

Estratégias de Funcionalização de Eletrodos para Detecção Eletroquímica do Biomarcador de câncer de ovário CA125.

Gabriel Marchezine Araujo Alves¹, Agnes Nascimento Simões¹, Talita Mazon¹

{gabriel.alves, agnes.simoes, talita.mazon}@cti.gov.br

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

Abstract. *The CA125 biomarker is essential for the early diagnosis of ovarian cancer; however, conventional detection methods are time-consuming and lack sensitivity. This study aimed to develop a sensitive electrochemical biosensor for CA125 detection using CePO₄ nanoparticles (CePO₄ NPs). Gold electrodes were functionalized with CePO₄ NPs through two methods: (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and dimethylformamide (DMF). The APTES method demonstrated superior NP adhesion, producing more intense and stable redox signals, as confirmed through cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) analyses. The developed biosensor is promising for CA125 detection, with potential for clinical application, provided that functionalization uniformity and signal stability are further optimized.*

Resumo. *O biomarcador CA125 é fundamental para o diagnóstico precoce do câncer de ovário, porém, os métodos de detecção convencionais são demorados e apresentam baixa sensibilidade. Este estudo teve como objetivo desenvolver um biossensor eletroquímico sensível para a detecção de CA125 utilizando nanopartículas de CePO₄. (CePO₄ NPs) Eletrodos de ouro foram funcionalizados com CePO₄ NPs por meio de dois métodos: (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) e dimetilformamida (DMF). O método com APTES demonstrou melhor adesão das NPs, produzindo sinais redox mais intensos e estáveis, conforme confirmado pelas análises de voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV). O biossensor desenvolvido é promissor para a detecção de CA125, com potencial para aplicação clínica, desde que sejam otimizadas a uniformidade da funcionalização e a estabilidade do sinal.*

1. Introdução

O câncer de ovário é uma das neoplasias ginecológicas mais agressivas e letais, ocupando a segunda posição entre os cânceres ginecológicos mais comuns, sendo superado apenas pelo câncer de colo do útero [1][2]. No Brasil, estima-se que houve 6.650 novos casos da doença em 2020, evidenciando a relevância desse problema de saúde pública. A alta taxa de mortalidade está associada ao diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas iniciais são vagos e inespecíficos, resultando em diagnósticos em estágios avançados. Estudos indicam que, quando detectado precocemente, em estágio I, a taxa de sobrevida em cinco anos pode alcançar 94%; entretanto, apenas cerca de 30% dos casos são diagnosticados em estágios iniciais. Assim, a necessidade de métodos de diagnóstico mais rápidos e sensíveis para detecção precoce é essencial [2][1][3].

O biomarcador CA125, uma glicoproteína expressa em altas concentrações nas células de câncer de ovário, é o principal parâmetro utilizado para a detecção e o monitoramento da doença. Embora amplamente utilizado, o CA125 apresenta limitações, especialmente em estágios iniciais, onde a sensibilidade ainda é insuficiente para a detecção confiável do câncer [1]. Os métodos convencionais de detecção de CA125, como os ensaios imunológicos, são geralmente caros, demorados e requerem infraestrutura laboratorial sofisticada, o que dificulta sua aplicação em larga escala e em ambientes com recursos limitados [4].

Diante desses desafios, os biossensores eletroquímicos destacam-se como uma alternativa inovadora e promissora para a detecção de biomarcadores como o CA125. Esses dispositivos analíticos combinam um componente biológico, como anticorpos ou enzimas, com um transdutor eletroquímico, oferecendo vantagens significativas como alta sensibilidade, rapidez de resposta, baixo custo e simplicidade de produção. Tais características tornam os biossensores eletroquímicos particularmente úteis para diagnósticos em ambientes clínicos, triagens de populações em risco e em regiões remotas onde o acesso a laboratórios é limitado [4][5][6].

Avanços recentes na área de biossensores incluem o uso de nanopartículas (NPs), que permitem a amplificação de sinais eletroquímicos e melhoram a sensibilidade dos sensores, permitindo a detecção de biomarcadores em concentrações muito baixas. No caso deste estudo, as nanopartículas de CePO_4 foram escolhidas por suas propriedades redox, estabilidade e alta área superficial, características que favorecem a interação com o biomarcador e melhoram o desempenho do sensor. Para otimizar a funcionalização do eletrodo e melhorar a adesão das NPs, foram testados dois métodos: funcionalização com (3-aminopropil)triethoxysilano (APTES) e com dimetilformamida (DMF), ambos visando melhorar a estabilidade e reprodutibilidade do biossensor [7].

