

Estudo e desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção biomarcador de câncer de ovário (CA125) com nanopartículas de CePO₄.

Jean Rodrigo Santos¹, Agnes Nascimento Simões¹, Talita Mazon¹

{jean.santos, agnes.simoes, talita.mazon}@cti.gov.br

**¹ Divisão de Infraestrutura para Nano e Microsistemas – DINAM
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP**

Abstract. Ovarian cancer is a leading cause of mortality among women globally, predominantly attributed to late diagnosis. Therefore, there is an urgent need to advance early and accurate detection methods. The biomarker CA125 has been used in the detection and monitoring of ovarian cancer, however, conventional detection approaches can be expensive, time-consuming and less sensitive. In this context, the implementation of electrochemical biosensors using nanoparticles emerges as a promising strategy due to their unique properties, such as high sensitivity, easy portability, reduced cost and simplicity of production. In the present pilot study for sensor development, voltametric techniques, including differential and cyclic pulse voltammetry, were used in conjunction with Fourier transform infrared spectroscopy in order to obtain an initial characterization of the biosensor.

Resumo. O câncer de ovário é uma das principais causas de mortalidade entre mulheres globalmente, predominantemente atribuída ao diagnóstico tardio. Portanto, surge uma necessidade urgente de avançar em métodos de detecção precoce e precisos. O biomarcador CA125 tem sido empregado na detecção e monitoramento do câncer de ovário, porém, abordagens convencionais de detecção podem ser dispendiosas, demoradas e menos sensíveis. Neste contexto, a implementação de biossensores eletroquímicos utilizando nanopartículas emerge como uma promissora estratégia devido às suas propriedades singulares, tais como alta sensibilidade, portabilidade facilitada, custo reduzido e simplicidade de produção. No presente estudo piloto de desenvolvimento do sensor, foram empregadas técnicas voltamétricas, incluindo voltametria de pulso diferencial e cíclica, em conjunto com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier a fim de se obter uma caracterização inicial do biossensor.

1. Introdução

O câncer de ovário é uma das neoplasias ginecológicas mais agressivas e letais, sendo a segunda mais comum, superada apenas pelo câncer do colo do útero [1][2]. A doença ocupa a sétima posição no ranking nacional de mortalidade entre as mulheres brasileiras, apresentando uma alta taxa de mortalidade que está fortemente associada ao diagnóstico tardio. Isso ocorre devido à natureza frequentemente vaga e inespecífica dos sintomas iniciais, resultando em diagnósticos predominantemente em estágios avançados da doença [3][4]. Em 2020, foram registrados no Brasil 6.650 novos casos de câncer de ovário [2]. Quando diagnosticado em estágio I, ou seja, quando a doença está confinada aos ovários, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de aproximadamente 94%. No entanto, apenas cerca de 30% dos casos são identificados em estágios iniciais, ressaltando a necessidade urgente de desenvolver métodos de detecção mais rápidos e precisos [1][4].

O biomarcador CA125, ou antígeno carboidrato 125, uma glicoproteína expressa em altas concentrações nas células do câncer de ovário, tem sido o principal parâmetro utilizado na detecção e monitoramento da doença [1]. Apesar de seu uso disseminado, a eficácia do CA125 é limitada, especialmente em estágios iniciais, onde a sensibilidade pode ser insuficiente para detectar o câncer [5]. Além disso, as abordagens convencionais de medição de CA125, como os ensaios imunológicos, tendem a ser caras, demoradas e requerem infraestrutura laboratorial sofisticada, o que limita sua aplicabilidade em larga escala e em ambientes com recursos limitados [6]. Nesse contexto, os biossensores eletroquímicos destacam-se como uma solução inovadora e promissora para a detecção de biomarcadores, como o CA125, oferecendo rapidez, precisão e alta sensibilidade [7][8].

Um biossensor eletroquímico é um dispositivo analítico que combina um componente biológico com um transdutor eletroquímico para detectar a presença e a concentração de analitos específicos. O componente biológico, que pode ser uma enzima, anticorpo ou receptor, interage com o analito, gerando uma resposta que é convertida em um sinal elétrico pelo transdutor. Esse sinal é então amplificado e medido, proporcionando informações quantitativas sobre o analito em questão. Os biossensores eletroquímicos são amplamente utilizados em diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental e controle de processos industriais devido à sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez de resposta [5][6][7].

Um exemplo é o trabalho de Pakchin *et al.* (2020), que desenvolveu um imunossensor eletroquímico utilizando uma plataforma de eletrodo de carbono vítreo modificada com um nanocompósito 3D composto por óxido de grafeno reduzido, nanotubos de carbono de paredes múltiplas e nanopartículas de ouro (3DrGO-MWCNT-PAMAM/AuNPs) [9]. Outro estudo relevante foi realizado por Mu *et al.* (2024), que desenvolveram um imunossensor eletroquímico utilizando nanocompósitos de CuCo-ONSs@AuNPs [10]. Um componente crucial desses biossensores é a sonda eletroquímica, responsável por gerar o sinal elétrico necessário para a detecção. Comumente, o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio

($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$) é utilizado como eletrólito devido à sua alta eficiência e estabilidade. Além disso, o cério, com seus estados de oxidação variáveis (+3 e +4), tem sido explorado como sonda eletroquímica devido à sua capacidade de promover reações redox eficazes, ampliando o desempenho desses dispositivos [11][12].

Na literatura, observa-se um esforço significativo na produção de testes diagnósticos portáteis, visando facilitar o acesso, reduzir o tempo de análise e possibilitar a detecção precoce de doenças. Os biossensores eletroquímicos, além de oferecerem essas vantagens, distinguem-se por seu baixo custo e relativa simplicidade de produção, características que os tornam ideais para aplicação em ambientes clínicos, bem como em triagens de populações em risco e regiões remotas [13].

Os biossensores têm visto avanços significativos com a incorporação de nanopartículas (NPs). Essas melhorias são particularmente notáveis na amplificação da eficiência dos sensores, permitindo a detecção de biomarcadores em concentrações extremamente baixas, o que é crucial para o diagnóstico precoce de condições como o câncer de ovário [14]. De acordo com Zhu *et al.* (2015), a integração de NPs em sensores eletroquímicos tem impulsionado o desenvolvimento desses sistemas por meio de sua capacidade de amplificação de sinais, aumento da superfície efetiva do eletrodo e melhoria da condutividade elétrica. Por exemplo, nanopartículas metálicas, como ouro e prata, não só amplificam o sinal eletroquímico, mas também oferecem alta especificidade e estabilidade na detecção de biomoléculas [15]. Além disso, a utilização de polímeros condutores, como a polianilina, não apenas facilita a imobilização de biomoléculas, mas também atua como mediador catalítico, aumentando a sensibilidade e a seletividade dos biossensores [16].

Nesse contexto, as nanopartículas de cério ($CePO_4$ NPs) têm demonstrado um potencial significativo na melhoria do desempenho de biossensores devido às suas propriedades únicas. A modificação de eletrodos de sensores eletroquímicos com $CePO_4$ permitiu a detecção sensível e seletiva de compostos tóxicos como catecol e hidroquinona, devido à alta área superficial e à excelente condutividade do material [17]. Além disso, a aplicação de heteroestruturas $CePO_4/CeO_2$ modificadas com nanopartículas de ouro em plataformas de detecção luminosa resultou em sensores de elevada sensibilidade para a detecção específica de enolase neuronal, ao integrar as propriedades catalíticas dos compostos $CePO_4$ e CeO_2 com a capacidade de amplificação proporcionada pelas nanopartículas de ouro [18].

Contudo, a ancoragem eficaz de NPs em eletrodos é um desafio bem documentado na literatura científica, frequentemente afetado por fenômenos de agregação e distribuição não uniforme. Nesse sentido, a modificação superficial dos eletrodos é crucial para evitar a aglutinação das partículas, o que pode comprometer a área superficial disponível para reações eletroquímicas e, consequentemente, a eficiência do biossensor [19]. Neste estudo piloto, buscamos abordar essas dificuldades ao testar duas metodologias distintas para a deposição

de NPs de CePO_4 : a funcionalização com (3-aminopropil)triethoxysilano (APTES) e com dimetilformamida (DMF). A funcionalização de superfícies com APTES é uma técnica amplamente utilizada para modificar a química superficial de materiais. O APTES é um agente silanizante que se liga a superfícies ricas em grupos hidroxila, como óxidos metálicos e vidros, formando uma camada organossilana. A molécula de APTES possui um grupo amino terminal, que pode ser utilizado para a conjugação de biomoléculas, como anticorpos ou aptâmeros. Essa funcionalização é crucial para aumentar a sensibilidade e a especificidade do biossensor, facilitando interações moleculares mais eficientes e a detecção precisa do analito-alvo [20]. A funcionalização com DMF por sua vez, é uma técnica que emprega este solvente para dispersar e depositar nanomateriais, como nanopartículas metálicas ou nanocompósitos, sobre a superfície do sensor. DMF é um solvente orgânico com excelentes propriedades de solvatação para uma ampla gama de nanomateriais, o que permite a criação de suspensões estáveis e homogêneas. Isso, por sua vez, pode melhorar significativamente as propriedades eletroquímicas do sensor, como a condutividade e a área superficial ativa [21][22].

