



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS NATURAIS – QUÍMICA
CAMPUS DE SÃO BERNARDO**

LAÍS CRISTINA MENDES ARAÚJO

ELABORAÇÃO DE UM BIOSSENSOR PARA MONITORAMENTO DE PSA

São Bernardo - MA

2019

LAÍS CRISTINA MENDES ARAÚJO

ELABORAÇÃO DE UM BIOSENSOR PARA MONITORAMENTO DE PSA

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Naturais com Habilitação em Química da Universidade Federal do Maranhão, sob orientação do professor Dr. André da Silva Freires, para obtenção da graduação em Ciências Naturais/Química.

São Bernardo - MA

2019

LAÍS CRISTINA MENDES ARAÚJO

ELABORAÇÃO DE UM BIOSSENSOR PARA MONITORAMENTO DE PSA

Monografia Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André da Silva Freires (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Prof. Dr. Josberg Silva Rodrigues (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Prof. Esp. Ednaldo dos Reis Santos – (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Dedico esse trabalho a Deus pela vida, força e disposição para realizar este trabalho. Aos meus pais João Junior e Zélia Silva, à minha irmã Tereza Cristina, a José Wilami e todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me honrado com a vida, por ter me guiado nessa caminhada e pelas bênçãos que ele me propôs, pois sem ele eu não sou nada.

Agradeço aos meus pais João Júnior Sardinha e Zélia Silva, por estarem sempre ao meu lado, me incentivando, me apoiando e jamais me deixaram desistir de lutar pelos meus sonhos, obrigada pai, mãe por nunca terem desistido de mim, obrigada por cada abraço, palavra de incentivo e até mesmo pelas broncas, obrigada por me ajudarem quando precisei. Vocês são minha fortaleza, minha razão de vida. Eu amo muito, muito vocês!

À minha irmã Tereza Cristina, que sempre me apoiou, torceu por mim e contribuiu de forma indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado José Wilami Fernandes, pelo amor, carinho, incentivo e por compartilhar comigo esse momento. Que foi o meu pilar nessa minha etapa, sem Deus e ele não teria conseguindo, pois por tantas vezes me apoiou e incentivou a não desistir e me ajudou me dando apoio moral para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também à minha amiga e companheira de todas as horas Nágila Carvalho, pois me ajudou em dos momentos mais difícil nessa etapa de curso, me apoio quando fraquejei, obrigada pela dedicação, foi meu ombro direito, foi mais que amiga, foi uma irmã. Sempre se preocupou e não me deixou desistir jamais.

À minha prima Monica Sardinha por me ajudar em momentos que tive dúvidas em meu TCC, mesmo estando longe sempre teve disposta a me auxiliar sem medir esforços, muito obrigada.

Obrigada a toda minha família, por estarem sempre orando por mim, por sempre estarem ao meu lado e por todo apoio e carinho que recebo.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. André Freires, pela orientação, paciência, compreensão, dedicação e pela contribuição na realização deste trabalho, sem ele não iria conseguir terminar, muito obrigada, principalmente pela paciência, que em meios as tribulações sempre foi paciente.

Aos meus colegas de turma, principalmente os amigos por estarem sempre comigo, pela ajuda, pelo carinho, por estarmos sempre juntos e nos apoiando nessa longa caminhada.

A todo o corpo docente da Universidade Federal do Maranhão – campus São Bernardo, em especial a Prof.^a Dr.^a Vilma Bragas de Oliveira, Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro Evangelista, Prof. Dr. Josberg Silva Rodrigues, Prof.^a Dr.^a Djavânia Azevedo da Luz , Prof.^a Ma. Gilvana do Nascimento Rodrigues, Prof.^a Dr.^a Louise Lee da Silva Magalhães, a coordenação Prof.^o Dr.^o

Leonardo Dominici Cruz, a coordenadora de estágio Prof.^a Dr.^a Fernanda Fernandes, pela dedicação e empenho de cada um em seus ensinamentos.

Enfim, agradeço a todos que participaram de forma direta e indireta na realização deste trabalho.

Quando se aprende a amar, o mundo passa a ser seu.

(Renato Russo)

RESUMO

O presente trabalho apresenta a elaboração de um biossensor fotoeletroquímico à base do semicondutor óxido de cobre (Cu_2O) e o material biológico anticorpo do PSA para detecção do PSA. O sensor foi caracterizado pela técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e as medidas de fotocorrente foram obtidas por amperometria empregando-se uma lâmpada de luz LED como fonte de irradiação. Após a otimização dos parâmetros experimentais o biossensor apresentou boa resposta para a imunorreação exibindo uma ampla faixa linear de concentração entre 1,0 ng / mL e 1000,0 ng / mL (com $r^2 = 0,995$), com limite de detecção de 1,0 ng / mL. A seletividade do fotosensor foi avaliada frente às espécies, tais como ácido úrico, ácido ascórbico, BSA e glicose e os resultados demonstraram que o biossensor proposto apresenta uma boa seletividade para a detecção de PSA.

Palavras-chave: Biossensor. Óxido de Cobre. PSA.

ABSTRACT

The present work presents the preparation of a photoelectrochemical biosensor based on the copper oxide (Cu₂O) semiconductor and the PSA biological antibody material for the PSA detection. The sensor was characterized by the Electrochemical Impedance Spectroscopy technique and the photocurrent measurements were obtained by amperometry employing an LED light as an irradiation source. After optimization of the experimental parameters, the biosensor presented a good response to the immunoreaction, exhibiting a wide linear concentration range between 1.0 ng / mL and 1000.0 ng / mL (with $r^2 = 0.995$), with a detection limit of 1.0 ng / mL. The photosensor selectivity was evaluated against the species such as uric acid, ascorbic acid, BSA and glucose, and the results had demonstrated that the proposed biosensor presents a good selectivity for the PSA detection.