Este trabalho explora a construção e caracterização inicial de um biossensor eletroquímico para detecção do CA125, com potencial aplicação no diagnóstico precoce do câncer de ovário.

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.

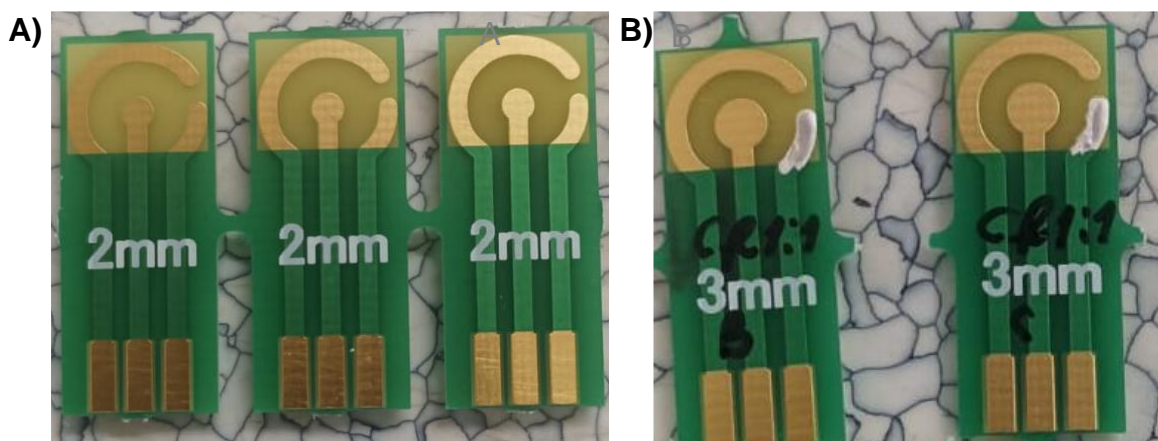


Figura 1. Bases sensoras miniaturizadas utilizadas na pesquisa: (a) limpas e (b) após deposição de tinta de prata/cloreto de prata no eletrodo de referência.

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).

2.2.1. Funcionalização com APTES

Para a funcionalização com APTES, 0,005g CePO_4 foram adicionados a uma solução de APTES 10% com volume de 15 ml que foi regulada com HCl 1M para pH 4. O valor do pH foi conferido com papel indicador de pH. Após o ajuste de pH, a solução foi agitada por 2 horas em aquecimento a 70°C em uma chapa de aquecimento com agitador magnético. A solução foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente, e então armazenada. A funcionalização do eletrodo com essa solução foi realizada depositando 10uL no eletrodo de trabalho, a seguir, as amostras foram secas em estufa a 100°C durante 24 h (overnight).

2.2.2. Funcionalização com DMF

Para a funcionalização com DMF, 0,002g de CePO_4 junto com 5% de sua massa em PVDF foram adicionados a 1 ml de DMF em um microtubo eppendorf, após a homogeneização da solução, a funcionalização do eletrodo com essa solução foi realizada depositando 10uL no eletrodo de trabalho e a seguir, as amostras foram secas em estufa a 100°C durante 24 h (overnight).

2.3. Modificação do Eletrodo

2.3.1 Imunosensor

Após a funcionalização com as nanopartículas, foi adicionado 7uL de uma solução de glutaraldeído 2,5%, utilizado como base de ligação para o anticorpo CA125, agindo por 45 min. Decorrido esse tempo, o sensor foi lavado com um jato de PBS por 3 segundos e levado a estufa a 100°C por 15 minutos.

Em seguida, foram adicionados 7 μL de anticorpo primário diluído a 1:1000 ao eletrodo, e a incubação foi realizada em uma câmara úmida por 1 hora a aproximadamente 37°C. Posteriormente, o eletrodo foi lavado novamente com PBS para remover anticorpos não ligados.

2.4. Caracterização

2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica dos eletrodos foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para verificar a deposição e distribuição das nanopartículas de CePO_4 na superfície dos eletrodos de trabalho, funcionalizados pelos métodos APTES e DMF. A análise foi conduzida no modo de alta resolução, com o objetivo de observar a adesão, dispersão e uniformidade das nanopartículas, aspectos fundamentais para o desempenho do biossensor.

