

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/03/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Pedro Costa Monteiro Pizzol

**Impedimetric Immunosensor Based on the Sensorial Platform of
Poly(o-phenylenediamine)-AuNPs and 5-methylCytosine Antibody**

Presidente Prudente

2025

Pedro Costa Monteiro Pizzol

Impedimetric Immunosensor Based on the Sensorial Platform of Poly(o-phenylenediamine)-AuNPs and 5-methylCytosine Antibody

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Monteiro Seraphim

Presidente Prudente

2025

P695i	Pizzol, Pedro Costa Monteiro Impedimetric Immunosensor Based on the Sensorial Platform of Poly(o-phenylenediamine)-AuNPs and 5-methylCytosine Antibody / Pedro Costa Monteiro Pizzol. -- São José do Rio Preto, 2025 72 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Marcos Fernando de Souza Teixeira Coorientador: Patrícia Monteiro Seraphim 1. Eletroquímica. 2. Química Analítica. I. Título.
-------	---

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este estudo apresenta um avanço significativo no campo dos biossensores, alinhando-se diretamente com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização Mundial da Saúde (OMS), particularmente no que diz respeito ao ODS 3, que visa assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades. A detecção precoce e precisa de alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, tem o potencial de revolucionar o diagnóstico e o monitoramento de doenças complexas, como o câncer, contribuindo para a redução da mortalidade prematura por doenças não transmissíveis (meta 3.4 dos ODS). A plataforma desenvolvida, baseada em um nanocompósito de polímero π -conjugado e nanopartículas metálicas, oferece uma alternativa eficiente, sensível, seletiva, portátil e de baixo custo para a detecção de biomarcadores epigenéticos. Esse método pode ser particularmente impactante em ambientes com recursos limitados, como unidades de atenção primária à saúde, promovendo equidade no acesso a diagnósticos avançados (ODS 10 - Redução das Desigualdades).

A utilização da espectroscopia de impedância eletroquímica, combinada com a imobilização de um único anticorpo específico (anti-5-metilcitosina), simplifica o processo de análise, reduzindo custos e tempo, enquanto mantém alta sensibilidade e seletividade. Essa abordagem inovadora pode impulsionar o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis e acessíveis, alinhando-se ao ODS 9, que prevê a construção de infraestruturas resilientes, promoção da industrialização inclusiva e sustentável, e o fomento à inovação. Além disso, o uso de oxigênio como mediador redox elimina a necessidade de reagentes adicionais, reduzindo custos e impactos ambientais, o que contribui para o ODS 12, que trata do consumo e produção responsáveis.

Ao possibilitar a detecção precoce de doenças e o monitoramento eficaz de tratamentos, essa pesquisa também apoia o ODS 17, que enfatiza parcerias e colaborações para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras. A combinação de técnicas avançadas e materiais acessíveis posiciona o imunossensor como uma ferramenta promissora para aplicações práticas em diagnósticos clínicos e pesquisas epigenéticas, contribuindo para o avanço da saúde global e o cumprimento das metas estabelecidas pela OMS.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study represents a significant advancement in the field of biosensors, directly aligning with the Sustainable Development Goals (SDGs) of the World Health Organization (WHO), particularly SDG 3, which aims to ensure healthy lives and promote well-being for all at all ages. The early and accurate detection of epigenetic changes, such as DNA methylation, has the potential to revolutionize the diagnosis and monitoring of complex diseases, such as cancer, contributing to the reduction of premature mortality from non-communicable diseases (target 3.4 of the SDGs). The developed platform, based on a π -conjugated polymer nanocomposite and metallic nanoparticles, offers an efficient, sensitive, selective, portable, and low-cost alternative for the detection of epigenetic biomarkers. This method can be particularly impactful in resource-limited settings, such as primary healthcare units, promoting equity in access to advanced diagnostics (SDG 10 - Reduced Inequalities).

The use of electrochemical impedance spectroscopy, combined with the immobilization of a specific antibody (anti-5-methylcytosine), simplifies the analysis process, reducing costs and time while maintaining high sensitivity and selectivity. This innovative approach can drive the development of sustainable and accessible technologies, aligning with SDG 9, which calls for building resilient infrastructure, promoting inclusive and sustainable industrialization, and fostering innovation. Furthermore, the use of oxygen as a redox mediator eliminates the need for additional reagents, reducing costs and environmental impacts, thereby contributing to SDG 12, which focuses on responsible consumption and production.

