

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 08/03/2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

André Olean Oliveira

**Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em
nanopartículas de ouro recobertas por polímeros condutores redox para o
monitoramento de marcadores biológicos**

São José do Rio Preto

2022

André Olean Oliveira

Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de ouro recobertas por polímeros condutores redox para a determinação de marcadores biológicos

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto O. Brito

São José do Rio Preto

2022

O48d

Oliveira, André Olean

Desenvolvimento de Imunossensores Eletroquímicos Baseados em Nanopartículas de Ouro Recobertas por Polímeros Condutores Redox para a Determinação de Marcadores Biológicos / André Olean Oliveira. -- São José do Rio Preto, 2022

169 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Marcos F. S. Teixeira

Coorientadora: Gilberto O. Brito

1. Eletroquímica. 2. Química Analítica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

André Olean Oliveira

**Desenvolvimento de Imunossensores Eletroquímicos Baseados em
Nanopartículas de Ouro Recobertas por Polímeros Condutores Redox para o
Monitoramento de Marcadores Biológicos**

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira
UNESP – Campus Presidente Prudente
Orientador

Profa. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori Braz
UEL – Londrina/PR

Profa. Dra. Sonia Tomie Tanimoto
SENAI – Três Lagoas/MS

Prof. Dr. André Luiz dos Santos
UFU – Ituiutaba/MG

Profa. Dra. Silvania Lanfredi
UNESP – Campus Presidente Prudente

São José do Rio Preto
08 de março de 2022

Dedico esse trabalho para meus pais,
Maria de Fátima e Manoel.
Minha Esposa Gabriela.
E ao meu irmão Tiago.

Agradecimentos

Gostaria de iniciar dizendo que esse foi um dos melhores momentos durante a construção da presente tese. Poder destacar e agradecer pessoas especiais que estiveram envolvidas durante esse processo.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida e por me manter na fé, para sempre resistir perante os desafios, buscando sempre fazer o meu melhor.

À minha Mãe e ao meu Pai, por serem meus maiores exemplos de coragem, otimismo, fé, trabalho, união e amor. Por me ensinarem a tratar as responsabilidades com compromisso e dedicação. Por sempre estarem ao meu lado me incentivando, acalmando ou encorajando, me dando todo o apoio e suporte necessário para que eu conseguisse lutar pelos meus sonhos.

Ao meu irmão Tiago, sou igualmente grato. Por todo o apoio, amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração. Também pela incrível oportunidade de poder atuar em parceria em trabalhos científicos.

Ao Prof. Dr. Marcos F. S. Teixeira, meu grande irmão! Por todos esses anos de amizade e orientação. Por ser um exemplo de amor a ciência. Por toda confiança depositada em minha capacidade e pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho. Também, por todos seus ensinamentos, conselhos e discussões científicas, seja elas no laboratório ou em um *happy hour* com boa cerveja, contribuindo imensamente para meu desenvolvimento como pessoa, pesquisador e futuro cientista.

À Profa. Dra. Patrícia M. Seraphim, pela imensurável contribuição para este trabalho e por todos os trabalhos em parceria. Agradeço enormemente por todos esses anos de amizade. (Enfim a dívida do *cupcake* foi paga!).

Ao Prof. Dr. Celso X. Cardoso, por toda parceria e trabalhos em colaboração.

Ao Prof. Gilberto O. Brito, pelas valiosas horas em encontros online debatendo e discutindo as diferentes áreas da química. Obrigado pela amizade, orientação e contribuições científicas.

À Profa. Dra. Silvania Lanfredi, pela oportunidade de poder colaborar em um grande trabalho.

À Profa. Dra. Elen Sartori, por todas as contribuições para presente tese e pelos grandes trabalhos que tive a grata oportunidade de colaborar.

Aos amigos de laboratório GPES, Heitor, Kevin, Gabriel Masiero, Gabriel Zaia, Jaqueline, Miquéias, Natalia, Tainá e Vinicius, pelas horas trabalhadas e partilha de bons momentos acompanhadas de cafés.

Ao Me. Yuri A. Oliveira, um irmão que a ciência me deu. Por toda amizade, parceria, conselhos, descontração e por ser um exemplo de persistência e coragem.

Ao Me. Fabiano Praxedes, antigo colega de classe que durante o doutorado tornou-se companheiro de pesquisa e de reuniões (intermináveis) do Conselho de Química da Pós. Agradeço também pela disponibilidade para realização das medidas de DRX e ATR-FTIR.

Ao Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF/CEPID/FAPESP).

Aos docentes e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica da FCT – UNESP, Ana Flora, Ana Pires, Beatriz, Eduardo, Gustavo, Sérgio, Silvânia, Valdemiro e Angélica, pelo carinho e ótima convivência durante esses anos.

Aos técnicos de laboratório, Sidney, Gabriel, Marcelo e Murillo, sempre dispostos a contribuir.

Aos amigos de longa data do Ana Jacinta, em especial aos amigos Jean Yamada, Jéfferson (Pajé), Felipe Mendes, Renan Schafer, Renan (MTB), Lucas (Chicó), Vitor (Chitão), André (Dé), Giovani (Teta), Gleisson (Feio), Rafael (Rato), André (Toty), Thiago (Cagão), Alberson, Paulo (Paulinho), Rafael (Pelo), Gustavo (Mênór), João e Luiz (Luizinho), pela sincera amizade de todos esses anos.

À minha segunda família, Paulo, Rosimeire e Eduarda, pelo imenso amor e carinho com o qual eu sempre fui e sou recebido. Sou grato por todo apoio e por fazerem com que eu me sinta como um filho.

À minha esposa Gabriela. Que alegria poder retornar a uma página de agradecimento e atualizá-la de namorada a cônjuge. Agradeço por todos esses anos de companheirismo, estando ao meu lado em todos os momentos dessa minha caminhada. Por sempre acreditar em mim e em meus sonhos. Obrigado por todo apoio e incentivo. Eu não teria conseguido sem você ao meu lado.

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

Informações Curriculares

Me. André Olean-Oliveira

Data de Nascimento: 17/11/1992

olean.oliveira.a@gmail.com

Departamento de Química e Bioquímica

Faculdade de Ciências e Tecnologia-Universidade Estadual Paulista (FCT/UNESP)

Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

Graduação

2016	Química	UNESP – Presidente Prudente-SP/Brasil
------	---------	---------------------------------------

Pós-graduação

2019	Mestrado em Química	UNESP - São José do Rio Preto-SP/Brasil
------	---------------------	---

2022	Doutorado em Química	UNESP - São José do Rio Preto-SP/Brasil
------	----------------------	---

Produção

Capítulo de Livro

1. A. Olean-Oliveira, Marcos F. S. Teixeira, Camila F. Pereira, Camila K. S. Matsu, Eroína F. Santiago, Nátaly M. Vergílio, Patrik D. S. Gois, Danielle C. Santos, Chemistry Show: The Use of Demonstrative Experiments for the Dissemination of Science in the Environment Week FCT/UNESP, in: C. Acadêmica (Ed.), NÚCLEOS ENSINO DA UNESP Artig. 2015, São Paulo, 2015: p. 590.

Publicações

h-index 6 (Web of Science 02/2022)

- [1] A. Olean-Oliveira, P. Monteiro Seraphim, M.F.S. Teixeira, Methylated DNA impedimetric immunosensor based on azo-polymer-AuNPs dots and 5-methylcytosine antibody using dissolved oxygen as a redox probe, *Electrochem. Commun.* 136 (2022) 107242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.elecom.2022.107242>.
- [2] A. Olean-Oliveira, G.A. Oliveira Brito, C.X. Cardoso, M.F.S. Teixeira, Nanocomposite Materials Based on Electrochemically Synthesized Graphene Polymers: Molecular Architecture Strategies for Sensor Applications, *Chemosens.* 9 (2021). <https://doi.org/10.3390/chemosensors9060149>.
- [3] H.F. Trevizan, A. Olean-Oliveira, C.X. Cardoso, M.F.S. Teixeira, 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 Actuators B Chem.* (2021) 130141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130141>.
- [4] J. Scremin, A. Olean-Oliveira, C.A.R. Salamanca-Neto, G.S. Ceravolo, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa-Dekker, C.E. Banks, M.F.S. Teixeira, E.R. Sartori, Application of botryosphaeran as a carbon black adherent on a glassy carbon electrode for the electrochemical determination of cyclobenzaprine, *Electrochim. Acta.* 379 (2021) 138176.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138176>.

- [5] Y.A. Oliveira, A. Olean-Oliveira, M.F.S. Teixeira, Short communication: Molecular architecture based on palladium-salen complex/graphene for low potential water oxidation, *J. Electroanal. Chem.* 880 (2021) 114928. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114928>.
- [6] A. Olean-Oliveira, G.A. Oliveira Brito, M.F.S. Teixeira, Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study, *ACS Omega*. (2020). <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03391>.
- [7] C.S. Martin, A. Olean-Oliveira, M.F.S. Teixeira, A new polymeric thin film by using electropolymerization: thin film of poly(phenazine-salen) obtained from 2,2'-[1,2-ethanediylbis(nitrilomethylidyne)]-bis[4-amino-phenol], *J. Electroanal. Chem.* 873 (2020) 114404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114404>.
- [8] J.C. Pacheco, A. Olean-Oliveira, M.F.S. Teixeira, Understanding the Performance of a Nanocomposite Based on a Conjugated Azo-Polymer and Reduced Graphene Oxide with Photoelectrically Switchable Properties by Analyzing the Potential Profile during Photocurrent Generation, *Macromol. Chem. Phys.* 221 (2020) 2000225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/macp.202000225>.
- [9] N.A. Alves, A. Olean-Oliveira, C.X. Cardoso, M.F.S. Teixeira, Photochemiresistor Sensor Development Based on a Bismuth Vanadate Type Semiconductor for Determination of Chemical Oxygen Demand, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 12 (2020) 18723–18729. <https://doi.org/10.1021/acscami.0c04259>.
- [10] C.A.R. Salamanca-Neto, A. Olean-Oliveira, J. Scremin, G.S. Ceravolo, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa-Dekker, M.F.S. Teixeira, E.R. Sartori, Carboxymethyl-botryosphaeran stabilized carbon nanotubes aqueous dispersion: A new platform design for electrochemical sensing of desloratadine, *Talanta*. 210 (2020) 120642. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120642>.
- [11] A. Olean-Oliveira, J.C. Pacheco, P.M. Seraphim, M.F.S. Teixeira, Synergistic effect of reduced graphene oxide/azo-polymer layers on electrochemical performance and application as nonenzymatic chemiresistor sensors for detecting superoxide anion radicals, *J. Electroanal. Chem.* 852 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113520>.
- [12] A. Olean-Oliveira, T. Olean-Oliveira, A.C.R. Moreno, P.M. Seraphim, M.F.S. Teixeira, A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption, *ACS Sensors*. 4 (2019). <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01013>.
- [13] C.F. Pereira, A. Olean-Oliveira, D.N. David-Parra, M.F.S. Teixeira, A chemiresistor sensor based on a cobalt(salen) metallopolymer for dissolved molecular oxygen, *Talanta*. 190 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.080>.
- [14] A. Olean-Oliveira, C.F. Pereira, D.N. David-Parra, M.F.S. Teixeira, Electrocatalytic Study of the Thin Metallopolymer Film of [2,2'-{1,2-Ethanediylbis[Nitrilo(1E)-1-Ethyl-1-Ylidene]}Diphenolate]-Nickel(II) for Ethanol Electrooxidation, *ChemElectroChem*. 5 (2018). <https://doi.org/10.1002/celec.201800532>.
- [15] A. Olean-oliveira, M.F.S. Teixeira, Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on π -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen, *Sensors Actuators B Chem.* 271 (2018) 353–357. <https://doi.org/S0925400518310372>.