2.4.2 Eletroquímico

Adicionalmente, foram realizadas caracterizações eletroquímicas utilizando o potenciostato Autolab com o auxílio do software Nova para avaliar a resposta eletroquímica do biossensor em cada fase do processo de modificação. A caracterização eletroquímica dos eletrodos funcionalizados foi realizada utilizando técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). O eletrólito escolhido foi uma solução de KCl 0,1 M. Na voltametria cíclica (VC) utilizou-se varredura de potencial de -0,5 V a 0,4 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 100 mV/s. e na voltametria de pulso diferencial (DPV) utilizou-se um potencial inicial de -0,5 V a 0,4 V vs Ag/AgCl também com uma taxa de varredura de 100 mV/s. Os dados obtidos foram convertidos para um formato compatível com o Microsoft Excel e analisados utilizando o software Origin (v. 2016).

3. Resultados e Discussões

3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV podem ser observadas na Figura 2.

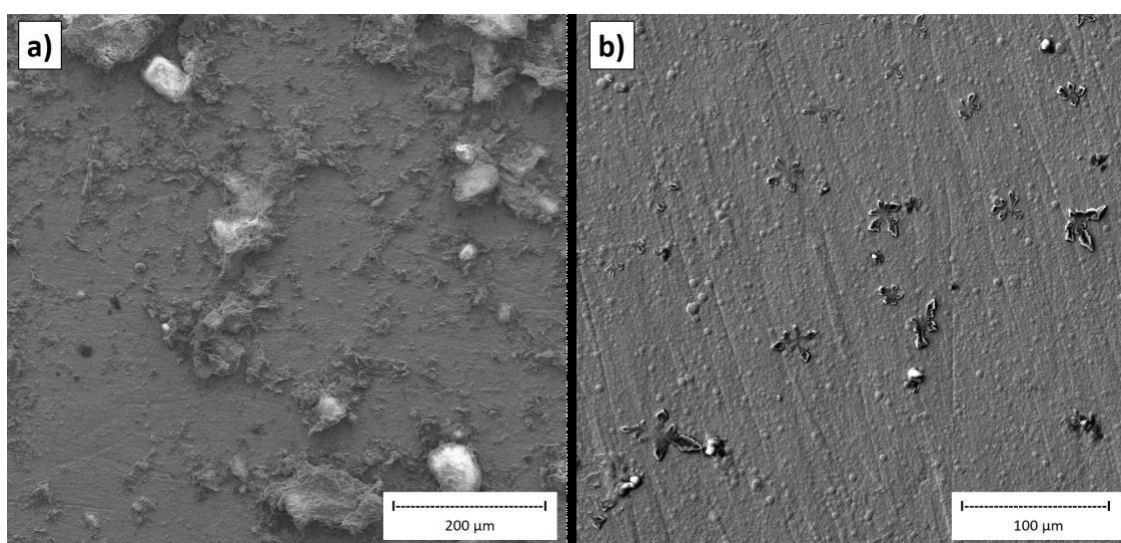


Figura 2. Imagens obtidas por MEV dos eletrodos de ouro após a deposição das nanopartículas de CePO_4 depois a caracterização eletroquímica; (A) deposição com APTES; (B) deposição com DMF.

As imagens analisadas na Figura 2 fornecem uma visão detalhada da superfície dos eletrodos após a deposição das nanopartículas de CePO_4 , funcionalizadas pelos métodos APTES e DMF. Na Figura 2A, observa-se que a funcionalização realizada com APTES resultou em uma cobertura mais densa e uniforme de nanopartículas na superfície do eletrodo. As partículas estão bem ancoradas, o que contribui para uma maior estabilidade da camada funcionalizada e para a intensificação dos sinais eletroquímicos obtidos. Em contraste, a Figura 2B mostra a superfície do eletrodo funcionalizada com DMF, onde é visível uma menor densidade de nanopartículas e uma maior exposição da superfície de ouro do eletrodo, indicando uma adesão menos efetiva.

3.2 Eletroquímico

Primeiramente foi analisado o eletrodo de ouro sem a deposição das CePO_4 NPs e os resultados podem ser observados na Figura 3.