Neste trabalho, focamos no desenvolvimento e na caracterização inicial de um biossensor eletroquímico portátil destinado à detecção do antígeno CA125 utilizando nanopartículas de CePO_4 como sonda eletroquímica, com o objetivo de estabelecer uma base sólida para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas mais eficazes, potencialmente transformando a abordagem atual para a detecção precoce do câncer de ovário e contribuindo assim para a redução da mortalidade associada a essa patologia.

2. Metodologia

2.1. Limpeza das bases sensoras

Para o desenvolvimento do biossensor, foram utilizadas bases sensoras miniaturizadas com os três eletrodos (trabalho, contra e referência) impressos em uma placa de PCB de (160x10x1mm), conforme figura 1. Inicialmente, realizou-se a limpeza das bases sensoras segundo as etapas descritas:

- 1) Submersão em detergente neutro Extran a 10% por 10 minutos em ultrassom;
- 2) Enxágue com água deionizada por duas vezes em ultrassom;
- 3) Submersão em etanol PA por 10 minutos em ultrassom;
- 4) Submersão em metanol por 10 minutos sem uso do ultrassom;

Para o eletrodo de referência foi utilizada uma tinta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) que posteriormente foi curada durante 10 minutos em estufa a 100°C . Após a limpeza, procedeu-se a adição de NPs ao eletrodo de trabalho da base sensora. As CePO_4

NPs foram fornecidas pelo Professor Dr. Rafael Aparecido Ciola Amoresi da Universidade Federal do ABC – UFABC.

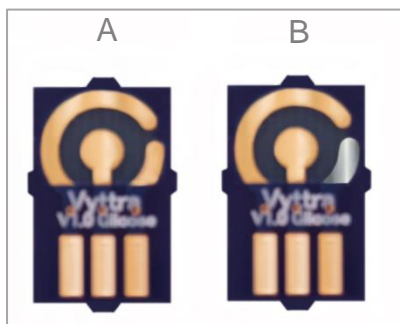


Figura 1. Bases sensoras miniaturizadas utilizadas na pesquisa: (a) limpas e (b) após deposição de tinta de prata/cloreto de prata no eletrodo de referência.

2.2. Funcionalização

A fim de verificar qual método é mais eficaz na ancoragem das nanopartículas, foram avaliados dois procedimentos: A) Funcionalização com (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) e B) Funcionalização com dimetilformamida (DMF), seguindo as etapas conforme demonstrado no fluxograma da figura 2.

2.2.1. Funcionalização com APTES

Para a funcionalização com APTES, foi preparada uma solução aquosa de APTES a 10% (v/v), com o pH ajustado para 4 verificado com fita de pH. Foram pesadas 0,05 g de CePO_4 NPs, as quais foram misturadas com 15 mL da solução de APTES ajustada. A mistura foi mantida sob agitação por 2 horas a 70°C , com a boca do béquer coberta por uma folha de alumínio para minimizar perdas devido à evaporação. Após esse período, foram adicionados 10 microlitros da solução resultante sobre o eletrodo de trabalho, enquanto a solução continuava em agitação. Os eletrodos tratados foram então armazenados em estufa a 120°C durante a noite. Cabe ressaltar que foram testados diferentes ácidos para o ajuste do pH da solução de APTES, incluindo ácido clorídrico 2 M, ácido nítrico 2 M e ácido acético 2 M.

2.2.2. Funcionalização com DMF

Para a funcionalização com DMF, adicionou-se 0,020 g de CePO_4 NPs a um tubo Eppendorf, seguido pela adição de 1 mL de DMF e 0,0013 g de polivinilpirrolidona (PVPF). A solução resultante foi agitada em um vórtex para assegurar uma mistura homogênea. Posteriormente, foram aplicados 5 microlitros da solução resultante sobre o eletrodo de trabalho, que foi então deixado em estufa a 120°C durante a noite.

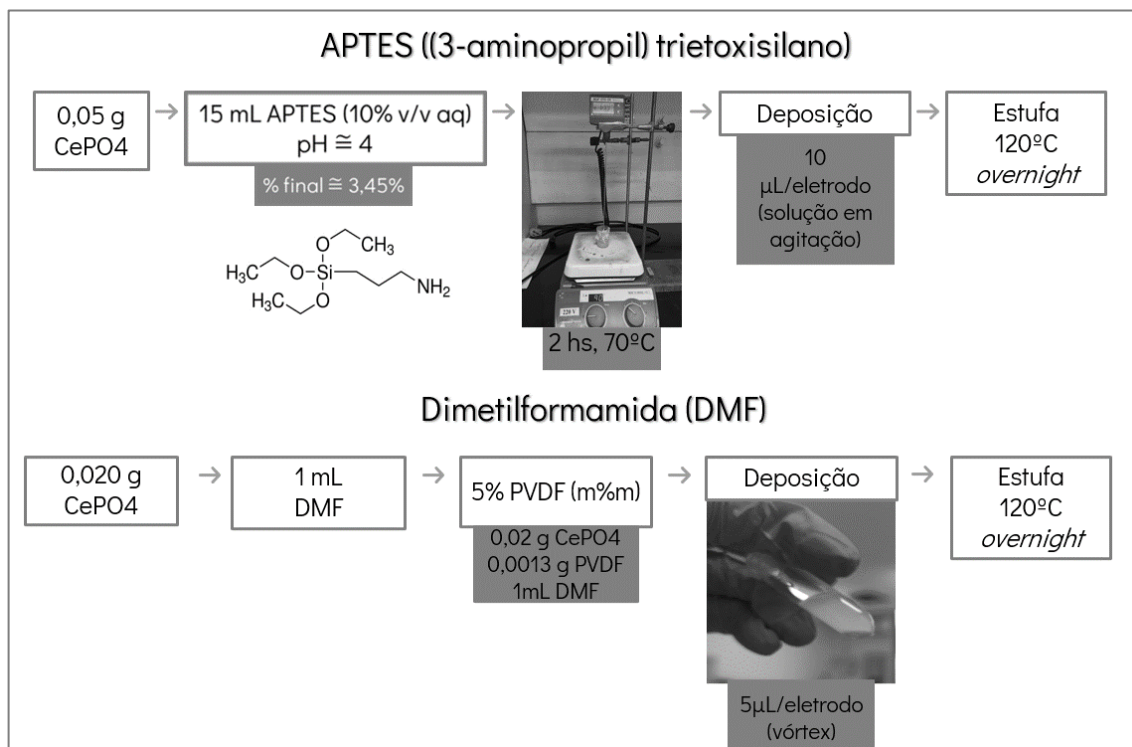


Figura 2. Esquema ilustrativo da fase de funcionalização empregando APTES ou DMF.

2.3. Modificação do Eletrodo

2.3.1 Imunossensor

O eletrodo de trabalho foi submetido a um processo de modificação utilizando cistamina a uma concentração de 20 mM. O eletrodo foi imerso na solução de cistamina e mantido à temperatura ambiente por um período de 2 horas. Em seguida, 10 μL de glutaraldeído a 2,5% foram adicionados ao eletrodo funcionalizado com cistamina, e o eletrodo foi incubado por 45 minutos à temperatura ambiente. O glutaraldeído atua como um agente reticulante, facilitando a formação de ligações covalentes entre a cistamina e os grupos amino do anticorpo.

Após a etapa de reticulação, o eletrodo foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) para remover reagentes não ligados. Em seguida, foram adicionados 15 μL de anticorpo primário diluído a 1:1000 ao eletrodo, e a incubação foi realizada em uma câmara úmida por 24 horas a aproximadamente 4°C. Posteriormente, o eletrodo foi lavado novamente com PBS para remover anticorpos não ligados. Para bloquear sítios livres e evitar ligações não específicas, foram adicionados 15 μL de albumina sérica bovina (BSA) a 1% ao eletrodo, e o bloqueio foi realizado por 30 minutos à temperatura ambiente. Essas etapas estão demonstradas na figura 3.

2.3.2 Detecção

Após a etapa de bloqueio, foram adicionados 15 µL de antígeno, com concentração de 35 U/mL, ao eletrodo para possibilitar a captura específica pelo anticorpo previamente imobilizado. A incubação foi mantida por 10 minutos antes da realização das medições (figura 3).



Figura 3. Esquema representativo do processo de modificação do eletrodo de trabalho.

2.4. Caracterização

2.4.1 FTIR

Em cada etapa de adição de compostos, a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi empregada para monitorar as possíveis variações estruturais. Para tal, utilizou-se o espectrômetro Spectrum 100 da PerkinElmer. Os espectros foram adquiridos no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras acumuladas. Como controle, foram realizadas leituras do eletrodo de trabalho em estado não funcionalizado. Os dados obtidos foram convertidos para um formato compatível com o Microsoft Excel e analisados utilizando o software Origin (v. 2016).