Prêmio

Melhor trabalho da área de exatas no XXVI Jornadas De Jóvenes Investigadores AUGM, Asociación De Universidades Grupo Montevideo.

Patente

André Olean-Oliveira, Patrícia M. Seraphim, Marcos F. S. Teixeira - “Sensor Eletroquímico para Glut-4 Baseado em Polímero Condutor-Nanopartícula de Ouro” – Agência Unesp de Inovação (UNESP) 2021. INPI Code: BR 10 2021 021811 8

Experiência Profissional

Professor de Química

Ensino médio:

2016 - 2017 – Colégio São Paulo

2016 - 2017 – Colégio Apogeu

Professor Bolsista Ensino Superior:

2021 – Universidade Estadual Paulista (FCT-UNESP) – Química Analítica para o Curso de Engenharia Ambiental

2022 – Universidade Estadual Paulista (FCT-UNESP) – Química Analítica para o Curso de Engenharia Ambiental

2022 – Universidade Estadual Paulista (FCT-UNESP) – Análise Instrumental para o Curso de Licenciatura em Química

Editor Convidado:

2021 – Special Issue “Novel Nanomaterials: Photoelectric Properties and Their Applications in Sensors” in Molecules (MDPI)

Divulgador científico:

2011 - 2017 – Trupe Quimiatividade – Apresentações e palestras interativas para escolas públicas e particulares da região de Presidente Prudente-SP.

RESUMO

A presente tese reúne os estudos e esforços dedicados ao desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos baseados em nanopartículas de ouro recobertas por polímeros condutores redox para o monitoramento de biomarcadores de interesses clínicos. Modificações genéticas e epigenéticas são fenômenos com ocorrência natural, sendo a principal responsável pela diversidade entre organismos. Contudo, fatores ambientais podem influenciar as taxas de mutações havendo como consequência doenças graves como o câncer. Assim, o desenvolvimento de tecnologias confiáveis e acessíveis que possibilitem o monitoramento de biomarcadores indicadores de anomalias genéticas pode auxiliar no diagnóstico precoce, aumentando significativamente as chances de recuperação. Por esse motivo, foram construídos dois imunossensores eletroquímicos baseados em espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para detecção e quantificação dos biomarcadores de espécies de DNA metilado e facilitador de transporte de glicose 4 (GLUT-4). Os materiais nanocompósitos desenvolvidos foram obtidos por técnica de eletropolimerização em etapa única, tendo como base os monômeros de Bismark Brown Y (BBY) e Tionina (TH). Os filmes formados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG), revelando nanoestruturas de ouro recobertas pelos polímeros condutores redox. Para imobilização dos anticorpos sobre a superfície dos nanocompósitos foi utilizada a estratégia de adsorção física para o poli(TH)-AuNPs e por ligação covalente para o poli(azo-BBY)-AuNPs. No melhor de nossos esforços, foi verificado que o mecanismo de detecção proposto na presente tese é inédito na literatura. Ele foi baseado na utilização do oxigênio dissolvido como mediador redox, não sendo preciso etapas extras para a marcação ou adição de mediadores redox na solução de análise. Por fim, verificou-se o desempenho analítico dos imunossensores, onde o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs apresentou limites de detecção de $0,64 \text{ pg mL}^{-1}$ para espécies de DNA metilado enquanto o imunossensor de poli(TH)-AuNPs apresentou limite de detecção de $38,0 \text{ pg mL}^{-1}$. Ambos os valores são satisfatórios para aplicação na análise de amostras de interesses clínico e acadêmico.

Palavras-chave: Sensor de DNA Metilado. Sensor de GLUT-4. Imunossensor eletroquímico. Nanopartícula de ouro-polímero. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

ABSTRACT

The present thesis the studies and efforts dedicated to the development of electrochemical immunosensors based on gold nanoparticles coated with redox conducting polymers for the detection of biomarkers of medical interest. Genetic and epigenetic modifications are naturally occurring phenomena, being the main responsible for the diversity among organisms. However, environmental factors can influence mutation rates resulting in serious diseases such as cancer. Thus, the development of reliable and accessible technologies that allow the monitoring of biomarkers showing genetic anomalies can help in early diagnosis, significantly increasing the chances of recovery. For this reason, two electrochemical immunosensors were constructed based on electrochemical impedance spectroscopy (EIS) for the detection and quantification of biomarkers of methylated DNA species and glucose transport facilitator 4 (GLUT-4). The nanocomposite materials developed were obtained by single-step electropolymerization technique, based on Bismarck Brown Y (BBY) and Thionine (TH) monomers. The formed films were characterized by field emission gun scanning electron microscopy (FEG-SEM), revealing gold particles covered by redox conducting polymers. For the immobilization of antibodies on the surface of the nanocomposites, the strategy of physical adsorption was used for poly(TH)-AuNPs and by covalent bonding for poly(azo-BBY)-AuNPs. In the best of our efforts, was verified that the detection mechanism proposed in the present thesis is unprecedented in the literature. It was based on the use of dissolved oxygen as a redox mediator, requiring no extra steps to label or add redox mediators to the analysis solution. Finally, the analytical performance of the immunosensors was verified, where the poly(azo-BBY)-AuNPs immunosensor presented detection limits of 0.64 pg mL^{-1} for methylated DNA species while the poly(TH)- AuNPs had a detection limit of 38.0 pg mL^{-1} . Both values are satisfactory for application in the analysis of samples for clinical and academic interests.

Keywords: DNA methylation sensor. Glut-4 sensor. Electrochemical immunosensor. Gold nanoparticle-polymers. Electrochemical impedance spectroscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Imagem ilustrativa da localização e estrutura do DNA em uma célula eucarionte. A mutação genética ocorre por alteração na sequência do código genético.	24
Figura 2 -Representação esquemática para mutação genética e mutação epigenética. O exemplo apresentado foi baseado na reação epigenética de metilação da citosina mediado pela enzima metiltransferase (DNAMT).	26
Figura 3-A) Representação esquemática para reação de metilação da citosina mediada pela DNA metiltransferase e B) representação dos níveis de metilação global e sua associação com tumorigênese.	28
Figura 4 -Diagrama esquemático para a expressão dos facilitadores de transporte de glicose em células saudáveis (A) e células cancerosas (B).	31
Figura 5 -Representação esquemática para a forma clássica de ensaios imunométricos.	32
Figura 6 -Representação esquemática para as formas de imunoensaio direto (A e B) e imunoensaio competitivo (C).	34
Figura 7-A) Estrutura 3D de uma molécula de anticorpo. B) Representação esquemática de um anticorpo destacando suas regiões.	36
Figura 8 -Ilustração esquemática para as formas de imobilização e as possíveis orientações dos anticorpos sobre substrato.	38
Figura 9 -Representação esquemática para o mecanismo de resposta de um imunossensor eletroquímico label-free baseado em espectroscopia de impedância eletroquímica.	40
Figura 10 -Representação esquemática do sinal de perturbação de uma interface eletroquímica (A) e das representações gráficas de Nyquist e BODE para o sinal de resposta (B).	41
Figura 11-A) Estrutura química do poliacetileno para exemplificação da cadeia polimérica com ligações π -conjugadas. B) Representação esquemática dos orbitais moleculares antes e após oxidação (a) ou redução (b) da cadeia polimérica. Os estados polarônicos foram exemplificados a partir da estrutura do politiofeno.	46
Figura 12 – Estrutura molecular do azo corante Bismark Brown Y.	48
Figura 13-A) Mecanismo redox do grupo azo por reação química (A) e eletroquímica (B). C) Imagem esquemática do comportamento de interruptor molecular apresentado pelo filme de poli(azo-BBY).	49

Figura 14 -Estrutura molecular do corante tionina.....	50
Figura 15-A) Representação esquemática das características e dimensões da célula eletroquímica para as imunorreações. B) Imagens dos eletrodos antes (i) e após (ii) a modificação com o filme nanocompósito.	58
Figura 16-A) Representação esquemática do eletrodo impresso utilizado para fabricação do imunossensor de GLUT-4. B) Imagem do eletrodo modificado com filme de poli(TH)-AuNPs.	59
Figura 17 -Imagens dos eletrodos de FTO após eletropolimerização e eletrodeposição. A) Filme de poli(azo-BBY), B) filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e C) eletrodo modificado com AuNP.....	60
Figura 18 -Imagens dos eletrodos de FTO após eletropolimerização e eletrodeposição. A) Filme de poli(TH), B) filme de poli(TH)-AuNPs e C) eletrodo modificado com AuNPs.	61
Figura 19 -Ilustração das etapas de construção do imunossensor. Os números abaixo estão representando as etapas de modificação.	63
Figura 20 -Representação esquemática do preparo do imunossensor para GLUT-4. Os números abaixo estão representando as etapas de modificação.....	64
Figura 21 -Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs (A), poli(azo-BBY) (B) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (C) aplicado 20 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} em HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2	68
Figura 22 -Mecanismo de formação do filme de poli(azo-BBY).....	72
Figura 23 -Ilustração para a formação do filme nanocompósito de poli(azo-BBY)-AuNPs sobre a superfície do eletrodo de FTO.	73
Figura 24 -Difratograma de raios X dos eletrodos de FTO, poli(azo-BBBY)@AuNP/FTO e poli(azo-BBY)/FTO.....	74
Figura 25 -Imagens obtidas por técnica de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) sobre os eletrodos de poli(azo-BBY)-AuNPs/FTO (A) e AuNP/FTO (B). 75	
Figura 26 -Histograma com os valores de diâmetro médio das nanopartículas no filme de poli(azo-BBY)@AuNP.....	76
Figura 27 -Voltamogramas cíclicos para a resposta eletroquímica dos filmes de poli(azo-BBY)@AuNP (A), poli(azo-BBY) (B) e AuNP (C) em solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,40) com velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2	78

Figura 28- Voltamograma cíclico para resposta eletroquímica do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs (A) e poli(azo-BBY) (B) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado somente com o gás N₂ (linha preta) e somente com o gás O₂ (linha vermelha) com velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹. C) Voltamograma comparativo para resposta em oxigênio dissolvido. D) Magnificação para região de reação de redução de oxigênio destacando os valores de potencial de onset.