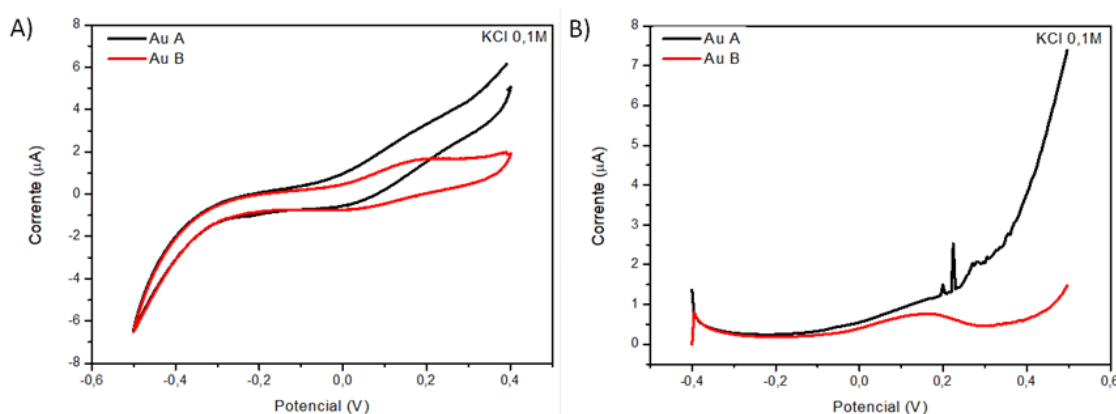


Figura 3. Voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) para o eletrodo de Au limpo, eletrólito de KCl 0,1M e velocidade de 0,1V/s. (A)curvas de voltametria cíclica; (B) curvas de voltametria de pulso diferencial. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,5 V a 0,4 V vs Ag/AgCl para CV e -0,5 V a 0,4 V vs Ag/AgCl para DPV, a uma taxa de varredura de 100 mV/s.

Primeiramente foi analisado o eletrodo de ouro sem a deposição das CePO_4 NPs. Na figura, é possível observar que o eletrodo de ouro limpo apresenta uma curva característica nas análises de CV e DPV, realizadas em eletrólito inerte de KCl 0,1M. Nos gráficos obtidos, não se observam picos significativos de oxidação ou redução, indicando que a superfície do eletrodo de ouro não possui espécies redox ativas após o processo de limpeza. Esse resultado confirma a eficiência da preparação do eletrodo, garantindo que não há

interferentes residuais que possam afetar as etapas subsequentes de funcionalização e caracterização.

A seguir, foram analisadas as características eletroquímicas do sensor com a deposição das CePO₄ NPs pelos dois métodos propostos: APTES e DMF. O resultado está disposto na Figura 4.