By enabling early disease detection and effective treatment monitoring, this research also supports SDG 17, which emphasizes partnerships and collaborations for the development of innovative technologies. The combination of advanced techniques and accessible materials positions the immunosensor as a promising tool for practical applications in clinical diagnostics and epigenetic research, contributing to the advancement of global health and the achievement of the goals established by the WHO.

Pedro Costa Monteiro Pizzol

Impedimetric Immunosensor Based on the Sensorial Platform of Poly(o-phenylenediamine)-AuNPs and 5-methylCytosine Antibody

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Química.

Data da defesa: 07/03/2025

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira
UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologia - Campus de Presidente Prudente

Prof. Dr. Silvania Lanfredi
UNESP – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Campus de Presidente Prudente

Prof. Dr. Ronaldo Spezia Nunes
UNESP – Faculdade de Engenharia e Ciências de Guaratinguetá

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador e grande amigo, Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira, por acreditar em mim e por sua contribuição inestimável no desenvolvimento deste trabalho. Pelos momentos de amizade e pelas conversas enriquecedoras. Por me ajudar a me tornar uma pessoa melhor, um profissional mais capacitado e um futuro pesquisador mais preparado.

À Profa. Dra. Patrícia M. Seraphim, pela sua valiosa contribuição para este trabalho e por compartilhar seus conhecimentos, enriquecendo minha formação e pesquisa.

À Julia Furini Alquati, minha “amora” e companheira em todos os momentos. Sua presença, apoio e carinho são essenciais e representam minha maior motivação para continuar seguindo em frente. Sinto-me extremamente privilegiado e orgulhoso por ter você ao meu lado.

Aos meus pais, Ana e Renilton, e ao meu irmão, Cauê, alicerces essenciais da minha vida, expresso minha eterna gratidão por todo o amor, apoio e dedicação que sempre me ofereceram. Sei que nada disso seria possível sem o incentivo constante e a confiança que vocês depositaram em mim ao longo dessa jornada.

Ao Miquéias de Lima Portugal, por ter me acolhido com tanto carinho durante todos esses anos de graduação e mestrado, por estar ao meu lado nos momentos de dificuldade e por todas as conversas e risadas que tornaram essa jornada mais leve e especial. Sua amizade e apoio foram fundamentais para mim.

Aos colegas do laboratório GPES, Heitor, Masiero, Vinicius, Manoela, João e Arthur, pelo acolhimento, pelas conversas enriquecedoras e pelo apoio durante esses dois anos.

Aos meus grandes amigos João Pedro Gomes Balanco e Vinícius Freitas. Por estarem presentes na minha vida há mais de uma década. Apesar de seguirmos caminhos completamente diferentes, nunca perdemos o amor, a amizade e o carinho que nos unem. Obrigado por serem parte essencial da minha história.

À minha família de Campo Grande, Sorriso, Nova Esperança e Tietê, pelo imenso amor e carinho que sempre me deram. Sinto-me privilegiado por tê-los ao meu lado durante todos esses anos.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta conquista, meu mais profundo agradecimento. Esta dissertação não é apenas minha, mas de todos que estiveram comigo nessa trajetória. Obrigado por fazerem parte desta história.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O avanço da pesquisa e desenvolvimento de relações entre o DNA metilado e a progressão de processos neoplásicos proporcionaram a elaboração de novas metodologias para a detecção da metilação das bases nitrogenadas e, consequentemente, o estudo do mecanismo epigenético da modulação de proteínas. O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um dispositivo baseado em um nanocompósito de nanopartículas de ouro (AuNPS) encapsulado em poli(o-fenilenodiamina) para o sensoriamento impedimétrico do nível global de DNA metilado em células. A plataforma sensorial foi construída por eletropolimerização de etapa única em uma solução contendo o monômero 1,2-fenilenodiamina e ácido cloroáurico sobre a superfície de um eletrodo circular impresso de ouro (BVT Technologies), demonstrando um possível encapsulamento de nanopartículas metálicas pela cadeia polimérica, apresentando uma maior área ativa e menor tempo de relaxação e maior sensibilidade frente ao O_2 . A plataforma foi construída se baseando na utilização de oxigênio como mediador redox, sem a necessidade de adição de demais mediadores redox. A elaboração do imunossensor se deu pela imobilização do anticorpo 5-metilcitosina (Ab-5-mC) na superfície do dispositivo revestido com pontos de polímero-AuNPs. Cada etapa da construção do imunossensor foi analisada a partir da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, permitindo avaliar os fenômenos interfaciais da plataforma, a partir de uma investigação mais detalhada das características e propriedades eletroquímicas. O mecanismo de resposta do sensor foi baseado nas alterações dos valores de impedância do sistema pela interação do analito 5-metilcitosina (5-mC) em solução tampão fosfato com o anticorpo sobre rede sensível pi-conjugada do nanocompósito. Por fim, verificou-se o desempenho analítico do imunossensor de poli(o-FD)-AuNPs que apresentou um limite de detecção para impedância imaginária e absoluta de $1,73 \text{ pg mL}^{-1}$ e $1,18 \text{ pg mL}^{-1}$, respectivamente. O imunossensor apresentou um desempenho sensível e satisfatório para detecção de DNA metilado.