..... 80

Figura 29-A) Espectros de Nyquist para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). B) Magnificação do espectro para a região de alta frequência. O Fit linear é referente ao ajuste matemático do modelo de circuito equivalente da **Figura 32**. 81

Figura 30-Espectro de BODE para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). 82

Figura 31- Espectro de BODE para os filmes de poli(azo-BBY)-AuNPs e poli(azo-BBY) em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturado com gás O₂. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). 83

Figura 32-Modelo de circuito equivalente proposto para o filme de poli(azo-BBY)-AuNPs e também utilizado para filme de poli(azo-BBY). 84

Figura 33-Espectros obidos para a ativação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs antes (• preta) e após 5 minutos de incubação com glutaraldeído (• azul). A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância real. 89

Figura 34-Espectros obidos para a modificação da superfície do filme de poli(azo-BBY)@AuNP-GA antes (• azul) e após (• verde) 30 minutos de incubação com anticorpo Ab-5-mC. A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância real. 91

Figura 35-Espectros obidos para a modificação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab antes (• verde) e após 30 minutos de incubação com a proteína BSA (• vermelha). A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa (ampliada) e C) gráfico de capacitância versus impedância imaginária. 94

Figura 36-Espectro de Nyquist para o imunossensor de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab-BSA em solução aquosa de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) saturada com os gases N₂, O₂ e ar atmosférico. Potencial aplicado de -0,30 V (vs. ECS). 95

Figura 37 -Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs com glutaraldeído. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.	96
Figura 38 - Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA com o anticorpo Ab-5-mC. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.....	97
Figura 39 - Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab com a proteína BSA. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.	98
Figura 40 -Variação relativa dos valores de R_{redox} em função do tempo de incubação do filme de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA-Ab-BSA frente ao padrão de 5-metilcitosina. A barra de erro é relativa ao desvio padrão para a resposta de três diferentes eletrodos.	99
Figura 41 -A) Espectros de Nyquist (A) e suas respectivas curvas analíticas (B e C) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de 5-mC em solução de PBS 0,05 mol L ⁻¹ (pH 7,40) em O ₂ saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.	101
Figura 42 -Relação Linear de [5-mC]xCr versus [5-mC]. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo 5-mC/Ab-5mC.	103
Figura 43 -A) Espectros de Nyquist para calibração do imunossensor de DNA metilado realizada em solução de PBS 0,05 mol L ⁻¹ com potencial aplicado de -0,30 V. Os espectros na cor preta representam as adições de padrão de 5-mC e na cor vermelha o espectro obtido para a amostra real. B) Curva de calibração e quantificação da amostra.....	104
Figura 44 -Voltamograma cíclico para a eletropolimerização do filme de poli(TH) pela aplicação de 30 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹ em solução de HCl 0,10 mol L ⁻¹ com 10 mmol L ⁻¹ do monômero tionina. T=25° e atmosfera de N ₂	105
Figura 45 -Resposta eletroquímica do filme de poli(TH) em solução de KCl 0,50 mol L ⁻¹ em atmosfera de N ₂ . A) Espectros de Nyquist para os potenciais aplicados de -0,40 V to +0,65 V vs. ECS (de i a viii). B) Voltametria cíclica registrada em velocidade de varredura de 25 mV s ⁻¹ . As formas reduzida e oxidada do polímero estão sendo representadas no gráfico de voltametria cíclica.....	108
Figura 46 -Modelo de circuito equivalente para ajustes matemáticos sobre espectros obtidos para o filme de poli(TH).	109

Figura 47 -Valores de R_{ct} em função do potencial aplicado. Os valores de resistência foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46 .	110
Figura 48 -Valores de W em função do potencial aplicado. Os valores do elemento de Warburg foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46 .	111
Figura 49 -Valores de CPE_{filme} em função do potencial aplicado. Os valores de capacitância foram obtidos a partir do ajuste matemático feito sobre modelo de circuito equivalente da Figura 46 .	112
Figura 50 -Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(TH) em solução de 10 mmol L^{-1} de tionina em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl. Foram aplicados 10 ciclos de potenciais e velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} com intervalo de potencial de: (A) $-0,30$ a $+0,80 \text{ V}$; (B) $-0,30$ a $+1,0 \text{ V}$; (C) $-0,30$ a $+1,4 \text{ V}$; e (D) $-0,30$ a $+1,60 \text{ V}$ (vs. ECS). Atmosfera de N_2 e $T = 25^\circ\text{C}$.	114
Figura 51 - Valores de R_{redox} obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente para os espectros dos filmes de poli(TH) construídos com diferentes intervalos de potenciais.	115
Figura 52 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{redox}) em função do número de ciclos aplicado durante a etapa de eletropolimerização obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente.	116
Figura 53 - Valores de resistência de transferência de carga (R_{redox}) em função da velocidade de varredura aplicada durante a etapa de eletropolimerização obtidos através de ajuste matemático utilizando modelo de circuito equivalente dos filmes de poli(TH).	118
Figura 54 -Voltamogramas cíclicos para eletropolimerização dos filmes de poli(TH) com 30 ciclos de potenciais aplicados a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do monômero de tionina em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl (A), HNO_3 (B), H_2PO_4 (C) e H_3PO_4 (D) sob atmosfera de N_2 a 25°C .	119
Figura 55 -Espectro de Nyquist para filmes construídos com diferentes eletrólitos de suporte. Potencial aplicado de $+0,20 \text{ V}$ vs. ECS em KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ ($pH = 2,0$). N_2 atm e 25°C .	121
Figura 56 -Valores de parâmetros interfaciais versus raio hidratado do ânion utilizados durante a etapa de eletropolimerização. A) Resistência da interface polímero/FTO (R_p), B) capacitância de dupla camada (CPE_{dc}), C) resistência de transferência de carga da interface	

polímero/solução (R_{redox}), D) capacitância de filme (CPE_{filme}) e E) difusão de íons (W). F) Área de superfície ativa calculada.	122
Figura 57 -Gráfico de Mott-Schottky dos filmes de poli(TH) em frequência fixa aplicada de 10 kHz.	124
Figura 58 -Voltamogramas cíclicos para a eletropolimerização dos filmes de poli(azo-BBY)@AuNP (A), poli(azo-BBY) (B) e eletrodeposição de nanopartículas de ouro (C) aplicado 30 ciclos de potenciais com velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . $T=25^\circ$ e atmosfera de N_2	126
Figura 59 -Voltamogramas cíclico para os eletrodos modificados de poli(TH), poli(TH)-AuNPs e AuNPs em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando-se velocidade de varredura de 25 mV s^{-1} . Atmosfera de N_2	127
Figura 60 -Espectros de Nyquist para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ com potencial aplicado de $+0,20 \text{ V}$ (vs. ECS). 25°C e atmosfera de N_2	128
Figura 61 -Espectros de Nyquist para os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs em solução de KCl $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ saturada com o gás O_2 aplicando-se potencial de $-0,30 \text{ V}$ (vs. ECS). 25°C e atmosfera de N_2	130
Figura 62 -Imagens obtidas através de MEV-FEG para os eletrodos de FTO modificados com o filme de poli(TH) (A), AuNPs (B) e poli(TH)-AuNPs (C).	133
Figura 63 -Histograma para os valores de tamanho médio das nanopartículas presentes na Figura 62C.	134
Figura 64 -Voltamograma cíclico referente a eletropolimerização do filme de poli(TH)-AuNPs sobre eletrodo impresso (SPE) com eletrodo de trabalho de platina. 25°C e atmosfera de N_2	135
Figura 65 -Espectro de Nyquist (A) e BODE (B) obtidos pela resposta do eletrodo de platina antes e após a modificação com o filme nanocompósito de poli(TH)-AuNPs. Solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) em atmosfera de N_2 e potencial aplicado de $-0,30 \text{ V}$ vs. ECS.	136
Figura 66 -Espectros obidos para a modificação do filme de poli(TH)-AuNPs antes e após incubação com o anticorpo de GLUT-4. A) Espectro de Nyquist, B) espectro de capacitância complexa e C) gráfico de capacitância versus impedância imaginária.	138
Figura 67 -A) Espectros de Nyquist (A) e a respectiva curva analítica (B) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de GLUT-4 em solução de PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,40) em diferentes concentrações contendo O_2 saturado em equilíbrio atmosférico. A	

barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos.....140

Figura 68-A) Espectros de capacitância complexa (A) e sua respectiva curva analítica (B) para a resposta do imunossensor frente a diferentes concentrações de GLUT-4 em solução de PBS 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,40) contendo O₂ saturado em equilíbrio atmosférico. A barra de erro representa o desvio padrão para o mesmo eletrodo em três diferentes experimentos. 141

Figura 69-Relação Linear de [GLUT-4]xCr versus [GLUT-4]. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo GLUT-4/Ab-GLUT-4. 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações dos reagentes utilizados no desenvolvimento do projeto.....	55
Tabela 2 -Valores de potenciais de pico para o primeiro e último ciclo de potencial aplicado obtidos durante a eletropolimerização e eletrodeposição dos filmes sobre o eletrodo de FTO.	69
Tabela 3 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 32. Os erros foram inferiores a 4%. .	85
Tabela 4 -Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após ativação da superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs com a molécula de glutaraldeído. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.	89
Tabela 5 -Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após imobilização do anticorpo Ab-5-mC sobre superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNPs-GA. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.	90
Tabela 6 -Parametros impedimétricos determinados por meio do ajuste matemático sobre modelo de circuito equivalente para os espectros anterior e após desativação dos sítios ativos remanescentes presentes na superfície do eletrodo de poli(azo-BBY)-AuNP-GA-Ab com a molécula de BSA. Os erros apresentados foram inferiores a 4%.	93
Tabela 7 -Valores comparativos do tempo médio necessário para cada execução de cada etapa para determinação de concentração de DNA metilado entre o sensor e o kit comercial.....	100
Tabela 8 -Valores de limite de detecção para sensores eletroquímicos de DNA metilado. ..	102
Tabela 9 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente. Os erros foram inferiores a 4%.	129
Tabela 10 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente. Os erros foram inferiores a 4%.	131
Tabela 11 -Parametros impedimétricos determinados a partir de ajustes matemáticos sobre modelo de circuito equivalente para os espectros antes e após modificação com o anticorpo Ab-GLUT-4. Os erros foram inferiores a 4%.	137

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. MUTAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICA.....	24
1.2. MARCADORES BIOLÓGICOS: BIOMARCADORES	26
1.2.1. Espécies de dna metilado como biomarcador para diagnóstico de câncer.....	27
1.2.2. Transportador de glicose 4 como biomarcador para tecidos tumorais	30
1.3. IMUNOENSAIOS	32
1.3.1. Aspectos analíticos	34
1.4. IMUNOENSAIO ELETROQUÍMICO.....	38
1.4.1. Utilização de espectroscopia de impedância eletroquímica para imunosensoriamento	40
1.5. MATERIAIS NANOCOMPÓSITO BASEADOS EM POLÍMEROS CONDUTORES	42
1.6. NANOPARTÍCULAS DE OURO	43
1.7.1. Polímero condutor redox baseado no monômero bismarck brown y: um azopolímero condutor	47
CAPÍTULO 2	52
OBJETIVOS	52
2. OBJETIVOS.....	53
2.1. OBJETIVO GERAL	53
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
CAPÍTULO 3	54
MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODO	55

3.1.	REAGENTES.....	55
3.2.	SOLUÇÕES.....	55
3.2.1.	Soluções para eletropolimerização do filme de poli(azo-bby)-aunps.....	55
3.2.3.	Solução tampão fosfato (pbs)	57
3.3.	CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	57
3.4.	CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	57
3.5.	MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	57
3.5.1.	Equipamentos	57
3.5.2.	Células eletroquímicas.....	57
3.5.2.1.	Eletropolimerização e medidas de investigação do desempenho eletroquímico.....	57
3.5.2.2.	Análises imunoeletroquímicas para espécie de dna metilado.....	58
3.5.2.3.	Análise imunoeletroquímica para espécie de glut-4.....	59
3.5.5.	Síntese do imunossensor de espécie de dna metilado baseado no filme de poli(azo-bby)-aunps	63
3.5.6.	Síntese do imunossensor para glut-4 baseado no filme de poli(th)-aunps	64
3.5.7.	Curva analítica para padrão de dna metilado	64
3.5.8.	Curva analítica para imunossensor de glut-4	65
3.5.9.	Análise de dna metilado em amostra real	65
	CAPÍTULO 4	66
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1.	DESENVOLVIMENTO DO IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA ESPÉCIE DE DNA METILADO BASEADO NO FILME NANOCOMPÓSITO DE BISMARCK BROWN Y COM NANOPARTÍCULAS DE OURO	67
4.1.1.	Construção do nanocompósito de azo-polímero condutor redox com nanopartículas de ouro encapsuladas.....	67