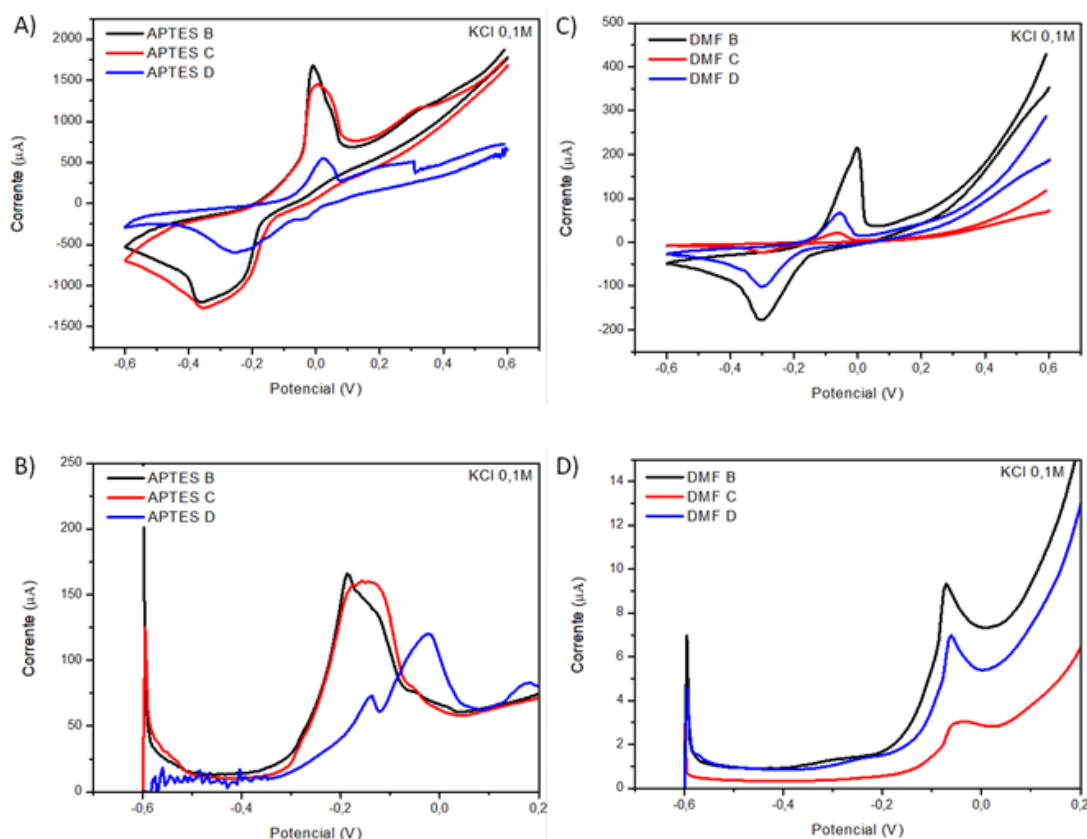


Figura 4. Voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial com funcionalização de nanopartículas de CePO₄. (A) Voltametria cíclica com APTES; (B) Voltametria de pulso diferencial com APTES; (C) Voltametria cíclica com DMF; (D) Voltametria de pulso diferencial com DMF. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,6 V a 0,6 V vs Ag/AgCl, a uma taxa de varredura de 100 mV/s.

Na análise por VC, tanto para a deposição realizada com APTES como por DMF, Figura 4a e Figura 4c respectivamente, pode-se observar um sinal de oxidação (0,05 V) e redução (-0,29 V). Além disso, na análise por DPV Figura 4b e 4d também foi possível observar o sinal de oxidação em -0,18V também para os dois tipos de funcionalização. Nessas análises foi utilizado como eletrólito o KCl 0,1M, ou seja, um eletrólito inerte, portanto, a partir desse resultado, pode-se inferir que os sinais obtidos são referentes à oxidação e redução do cério presente nas nanopartículas

A partir dos resultados apresentados nas Figuras 2 e 4, pode-se concluir que a deposição das nanopartículas de CePO_4 utilizando o método de funcionalização com APTES é mais eficaz do que a deposição com DMF. Na Figura 4, que mostra as curvas de voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV) para ambas as técnicas, observa-se que os eletrodos funcionalizados com APTES exibem sinais redox mais intensos e reprodutíveis, indicando uma maior eficiência na transferência de carga. Esse comportamento sugere que as nanopartículas estão melhor ancoradas à superfície do eletrodo, permitindo uma interação eletroquímica mais consistente.

A análise por MEV na Figura 2 confirma essa observação: enquanto o eletrodo funcionalizado com APTES apresenta uma cobertura densa e uniforme de nanopartículas, o eletrodo tratado com DMF mostra uma distribuição menos homogênea, com áreas expostas da superfície de ouro. Essa diferença na aderência e na uniformidade das nanopartículas é um fator crucial para o desempenho eletroquímico do biossensor, uma vez que uma camada uniforme proporciona uma área de superfície maior e mais estável para a detecção do biomarcador CA125. Portanto, a partir desse ensaio, os testes realizados a seguir foram feitos utilizando a deposição pelo método APTES.

Em geral, nos ensaios realizados anteriormente, pode-se observar que dentro de um mesmo ensaio não foi possível obter resultados totalmente reprodutíveis. A fim de verificar se a heterogeneidade dos resultados seria influência da lavagem dos sensores, foram realizados testes de lavagem com PBS, para analisar a sua interferência no sinal. Então, afim de avaliar esse parâmetro foram aplicados dois métodos para lavagem do biossensor, i) com jato de PBS e ii) com imersão em PBS. Ambas as amostras imediatamente após a lavagem foram deixadas em estufa a 100°C durante 15 minutos antes da caracterização eletroquímica. Os resultados obtidos desses ensaios estão dispostos na Figura 5.