Palavras-chave: nanocompósito de ouro; sensor impedimétrico; DNA metilado.

ABSTRACT

Advances in research and development of relation between methylated DNA and the progression of neoplastic processes have led to the development of new methodologies for the detection of methylation of nitrogenous bases and, consequently, the study of the epigenetic mechanism of protein modulation. The objective of this work was the development of a device based on a nanocomposite of gold nanoparticles (AuNPs) encapsulated in poly(o-phenylenediamine) for impedimetric sensing of the global level of methylated DNA in cells. The sensory platform was constructed by single-step electropolymerization in a solution containing the monomer 1,2-phenylenediamine and chloroauric acid on the surface of a circular imprinted gold electrode (BVT Technologies), demonstrating a possible encapsulation of metallic nanoparticles by the polymer chain, presenting a larger active area and shorter relaxation time and greater sensitivity to O_2 . The platform was built based on the use of oxygen as a redox mediator, without the need to add other redox mediators. The immunosensor was created by immobilizing the 5-methylcytosine antibody (Ab-5-mC) on the surface of the device coated with polymer-AuNPs dots. Each stage of the construction of the immunosensor was analyzed using electrochemical impedance spectroscopy technique, allowing the interfacial phenomena of the platform to be evaluated, based on a more detailed investigation of the electrochemical characteristics and properties. The sensor's response mechanism was based on changes in the system's impedance values due to the interaction of the analyte 5-methylcytosine (5-mC) in phosphate buffer solution with the antibody on the sensitive pi-conjugated network of the nanocomposite. Finally, the analytical performance of the poly(o-FD)-AuNPs immunosensor was verified, which presented a detection limit of 1.73 pg mL^{-1} for imaginary impedance and 1.18 pg mL^{-1} for absolute impedance. The immunosensor presented a sensitive and satisfactory performance for detecting methylated DNA.

Keywords: gold nanocomposite; impedimetric sensor; methylated DNA.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1: Representação esquemática das principais variações do método ELISA..... 19

Figura 2: Representação da estrutura de poli(o-fenilenodiamina): (A) estrutura em anel aberto com grupos -NH_2 livres e =NH ; (b) = com estrutura em escada com grupos =N e =NH 23

CAPÍTULO 3

Figura 1: Cyclic voltammograms of the electrochemical processes..... 29

Figura 2: Morphological characterization of PoPD-AuNPs nanocomposite 34

Figura 3: Electrochemical characterization of poly(o-PD) and poly(o-PD)-AuNP nanocomposite films in 0.01 mol L^{-1} PBS solution (pH 7.4)..... 36

Figura 4: Stepwise electrochemical characterization of the immunosensor assembly using IS in 0.01 mol L^{-1} PBS solution saturated with O_2 40

Figura 5: Complex capacitance plots (C'' vs. C') showing the evolution of the immunosensor capacitive response 43

Figura 6: Electrochemical evaluation of the immunosensor response to 5-methylcytosine (5-mC) 46

Figura 7: Selectivity of the poly(o-PD)-AuNP immunosensor 49

Figura 1S: UV-Vis absorption spectra 58

Figura 2S: Scanning electron microscopy (SEM) image of the neat poly(o-phenylenediamine) electropolymerized under the same conditions as the nanocomposite film 59