2.4.2 Eletroquímico

Adicionalmente, foram realizadas leituras voltamétricas utilizando o potenciostato portátil Sensit Smart (PalmSens) para avaliar a resposta eletroquímica do biossensor em cada fase do processo de modificação. As leituras foram efetuadas com o auxílio do software PSTrace (v.5-PalmSens), e os parâmetros de leitura estão detalhados na tabela 1. Os dados obtidos foram convertidos para um formato compatível com o Microsoft Excel e analisados utilizando o software Origin (v. 2016).

Tabela 1. Parâmetros utilizados para leituras voltamétricas no processo de modificação do biossensor.

Parâmetro	Voltametria cíclica	Voltametria de pulso diferencial
<i>Start potential</i>	-0,6 vref	-0,6 vref
<i>Upper vertex potential</i>	0,6 vref	-
<i>Lower vertex potential</i>	-0,6 vref	-
<i>Stop potential</i>	1,2 vref	1,2 vref
<i>Number of scans</i>	5	1
<i>Scan rate</i>	0,1 v/s	-
<i>Step</i>	0,001 v	0,005 v
<i>Modulation amplitude</i>	-	0,025 v
<i>Modulation time</i>	-	0,05v
<i>Interval time</i>	-	0,5s

3. Resultados e Discussões

3.1 FTIR

Testes com diferentes ácidos (ácido clorídrico, nítrico e acético ambos a 2M) para ajuste de pH do APTES foram realizados, mas não revelaram diferenças significativas nos espectros de FTIR (figura 4), sugerindo que o ácido utilizado para controle de pH do APTES não desempenhou um papel crítico no processo de funcionalização. Em ambos os gráficos pode-se observar a presença de bandas em torno de 1080 cm^{-1} atribuída às vibrações de estiramento assimétrico do grupo Si-O-Si, que é típico de estruturas de silano após a formação de uma rede de siloxano além da bandas próximo a 3360 cm^{-1} que pode ser relacionada ao estiramento N-H dos grupos amina protonados (-NH_3^+) do APTES. A presença dessa banda indica que a protonação do grupo amina ocorreu, o que é esperado em condições ácidas.

Tendo isso em vista, o ácido selecionado para os experimentos subsequentes foi o ácido nítrico pois os resíduos de HNO_3 são facilmente removidos por simples lavagem, sem deixar resíduos que possam interferir nos experimentos subsequentes. Isso é particularmente importante para garantir que a superfície do sensor esteja livre de contaminantes que poderiam afetar a reatividade ou a sensibilidade do biossensor.

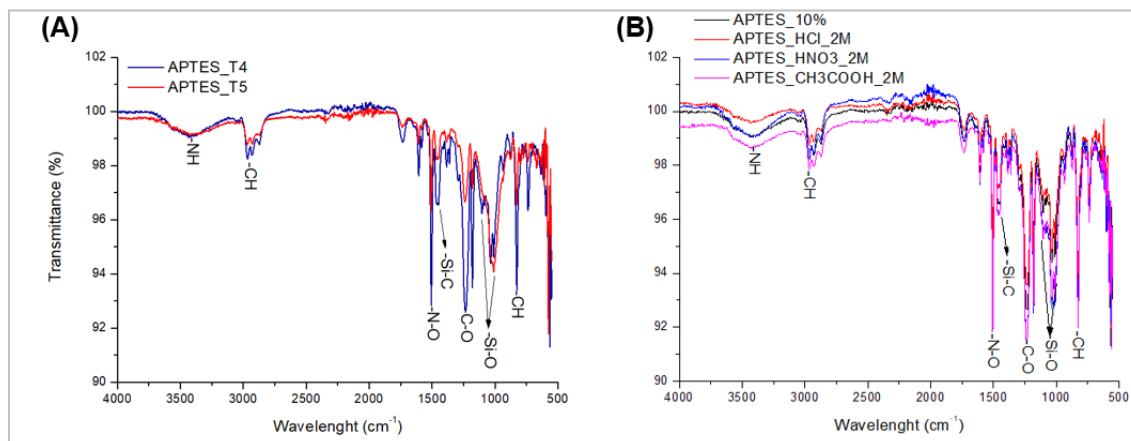


Figura 4. Espectros de FTIR para avaliação dos efeitos de diferentes ácidos no ajuste do pH do APTES. (A) Espectro de APTES a 10%; (B) Espectro de APTES ajustado para pH 4 utilizando diferentes ácidos. Espectros adquiridos no intervalo de 4000–400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 4 varreduras acumuladas.

A etapa de preparação de uma solução de APTES em meio ácido é fundamental para garantir a eficiente ancoragem das CePO₄ NPs no eletrodo de ouro. O meio ácido influencia diretamente a protonação do grupo amino presente no APTES. Em solução ácida, o grupo amino (-NH₂) do APTES se protona, formando -NH₃⁺. Essa protonação é crucial porque melhora a interação eletrostática entre o APTES e o substrato de ouro, que pode possuir uma carga superficial negativa, especialmente em condições ligeiramente alcalinas ou neutras. Além disso, o meio ácido também promove a hidrólise parcial dos grupos etoxisilano (-Si(OC₂H₅)₃) do APTES, formando grupos silanol (-SiOH). Esses grupos silanol são essenciais para a formação de ligações covalentes fortes com a superfície de ouro, através de processos de condensação, que ancoram firmemente as nanopartículas ao eletrodo. Portanto, a preparação em meio ácido não só garante a protonação necessária dos grupos amino para maximizar as interações eletrostáticas, como também facilita a formação de uma camada de silano bem aderida ao ouro, que é crucial para a estabilidade e funcionalidade do sistema eletroquímico [23]. A figura 5 ilustra a interação dos grupos silanóis com o eletrodo.

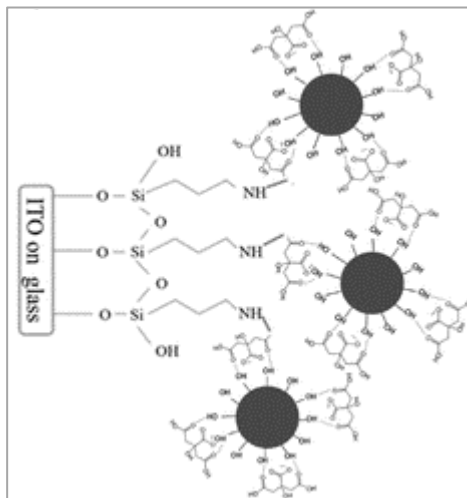


Figura 5. Esquema ilustrando os processos de funcionalização do APTES no eletrodo de ouro. Inicialmente, os grupos trietoxissilano ($\text{Si}(\text{OEt})_3$) do APTES sofrem hidrólise em meio ácido, formando grupos silanol ($\text{Si}-\text{OH}$). Paralelamente, a amina ($-\text{NH}_2$) do APTES é protonada, formando $-\text{NH}_3^+$, o que facilita a interação eletrostática com a superfície do eletrodo. Os grupos silanol formados permitem a ligação covalente do APTES ao ouro, promovendo uma ancoragem robusta e eficiente das nanopartículas de CePO_4 . O ajuste do pH pós-ancoragem pode desprotonar as aminas, resultando em uma camada mais compacta e organizada. Extraído de: Nor *et al.*, (2022)[24].

Os espectros de FTIR apresentados na Figura 6 mostram bandas características da espécie CePO_4 em ambas as metodologias de funcionalização (APTES e DMF). Em particular, observam-se as bandas em torno de 1040 cm^{-1} , associadas ao estiramento assimétrico dos grupos fosfato (PO_4^{3-}), e aproximadamente a 600 cm^{-1} , relacionadas ao estiramento das ligações $\text{Ce}-\text{O}$. A presença dessas bandas em ambos os espectros confirma a adsorção eficaz de CePO_4 , independentemente do método de funcionalização utilizado, indicando que as nanopartículas de CePO_4 foram adequadamente ancoradas na superfície dos eletrodos tanto com APTES quanto com DMF.