4.1.1.1.	Eletropolimerização.....	67
4.1.1.2.	Mecanismo de formação do filme de poli(azo-bby)-aunps e arquitetura formada 71	
4.1.2.	Caracterização por difração de raios x.....	73
4.1.3.	Caracterização morfológica.....	74
4.1.4.	Caracterização eletroquímica do filme de poli(azo-bby)-aunps	76
4.1.4.2.	Resposta frente ao oxigênio dissolvido	79
4.1.4.3.	Investigação por espectroscopia de impedância eletroquímica	80
4.1.4.4.	Análise por ajustes matemáticos sobre modelos de circuito equivalente	83
4.1.5.	Preparação do imunossensor	86
4.1.5.1.	Ativação da superfície	87
4.1.5.2.	Imobilização do anticorpo 5-metil citosina	90
4.1.5.3.	Bloqueio dos sítios remanescentes ativos com bsa	92
4.1.5.6.	Afinidade de ligação antígeno-anticorpo	102
4.1.6.	Análise em amostra real	103
4.2.	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR PARA GLUT-4 BASEADO EM FILME POLIMÉRICO REDOX DE POLI(TH) COM NANOPARTÍCULAS DE OURO	105
4.2.1.	Desenvolvimento do filme de poli(th)	105
4.2.1.1.	Eletropolimerização.....	105
4.2.2.	Comportamento eletroquímico.....	107
4.2.2.1.	Voltametria cíclica	107
4.2.3.	Otimização dos parametros para eletropolimerização da poli(th).....	113
4.2.3.1.	Variação do intervalo de potencial aplicado	113
4.2.3.2.	Influência do número de ciclos aplicado	115
4.2.3.3.	Estudo da velocidade de varredura aplicada	117

4.2.3.4.	Influência do eletrólito de suporte durante a etapa de eletropolimerização ...	118
4.2.3.5.	Avaliação do comportamento semicondutor dos filmes eletropolimerizados: análise por mott-schottky	123
4.2.4.	Construção do filme nanocompósito.....	125
4.2.4.1.	Resposta frente ao oxigênio dissolvido	129
4.2.5.	Caracterização morfológica.....	132
4.2.6.	Eletropolimerização sobre eletrodo impresso	134
4.2.7.	Construção e avaliação eletroquímica do immunosensor	137
4.2.8.	Curva analítica.....	139
5.	CONCLUSÃO.....	143
5.1.	CONCLUSÕES IMUNOSSENSOR PARA DNA METILADO	143
5.2.	CONCLUSÕES IMUNOSSENSOR PARA GLUT-4.....	144
6.	ALGUMAS PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	145
	REFERÊNCIAS.....	146

Capítulo 1

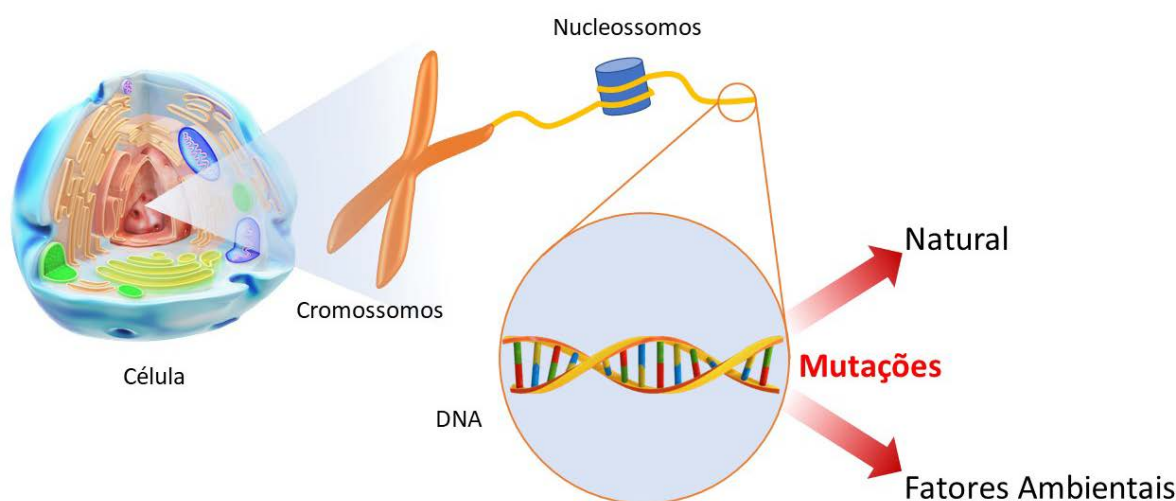
Introdução

1. Introdução

1.1. Mutações Genéticas e Epigenética

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um composto orgânico com a função de fornecer o código genético dos seres vivos (SINDEN; WELLS, 1992; PEARSON; EDAMURA; CLEARY, 2005; LOEWE; HILL, 2010). Em células eucariontes, o DNA fica confinado no núcleo celular na forma de cromossomos. Os cromossomos são conjuntos de nucleossomos onde as fitas de DNA se encontram organizadas (Figura 1).

Figura 1-Imagem ilustrativa da localização e estrutura do DNA em uma célula eucarionte. A mutação genética ocorre por alteração na sequência do código genético.



Fonte: Autoria própria.

As mutações no DNA, ou mutações genéticas, são definidas como alterações na sequência do código genético presentes no DNA (SINDEN; WELLS, 1992; PEARSON; EDAMURA; CLEARY, 2005; LOEWE; HILL, 2010). Essas mutações podem ocorrer em diferentes níveis, podendo ser classificadas de acordo com o modo de alteração do código, tal como mutação pontual, por exclusão, por inserção e por translocação, e apresentar diferentes formas de consequências (LOEWE; HILL, 2010).

Um famoso exemplo da consequência de uma mutação genética é o caso da Anemia Falciforme, sendo resultado de uma alteração no gene responsável pela formação da hemoglobina (TAYLOR 6TH et al., 2008; JARRETT et al., 2016). A expressão genética responsável pela formação da beta hemoglobina possui 147 aminoácidos. A simples substituição de um único aminoácido (mutação pontual) tem como consequência a formação

da proteína da hemoglobina na forma falciforme. Como consequência, há uma diminuição na eficiência da oxigenação de tecidos devido a alteração da estrutura tridimensional da hemoglobina. Contudo, é importante destacar que nem toda mutação genética pode resultar em consequências diretas e/ou de grandes magnitudes. De fato, algumas mantêm-se silenciadas no indivíduo.

Qualquer célula pode ter seu material genético alterado. A alteração pode ocorrer por influência de fatores externos como, exposição química ou radiações eletromagnéticas ionizantes (por exemplo, radiação ultravioleta e de raio X), ou mesmo por fatores naturais decorrentes de erros durante a replicação (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; HUNTER, 2005; FEIL, 2006; SKINNER; GUERRERO-BOSAGNA; HAQUE, 2015). Caso essa mutação ocorra em uma célula germinativa (óvulos ou espermatozoides) ela poderá ser transmitida para seus descendentes, estando presente em cada célula do desenvolvimento embrionário. Por sua vez, se a mutação ocorrer em qualquer outra linhagem de célula, essa mutação não será transmitida para seus descendentes, sendo classificada como mutação somática.

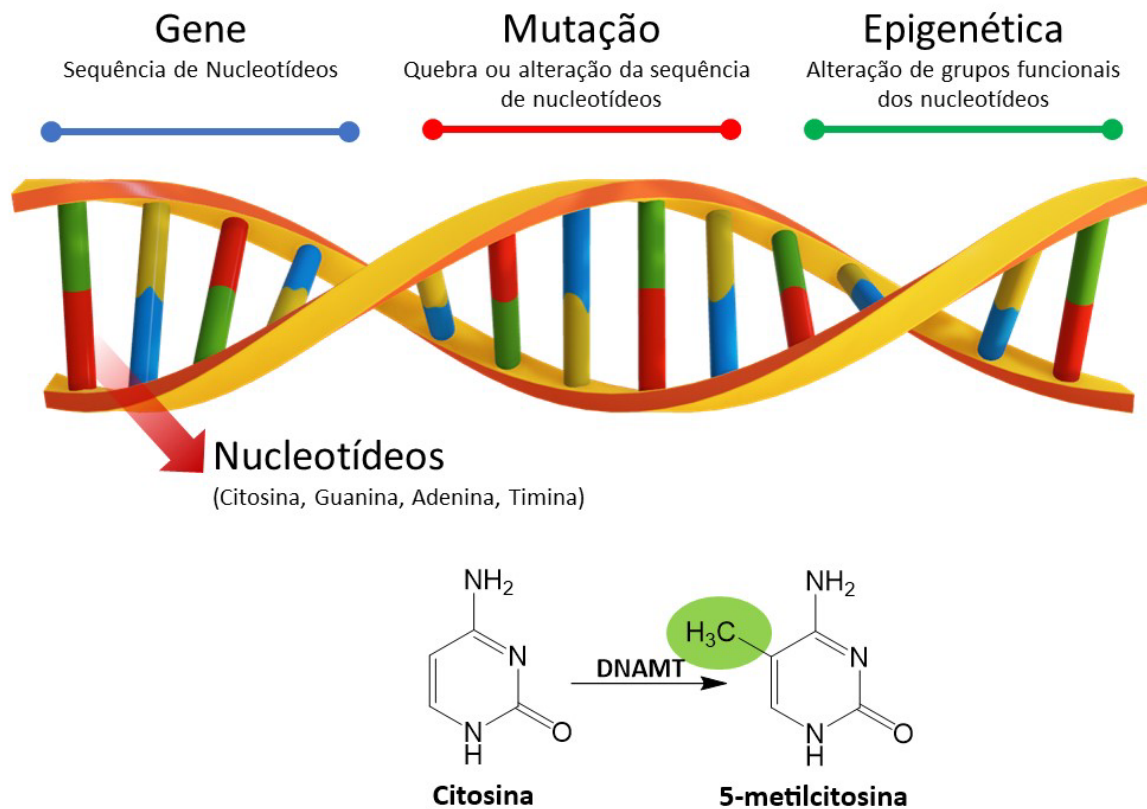
Enquanto a genética dedica-se ao estudo das mutações supracitadas, a epigenética direciona esforços para compreender como as células regulam a atividade genética sem necessidade de alterar a sequência do DNA (Figura 2) (A.; DAIYA, 2001; LARSSON; CASTILHO; GIANNOBILE, 2015; PARK et al., 2019; UNNIKRISHNAN et al., 2019).

Essa regulação se dá pelo “ligamento” ou “desligamento” dos genes pela adição de grupos funcionais a nucleotídeos específicos, que irão influenciar na produção de proteínas em células. Essa regulação ajuda a garantir que as células irão produzir apenas aquelas proteínas que são necessárias para sua função. Garantindo assim, por exemplo, que proteínas responsáveis pelo crescimento dos ossos não sejam promovidas em células musculares. Assim como mutações genéticas, reações epigenéticas podem ser afetadas por fatores ambientais (SUTHERLAND; COSTA, 2003; FEIL; FRAGA, 2012). Dieta pessoal e exposição a poluentes são apenas dois exemplos de uma série de fatores que podem influenciar na regulação epigenética de um indivíduo.