Figura 3S: Optimization of reaction/incubation times 60

Figura 4S: Assessment of the inter-electrode reproducibility of the poly(o-PD)-AuNP immunosensor 61

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1.1 INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	13
CAPÍTULO 2	15
2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1.1. Câncer e DNA Metilado	16
2.1.2. Métodos de Detecção de Mutações Genéticas	17
2.1.3. Nanocompósitos de Polímeros pi-Conjugados e Ouro	21
CAPÍTULO 3	24
3.1. ARTIGO CIENTÍFICO: STUDY OF AN IMPEDIMETRIC IMMUNOSENSOR BASED ON THE SENSORIAL PLATFORM OF POLY(O-PHENYLENEDIAMINE)- AuNPS AND 5-METHYLCYTOSINE ANTIBODY.....	26
3.2. MATERIAL SUPLEMENTAR	58
CAPÍTULO 4	63
4.1. CONCLUSÕES	64
4.2. DESAFIOS FUTUROS	65
REFERÊNCIAS	67

Capítulo I

Introdução Geral e Objetivos da Dissertação

1.1 Introdução Geral e Objetivos da Dissertação

A análise e o prognóstico de doenças com alta morbimortalidade são fundamentais para o tratamento precoce e eficaz, impactando diretamente a qualidade de vida dos pacientes e a eficiência dos sistemas de saúde. Diante desse cenário, observa-se um crescente interesse no desenvolvimento de técnicas avançadas no campo da nanobiotecnologia, que permitem a investigação detalhada de sistemas biológicos e a criação de ferramentas diagnósticas mais precisas e acessíveis. Nesse contexto, os nanocompósitos, aliados a biomoléculas, emergem como uma abordagem promissora, pois possibilitam explorar as relações e propriedades físico-químicas de biosistemas de maneira inovadora. Esses materiais híbridos, que combinam propriedades únicas de nanomateriais com a funcionalidade de biomoléculas, têm viabilizado avanços significativos no desenvolvimento de sistemas de diagnóstico e prognóstico para diversas doenças.

Entre as metodologias eletroquímicas, destaca-se o uso de polímeros π -conjugados em conjunto com nanopartículas metálicas, que têm sido amplamente empregados como plataformas sensoriais. Essa combinação é particularmente vantajosa devido à facilidade de síntese por meio de eletropolimerização, além de proporcionar um ambiente ideal para a imobilização de uma ampla gama de entidades biológicas, como enzimas, proteínas, organelas, células, bactérias e DNA. A versatilidade desses materiais permite a criação de sensores altamente sensíveis e seletivos, capazes de detectar biomarcadores específicos com grande precisão.

Neste estudo, propõe-se o desenvolvimento de uma plataforma sensorial label-free, baseada em um nanocompósito composto por poli(o-fenilenodiamina) (poli(o-FD)) e nanopartículas de ouro (AuNPs), em conjunto com o anticorpo Ab-5-mC e o oxigênio dissolvido como sonda redox, para a detecção e quantificação global de 5-metilcitosina (5-mC). A 5-mC é um importante biomarcador epigenético, cuja detecção e quantificação são essenciais para o entendimento de processos biológicos e patológicos, como o câncer e outras doenças relacionadas a alterações epigenéticas. O imunossensor desenvolvido opera com base na resposta impedimétrica do sistema, que é influenciada pelo aumento da resistência à difusão do oxigênio devido à formação de uma barreira física após a interação antígeno-anticorpo. Essa interação ocorre diretamente na superfície do dispositivo, eliminando a necessidade de anticorpos secundários ou enzimas, o que simplifica o processo, reduz custos e aumenta a eficiência do sistema. Explorou-se o potencial de miniaturização do dispositivo, investigando-se a viabilidade de sua integração em sistemas portáteis e de baixo custo.

A viabilidade dessa abordagem é garantida pela resposta seletiva e sensível do polímero condutor à reação de redução do oxigênio dissolvido. Além disso, o método de eletropolimerização por etapa única se destaca por facilitar o encapsulamento de nanoclusters de ouro pelo polímero, contribuindo para o aumento da área ativa, estabilidade e sensibilidade da plataforma sensorial. A combinação desses elementos resulta em um dispositivo com alto desempenho analítico, capaz de operar em escalas reduzidas e com potencial para miniaturização, o que o torna adequado para aplicações portáteis e de fácil utilização.