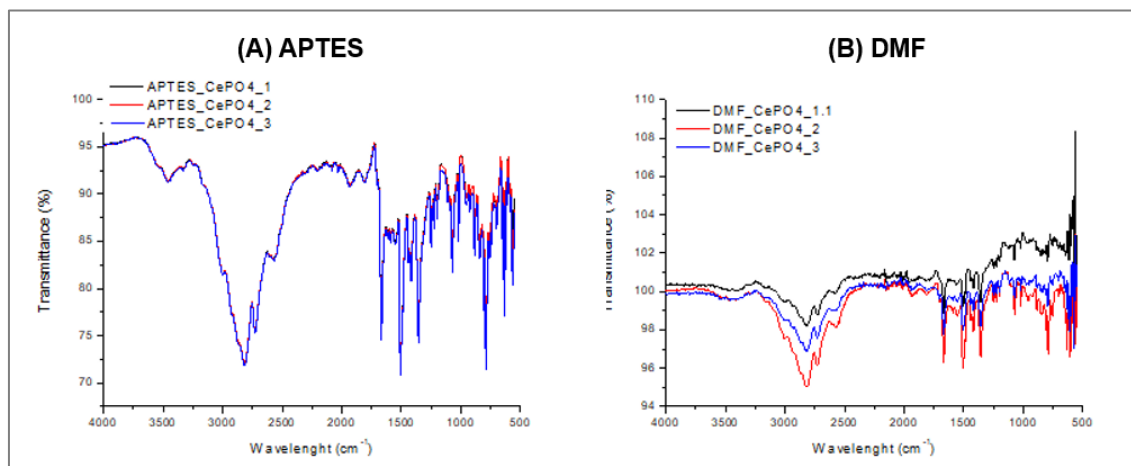


Figura 6. Espectros de FTIR para o eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO₄ utilizando APTES e DMF. (A) Espectro de FTIR do eletrodo após funcionalização com APTES. (B) Espectro de FTIR do eletrodo após funcionalização com DMF. Espectros adquiridos no intervalo de 4000–400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 4 varreduras acumuladas.

Após cada etapa de adição de composto, foi realizada a caracterização por FTIR a fim de verificar se é possível observar mudança no espectro e comprovar a eficiência de cada etapa. Nos espectros obtidos demonstrados na Figura 7, é possível observar que houve variações nas intensidades das bandas, sugerindo interações sutis entre os compostos e a superfície do eletrodo. É importante ressaltar a reprodutibilidade dos resultados, uma vez que as replicatas de cada etapa de adição de compostos mostraram semelhanças consistentes, conforme é demonstrado nas figuras 7 e 8.

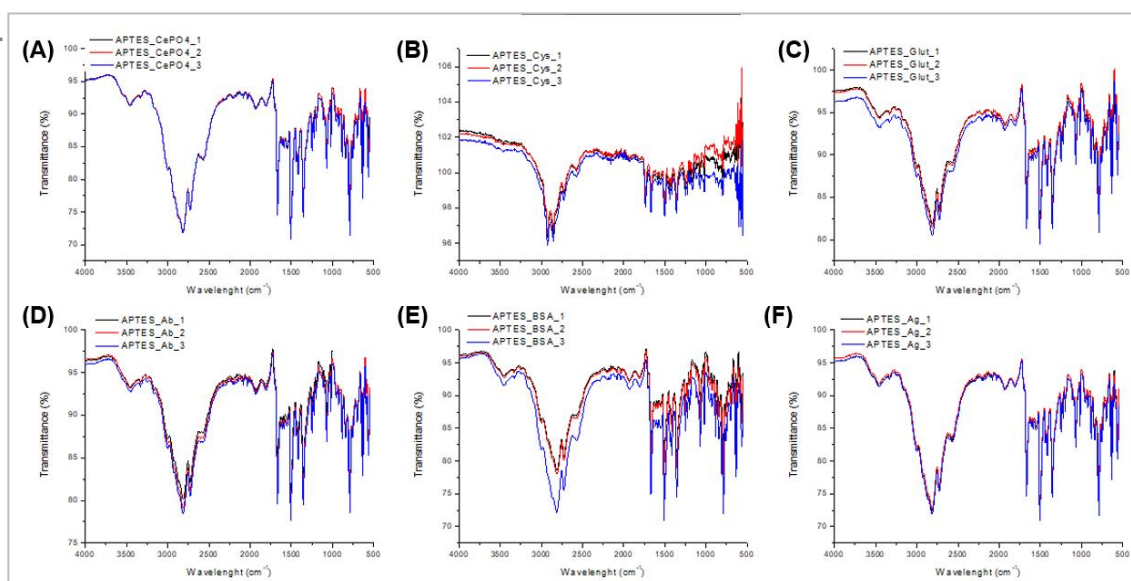


Figura 7. Espectros de FTIR para a funcionalização utilizando APTES em cada etapa de adição dos compostos. (A) CePO₄ NPs; (B) Cistamina adicionada; (C) Glutaraldeído

adicionado; (D) Anticorpo primário adicionado; (E) BSA adicionado; (F) Antígeno (CA125) adicionado. Espectros adquiridos no intervalo de 4000–400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras acumuladas.

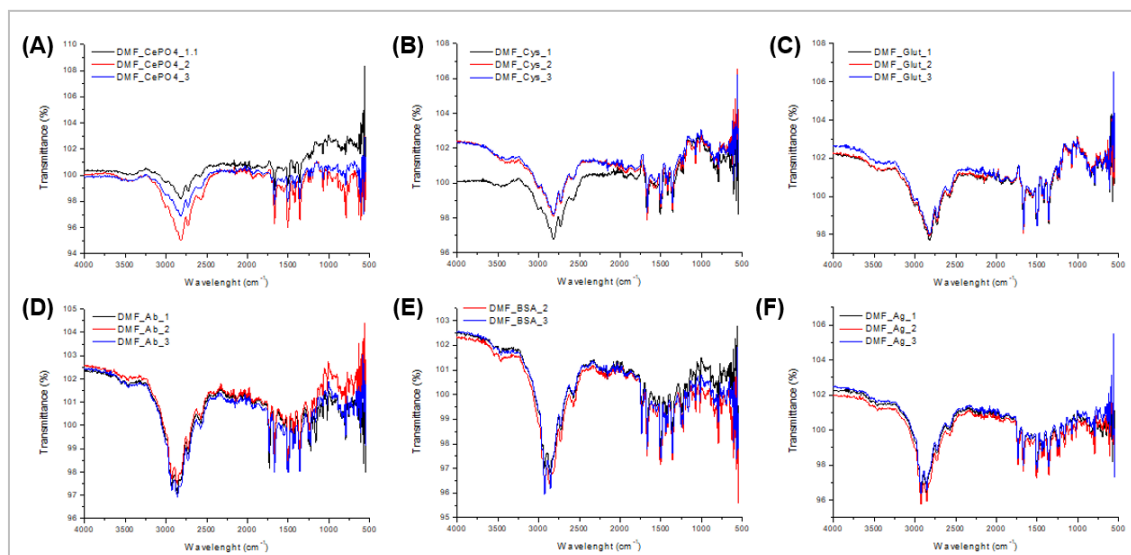


Figura 8. Espectros de FTIR para a funcionalização com DMF em cada etapa de adição dos compostos. (A) CePO_4 NPs; (B) Cistamina adicionada; (C) Glutaraldeído adicionado; (D) Anticorpo primário adicionado; (E) BSA adicionado; (F) Antígeno (CA125) adicionado. Espectros adquiridos no intervalo de 4000–400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras acumuladas.

Sobre as modificações realizadas com APTES e DMF, nas Figura 7a e 8a respectivamente, observa-se bandas características das comentadas anteriormente para as CePO_4 NPs depositadas. Na Figura 7b, observa-se um aumento na intensidade das bandas em torno de 3300-3500 cm^{-1} (estiramento N-H) que pode sugerir a presença de cistamina ligada à superfície. Essa mesma banda não é observada na Figura 8b, o que pode ser indicativo de uma ancoragem ineficiente da cistamina às moléculas de CePO_4 . Tanto na Figura 7c e 8c, pode-se observar o aumento na intensidade da banda de 1720-1740 cm^{-1} indicando a ligação do glutaraldeído ao eletrodo através da reação com os grupos amina da cistamina. A etapa de imobilização do anticorpo, pode ser evidenciada por bandas associadas às proteínas, das quais os anticorpos são compostos. Há uma banda na região de 1540-1560 cm^{-1} , correspondente à amida II (N-H) que pode ser identificada mais intensa na Figura 7d do que na Figura 8d. A etapa seguinte, incubação com BSA, não deve apresentar modificação significativa nos espectros uma vez que o BSA, sendo uma proteína, deve exibir bandas características semelhantes às do anticorpo, principalmente nas regiões de amida, o que de fato é observado tanto na Figura 7e quando na Figura 8e. Semelhantemente, após a incubação do antígeno, é esperado que não ocorra mudanças significativas nos espectros já que o antígeno CA125, que é uma glicoproteína, pode também apresentar bandas semelhantes às

espécies adicionadas anteriormente, e isso é observado para os espectros da Figura 7f e Figura 8f.

3.2 Eletroquímico

É válido salientar que foram exploradas diferentes concentrações do eletrólito KCl (cloreto de potássio), juntamente com diferentes intervalos de tempo para as leituras (figuras 9, 10 e 11). A condição que se mostrou mais apropriada foi a utilização de KCl 0,1 M, com um tempo de espera de 1 minuto para a leitura. O KCl é frequentemente empregado como eletrólito em sensores eletroquímicos devido à sua capacidade de fornecer íons de potássio e cloro, contribuindo para a condutividade elétrica da solução [25].