E assim como ocorre com as mutações genéticas, as mutações epigenéticas também podem ser transmitidas para gerações (LILLYCROP; BURDGE, 2015; SCHAGDARSURENGIN; STEGER, 2016). Dessa forma, o monitoramento e entendimento de modificações epigenéticas são de grande importância para avanços nas áreas médicas, seja através de diagnósticos ou por meio de estudos para o entendimento e desenvolvimento de tratamentos, contribuindo

com incremento em saúde e bem estar populacional (JONES; BAYLIN, 2002; WEI; LILLEHOJ; HO, 2010; CAMPUZANO et al., 2019).

Figura 2-Representação esquemática para mutação genética e mutação epigenética. O exemplo apresentado foi baseado na reação epigenética de metilação da citosina mediado pela enzima metiltransferase (DNAMT).



Fonte: Autoria própria.

ΔR corresponde ao inverso da variação da capacitância redox do sistema ($1/C_R$), R_m é o máximo de sinal e [GLUT-4] a concentração de 5-metilcitosina. Dessa forma, a partir do coeficiente linear do gráfico foi obtido o valor de $(K_d R_m)^{-1}$, e pelo coeficiente angular o valor de R_m^{-1} . O valor calculado de k_d para o presente imunossensor foi de $3,58 \text{ L ng}^{-1}$.

5. Conclusão

5.1. Conclusões Imunossensor para DNA metilado

O presente trabalho apresentou o desenvolvimento de uma nova plataforma imunossensorial baseada em filme nanocompósito composto por polímero condutor redox de Bismarck Brown Y e nanopartículas de ouro. Através da técnica de eletropolimerização, em etapa única, foi obtida uma estrutura molecular tridimensional de nanopartículas de ouro em estrutura de *clusters* de dimensões aproximadas de 250 nm encapsuladas por uma fina camada do azo-polímero.

A análise por técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica permitiu caracterizar os fenômenos interfaciais e comparar o desempenho eletroquímico com o eletrodo composto apenas com o filme de poli(azo-BBY). De fato, a presença das nanopartículas de ouro resultou em aumento do desempenho eletroquímico. Foi alcançado aumento significativo do valor de área eletroativa pela presença das nanopartículas, bem como aumento da constante de transferência eletrônica frente a molécula de oxigênio dissolvido.

Em relação ao desempenho frente a molécula de oxigênio, o filme nanocompósito demonstrou aumento do valor de corrente em uma magnitude de aproximadamente 10 vezes. Foi percebido também uma diminuição do sobrepotencial necessário para a reação. Análise por EIE através de modelo de circuito equivalente também demonstrou diminuição significativa dos valores de resistência de transferência de carga bem como aumento da superfície de área ativa pelos valores de capacitância do sistema.

As características do polímero permitiram a imobilização do anticorpo por meio de formação de ligação covalente utilizando um reagente de ligação cruzada (glutaraldeído). A efetividade da formação da ligação foi comprovada por medidas eletroquímicas, assim como a caracterização de cada etapa da construção do imunossensor.

Com o imunossensor caracterizado, foi realizada a análise de seu desempenho a um padrão de citosina metilada para construção da curva analítica. O imunossensor apresentou

resposta em um intervalo linear de 0,005 a 0,12 ng ml⁻¹ e um limite de detecção de 0,64 pg ml⁻¹. Os resultados foram satisfatórios e superior ao verificado para o kit comercial de referência usados para o presente estudo, uma vez que amostra com menor concentração pode ser utilizadas para a análise.

A constante de ligação também foi avaliada. Por meio da isoterma de Langmuir calculou-se o valor de $K_d = 1,20 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$, sendo próximo ao valor verificado para o conjunto antígeno-anticorpo 5-mC em solução, demonstrando que a estratégia de imobilização por meio de agente de ligação cruzada não afetou a capacidade de reconhecimento do anticorpo.

Por fim, avaliou-se o imunossensor através da análise de uma amostra real de DNA. O valor de concentração de DNA metilado encontrada teve desvio de apenas 3% em comparação ao determinado pelo Kit comercial. Dessa forma, pode-se concluir que as estratégias e metodologias empregadas na presente tese para o desenvolvimento de um imunossensor para DNA metilado foram satisfatórias, sendo uma alternativa promissora para análise de DNA metilado.

5.2. Conclusões Imunossensor para GLUT-4

O presente trabalho de tese apresentou os resultados do desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico baseado em filme nanocompósito de nanopartículas de ouro recobertas por polimérico condutor redox de tionina para determinação de GLUT-4.

O filme polimérico foi sintetizado por técnica de eletropolimerização utilizando voltametria cíclica. Os parâmetros eletroquímicos para otimização da síntese, como intervalo de potencial aplicado, número de ciclos, velocidade de varredura e eletrólito de suporte foram analisados por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica buscando os menores valores de resistência de transferência de carga da interface polímero/solução. Por meio desses estudos, importantes parâmetros foram investigados de forma a contribuir com o estudo de síntese eletroquímica de polímeros condutores.

Após otimização dos parâmetros do filme de poli(TH), foi investigado a construção do material nanocompósito pela introdução da nanopartícula de ouro na matriz polimérica. A síntese do material nanocompósito foi realizada também por eletropolimerização em etapa única. Utilizando MEV-FEG foram obtidas imagens que permitiram verificar que houve o crescimento de nanopartículas na matriz polimérica com dimensões médias de 123 nm.

Por EIE, foi realizado uma análise sistemática comparativa entre os filmes de poli(TH) e poli(TH)-AuNPs, tanto na presença quanto na ausência da molécula de oxigênio dissolvido. Esse estudo permitiu concluir que a presença das nanopartículas na matriz polimérica melhorou o desempenho eletroquímico do filme de poli(TH), aumentando a concentração de centros redox ativos bem como ampliando o sinal eletroquímico para a resposta do polímero frente a molécula de oxigênio dissolvido. A importância da ampliação do sinal eletroquímico frente a molécula de oxigênio teve base na prerrogativa de seu uso como mediador redox substituindo espécies altamente carregadas como ferricianeto.

Modificou-se a superfície do filme nanocompósito desenvolvido com o anticorpo de GLUT-4 pela estratégia de adsorção física. A resposta eletroquímica demonstrou estabilidade e permitiu a construção de uma curva analítica. Por meio da equação da reta obtida através da curva analítica foi possível calcular o valor de limite de detecção de $38,0 \text{ pg ml}^{-1}$. Esse resultado foi satisfatório e demonstra a potencialidade da estratégia desenvolvida para análises quantitativas de amostras contendo GLUT-4.

REFERÊNCIAS

- A., J. P.; DAIYA, T. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, v. 293, n. 5532, p. 1068–1070, 10 ago. 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1063852>>.
- ABAY, A. et al. *Glutaraldehyde – A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells* *Frontiers in Physiology*, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.00514>>.
- ABD-ELWAHED, A.; HOLZE, R. Ion size and size memory effects with electropolymerized polyaniline. *Synthetic Metals*, v. 131, n. 1, p. 61–70, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379677902001534>>.
- ADÁN-MÁS, A. et al. Application of the Mott-Schottky model to select potentials for EIS studies on electrodes for electrochemical charge storage. *Electrochimica Acta*, v. 289, p. 47–55, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468618319613>>.
- ADEKOLA, K.; ROSEN, S. T.; SHANMUGAM, M. Glucose Transporters in Cancer Metabolism. *Current opinion in oncology*, v. 24, n. 6, p. 650–654, nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22913968>>.
- ALEXANDER, C. L.; TRIBOLLET, B.; ORAZEM, M. E. Contribution of Surface Distributions to Constant-Phase-Element (CPE) Behavior: 2. Capacitance. *Electrochimica Acta*, 2016.
- ANDERSON, J. E.; SAWTELLE, S. M. In situ generation and characterization of gold(I) complexes from K[AuCl₄] in aqueous solutions. *Inorganica Chimica Acta*, v. 194, n. 2, p. 171–177, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169300826596>>.
- APITZ, D. et al. Conductivity of oriented bis-azo polymer films. *ChemPhysChem*, v. 7, n. 2, p. 468–474, 2006.
- ARMSTRONG, F. A.; WILSON, G. S. Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochimica Acta*, v. 45, n. 15, p. 2623–2645, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346860000342X>>.
- ASADI, S. et al. Laser-induced optothermal response of gold nanoparticles: From a physical viewpoint to cancer treatment application. *Journal of Biophotonics*, v. 14, n. 2, p. e202000161, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbio.202000161>>.

ATANASOV, S. E. et al. Highly Conductive and Conformal Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) Thin Films via Oxidative Molecular Layer Deposition. *Chemistry of Materials*, v. 26, n. 11, p. 3471–3478, 10 jun. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cm500825b>>.

AUGUSTIN, R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, v. 62, n. 5, p. 315–333, 1 maio 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/iub.315>>.

AZRI, F. A. et al. *Electrochemical Immunosensor for Detection of Aflatoxin B1 Based on Indirect Competitive ELISA* *Toxins*, 2018. .

BABAIEE, M.; PAKSHIR, M.; HASHEMI, B. Effects of potentiodynamic electropolymerization parameters on electrochemical properties and morphology of fabricated PANI nanofiber/graphite electrode. *Synthetic Metals*, v. 199, p. 110–120, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037967791400397X>>.

BARADOKE, A. et al. Reagentless Redox Capacitive Assaying of C-Reactive Protein at a Polyaniline Interface. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 5, p. 3508–3511, 3 mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05633>>.

BARD, A. J. et al. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 2ed. ed. [s.l: s.n.]

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. [s.l: s.n.]v. 2

BARRON, C. C. et al. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*, v. 65, n. 2, p. 124–139, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049515002991>>.

BARROSSE-ANTLE, L. E. et al. Voltammetry in Room Temperature Ionic Liquids: Comparisons and Contrasts with Conventional Electrochemical Solvents. *Chemistry – An Asian Journal*, v. 5, n. 2, p. 202–230, 1 fev. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/asia.200900191>>.

BARSAN, M. M.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 881, p. 1–23, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701500238X>>.

BARSAN, M. M.; PINTO, E. M.; BRETT, C. M. A. Electrosynthesis and electrochemical characterisation of phenazine polymers for application in biosensors. *Electrochimica Acta*, v. 53, n. 11, p. 3973–3982, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468607012479>>.

BATZILL, M.; DIEBOLD, U. The surface and materials science of tin oxide. *Progress in Surface Science*, v. 79, n. 2, p. 47–154, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007968160500050X>>.

BEN ISHAY, R. et al. Multiple functionalization of tungsten disulfide inorganic nanotubes by covalently grafted conductive polythiophenes. *RSC Advances*, v. 6, n. 92, p. 89585–89598, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA19628D>>.

BINDER, C. et al. Deregulated Simultaneous Expression of Multiple Glucose Transporter Isoforms in Malignant Cells and Tissues. *Anticancer research*, v. 17, n. 6D, p. 4299–4304, 1997. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/9494524>>.

BONANNI, A.; VALLE, M. Analytica Chimica Acta Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors : A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 678, n. 1, p. 7–17, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.022>>.

BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. *Accounts of Chemical Research*, v. 18, n. 10, p. 309–315, 1 out. 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ar00118a005>>.

BÜTTIKER, M.; THOMAS, H.; PRÊTRE, A. Mesoscopic capacitors. *Physics Letters A*, v. 180, n. 4, p. 364–369, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0375960193911939>>.

BYERLY, T. C. *Handbook of Biological Data*. [s.l: s.n.]v. 118

BYZOVA, N. A. et al. Less is More: A Comparison of Antibody–Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios. *Bioconjugate Chemistry*, v. 28, n. 11, p. 2737–2746, 15 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00489>>.