4.1. Conclusão

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de uma plataforma sensorial fundamentada em um filme nanocompósito composto por poli(o-FD) e nanopartículas de ouro (AuNPs) encapsuladas. A síntese do material foi realizada por meio de eletropolimerização em etapa única, empregando dois substratos distintos com perfil voltamétrico estável e reproduzível. A espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para caracterizar os fenômenos interfaciais e comparar o desempenho eletroquímico dos filmes de poli(o-FD) e poli(o-FD)-AuNPs. A incorporação das nanopartículas de ouro promoveu um aumento significativo na sensibilidade, confirmado pelo cálculo da área ativa do eletrodo. A caracterização morfológica do nanocompósito, realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), que revelou a formação de nanoclusters de ouro encapsulados pela matriz polimérica condutora.

A construção do filme nanocompósito foi bem-sucedida, e a caracterização por espectroscopia de impedância eletroquímica permitiu monitorar de forma eficiente as interações e respostas em cada etapa do processo, incluindo a imobilização de glutaraldeído, anticorpos e BSA. Essa técnica também possibilitou a construção de uma curva de calibração e o cálculo dos limites de detecção do sensor com base em múltiplos parâmetros em uma única medição, destacando a versatilidade e a robustez da metodologia.

A plataforma sensorial impedimétrica desenvolvida demonstrou desempenho excepcional, com limites de detecção bastante reduzidos, o que a torna altamente sensível para aplicações analíticas. O imunossensor foi construído em um eletrodo impresso com área de trabalho de aproximadamente $0,008 \text{ cm}^2$, evidenciando sua capacidade de operação em escalas miniaturizadas. Essa característica, aliada à sua alta sensibilidade e custo-benefício, reforça seu potencial para integração em dispositivos portáteis e de fácil utilização, adequados para diagnósticos rápidos e análises in situ. A metodologia adotada dispensa o uso de anticorpos secundários ou enzimas, além de exigir baixas concentrações de reagentes e amostras, o que a torna uma alternativa economicamente viável e altamente promissora para aplicações em diagnóstico, monitoramento e análise em diversas áreas. A combinação de sensibilidade, praticidade e viabilidade econômica posiciona essa plataforma como uma ferramenta analítica de grande potencial para o futuro.

Por fim, o estudo de interferentes, utilizando as bases nitrogenadas, demonstrou a alta seletividade do imunossensor, evidenciando sua capacidade de reconhecer e se ligar especificamente ao antígeno-alvo, mesmo na presença de moléculas estruturalmente semelhantes. Essa seletividade foi comprovada pela baixa variação da resposta da plataforma (abaixo de 5%) o que reforça a eficácia e a confiabilidade do anticorpo em aplicações analíticas e diagnósticas.

4.2. Desafios Futuros

Apesar dos avanços significativos alcançados com o desenvolvimento da plataforma sensorial baseada no filme nanocompósito de poli(o-FD) e nanopartículas de ouro (AuNPs), diversos desafios persistem e devem ser abordados para maximizar o potencial do método quantitativo. Um dos principais desafios é a otimização da estabilidade e da durabilidade do nanocompósito em condições operacionais variadas, especialmente em ambientes complexos, como fluidos biológicos, onde a interferência de outras moléculas pode afetar o desempenho do sensor.

Outro desafio importante é a integração da plataforma em dispositivos portáteis, que possam ser utilizados em ambientes fora do laboratório, como em pontos de atendimento ou em locais remotos. A validação clínica da plataforma em amostras reais e diversificadas é outro passo crucial para sua adoção em diagnósticos médicos. Estudos adicionais são necessários para avaliar o desempenho do sensor em diferentes matrizes biológicas, como sangue e tecidos, e para comparar sua eficácia com métodos diagnósticos já estabelecidos. Além disso, a exploração de novos biomarcadores e a adaptação da plataforma para a detecção de outras moléculas de interesse clínico podem ampliar sua aplicabilidade.

Por fim, questões relacionadas à escalabilidade da produção e ao custo-benefício do dispositivo precisam ser abordadas para garantir sua viabilidade comercial. A redução dos custos de fabricação, o uso de materiais sustentáveis e a otimização dos processos de síntese e funcionalização do nanocompósito são aspectos essenciais para a transição da tecnologia do laboratório para o mercado. Superar esses desafios permitirá que a plataforma sensorial desenvolvida se consolide como uma ferramenta analítica inovadora, contribuindo para o avanço do diagnóstico precoce, do monitoramento de doenças e da análise em diversas áreas da saúde e da pesquisa biomédica.