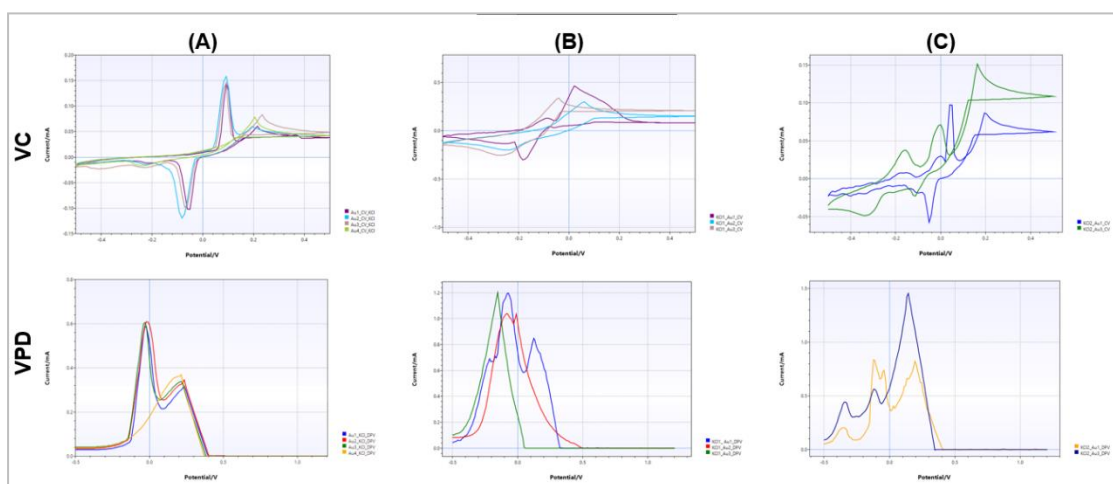


Figura 9. Voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (DPV) realizadas em bases sensoras com eletrodo de trabalho não funcionalizado, variando a concentração de KCl para (A) 0,1 M, (B) 1 M e (C) 2 M de KCl.

Com base nos resultados apresentados na Figura 9, foi possível observar que a concentração de KCl influencia significativamente a qualidade dos espectros obtidos. Em particular, as medições realizadas com KCl na concentração de 0,1 M apresentaram espectros mais claros e definidos, sugerindo uma menor interferência de ruído e uma maior estabilidade durante as análises. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que uma menor concentração de KCl reduz o impacto de forças iônicas excessivas, que poderiam afetar a estabilidade do eletrodo e, consequentemente, a precisão das medições. Dessa forma, optou-se por utilizar a solução de KCl a 0,1 M nas etapas subsequentes do estudo, assegurando uma maior reprodutibilidade e sensibilidade nas detecções realizadas com o biossensor.

Após a seleção do eletrólito, foi realizado um novo ensaio para avaliar a resposta das CePO₄ NPs frente às diferentes técnicas de deposição. Para isso, conduziu-se um teste de voltametria cíclica, comparando os resultados obtidos a partir do eletrodo limpo, das CePO₄

NPs depositadas com DMF e daquelas depositadas com APTES. Os resultados são apresentados na Figura 10.

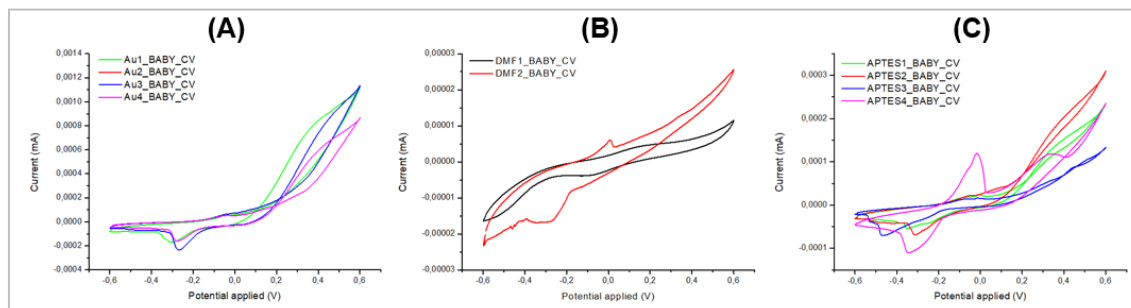


Figura 10. Curvas de Voltametria Cíclica obtidas a partir de leituras realizadas utilizando KCl 0,1M, um minuto após a adição do eletrólito. (A) Representa as bases sensoras em sua condição limpa; (B) apresenta as bases sensoras funcionalizadas com CePO₄/DMF; e (C) mostra as bases sensoras funcionalizadas com CePO₄/APTES.

Com base nos resultados apresentados na Figura 11, é possível observar que a ausência de picos na Figura 11a é um resultado esperado e positivo, pois o eletrodo de ouro utilizado nesta etapa ainda não havia sido funcionalizado com nenhuma espécie eletroativa. Essa ausência confirma que o eletrodo de ouro estava adequadamente limpo e inativo, sem interferências que pudessem comprometer as análises subsequentes. Na Figura 11b, referente à deposição das CePO₄ NPs utilizando DMF, observou-se que, em uma das replicatas, não apareceu pico significativo, enquanto na outra, o pico detectado foi de baixa intensidade, sugerindo uma deposição não uniforme ou uma interação menos eficiente entre as CePO₄ e a superfície do eletrodo. Por outro lado, na Figura 11c, correspondente à deposição com APTES, o pico observado foi bem definido e de maior intensidade, indicando uma deposição mais eficaz das nanopartículas e uma interação mais robusta com a superfície do eletrodo. Esses resultados sugerem que o APTES promove uma ancoragem mais estável e consistente das CePO₄, potencialmente resultando em uma melhor performance do biossensor nas análises eletroquímicas.

Após a deposição das CePO₄, prosseguiu-se com a construção do imunossensor e posterior detecção com antígeno. Foram avaliados novamente o resultado a partir dos dois métodos de deposição. Primeiramente, pode-se observar nas Figuras 11 e 12 o resultado obtido dessas análises em triplicata realizada com a deposição por APTES.

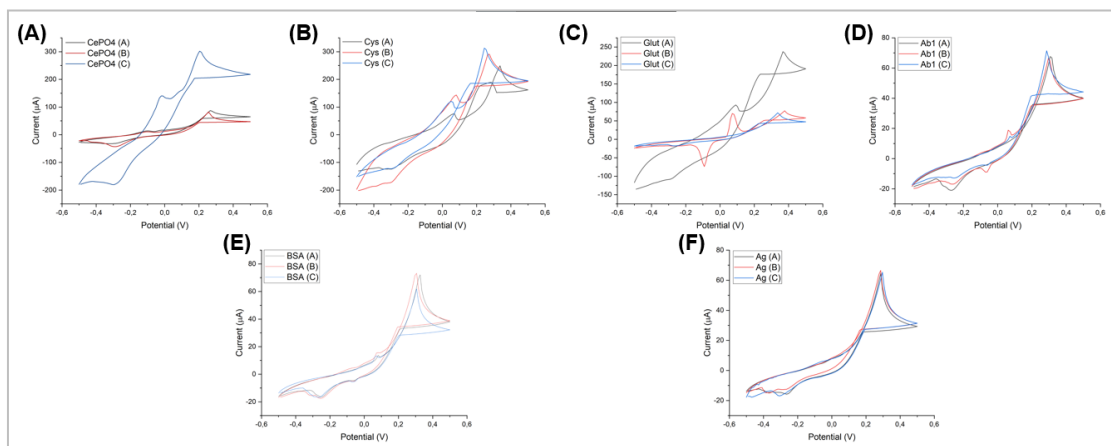


Figura 11. Voltametria cíclica (VC) para o eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO₄ utilizando APTES. Curvas de voltametria cíclica obtidas após cada etapa de funcionalização: (A) eletrodo funcionalizado com as CePO₄ NPs pelo método de APTES; (B) após adição de cistamina, (C) após adição de glutaraldeído, (D) após imobilização do anticorpo primário para CA125, (E) após bloqueio com BSA, e (F) após adição do antígeno CA125. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,2 V a 0,8 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 50 mV/s.