CALVO, M. B. et al. Potential Role of Sugar Transporters in Cancer and Their Relationship with Anticancer Therapy. *International Journal of Endocrinology*, v. 2010, p. 205357, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2010/205357>>.

CAMPUZANO, S. et al. Opportunities, Challenges, and Prospects in Electrochemical Biosensing of Circulating Tumor DNA and Its Specific Features. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 19, n. 17, p. 3762, 30 ago. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31480367>>.

CAO, Y.; DONG, Y. Electrochemical aptasensor for multi-antibiotics detection based on endonuclease and exonuclease assisted dual recycling amplification strategy. *Talanta*, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.016>>.

CHAKRABORTY, A. et al. Electrochemical estimation of active site density on a metal-free carbon-based catalyst. *RSC Advances*, v. 9, n. 1, p. 466–475, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8RA08906J>>.

CHEN, A. X. et al. Beyond Stretchability: Strength, Toughness, and Elastic Range in Semiconducting Polymers. *Chemistry of Materials*, v. 32, n. 18, p. 7582–7601, 22 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c03019>>.

CHEN, F. et al. Gold nanoparticles to enhance ophthalmic imaging. *Biomaterials Science*, v. 9, n. 2, p. 367–390, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D0BM01063D>>.

CHEUNG, D. T.; NIMNI, M. E. Mechanism of Crosslinking of Proteins by Glutaraldehyde I: Reaction with Model Compounds. *Connective Tissue Research*, v. 10, n. 2, p. 187–199, 1 jan. 1982. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/03008208209034418>>.

CHINNADAYYALA, S. R.; CHO, S. *Electrochemical Immunosensor for the Early Detection of Rheumatoid Arthritis Biomarker: Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Human Serum Based on Avidin-Biotin System* *Sensors*, 2021. .

CHIU, M. L. et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 4, p. 55, 3 dez. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31816964>>.

CHO, I.-H. et al. *Current Technologies of Electrochemical Immunosensors: Perspective on Signal Amplification* *Sensors*, 2018. .

CINCOTTO, F. H. et al. A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers. *Talanta*, v. 195, p. 62–68, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914018311731>>.

CONGUR, G.; EKSIN, E.; ERDEM, A. Electrochimica Acta Impedimetric Detection of microRNA

at Graphene Oxide Modified Sensors. *Electrochimica Acta*, v. 172, p. 20–27, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.03.210>>.

CREAGER, S. E.; WOOSTER, T. T. A New Way of Using ac Voltammetry To Study Redox Kinetics in Electroactive Monolayers. *Analytical Chemistry*, v. 70, n. 20, p. 4257–4263, 1 out. 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac980482l>>.

DAVIES, C. Chapter 1.3 - Immunoassay Performance Measures. In: WILD, D. B. T.-T. I. H. (FOURTH E. (Ed.). Oxford: Elsevier, 2013a. p. 11–26.

DAVIES, C. Chapter 2.1 - Principles of Competitive and Immunometric Assays (Including ELISA)1. In: WILD, D. B. T.-T. I. H. (FOURTH E. (Ed.). Oxford: Elsevier, 2013b. p. 29–59.

DE PAULI, M. et al. Capacitance spectra extracted from EIS by a model-free generalized phase element analysis. *Electrochimica Acta*, 2019.

DENG, H. et al. A new strategy for label-free electrochemical immunoassay based on “gate-effect” of β -cyclodextrin modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 926, p. 48–54, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267016304937>>.

DESHPANDE, M. V.; AMALNERKAR, D. P. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. *Prog. Polym. Sci.*, v. 18, p. 623–649, 1993.

DUDIN, P. V; UNWIN, P. R.; MACPHERSON, J. V. Electrochemical Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles on Single-Walled Carbon Nanotubes: New Mechanistic Insights. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 31, p. 13241–13248, 12 ago. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp1043706>>.

ĐUROVIĆ, M. D. et al. Studies on the reactions of $[\text{AuCl}_4]^-$ with different nucleophiles in aqueous solution. *Dalton Transactions*, v. 43, n. 23, p. 8620–8632, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4DT00247D>>.

ESSOUSI, H. et al. An Electrochemical Sensor Based on Reduced Graphene Oxide, Gold Nanoparticles and Molecular Imprinted Over-oxidized Polypyrrole for Amoxicillin Determination. *Electroanalysis*, v. 32, n. 7, p. 1546–1558, 1 jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/elan.201900751>>.

FAN, Y. et al. A paper-based electrochemical immunosensor with reduced graphene oxide/thionine/gold nanoparticles nanocomposites modification for the detection of cancer

antigen 125. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 135, p. 1–7, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566319302787>>.

FEIL, R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 600, n. 1, p. 46–57, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510706001722>>.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 2, p. 97–109, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg3142>>.

FERGUSON, M. A.; VAIDYA, V. S. *Biomarkers: An Evolutionary Perspective* *Biomarkers*: Wiley Online Books., 20 set. 2010. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9780470918562.ch1>>.

FERNANDES, F. C. B. et al. Label free redox capacitive biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013.

FREGER, V. Diffusion impedance and equivalent circuit of a multilayer film. *Electrochemistry Communications*, v. 7, n. 9, p. 957–961, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248105001992>>.

FREITAS DE FREITAS, L. et al. An Overview of the Synthesis of Gold Nanoparticles Using Radiation Technologies. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 11, p. 939, 15 nov. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30445694>>.

GAO, S.; GUISÁN, J. M.; ROCHA-MARTIN, J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1189, p. 338907, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267021007339>>.

GE, Y. et al. How to measure and report the capacity of electrochemical double layers, supercapacitors, and their electrode materials. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 24, n. 11, p. 3215–3230, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10008-020-04804-x>>.

GILLESPIE, P.; LADAME, S.; O'HARE, D. Molecular methods in electrochemical microRNA detection. *Analyst*, v. 144, n. 1, p. 114–129, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8AN01572D>>.

GUALDESI, M. S. et al. Thionine in the design of new photosensitizers: Bromination and

vehiculization in polymeric nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, v. 310, p. 113247, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732219371314>>.

GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, v. 598, n. 2, p. 181–192, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326700701238X>>.

GUTIÉRREZ PINEDA, E. et al. Electrochemical Preparation and Characterization of Polypyrrole/Stainless Steel Electrodes Decorated with Gold Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 7, n. 4, p. 2677–2687, 4 fev. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/am507733b>>.

HAN, J. et al. Conducting polymer-noble metal nanoparticle hybrids: Synthesis mechanism application. *Progress in Polymer Science*, v. 70, p. 52–91, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670017300837>>.

HANKIN, A. et al. Flat band potential determination: Avoiding the pitfalls. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019.

HASSANPOUR, S.; HASANZADEH, M. Label-free electrochemical-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in the efficient diagnosis of cancer employing electroanalysis and based on point of care (POC). *Microchemical Journal*, v. 168, p. 106424, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X21005087>>.

HEIMBÖCKEL, R.; HOFFMANN, F.; FRÖBA, M. Insights into the influence of the pore size and surface area of activated carbons on the energy storage of electric double layer capacitors with a new potentially universally applicable capacitor model. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 21, n. 6, p. 3122–3133, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C8CP06443A>>.

HEINZE, J. et al. On the origin of the so-called nucleation loop during electropolymerization of conducting polymers. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, n. 5, p. 989–997, 2007.

HOSSAIN, T. et al. Biosensors and Bioelectronics Electrochemical biosensing strategies for DNA methylation analysis. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 94, n. November 2016, p. 63–73, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.026>>.

HOU, C. et al. Potentiostatic electrodeposition of gold nanoparticles: variation of electrocatalytic activity toward four targets. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 51, n. 12, p. 1721–1730, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10800-021-01604-7>>.

HU, F. et al. *PEDOT-Based Conducting Polymer Actuators* *Frontiers in Robotics and AI*, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/frobt.2019.00114>>.

HU, Q. et al. Anion Layering and Steric Hydration Repulsion on Positively Charged Surfaces in Aqueous Electrolytes. *ChemPhysChem*, v. 18, n. 21, p. 3056–3065, 3 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cphc.201700865>>.

HUANG, J. et al. Graphical analysis of electrochemical impedance spectroscopy data in Bode and Nyquist representations. *Journal of Power Sources*, v. 309, p. 82–98, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2016.01.073>>.

HUANG, Q. et al. A dual enzymatic-biosensor for simultaneous determination of glucose and cholesterol in serum and peritoneal macrophages of diabetic mice: Evaluation of the diabetes-accelerated atherosclerosis risk. *Analytica Chimica Acta*, v. 707, n. 1–2, p. 135–141, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.003>>.

HUNTER, D. J. Gene–environment interactions in human diseases. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 4, p. 287–298, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg1578>>.

HUO, H. Y.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Electrochemical sensor for heparin based on a poly(thionine) modified glassy carbon electrode. *Microchimica Acta*, v. 167, n. 3, p. 195, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-009-0240-5>>.

INAGAKI, C. S.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Direct and one-step synthesis of polythiophene/gold nanoparticles thin films through liquid/liquid interfacial polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 516, p. 498–510, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718300924>>.

ISLAM, N. et al. Biosensors and Bioelectronics Optical biosensing strategies for DNA methylation analysis. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 92, n. August 2016, p. 668–678, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.034>>.

IZQUIERDO, J.; KRANZ, C. Electrochemical techniques for investigating redox active

macromolecules. *European Polymer Journal*, v. 83, p. 428–449, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305716304384>>.

JARRETT, K. et al. “Sickle Cell Anemia: Tracking down a Mutation”: An Interactive Learning Laboratory That Communicates Basic Principles of Genetics and Cellular Biology. *Advances in physiology education*, v. 40, n. 1, p. 110–115, mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26873898>>.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 6, p. 415–428, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg816>>.

JORCIN, J.-B. et al. CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta*, v. 51, n. 8, p. 1473–1479, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468605008285>>.

K, N.; ROUT, C. S. Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. *RSC Advances*, v. 11, n. 10, p. 5659–5697, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D0RA07800J>>.

KARIMI-MALEH, H. et al. A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 184, p. 113252, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656632100289X>>.

KARUNANITHY, R.; HOLLAND, T.; SIVAKUMAR, P. Influence of Glutaraldehyde’s Molecular Transformations on Spectroscopic Investigations of Its Conjugation with Amine-Modified Fe₃O₄ Microparticles in the Reaction Medium. *Langmuir*, v. 37, n. 17, p. 5242–5251, 4 maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00182>>.

KIM, J.; PARK, M. *Recent Progress in Electrochemical Immunosensors Biosensors*, 2021. .

KIZLING, M. et al. Gold nanoparticles in bioelectrocatalysis – The role of nanoparticle size. *Current Opinion in Electrochemistry*, v. 12, p. 113–120, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451910318300826>>.

KOMSIYSKA, L.; STAIKOV, G. Electrocrystallization of Au nanoparticles on glassy carbon from HClO₄ solution containing [AuCl₄][–]. *Electrochimica Acta*, v. 54, n. 2, p. 168–172, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468608010177>>.

KONDZIOR, M.; GRABOWSKA, I. *Antibody-Electroactive Probe Conjugates Based Electrochemical Immunosensors*, 2020. .

KOR, K.; ZAREI, K. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. *Talanta*, v. 146, p. 181–187, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.042>>.