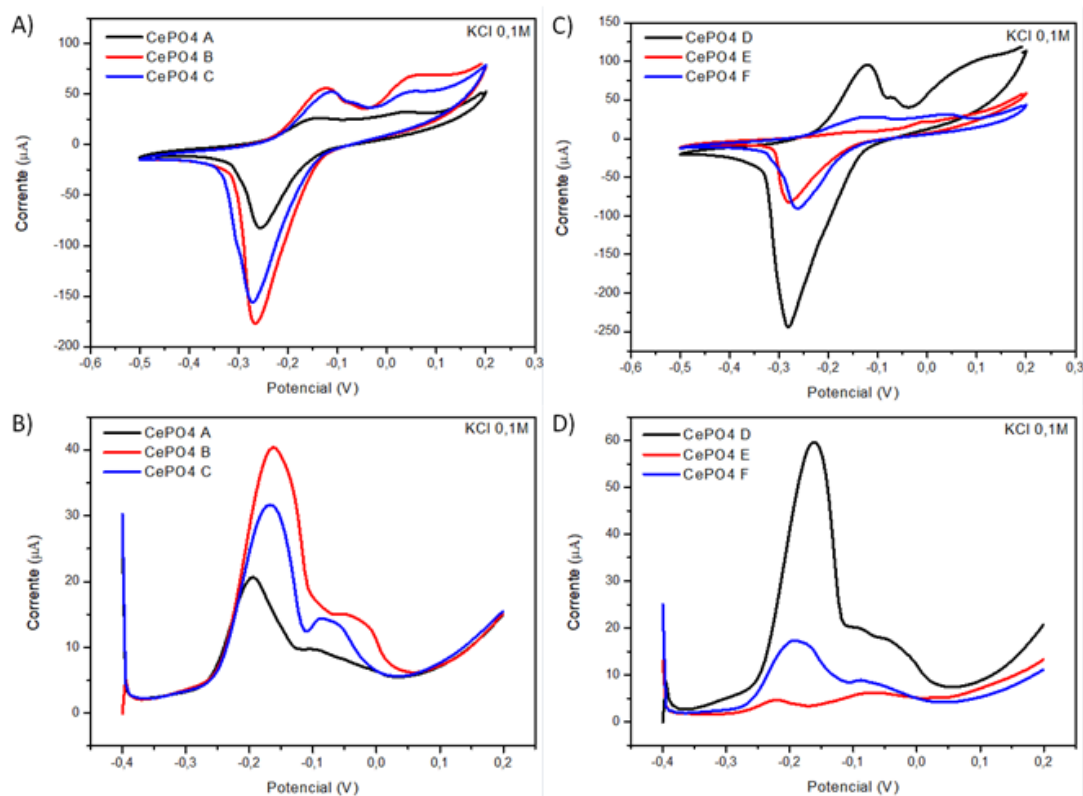


Figura 5. Voltametria cíclica (CV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) de nanopartículas de CePO₄ com 2 métodos de lavagem com PBS. (A) Voltametria cíclica (CV) com lavagem com jato de PBS; (B) Voltametria de pulso diferencial (DPV) com lavagem com jato de PBS; (C) Voltametria cíclica (CV) com lavagem por imersão em PBS; (D) Voltametria de pulso diferencial (DPV) com lavagem por imersão em PBS. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,5 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para CV e de -0,4 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para DPV, a uma taxa de varredura de 100 mV/s.

Nos gráficos da Figura 5, as amostras a, b, c foram lavadas com jato de PBS e as amostras d, e e f lavadas por imersão em PBS. Para ambas as técnicas pode-se observar que as amostras que foram lavadas com jato de PBS apresentaram uma maior reprodutibilidade, demonstrando que de fato o método de lavagem pode influenciar na reprodutibilidade das amostras; também que o método por jato é o mais indicado para prosseguir com as análises.

Definido o método de deposição das CePO₄ NPs, bem como o melhor método de lavagem, pode-se dar sequência na construção do imunossensor.

O próximo passo é a modificação do eletrodo contendo as CePO₄ NPs com glutaraldeído que é o agente responsável pela ligação com o anticorpo CA125. As amostras com essa modificação foram analisadas por VC e DPV e os resultados podem ser observados na Figura 6.