REFERÊNCIAS

- A, B.; M, Del V. Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: a review. **Analytica chimica acta**, [s. l.], v. 678, n. 1, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20869498/>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- BHATTACHARJEE, R.; MORIAM, S.; UMER, M.; NGUYEN, N.-T.; SHIDDIKY, M. J. A. DNA methylation detection: recent developments in bisulfite free electrochemical and optical approaches. **The Analyst**, [s. l.], v. 143, n. 20, p. 4802–4818, 2018. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8AN01348A>. Acesso em: 28 mar. 2023.
- BHOOTRA, S.; JILL, N.; SHANMUGAM, G.; RAKSHIT, S.; SARKAR, K. **DNA methylation and cancer: transcriptional regulation, prognostic, and therapeutic perspective**, Springer, 2023.
- CHEN, C.; WANG, Z.; DING, Y.; WANG, L.; WANG, S.; WANG, H.; QIN, Y. **DNA Methylation: From Cancer Biology to Clinical Perspectives**, IMR Press Limited, 2022.
- CROUCH, A. M.; KHOTSENG, L. E.; POLHUIS, M.; WILLIAMS, D. R. **Comparative study of cyclic voltammetry with potentiometric analysis for determining formation constants for polyaminocarboxylate-metal ion complexes** *Analytica Chimica Acta*. [s.l: s.n.].
- DE LA RICA, R.; STEVENS, M. M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. **Nature Nanotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 821–824, 2012.
- DINCER, C.; BRUCH, R.; COSTA-RAMA, E.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; MERKOÇI, A.; MANZ, A.; URBAN, G. A.; GÜDER, F. **Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring**, Wiley-VCH Verlag, 2019.
- E, E.; G, C.; A, E. Electrochemical assay for determination of gluten in flour samples. **Food chemistry**, [s. l.], v. 184, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25872442/>. Acesso em: 27 abr. 2023.
- ELAHI, N.; KAMALI, M.; BAGHERSAD, M. H. **Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review**, Elsevier B.V., 2018.
- FAN, Y.; LIANG, Y.; DENG, K.; ZHANG, Z.; ZHANG, G.; ZHANG, Y.; WANG, F. Analysis of DNA methylation profiles during sheep skeletal muscle development using whole-genome bisulfite sequencing. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 21, n. 1, 2020.
- FRISO, S.; CHOI, S. W.; DOLNIKOWSKI, G. G.; SELHUB, J. A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 74, n. 17, p. 4526–4531, 2002.
- GOUIL, Q.; KENIRY, A. **Latest techniques to study DNA methylation**, Portland Press Ltd, 2019.

GUO, S.; WANG, E. **Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles**, 2007.

HE, S.; YUAN, Y.; NAG, A.; FENG, S.; AFSARIMANESH, N.; HAN, T.; MUKHOPADHYAY, S. C.; ORGAN, D. R. A Review on the Use of Impedimetric Sensors for the Inspection of Food Quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 17, n. 14, p. 5220, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/14/5220>. Acesso em: 26 mar. 2023.

HOSSAIN, T.; MAHMUDUNNABI, G.; MASUD, M. K.; ISLAM, Md. N.; OOI, L.; KONSTANTINOV, K.; HOSSAIN, M. S. Al; MARTINAC, B.; ALICI, G.; NGUYEN, N.-T.; SHIDDIKY, M. J. A. Electrochemical biosensing strategies for DNA methylation analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 94, p. 63–73, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566317301124>. Acesso em: 26 mar. 2023.

JADOUN, S.; RIAZ, U.; YÁÑEZ, J.; PAL SINGH CHAUHAN, N. **Synthesis, characterization and potential applications of Poly(o-phenylenediamine) based copolymers and Nanocomposites: A comprehensive review**, Elsevier Ltd, 2021.

JAMKHANDE, P. G.; GHULE, N. W.; BAMER, A. H.; KALASKAR, M. G. **Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications**, Editions de Sante, 2019.