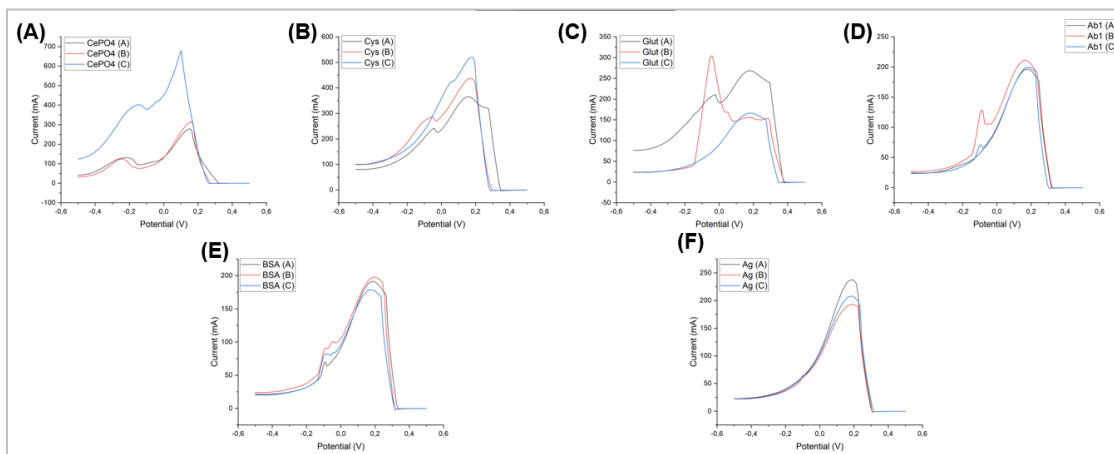


Figura 12. Voltametria de pulso diferencial (DPV) para o eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO₄ utilizando APTES. Curvas de voltametria cíclica obtidas após cada etapa de funcionalização: (A) eletrodo funcionalizado com as CePO₄ NPs pelo método de APTES; (B) após adição de cistamina, (C) após adição de glutaraldeído, (D) após imobilização do anticorpo primário para CA125, (E) após bloqueio com BSA, e (F) após adição do antígeno CA125. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,2 V a 0,8 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 50 mV/s.

Para o método de deposição utilizando APTES, as mudanças nos valores de IPA após a adição de CePO_4 NPs indicam um efeito de passivação parcial da superfície do eletrodo em CV, com uma diminuição significativa do IPA, sugerindo que as CePO_4 NPs podem estar bloqueando a transferência de elétrons. Entretanto, em DPV, observou-se um leve aumento no IPA, o que pode indicar que, apesar do bloqueio, as CePO_4 NPs promovem uma resposta mais sensível nesta técnica. A adição de Cistamina ao eletrodo modificado por APTES resultou em um aumento significativo no IPA em ambas as técnicas, sugerindo que a Cistamina melhora a transferência de elétrons e, portanto, a condutividade do eletrodo. Por outro lado, a adição de Glutaraldeído provocou uma diminuição acentuada no IPA em CV, apontando para uma possível formação de uma barreira na superfície do eletrodo, o que foi refletido também em DPV, onde houve uma leve redução no IPA. Quando anticorpos foram adicionados ao eletrodo modificado por APTES, houve uma ligeira diminuição no IPA em CV, indicando uma possível passivação da superfície do eletrodo, possivelmente devido à formação de uma camada biomolecular. Em DPV, essa diminuição foi mais pronunciada, sugerindo que a camada de anticorpos dificulta a detecção de espécies eletroativas. Resultados semelhantes foram observados com a adição de BSA, onde o IPA diminuiu em ambas as técnicas, reforçando a ideia de que BSA forma uma camada protetora na superfície do eletrodo. Com o antígeno, observou-se uma leve redução no IPA tanto em CV quanto em DPV, o que sugere que o antígeno também contribui para a diminuição da atividade eletroquímica do eletrodo.

Semelhantemente, prosseguiu-se com a construção do imunossensor e posterior detecção com antígeno sendo a ancoragem inicial das CePO_4 NPs realizada em triplicata com DMF. Os resultados obtidos em triplicata podem ser observados nas Figuras 13 e 14.

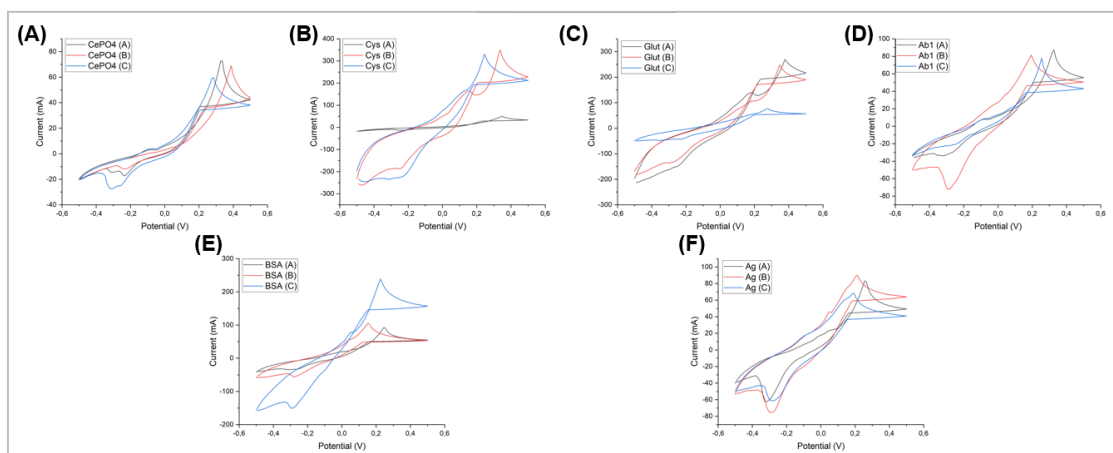


Figura 13. Voltametria cíclica (VC) para o eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO_4 utilizando DMF. Curvas de voltametria cíclica obtidas após cada etapa de funcionalização: (A) eletrodo funcionalizado com as CePO_4 NPs pelo método de DMF; (B) após adição de cistamina, (C) após adição de glutaraldeído, (D) após imobilização do anticorpo primário para CA125, (E) após bloqueio com BSA, e (F) após adição do antígeno CA125. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,2 V a 0,8 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 50 mV/s.

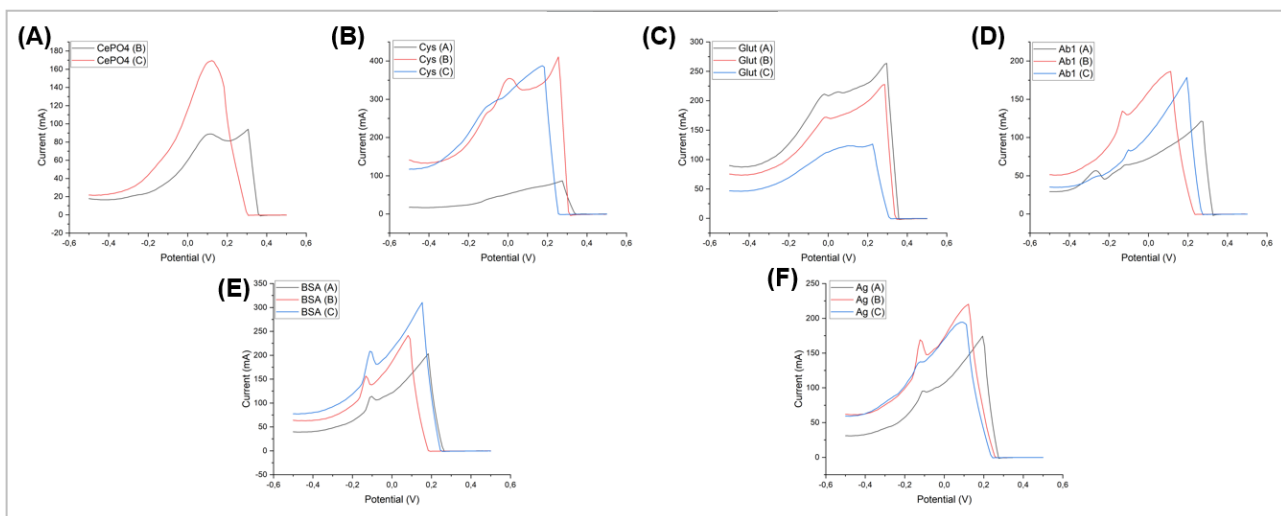


Figura 14. Voltametria pulso diferencial (DPV) para o eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO₄ utilizando DMF. Curvas de voltametria cíclica obtidas após cada etapa de funcionalização: (A) eletrodo funcionalizado com as CePO₄ NPs pelo método de DMF; (B) após adição de cistamina, (C) após adição de glutaraldeído, (D) após imobilização do anticorpo primário para CA125, (E) após bloqueio com BSA, e (F) após adição do antígeno CA125. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,2 V a 0,8 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 50 mV/s.