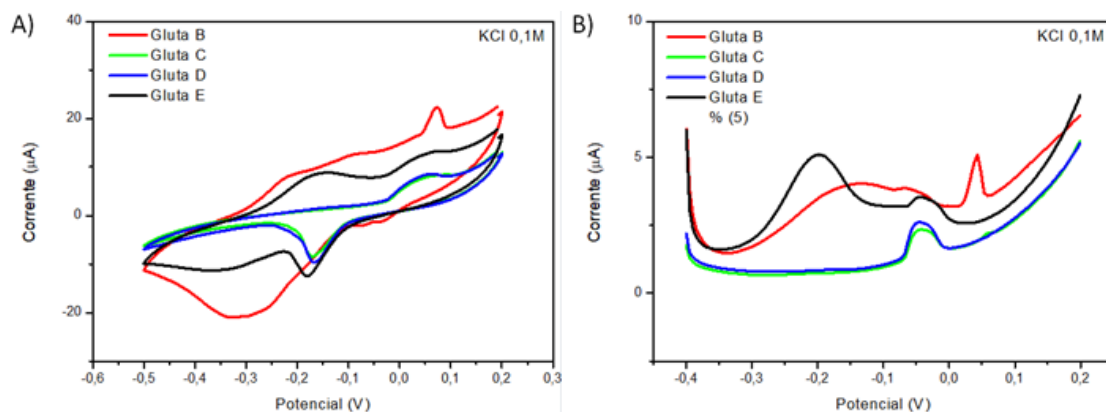


Figura 6. Resultados de voltametria cíclica com adição de compostos. (A) Voltametria cíclica (CV) Gluta; (B) Voltametria de pulso diferencial (DPV) Gluta. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,5 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para CV e de -0,4 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para DPV, a uma taxa de varredura de 100 mV/s.

Após a adição do glutaraldeído, é possível observar que para ambas as técnicas foi observado uma redução na corrente obtida quando comparado aos eletrodos modificados com as CePO₄ NPs apenas. Esse fenômeno é esperado, uma vez que com a adição de compostos na superfície do eletrodo, a transferência de carga é dificultada na interface eletrodo/solução, diminuindo assim o fluxo de elétrons e consequentemente a corrente obtida.

O próximo passo a ser realizado então, é a deposição do anticorpo que é o elemento responsável pelo reconhecimento do antígeno e consequente detecção desejada. Novamente em triplicata foram preparadas novas amostras, desta vez contendo o anticorpo CA125, que foi preparado no eletrodo contendo as CePO₄ NPs e glutaraldeído. Os ensaios foram caracterizados por VC e DPV e os resultados dispostos na Figura 7.

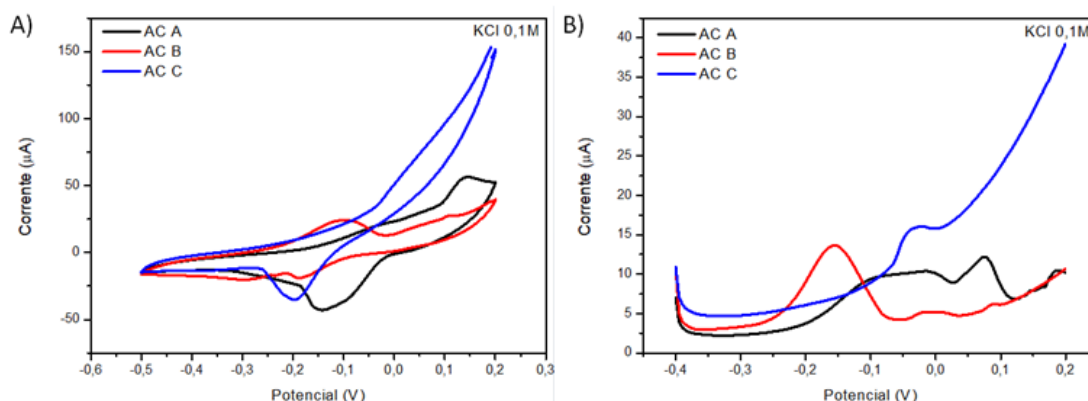


Figura 7. Voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV) do anticorpo CA125. (A) Voltametria cíclica (CV). (B) Voltametria de pulso diferencial (DPV). As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,5 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para CV e de -0,4 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para DPV, a uma taxa de varredura de 100 mV/s

A partir dos resultados obtidos após a caracterização do imunossensor, pode-se observar assim como no resultado com glutaraldeído que houve uma diminuição da corrente, o qual pode ser explicado pelo fenômeno descrito anteriormente. Além disso, observa-se que a corrente aumentou se comparado com o ensaio realizado anteriormente. Esse fenômeno pode ter relação com a interação entre o glutaraldeído e o anticorpo que podem de alguma forma favorecer a transferência de carga nesse processo, aumentando o valor da corrente obtida.