KOSTJUKOVA, L. O.; LEONTIEVA, S. V; KOSTJUKOV, V. V. TD-DFT/DFT study of thionine in aqueous solution: Vibronic absorption spectrum and electronic properties. *Optik*, v. 242, p. 167156, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003040262100824X>>.

KOZUCH, S.; MARTIN, J. M. L. “Turning Over” Definitions in Catalytic Cycles. *ACS Catalysis*, v. 2, n. 12, p. 2787–2794, 7 dez. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cs3005264>>.

KRAMER, H.; WINDRUM, G. M. THE METACHROMATIC STAINING REACTION. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 3, n. 3, p. 227–237, 1 maio 1955. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/3.3.227>>.

KREJCOVA, L. et al. Biosensors and Bioelectronics Current trends in electrochemical sensing and biosensing of DNA methylation. *Biosensors and Bioelectronic*, v. 97, n. May, p. 384–399, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.004>>.

KUNTAMUNG, K.; JAKMUNEE, J.; OUNNUNKAD, K. A label-free multiplex electrochemical biosensor for the detection of three breast cancer biomarker proteins employing dye/metal ion-loaded and antibody-conjugated polyethyleneimine-gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, n. 33, p. 6576–6585, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/D1TB00940K>>.

KUZIN, Y. I. et al. Electrochemistry of new derivatives of phenothiazine: Electrode kinetics and electropolymerization conditions. *Electrochimica Acta*, v. 375, p. 137985, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468621002759>>.

LACH, P. et al. “gate Effect” in p-Synephrine Electrochemical Sensing with a Molecularly Imprinted Polymer and Redox Probes. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 12, p. 7546–7553, 2019.

LANDRY, J. P. et al. Measuring Affinity Constants of 1450 Monoclonal Antibodies to Peptide Targets with a Microarray-Based Label-Free Assay Platform. *Journal of immunological*

methods, v. 417, p. 86–96, fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25536073>>.

LANGE, U.; MIRSKY, V. M. Chemiresistors based on conducting polymers: A review on measurement techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 687, n. 2, p. 105–113, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.030>>.

LARSSON, L.; CASTILHO, R. M.; GIANNOBILE, W. V. Epigenetics and Its Role in Periodontal Diseases: A State-of-the-Art Review. *Journal of Periodontology*, v. 86, n. 4, p. 556–568, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1902/jop.2014.140559>>.

LASIA, A. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications. In: CONWAY, B. E.; BOCKRIS, J. O.; WHITE, R. E. (Ed.). *Modern Aspects of Electrochemistry*. Boston, MA: Springer US, 2002. p. 143–248.

LASIA, A. *Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications*. 1. ed. New York: Springer-Verlag New York, 2014.

LE, H. T. N.; PARK, J.; CHO, S. A Probeless Capacitive Biosensor for Direct Detection of Amyloid Beta 1-42 in Human Serum Based on an Interdigitated Chain-Shaped Electrode *Micromachines*, 2020. .

LE, T.-H.; KIM, Y.; YOON, H. *Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers* *Polymers*, 2017. .

LEE, J. W.; CHOI, S.-R.; HEO, J. H. Simultaneous Stabilization and Functionalization of Gold Nanoparticles via Biomolecule Conjugation: Progress and Perspectives. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 13, n. 36, p. 42311–42328, 15 set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsami.1c10436>>.

LEONARD, N. D. et al. Deconvolution of Utilization, Site Density, and Turnover Frequency of Fe–Nitrogen–Carbon Oxygen Reduction Reaction Catalysts Prepared with Secondary N-Precursors. *ACS Catalysis*, v. 8, n. 3, p. 1640–1647, 2 mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02897>>.

LILLYCROP, K. A.; BURDGE, G. C. Maternal diet as a modifier of offspring epigenetics. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 6, n. 2, p. 88–95, 2015. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/maternal-diet-as-a-modifier-of-offspring>>.

epigenetics/FE72FFF08204EBEE05F047A53B498696>.

LOEWE, L.; HILL, W. G. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 365, n. 1544, p. 1153–1167, 27 abr. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0317>>.

LOHSE, S. E.; MURPHY, C. J. The Quest for Shape Control: A History of Gold Nanorod Synthesis. *Chemistry of Materials*, v. 25, n. 8, p. 1250–1261, 23 abr. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/cm303708p>>.

LU, Z. et al. One pot synthesis of dandelion-like polyaniline coated gold nanoparticles composites for electrochemical sensing applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 525, p. 86–96, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718304508>>.

LUO, H. et al. Nanoarchitected Porous Conducting Polymers: From Controlled Synthesis to Advanced Applications. *Advanced Materials*, v. 33, n. 29, p. 2007318, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/adma.202007318>>.

MAHBUBUR RAHMAN, M.; LEE, J.-J. Sensitivity control of dopamine detection by conducting poly(thionine). *Electrochemistry Communications*, v. 125, p. 107005, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248121000898>>.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 50, p. 460–471, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313004570>>.

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-ethanediylbis(nitrilomethylidyne)]-bis[4-amino-phenol]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 873, p. 114404, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665720306317>>.

MARYS, N. et al. Formation Of Thin Film Electropolymerized Phenothiazine Material e Métodos Resultados e Discussão The polymerization occurs through the. v. 395, n. 1c, p. 1999, 1999.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin.

Toxicology and Applied Pharmacology, v. 195, n. 3, p. 298–308, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X03004952>>.

MAYET, N. et al. *Probing the Surface of Noble Metals Electrochemically by Underpotential Deposition of Transition Metals Surfaces*, 2019. .

MCBRAYER, S. K. et al. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy. *Blood*, v. 119, n. 20, p. 4686–4697, 17 maio 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-377846>>.

MERA, K. et al. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. *Journal of Immunological Methods*, v. 334, n. 1, p. 82–90, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175908000550>>.

MERINO, E.; RIBAGORDA, M. Control over molecular motion using the cis-trans photoisomerization of the azo group. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 8, p. 1071–1090, 2012.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, v. 37, n. 5, p. 790–802, 1 nov. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.2144/04375RV01>>.

MOHD RADZUAN, N. A.; SULONG, A. B.; SAHARI, J. A review of electrical conductivity models for conductive polymer composite. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 42, n. 14, p. 9262–9273, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.045>>.

MONTERO-CALLE, A. et al. Versatile Electroanalytical Bioplatforms for Simultaneous Determination of Cancer-Related DNA 5 - Methyl- and 5 - Hydroxymethyl-Cytosines at Global and Gene-Specific Levels in Human Serum and Tissues. 2019.

MUHAMAD, N. B.; KHAIRUL, W. M.; YUSOFF, F. Synthesis and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) functionalized graphene with gold nanoparticles as a potential oxygen reduction electrocatalyst. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 275, p. 30–37, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022459619301719>>.

NAKAYAMA, M. et al. Electrochemical synthesis of a nanohybrid film consisting of stacked graphene sheets and manganese oxide as oxygen evolution reaction catalyst. *RSC Advances*,

2016.

NARESH, V.; LEE, N. *A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors*, 2021. .

NAVALE, A. M.; PARANJAPE, A. N. Glucose Transporters: Physiological and Pathological Roles. *Biophysical reviews*, v. 8, n. 1, p. 5–9, mar. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28510148>>.

NEUMANN, M. G.; RODRIGUES, M. R. The mechanism of the photoinitiation of the polymerization of MMA by the thionine-triethanolamine system. *Polymer*, v. 39, n. 8, p. 1657–1661, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386197004606>>.

NISHITANI, S.; SAKATA, T. Potentiometric Adsorption Isotherm Analysis of a Molecularly Imprinted Polymer Interface for Small-Biomolecule Recognition. *ACS Omega*, v. 3, n. 5, p. 5382–5389, 31 maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00627>>.

NOGUCHI, Y. et al. Expression of Facilitative Glucose Transporters in Gastric Tumors. *Hepato-gastroenterology*, v. 46, n. 28, p. 2683–2689, 1999. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/10522065>>.

OHSAKA, T.; TANAKA, K.; TOKUDA, K. Electrocatalysis of poly(thionine)-modified electrodes for oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n. 3, p. 222–224, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C39930000222>>.

OLDE DAMINK, L. H. H. et al. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 6, n. 8, p. 460–472, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00123371>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption. *ACS Sensors*, v. 4, n. 1, 2019a.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. 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*, v. 852, 2019b.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. A Chemiresistor Sensor Based on Azo-Polymer and Graphene for

Real-Time Monitoring of Mitochondrial Oxygen Consumption. *ACS Sensors*, v. 4, n. 1, p. 118–125, 25 jan. 2019c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01013>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A. et al. *Nanocomposite Materials Based on Electrochemically Synthesized Graphene Polymers: Molecular Architecture Strategies for Sensor Applications* *Chemosensors*, 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*, v. 136, p. 107242, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248122000443>>.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA BRITO, G. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *ACS Omega*, 2020.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA BRITO, G.; TEIXEIRA, M. Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *ACS Omega*, v. 5, n. 40, p. 25954–25967, [s.d.]

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*, v. 271, n. March, p. 353–357, 2018a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400518310372>>.

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*, v. 271, 2018b.

ORAZEM, M. E.; PÉBÈRE, N.; TRIBOLLET, B. Enhanced Graphical Representation of Electrochemical Impedance Data. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 153, n. 4, p. B129, 2006. Disponível em: <<http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/1.2168377>>.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. A tutorial on electrochemical impedance spectroscopy.

ChemTexts, v. 6, n. 2, p. 12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40828-020-0110-7>>.

PACHECO, J. C.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Understanding the Performance of a Nanocomposite Based on a Conjugated Azo-Polymer and Reduced Graphene Oxide with Photoelectrically Switchable Properties by Analyzing the Potential Profile during Photocurrent Generation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 221, n. 18, p. 2000225, 1 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/macp.202000225>>.

PAL, A. et al. Development of an impedimetric immunosensor for machine learning-based detection of endometriosis: A proof of concept. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 346, p. 130460, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521010285>>.

PARK, C. et al. Stress, epigenetics and depression: A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 102, p. 139–152, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763418309576>>.

PAULIUKAITE, R. et al. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Letters*, v. 43, n. 10–11, p. 1588–1608, 6 jul. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00032711003653791>>.

PAULSEN, B. D.; FRISBIE, C. D. Dependence of Conductivity on Charge Density and Electrochemical Potential in Polymer Semiconductors Gated with Ionic Liquids. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 116, n. 4, p. 3132–3141, 2 fev. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jp2093934>>.

PEARSON, C. E.; EDAMURA, K. N.; CLEARY, J. D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, v. 6, n. 10, p. 729–742, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrg1689>>.

POTTS, J. R. et al. Graphene-based polymer nanocomposites. *Polymer*, 2011.

POVEDANO, E. et al. Electrochemical affinity biosensors for fast detection of gene-specific methylations with no need for bisulfite and amplification treatments. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 6418, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24902-1>>.

POVEDANO, E. et al. Rapid Electrochemical Assessment of Tumor Suppressor Gene

Methylations in Raw Human Serum and Tumor Cells and Tissues Using Immunomagnetic Beads and Selective DNA Hybridization. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 57, n. 27, p. 8194–8198, 2 jul. 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/anie.201804339>>.

POVEDANO, E. et al. Amperometric Bioplatforms To Detect Regional DNA Methylation with Single-Base Sensitivity. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 7, p. 5604–5612, 7 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00628>>.

QIAO, J.; QI, L. Recent progress in plant-gold nanoparticles fabrication methods and bio-applications. *Talanta*, v. 223, p. 121396, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914020306871>>.