JANRAO, D. M.; PATHAN, J.; KAYANDE, D. D.; MULLA, J. J. AN OVER VIEW OF POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF STABILITY CONSTANTS OF METAL COMPLEXES. **Sci. Revs. Chem. Commun**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 11–24, 2014. Disponível em: www.sadgurupublications.com

JIN, Z.; LIU, Y. **DNA methylation in human diseases**, Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan jiu suo, 2018.

K, N.; ROUT, C. S. Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 5659–5697, 2021. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0RA07800J>. Acesso em: 14 fev. 2023.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. **Nanoparticles: Properties, applications and toxicities**, Elsevier B.V., 2019.

KIZLING, M.; DZWONEK, M.; WIECKOWSKA, A.; BILEWICZ, R. **Gold nanoparticles in bioelectrocatalysis – The role of nanoparticle size**, Elsevier B.V., 2018.

KOCH, A.; JOOSTEN, S. C.; FENG, Z.; DE RUIJTER, T. C.; DRAHT, M. X.; MELOTTE, V.; SMITS, K. M.; VEECK, J.; HERMAN, J. G.; VAN NESTE, L.; VAN CRIEKINGE, W.; DE MEYER, T.; VAN ENGELAND, M. Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p.

459–466, 2018. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41571-018-0004-4>. Acesso em: 18 jan. 2023.

KWON, T.; GUNASEKARAN, S.; EOM, K. **Atomic force microscopy-based cancer diagnosis by detecting cancer-specific biomolecules and cells**, Elsevier B.V., 2019.

LAZANAS, A. C.; PRODRONIDIS, M. I. Electrochemical Impedance Spectroscopy—A Tutorial. **ACS Measurement Science Au**, [s. l.], 2022.

LEITÃO, E.; BEYGO, J.; ZESCHNIGK, M.; KLEIN-HITPASS, L.; BARGULL, M.; RAHMANN, S.; HORSTHEMKE, B. Locus-specific DNA methylation analysis by targeted deep bisulfite sequencing. Em: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] : Humana Press Inc., 2018. v. 1767p. 351–366.

LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILLNER, P. A. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Medical Microbiology and Immunology**, [s. l.], v. 209, n. 3, p. 343–362, 2020. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00430-020-00668-0>. Acesso em: 28 fev. 2023.

LI, Y.; FAN, Z.; MENG, Y.; LIU, S.; ZHAN, H. **Blood-based DNA methylation signatures in cancer: A systematic review**, Elsevier B.V., 2023.

LIU, D.; WANG, J.; WU, L.; HUANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHU, M.; WANG, Y.; ZHU, Z.; YANG, C. **Trends in miniaturized biosensors for point-of-care testing**, Elsevier B.V., 2020.

LOCKE, W. J.; GUANZON, D.; MA, C.; LIEW, Y. J.; DUESING, K. R.; FUNG, K. Y. C.; ROSS, J. P. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 10, p. 1150, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.01150/full>. Acesso em: 8 fev. 2023.

LOPES, L. C.; SANTOS, A.; BUENO, P. R. An outlook on electrochemical approaches for molecular diagnostics assays and discussions on the limitations of miniaturized technologies for point-of-care devices. **Sensors and Actuators Reports**, [s. l.], v. 4, 2022.

LU, Z.; DAI, W.; LIU, B.; MO, G.; ZHANG, J.; YE, J.; YE, J. One pot synthesis of dandelion-like polyaniline coated gold nanoparticles composites for electrochemical sensing applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 525, p. 86–96, 2018.

MARTIN, C. S.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. A new polymeric thin film by using electropolymerization: thin film of poly(phenazine-salen) obtained from 2,2'-[1,2-ethanediyldis(nitrilomethylidyne)] -bis[4-amino-phenol]. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 873, 2020.

NEZAKATI, T.; SEIFALIAN, A.; TAN, A.; SEIFALIAN, A. M. **Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications**, American Chemical Society, 2018. a.

NEZAKATI, T.; SEIFALIAN, A.; TAN, A.; SEIFALIAN, A. M. **Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications**, American Chemical Society, 2018. b.