Pode-se então comparar os resultados obtidos das análises até aqui realizadas em todas as etapas, disposto na Figura 8

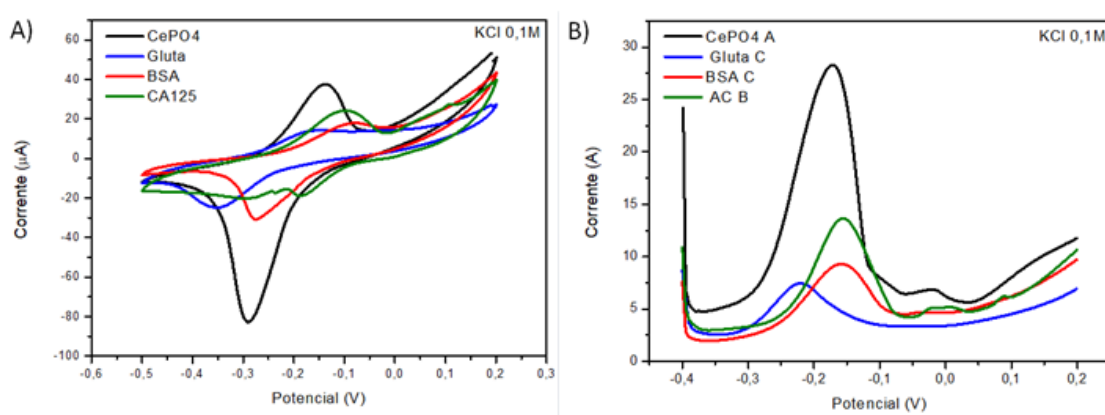


Figura 8. Voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV) para eletrodo funcionalizado com nanopartículas de CePO₄, utilizando APTES. (A) Curvas de voltametria cíclica obtidas após cada etapa de funcionalização: (1) CePO₄, (2) glutaraldeído, (3) BSA, (4) CA125; (B) Resultados de DPV para as mesmas etapas de funcionalização. As medições foram realizadas em solução de KCl 0,1 M, com varredura de potencial de -0,5 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para CV e de -0,4 V a 0,2 V vs Ag/AgCl para DPV, a uma taxa de varredura de 100 mV/s.

Na Figura 8 são representadas todas as etapas para a construção do imunossensor. Iniciando pelo CePO₄, que apresenta o maior valor de corrente. A seguir, o glutaraldeído, que serve de elemento de ancoragem para o anticorpo CA125. Analisando os sinais obtidos em cada uma das etapas, comparando-os com o sinal apenas das CePO₄ NPs, é possível inferir que as deposições realizadas estão sendo efetivas, devido a mudança do sinal de corrente obtido. Além disso, como o sinal obtido para as CePO₄ NPs é bastante diferente do imunossensor, o biossensor torna-se bastante promissor, sendo necessário ensaios utilizando o imunossensor na presença do antígeno para confirmar sua viabilidade.

4. Conclusão

O projeto alcançou avanços significativos no desenvolvimento de um biossensor para a detecção do biomarcador do câncer de ovário. Inicialmente, os métodos de funcionalização com nanopartículas de CePO₄ foram comparados, e a técnica utilizando APTES mostrou-se mais eficaz, proporcionando uma ancoragem melhor das nanopartículas na superfície do eletrodo e, conseqüentemente, um sinal eletroquímico mais intenso. A

análise detalhada das técnicas de voltametria cíclica (CV) e de pulso diferencial (DPV) revelou que os sinais observados, correspondentes aos processos redox do $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$, foram mais reprodutíveis com a funcionalização por APTES.

No desenvolvimento do imunossensor, a aplicação de camadas adicionais, como o glutaraldeído e o anticorpo CA125, afetou a intensidade do sinal eletroquímico, o que é esperado devido à diminuição da transferência de carga com cada nova camada. Os resultados sugerem que o imunossensor é sensível ao anticorpo CA125, porém, a reprodutibilidade dos sinais ainda é um desafio a ser aprimorado, possivelmente devido à distribuição das nanopartículas e do anticorpo no eletrodo.

Em resumo, o imunossensor proposto é promissor para a detecção do biomarcador CA125, porém melhorias na uniformidade da funcionalização e estratégias para otimizar a estabilidade do sinal são recomendações para estudos subsequentes, visando à viabilidade clínica do dispositivo.

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. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.