. 225–232, 2018. DOI:10.1016/j.msec.2017.05.099

PAC. Glossary for chemists of terms used in biotechnology. **IUPAC Recommendations 1992**. 64, 143, p. 148, 1992.

PAN, H. M. *et al.* **Conjugated polymers for biosensor devices** : Comprehensive Biomaterials II. Elsevier, 2017. cap. 3.33, p. 716–754.

PATSKOVSKY V. Y. *et al.* Distinctive Structure of the Human GSTM3 Gene—Inverted Orientation Relative to the Mu Class Glutathione Transferase Gene Cluster. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. Vol. 361, p. 85–93, 1999. DOI : 10.1006/abbi.1998.0964

PRABHAKAR, T. *et al.* Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective. **Chemical Engineering Journal**, v. 503, n. 158054, 2025. DOI :10.1016/j.cej.2024.158054

PRENSNER, J. R. *et al.* Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 127, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003180

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019. DOI : 10.14740/wjon1191.

RIBEIRO, D. V.; SOUZA, C. A. C.; ABRANTES, J. C. C. Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) to monitoring the corrosion of reinforced concrete. **Revista IBRACON de Estruturas e Materiais**, v. 8, n. 4, p. 529–546, 2015. DOI: 10.1590/s1983-41952015000400007

BOTT, S. R. J.; KENG, F.; NG, L. **Prostate Cancer**. Frimley : Exon publications, 2021

ROBINSON, C.; JUSKA, V. B.; O'RIORDAN, A. Surface chemistry applications and development of immunosensors using electrochemical impedance spectroscopy: A comprehensive review. **Environmental Research Academic**, v. 237, n. 116877, 2023. DOI: 10.1016/j.envres.2023.116877

RONKAINEN, N. J.; OKON, S. L. Nanomaterial-based electrochemical immunosensors for clinically significant biomarkers. **Materials**, v. 7, p. 4669-4709, 2014. DOI: 10.3390/ma7064669

SANDHU, S. *et al.* Prostate cancer. **The Lancet**, v. 398, p. 1075-1090, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00950-8

SANTORO, K.; RICCIARDI, C. **Biosensors**. In: Encyclopedia of Food and Health. Elsevier Inc., 2015. p. 430–436.

SAOUD, R. *et al.* Incorporating prognostic biomarkers into risk assessment models and TNM staging for prostate cancer. **Cells**, v. 9, n. 2116, p. 1-12, 2020. DOI : 10.3390/cells9092116

SCHUMACHER, F. R. *et al.* Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. **Nature Genetics**, v. 50, n. 7, p. 928–936, 2018. DOI: 10.1038/s41588-018-0142-8

SEKHOACHA, M. *et al.* Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules**, v. 27, n. 5730, 2022. DOI : 10.3390/molecules27175730

SHIOTA, M. *et al.* Gene polymorphisms in antioxidant enzymes correlate with the efficacy of androgen-deprivation therapy for prostate cancer with implications of oxidative stress. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 3, p. 569–575, 2017. DOI : 10.1093/annonc/mdw646

SINGH, A.; MISHRA, A.; VERMA, A. **Antibodies**: Monoclonal and polyclonal. In: Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 327–352.

SPOSITO, H. G. M. *et al.* Swift electrochemical sensing of diltiazem employing highly-selective molecularly-imprinted 3-amino-4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 911, n. 116207, 2022. DOI : 10.1016/j.jelechem.2022.116207

SILVA, T.S. *et al.* Electrochemical modification of electrodes with polymers derived from hydroxybenzoic acid isomers: Optimized platforms for an alkaline phosphatase biosensor for pesticide detection. **Materials Chemistry and Physics**, v. 252, n.123221, 2020. DOI : 10.1016/j.matchemphys.2020.123221

SILVA, T.S. *et al.* Development of a label-free impedimetric immunosensor for the detection of respiratory syncytial virus. **J Solid State Electrochem.** v. 28, p. 4015–4027, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10008-024-05999-z>

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660

TAO, Y. *et al.* A novel electrochemical immunosensor based on poly(m-aminophenol) modified expanded graphite electrode. **Synthetic Metals**, v. 183, p. 50–56, 2013. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.09.010

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p.121-131, 2001.

TORRINHA, Á. *et al.* Biosensing based on pencil graphite electrodes. **Talanta**, v.190, p.235-247, 2018. DOI : 10.1016/j.talanta.2018.07.086

TOTHILL, I. E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 30, n. 1, p. 205–218, 2001. DOI:10.1016/S0168-1699(00)00165-4

LEENDERS, G. J. L. H. V.; VERHOEF, E. I.; HOLLEMANS, E. Prostate cancer growth patterns beyond the Gleason score: entering a new era of comprehensive tumour grading. **Histopathology**, v. 77, p. 850-861, 2020. DOI : 10.1111/his.14214

VINOD, D.; SADANANDAN, S.; RAJAMANI, R. Peptide-based electrochemical biosensors for the detection of disease biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics: X**, v. 20, n. 100531, 2024. DOI : 10.1016/j.biosx.2024.100531

WANG, S. *et al.* Gstm3 function and polymorphism in cancer: Emerging but promising. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 10377-10388, 2020. DOI : 10.2147/CMAR.S272467

WILLIAMS, A. J. K. *et al.* Non-specific binding to protein A Sepharose and protein G Sepharose in insulin autoantibody assays may be reduced by pre-treatment with glycine or ethanolamine. **Journal of Immunological Methods**, v. 314, p. 170–173, 2006. DOI : 10.1016/j.jim.2006.06.003

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em:
<https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 14 jan. 2025.

ZENG, X.; SHEN, Z.; MERNAUGH, R. Recombinant antibodies and their use in biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 3027- 3038, 2012. DOI: 10.1007/s00216-011-5569-z

ZHANG, Z. *et al.* Nanomaterials-based electrochemical immunosensors. **Micromachines**, v. 10, n. 397, 2019. DOI : 10.3390/mi10060397

ZHANG, Z. *et al.* Carbon Material Based Electrochemical Immunosensor for Gastric Cancer Markers Detection. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, n.736271, 2021. DOI: 10.3389/fchem.2021.736271