QIN, L. et al. “Gold rush” in modern science: Fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 359, p. 1–31, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854517305118>>.

QIU, L. et al. Polypyrrole nanotube-supported gold nanoparticles: An efficient electrocatalyst for oxygen reduction and catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Applied Catalysis A: General*, v. 413–414, p. 230–237, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X11006740>>.

RAHMATI, Z. et al. An electrochemical immunosensor using SARS-CoV-2 spike protein-nickel hydroxide nanoparticles bio-conjugate modified SPCE for ultrasensitive detection of SARS-CoV-2 antibodies. *Microchemical Journal*, v. 170, p. 106718, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X21008043>>.

RAJAKUMARA, E. et al. Mechanistic insights into the recognition of 5-methylcytosine oxidation derivatives by the SUVH5 SRA domain. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 20161, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep20161>>.

RAMANAVICIUS, S.; RAMANAVICIUS, A. *Conducting Polymers in the Design of Biosensors and Biofuel Cells* Polymers , 2021. .

RANDRIAMAHAZAKA, H.; ASAKA, K. Electromechanical analysis by means of complex capacitance of bucky-gel actuators based on single-walled carbon nanotubes and an ionic liquid. *Journal of Physical Chemistry C*, 2010.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3AY26476A>>.

REN, Y.; ZHOU, G. Rediscovering Mott-Schottky plots: A knee-point in the plot for passive films on chromium. *Journal of the Electrochemical Society*, 2017.

REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors Affecting the Antigen-Antibody Reaction. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, v. 5, n. 4, p. 227–240, nov. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19204779>>.

ROY, R. et al. *Biomarkers in Cancer* Biomarkers: Wiley Online Books., 20 set. 2010. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9780470918562.ch14>>.

RUDOLPH, M.; RATCLIFF, E. L. Normal and inverted regimes of charge transfer controlled by density of states at polymer electrodes. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 1048, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01264-2>>.

RUSSO, M. J. et al. Antifouling Strategies for Electrochemical Biosensing: Mechanisms and Performance toward Point of Care Based Diagnostic Applications. *ACS Sensors*, v. 6, n. 4, p. 1482–1507, 23 abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00390>>.

SABATÉ DEL RÍO, J. et al. An antifouling coating that enables affinity-based electrochemical biosensing in complex biological fluids. *Nature Nanotechnology*, v. 14, n. 12, p. 1143–1149, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41565-019-0566-z>>.

SAHALIANOV, I. et al. The intrinsic volumetric capacitance of conducting polymers: pseudo-capacitors or double-layer supercapacitors? *RSC Advances*, v. 9, n. 72, p. 42498–42508, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C9RA10250G>>.

SAMADI PAKCHIN, P. et al. Electrochemical immunosensor based on chitosan-gold nanoparticle/carbon nanotube as a platform and lactate oxidase as a label for detection of CA125 oncomarker. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 122, p. 68–74, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566318307012>>.

SANTOS, C. da C. et al. Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019.

SCHAGDARSURENGIN, U.; STEGER, K. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nature Reviews Urology*, v. 13, n. 10, p. 584–595, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.157>>.

SHAMSPUR, T. et al. An Electrochemical Immunosensor Based on Poly(Thionine)-Modified Carbon Paste Electrode for the Determination of Prostate Specific Antigen. *IEEE Sensors Journal*, v. 18, n. 12, p. 4861–4868, 2018.

SHAO, B.; XIAO, Z. Recent achievements in exosomal biomarkers detection by nanomaterials-based optical biosensors - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1114, p. 74–84, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267020302336>>.

SHEN, Q. et al. Electrochemical DNA sensor-based strategy for sensitive detection of DNA demethylation and DNA demethylase activity. *Analytica Chimica Acta*, v. 934, p. 66–71, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267016308005>>.

SINDEN, R. R.; WELLS, R. D. DNA structure, mutations, and human genetic disease. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 3, n. 6, p. 612–622, 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0958166992900054>>.

SINGH, R. K. et al. Electrochemical Impedance Spectroscopy of Oxygen Reduction Reaction (ORR) in a Rotating Disk Electrode Configuration: Effect of Ionomer Content and Carbon-Support. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 162, n. 6, p. F489–F498, 2015. Disponível em: <<http://jes.ecsdl.org/cgi/doi/10.1149/2.0141506jes>>.

SKINNER, M. K.; GUERRERO-BOSAGNA, C.; HAQUE, M. M. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of sperm epimutations promote genetic mutations. *Epigenetics*, v. 10, n. 8, p. 762–771, 3 ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1062207>>.

STILWELL, D. E.; PARK, S. Electrochemistry of Conductive Polymers: V. In Situ Spectroelectrochemical Studies of Polyaniline Films. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 136, n. 2, p. 427–433, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1149/1.2096649>>.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What Are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20978388>>.

STRONG, M. E. et al. Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte

detection in diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 177, p. 112949, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566320309349>>.

SUNDFORS, F.; BOBACKA, J. EIS study of the redox reaction of Fe(CN)₆^{3-/4-} at poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrodes: influence of dc potential and cOx:cRed ratio. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 572, n. 2, p. 309–316, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072803007939>>.

SUTHERLAND, J. E.; COSTA, M. A. X. Epigenetics and the Environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 983, n. 1, p. 151–160, 1 mar. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb05970.x>>.

TALEAT, Z. et al. Trends in Analytical Chemistry Detection strategies for methylated and hypermethylated DNA. v. 66, p. 80–89, 2015.

TAYLOR 6TH, J. G. et al. Mutations and Polymorphisms in Hemoglobin Genes and the Risk of Pulmonary Hypertension and Death in Sickle Cell Disease. *American journal of hematology*, v. 83, n. 1, p. 6–14, jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17724704>>.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. *RSC Adv.*, v. 6, n. 103, p. 101318–101322, 2016a. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA20335C>>.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. *RSC Adv.*, v. 6, n. 103, p. 101318, 2016b.

TEPALE, N. et al. *Nanoengineering of Gold Nanoparticles: Green Synthesis, Characterization, and Applications Crystals*, 2019. .

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 298, n. 2, p. E141–E145, 15 dez. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00712.2009>>.

TIAN, B. et al. Ultrasensitive determination of mercury ions using a glassy carbon electrode modified with nanocomposites consisting of conductive polymer and amino-functionalized graphene quantum dots. *Microchimica Acta*, v. 187, n. 4, p. 210, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00604-020-4191-1>>.

TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly(thionine) thin films: The

effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, n. 1, 5 jan. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.39686>>.

TOPÇU, E.; ALANYALIOĞLU, M. Electrochemical formation of poly(thionine) thin films: The effect of amine group on the polymeric film formation of phenothiazine dyes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, n. 1, p. 1–9, 2014.

TREVIZAN, H. F. et al. 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*, p. 130141, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521007103>>.

TRILLING, A. K.; ZUILHOF, H. Antibody orientation on biosensor surfaces : a minireview. p. 1619–1627, 2013.

UNNIKRISHNAN, A. et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 195, p. 172–185, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725818301980>>.

UYGUN, Z. O.; ERTUĞRUL UYGUN, H. D. A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2014.

VANOYE, L. et al. Insights in the aerobic oxidation of aldehydes. *RSC Advances*, v. 3, n. 41, p. 18931–18937, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C3RA42385A>>.

VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. Chapter 1 - Immunoassays: An Overview. In: VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. B. T.-H. OF I. T. (Ed.). [s.l.] Academic Press, 2018. p. 1–18.

VELÁZQUEZ-MANZANARES, M. et al. Electrochemical Behavior of Simetryn Herbicide at Water|1,2-Dichloroethane Interface. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 166, n. 8, p. H286–H290, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1149/2.0481908jes>>.

VON HAUFF, E. Impedance Spectroscopy for Emerging Photovoltaics. *Journal of Physical Chemistry C*, 2019.

WANG, J.-G. et al. In-situ plasmonic tracking oxygen evolution reveals multistage oxygen diffusion and accumulating inhibition. *Nature Communications*, v. 12, n. 1, p. 2164, 2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-021-22434-3>>.

WANG, J. et al. Electrochemical Oxidation and Determination of Glucose in Alkaline Media Based on Au (111)-Like Nanoparticle Array on Indium Tin Oxide Electrode. *Electrochimica Acta*, v. 138, p. 174–186, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468614013164>>.

WEI, F.; LILLEHOJ, P. B.; HO, C.-M. DNA Diagnostics: Nanotechnology-Enhanced Electrochemical Detection of Nucleic Acids. *Pediatric Research*, v. 67, n. 5, p. 458–468, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d361c3>>.

WELCH, N. G. et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases*, v. 12, n. 2, p. 02D301, 16 mar. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1116/1.4978435>>.

WILD, D.; DAVIES, C. Chapter 1.2 - Immunoassay for Beginners. In: WILD, D. B. T.-T. I. H. (FOURTH E. (Ed.). Oxford: Elsevier, 2013. p. 7–10.

WOLFART, F. et al. Electrochemical supercapacitive properties of polypyrrole thin films: influence of the electropolymerization methods. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 20, n. 4, p. 901–910, 2016.

WU, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, v. 369, n. 2, p. 119–124, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898106002075>>.

WU, Y.; ZHANG, B.; GUO, L. Label-Free and Selective Photoelectrochemical Detection of Chemical DNA Methylation Damage Using DNA Repair Enzymes. 2013.

XIA, N.; HAO, Y. Recent Progress in Electrochemical Biosensors for Detection of DNA Methylation and Methyltransferase Activity. v. 14, p. 1843–1854, 2019.

XIA, Y. et al. The Constant Region Affects Antigen Binding of Antibodies to DNA by Altering Secondary Structure. *Molecular immunology*, v. 56, n. 1–2, p. 28–37, nov. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23665381>>.

YIN, H. et al. Electrochemical biosensor for DNA demethylase detection based on demethylation triggered endonuclease BstUI and Exonuclease III digestion. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 66, p. 266–270, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566314009154>>.

ZAIDI, S. A.; SHAHZAD, F.; BATOOL, S. Progress in cancer biomarkers monitoring strategies using graphene modified support materials. *Talanta*, v. 210, p. 120669, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914019313025>>.

ZHANG, C. et al. An oriented antibody immobilization based electrochemical platform for detection of leptin in human with different body mass index. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 353, p. 131074, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400521016427>>.

ZHANG, M. et al. Recent advances in the synthesis and applications of graphene–polymer nanocomposites. *Polym. Chem.*, v. 6, n. 34, p. 6107–6124, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PY00777A>>.

ZHAO, M. et al. Electrochemical polymerization: an emerging approach for fabricating high-quality luminescent films and super-resolution OLEDs. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 8, n. 16, p. 5310–5320, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C9TC07028A>>.

ZHOU, Y. et al. Enzyme-based electrochemical biosensor for sensitive detection of DNA demethylation and the activity of DNA demethylase. *Analytica Chimica Acta*, v. 840, p. 28–32, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014007533>>.

ZHU, B. et al. Biosensors and Bioelectronics Distinguishing cytosine methylation using electrochemical , label-free detection of DNA hybridization and ds-targets. v. 64, p. 74–80, 2015.

ZHU, B.; TRAVAS-SEJDIC, J. PNA versus DNA in electrochemical gene sensing based on conducting polymers : study of charge and surface blocking effects on the sensor signal †. p. 687–694, 2018.

ZOZOULENKO, I. et al. Polarons, Bipolarons, And Absorption Spectroscopy of PEDOT. *ACS Applied Polymer Materials*, v. 1, n. 1, p. 83–94, 11 jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00061>>.