O método de deposição utilizando DMF também mostrou diferentes padrões de alteração no IPA após a adição dos compostos. A adição de CePO₄ NPs resultou em uma significativa redução no IPA em CV, sugerindo uma forte passivação da superfície do eletrodo. No entanto, em DPV, houve um aumento substancial no IPA, indicando que as CePO₄ NPs podem promover uma interação favorável nesta técnica, potencialmente aumentando a sensibilidade do sensor. A Cistamina, quando adicionada ao eletrodo modificado por DMF, causou uma leve redução no IPA em CV, mas com grande variação nos resultados, sugerindo uma possível heterogeneidade na modificação do eletrodo. Em DPV, o IPA aumentou, o que sugere que, apesar da variabilidade, a Cistamina melhora a resposta eletroquímica do eletrodo. A adição de Glutaraldeído ao eletrodo modificado por DMF resultou em um aumento no IPA em CV, o que pode indicar que este composto favorece a transferência de elétrons, ao contrário do observado com APTES. Em DPV, entretanto, houve uma ligeira diminuição no IPA, sugerindo um efeito passivante leve. A adição de anticorpos ao eletrodo modificado por DMF reduziu o IPA em ambas as técnicas, indicando uma formação de camada que limita a transferência de elétrons, semelhante ao observado com APTES, mas com uma diminuição menor em DPV. Com a adição de BSA, observou-se um aumento no IPA em CV, sugerindo uma interação positiva entre BSA e a superfície do eletrodo, ao contrário do observado com APTES. Entretanto, em DPV, o IPA diminuiu, o que sugere que, em DMF, BSA também forma uma camada passivante, embora o impacto seja menor. Por fim, a adição de antígeno levou a uma redução significativa no IPA em CV e DPV, sugerindo uma forte passivação da superfície do eletrodo em ambos os casos.

Tabela 2. Médias e desvios padrão da corrente de pico de anodização (IPA) obtidas por CV e DPV durante as etapas de adição de compostos em sensores funcionalizados com as CePO₄NPs via APTES.

Composto adicionado	IPA CV (mA)	IPA DPV (mA)
CePO₄	0,051 ± 0,0638	0,294 ± 0,221
Cistamina	0,179 ± 0,0548	0,422 ± 0,0791
Glutaraldeído	0,0305 ± 0,0506	0,268 ± 0,0734
Anticorpo	0,036 ± 0,00151	0,196 ± 0,00721
Albumina sérica bovina	0,0371 ± 0,00152	0,189 ± 0,0101
Antígeno	0,0355 ± 0,000231	0,205 ± 0,0229

Tabela 3. Médias e desvios padrão da corrente de pico de anodização (IPA) obtidas por CV e DPV durante as etapas de adição de compostos em sensores funcionalizados com as CePO₄NPs via DMF.

Composto adicionado	IPA CV (mA)	IPA DPV (mA)
CePO₄	0,0248 ± 0,00327	0,529 ± 0,511
Cistamina	0,094 ± 0,0971	0,373 ± 0,178
Glutaraldeído	0,106 ± 0,0713	0,222 ± 0,0710
Anticorpo	0,035 ± 0,00493	0,176 ± 0,0329
Albumina sérica bovina	0,047 ± 0,0320	0,231 ± 0,0516
Antígeno	0,0195 ± 0,0196	0,181 ± 0,0187

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, observa-se uma diferença significativa nos picos de corrente de anodização (IPA) entre as amostras preparadas com APTES e DMF. Na deposição utilizando APTES, os valores de IPA em CV mostraram uma diminuição significativa após a adição de CePO₄ NPs, sugerindo que a deposição com APTES pode causar um efeito de passivação parcial na superfície do eletrodo, o que reduz a transferência de elétrons. Em contraste, o IPA em DPV apresentou um leve aumento, o que indica que, apesar do efeito de passivação, as CePO₄ NPs podem melhorar a sensibilidade na detecção nesta técnica. Por outro lado, a deposição com DMF mostrou um padrão diferente: uma redução substancial no IPA em CV, indicando uma passivação mais forte da superfície, enquanto em DPV houve um aumento significativo no IPA, sugerindo que as CePO₄ NPs depositadas com DMF podem promover uma interação mais favorável em condições de pulso diferencial. Esses resultados destacam que o método de deposição com APTES tende a oferecer maior consistência e previsibilidade na resposta eletroquímica, enquanto o DMF,

embora apresente maior variabilidade, pode oferecer vantagens em termos de sensibilidade na técnica de DPV

Por fim, para ilustrar todos os processos realizados neste trabalho, é apresentado nas Figura 15 e 16 uma visão geral dos resultados obtidos para FTIR, CV e DPV, respectivamente durante a pesquisa analisando em conjunto a construção do imunossensor bem como a etapa de detecção com o antígeno

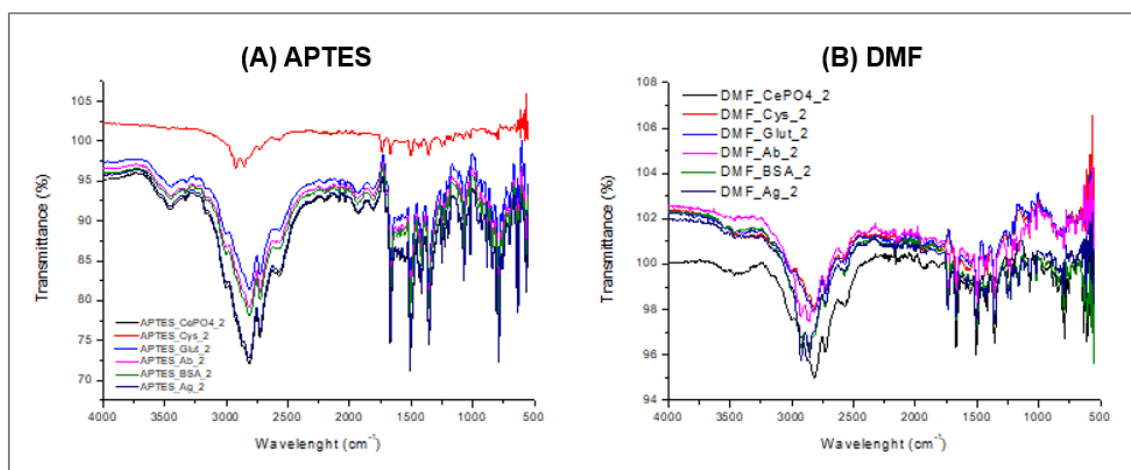


Figura 15. Espectros de FTIR para a funcionalização com (A) APTES e (B) DMF em cada etapa de adição dos compostos. Espectros adquiridos no intervalo de 4000–400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras acumuladas.

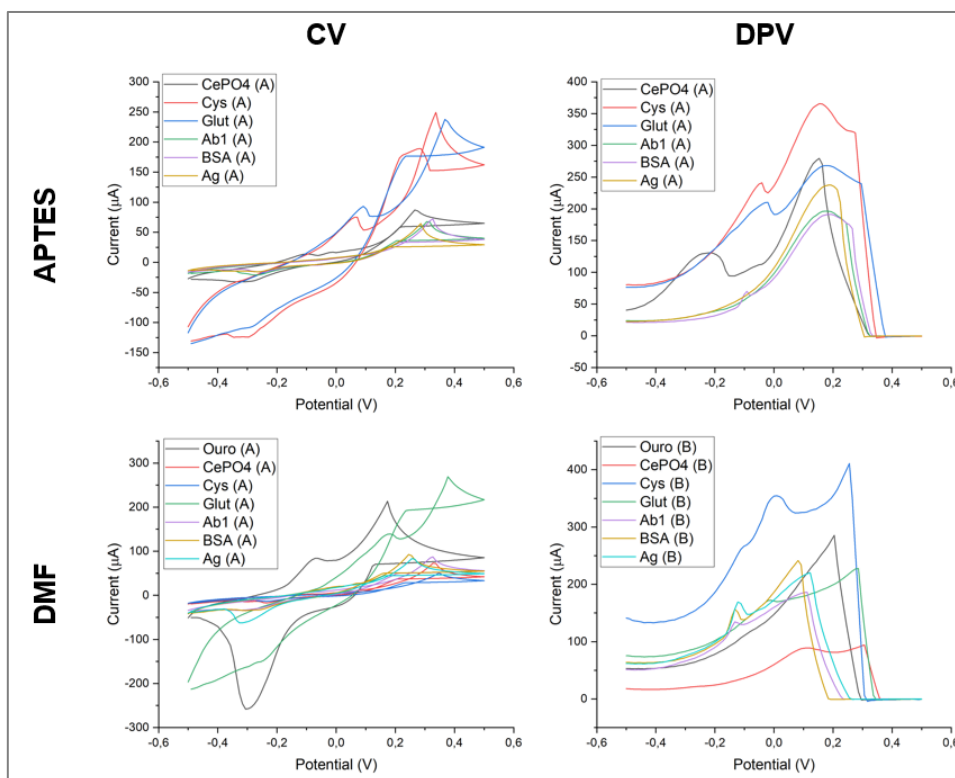


Figura 16. Voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV) para o eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO₄ utilizando APTES e DMF DMF em cada etapa de adição dos compostos. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,2 V a 0,8 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 50 mV/s.

A análise FTIR na Figura 15, revelou que não houve mudanças significativas nas bandas de absorção associadas ao APTES e ao DMF após cada etapa de adição dos compostos, indicando que a modificação superficial não afetou de maneira substancial a estrutura química detectada pelo FTIR.