NISHIYAMA, A.; NAKANISHI, M. **Navigating the DNA methylation landscape of cancer**, Elsevier Ltd, 2021.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; BRITO, G. A. O.; CARDOSO, C. X.; TEIXEIRA, M. F. S. **Nanocomposite materials based on electrochemically synthesized graphene polymers: Molecular architecture strategies for sensor applications**, MDPI AG, 2021.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; MONTEIRO SERAPHIM, P.; TEIXEIRA, M. F. S. Methylated DNA impedimetric immunosensor based on azo-polymer-AuNPs dots and 5-methylcytosine antibody using dissolved oxygen as a redox probe. **Electrochemistry Communications**, [s. l.], v. 136, 2022.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; OLEAN-OLIVEIRA, T.; MORENO, A. C. R.; SERAPHIM, P. M.; TEIXEIRA, M. F. S. A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption. **ACS Sensors**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 118–125, 2019. a.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; PACHECO, J. C.; SERAPHIM, P. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Synergistic effect of reduced graphene oxide/azo-polymer layers on electrochemical performance and application as nonenzymatic chemiresistor sensors for detecting superoxide anion radicals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 852, p. 113520, 2019. b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157266571930788X>. Acesso em: 27 abr. 2023.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; SERAPHIM, P. M.; PORTUGAL, M. L.; TEIXEIRA, M. F. S. A novel GLUT-4 electrochemical immunosensor based on a poly(thionine)-gold nanoparticle nanocomposite: Combining complex capacitance and dissolved oxygen to obtain an analytical signal. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 275, 2025.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on Π -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 271, p. 353–357, 2018.

PAJARES, M. J.; PALANCA-BALLESTER, C.; URTASUN, R.; ALEMANY-COSME, E.; LAHOZ, A.; SANDOVAL, J. **Methods for analysis of specific DNA methylation status**, Academic Press Inc., 2021.

PAWEŁ, K.; MAŁGORZATA, S. M. **CpG Island Methylator Phenotype—A Hope for the Future or a Road to Nowhere?**, MDPI, 2022.

PEJCIC, B.; MARCO, R. De; PARKINSON, G. The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases. **The Analyst**, [s. l.], v. 131, n. 10, p. 1079, 2006. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b603402k>. Acesso em: 27 abr. 2023.

SHARMA, N. K.; NAIN, A.; SINGH, K.; RANI, N.; SINGAL, A. Impedimetric sensors: Principles, applications and recent trends. **International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 4015–4025, 2019.

SHNOUDEH, A. J.; HAMAD, I.; ABDO, R. W.; QADUMII, L.; JABER, A. Y.; SURCHI, H. S.; ALKELANY, S. Z. Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles. Em: **Biomaterials and Bionanotechnology**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 527–612.

SKVORTSOVA, K.; STIRZAKER, C.; TABERLAY, P. **The DNA methylation landscape in cancer**, Portland Press Ltd, 2019.

SOLEYMANI, L.; LI, F. **Mechanistic Challenges and Advantages of Biosensor Miniaturization into the Nanoscale**, American Chemical Society, 2017.

TAJIK, S.; BEITOLLAHI, H.; NEJAD, F. G.; SHOAIE, I. S.; KHALILZADEH, M. A.; ASL, M. S.; VAN LE, Q.; ZHANG, K.; JANG, H. W.; SHOKOUHIMEHR, M. Recent developments in conducting polymers: applications for electrochemistry. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 62, p. 37834–37856, 2020. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0RA06160C>. Acesso em: 15 fev. 2023.

TREVIZAN, H. F.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; CARDOSO, C. X.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of a molecularly imprinted polymer for uric acid sensing based on a conductive azopolymer: Unusual approaches using electrochemical impedance/capacitance spectroscopy without a soluble redox probe. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [s. l.], v. 343, 2021.

UMOREN, S. A.; SOLOMON, M. M. **Protective polymeric films for industrial substrates: A critical review on past and recent applications with conducting polymers and polymer composites/nanocomposites**, Elsevier Ltd, 2019.

XIAO, T.; HUANG, J.; WANG, D.; MENG, T.; YANG, X. **Au and Au-Based nanomaterials: Synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications**, Elsevier B.V., 2020.

YUK, H.; LU, B.; LIN, S.; QU, K.; XU, J.; LUO, J.; ZHAO, X. 3D printing of conducting polymers. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.

ZHANG, X.; LI, G.; WANG, J.; CHU, J.; WANG, F.; HU, Z.; SONG, Z. Revisiting the Structure and Electrochemical Performance of Poly(o-phenylenediamine) as an Organic Cathode Material. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 14, n. 24, p. 27968–27978, 2022.