Já na caracterização eletroquímica, apresentada na Figura 16, a análise das variações observadas nos gráficos de CV e DPV indica que o método de deposição afeta de maneira distinta a interação entre os compostos adicionados e a superfície do eletrodo. O método de funcionalização com APTES demonstrou proporcionar respostas mais consistentes e previsíveis, especialmente em DPV, sugerindo uma modificação mais uniforme e controlada da superfície do eletrodo. Isso se reflete em valores de IPA menos variáveis e, em muitos casos, menores desvios padrão, o que indica uma superfície que facilita a transferência de elétrons de maneira mais homogênea.

Por outro lado, o método de funcionalização com DMF apresentou maior variabilidade nas respostas, com algumas amostras exibindo valores de IPA significativamente distintos entre CV e DPV. Esse comportamento pode ser explorado para aumentar a sensibilidade do biossensor em determinadas aplicações, particularmente onde a técnica de pulso diferencial é mais adequada. Contudo, a maior variabilidade dos resultados, especialmente em DPV, sugere que o DMF pode criar uma superfície com interações menos controladas, o que pode representar um desafio em termos de reprodutibilidade.

Portanto, enquanto o APTES parece oferecer uma superfície de eletrodo que promove uma resposta eletroquímica mais estável e reprodutível, o DMF pode ser vantajoso em contextos onde se busca uma maior sensibilidade, embora com o custo potencial de maior variabilidade nos resultados. Por fim, as perspectivas futuras deste estudo incluem a exploração de outros materiais e métodos de deposição para aprimorar as investigações em andamento, bem como o aumento do número de experimentos realizados.

4. Conclusão

O desenvolvimento e a caracterização de biossensores eletroquímicos para a detecção do biomarcador CA125 representam um avanço significativo na busca por métodos mais rápidos e eficazes para o diagnóstico precoce do câncer de ovário. Neste estudo, foi abordada a funcionalização de eletrodos com CePO₄ NPs por meio de duas metodologias distintas: a funcionalização com (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) e com dimetilformamida

(DMF). Ambas as abordagens foram analisadas quanto à sua eficácia na modificação superficial dos eletrodos e na melhoria da resposta eletroquímica para a detecção do CA125.

Os resultados obtidos revelaram que o método de funcionalização com APTES proporcionou uma superfície de eletrodo com respostas eletroquímicas mais consistentes e previsíveis, especialmente em DPV. A interação uniforme e controlada promovida pelo APTES resultou em valores de IPA mais estáveis, sugerindo uma modificação eficaz e reprodutível da superfície do eletrodo. Em contraste, a funcionalização com DMF demonstrou uma maior variabilidade nos resultados, com diferenças notáveis entre as técnicas de CV e DPV. Apesar da maior variabilidade, o método de DMF mostrou potencial para aumentar a sensibilidade do biossensor, especialmente em contextos onde a técnica de pulso diferencial é mais adequada.

A análise de FTIR e das voltametrias cíclicas e de pulso diferencial evidenciou que a escolha do método de deposição de nanopartículas influencia significativamente as propriedades eletroquímicas do biossensor. A abordagem com APTES revelou-se mais estável, enquanto a funcionalização com DMF apresentou maior variabilidade, mas com potencial para melhorar a sensibilidade em determinadas condições. Esses achados destacam a importância de selecionar a metodologia de funcionalização adequada para otimizar o desempenho dos biossensores eletroquímicos na detecção de biomarcadores.

Embora os resultados obtenham progresso significativo, alguns aspectos técnicos, como a estabilidade da funcionalização e a otimização dos parâmetros de leitura, precisam de ajustes para alcançar uma aplicação clínica robusta. As perspectivas futuras incluem a exploração de novos materiais e técnicas de deposição para aprimorar ainda mais a eficácia e a reprodutibilidade desses dispositivos. A pesquisa demonstrou o potencial do uso de CePO₄ NPs no desenvolvimento de biossensores para diagnóstico precoce de câncer de ovário, mas reconhece-se a necessidade de mais experimentos e melhorias para que a tecnologia possa ser aplicada clinicamente de forma confiável. Com base nos resultados, a continuidade do desenvolvimento e a ampliação dos experimentos realizados poderão contribuir substancialmente para a evolução dos métodos de diagnóstico precoce do câncer de ovário e, consequentemente, para a redução da mortalidade associada a essa condição.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho. Também ao Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI Renato Archer) pelo suporte técnico e pelo uso das instalações para a condução de todas as análises experimentais.

Referências

1. DERCHAIN, S. F. M.; DUARTE-FRANCO, E.; SARIAN, L. O. Panorama atual e perspectivas em relação ao diagnóstico precoce do câncer de ovário. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 31, p. 159-163, 2009.
2. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 31 jul. 2024.
3. APPEL, Márcia *et al.* Rastreamento e diagnóstico do câncer de ovário. *Revista AMRIGS*, v. 53, n. 3, p. 313-318, 2009.
4. MACHADO, C. Co. *et al.* Câncer de ovário. *Acta méd.* (Porto Alegre), 2017.
5. RAZMI, N.; HASANZADEH, M. Current advancement on diagnosis of ovarian cancer using biosensing of CA 125 biomarker: Analytical approaches. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 108, p. 1-12, 2018.
6. AL-OGAIDI, I. *et al.* Detection of the ovarian cancer biomarker CA-125 using chemiluminescence resonance energy transfer to graphene quantum dots. *Chemical Communications*, v. 50, n. 11, p. 1344-1346, 2014.
7. SILVA, G. J. L. Biossensor eletroquímico baseado em nanocompósitos híbridos de polianilina-nanopartículas de ouro para diagnóstico da dengue. 2014. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão.
8. GASPAROTTO, G. *et al.* Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. *Materials Science and Engineering: C*, v. 76, p. 1240-1247, 2017.
9. PAKCHIN, P. S. *et al.* A novel electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of CA125 in ovarian cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 153, p. 112029, 2020.
10. MU, W. *et al.* Ultrasensitive and label-free electrochemical immunosensor for the detection of the ovarian cancer biomarker CA125 based on CuCo-ONSs@ AuNPs nanocomposites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 243, p. 116080, 2024.

11. OLIVEIRA *et al.* Biossensores Eletroquímicos Baseados em Peroxidase: Revisão. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 4, 759-778, 2022.
12. RIBEIRO, J. F. F. Plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificada por pontos quânticos. 2016. 89f. Dissertação (Mestrado em engenharia biomédica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
13. 10. GUERRA, Beatriz Santiago. Desenvolvimento de biossensor eletroquímico baseado em nanopartículas de óxido de zinco para imunodeteção de aflatoxina B1 em alimentos. 2021. 85f. Dissertação (Mestrado em inovação terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
14. GARCIA, D. G. *et al.* Síntese de Nanopartículas de Prata pela Técnica de Eletrodeposição para Desenvolvimento de Biossensores. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 3, p. 31130-31145, 2021.
15. ZHU, C. *et al.* Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical chemistry*, v. 87, n. 1, p. 230-249, 2015.
16. LUO, X. *et al.* Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, v. 18, n. 4, p. 319-326, 2006.
17. DANG, Y. *et al.* Selective electrochemical detection of hydroquinone and catechol at a one-step synthesised pine needle-like nano-CePO 4 modified carbon paste electrode. *RSC advances*, v. 6, n. 87, p. 83994-84002, 2016.
18. LI, M. *et al.* CePO₄/CeO₂ heterostructure and enzymatic action of D-Fe₂O₃ co-amplify luminol-based electrochemiluminescence immunosensor for NSE detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 214, p. 114516, 2022.
19. RIBEIRO, M. C. Uso de eletrodos de diamante na eletrooxidação de etanol. 2004. 103f. Dissertação (Mestrado em físico-química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
20. MODKOVSKI, T. A. Adsorção e biodegradação de corantes de efluente têxtil utilizando partículas magnéticas e lacase. 2020. 95f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia ambiental - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.
21. QUARESMA, L. J. B. Desenvolvimento de sensor piezorresistivo nanoestruturado impresso em 3D. 2023. 115f. Dissertação (Mestrado em ciência e engenharia de materiais) - Universidade Federal do Pará, Ananindeua.

22. CAMPOS, A. M. Utilização de sensores eletroquímicos à base de sílica mesoporosa contendo grafeno para a análise de bisfenol. 2015. 46f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em química) – Universidade de São Paulo, São Carlos.
23. NASIR, T. *et al.* Electrografting of 3-aminopropyltriethoxysilane on a glassy carbon electrode for the improved adhesion of vertically oriented mesoporous silica thin films. *Langmuir*, v. 32, n. 17, p. 4323-4332, 2016.
24. NOR, M. N *et al.* Self-assembled iron oxide nanoparticle-modified APTES-ITO electrode for simultaneous stripping analysis of Cd (II) and Pb (II) ions. *ACS omega*, v. 7, n. 4, p. 3823-3833, 2022.
25. AMARAL, E. M. F. *et al.* Sensores Eletroquímicos e Biossensores: Seus Princípios Básicos de Funcionamento e Algumas Aplicações: Princípios básicos sobre sensores eletroquímicos e biossensores. *Revista Virtual de Química*, v. 15, n. 3, 2023.

.