Keywords: Biosensor. Copper Oxide. PSA.

LISTA DE SIGLAS

PSA: Antígeno Prostático Específico

BC: Banda de condução

EG: Band gap

BV: Banda de valência

PEC: Biossensor Fotoeletroquímico

CP: Câncer de Próstata

EIS: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

CuO: Óxido de cobre

YSI: Yellow Spring Instruments

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Estrutura tridimensional do PSA..... | 16 |
| Figura 2- Esquema geral de um biossensor..... | 18 |
| Figura 3- Representação esquemática do mecanismo PEC..... | 20 |
| Figura 4- Diagrama Nyquist realizados em solução 0,1 mol L ⁻¹ de KCl contendo 5,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} para o ITO não modificado (espectro vermelho), ITO modificado com: Cu ₂ O (espectro preto); anti-PSA/Cu ₂ O (espectro azul)..... | 26 |
| Figura 5- Resposta fotoeletroquímica do Cu ₂ O/ITO (amperograma preto), anti-PSA/Cu ₂ O/ITO (amperograma vermelho) e anti-PSA/Cu ₂ O/ITO após reação com PSA (amperograma azul), em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0, potencial aplicado de -0,2 V..... | 27 |
| Figura 6- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu ₂ O/ITO em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , em diferentes valores de pH, potencial aplicado de -0,2 V..... | 28 |
| Figura 7- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu ₂ O/ITO em diferentes tampões na concentração de 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,0, potencial aplicado de -0,2 V..... | 29 |
| Figura 8- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu ₂ O/ITO em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,0, em diferentes valores de potencial..... | 30 |
| Figura 9- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu ₂ O/ITO em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,0, para diferentes tempo de incubação, potencial aplicado de -0,2 V..... | 31 |
| Figura 10- (a) Amperogramas referente à diferentes concentrações de PSA em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0. (b) curva analítica. Estudos conduzidos sob condições experimentais e operacionais otimizadas. E _{appl.} = - 0,2 V..... | 32 |
| Figura 11- Efeito de alguns interferentes que podem influenciar na resposta do PSA..... | 33 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 Câncer de Próstata | 15 |
| 2.2 Biossensores | 17 |
| 2.2.1 Tipos de Biossensores | 19 |
| 2.3 Fotoeletroquímica | 19 |
| 3 OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Geral | 23 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 23 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4.1 Reagente e Soluções | 24 |
| 4.2 Estudos Eletroquímicos e Fotoeletroquímicos | 24 |
| 4.3 Construção do sensor fotoeletroquímico anti-PSA/Cu₂O/ITO | 25 |
| 5 RESULTADO E DISCUSSÃO | 26 |
| 5.1 Caracterização do sensor por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica ... 26 | |
| 5.2 Comportamento fotoeletroquímico do sensor na ausência e presença do PSA . 27 | |
| 5.3 Influência dos parâmetros experimentais e operacionais na resposta fotoeletroquímica de HQ sobre o biossensor HRP-CuS/FTO 27 | |
| 5.4 Desempenho analítico do biossensor fotoeletroquímico para determinação de PSA31 | |
| 5.5 Estudo da seletividade do sensor 33 | |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |

1 INTRODUÇÃO

Nas mais diversas áreas clínica, farmacológica, biológica, alimentos e ambiental a necessidade de monitoramento de microrganismos e de substâncias biológicas ou químicas que possam causar algum dano à saúde é primordial, nesse sentido a busca por dispositivos ou técnicas que possam realizar com precisão e rapidez análises como, de fármacos, drogas, análises de alimentos, diagnóstico de doenças, cresce rapidamente.

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que o câncer de próstata (CP) é a neoplasia maligna não cutânea mais comum que acomete o homem brasileiro e a segunda maior causa de mortalidade por câncer masculino, em 2018 pelo INCA foi constado 68.220 casos de câncer de próstata. Entre a faixa etária mais acometida encontram-se os homens com mais de 50 anos, sendo com maior incidência na zona periférica da próstata e, portanto, assintomático nas fases iniciais (INCA, 2018). Com o advento do Antígeno Prostático Específico (PSA), tem se mostrado como fator importante, porém não exclusivo nesse processo. Isso porque várias doenças como prostatite crônica, prostatite aguda, CP e outras elevam os níveis sérico dessa proteína. Através de biópsias mais precoce e protocolos atuais, permitiu-se o diagnóstico mais precoce da doença. Atualmente, na tentativa de se diminuir a mortalidade específica da doença, a idade recomendada para a primeira determinação sérica do PSA, segundo a Associação de Urologia, é a partir dos 40 anos.

Nesta vertente, o campo dos biossensores tem se mostrado como uma ótima opção sendo empregado na detecção e monitoramento em áreas como: ambiental (AMINE, 2006), análises para a segurança alimentar (FERRO, 2008), diagnóstico clínico (RIBOVSKI, 2017) entre outros. Muitas pesquisas constam que sensores e biossensores estão cada vez mais frequentes e são melhores para detecção de câncer e biomarcadores cardíacos do que outros meios de análises (CELINE, 2016).

Sensores são dispositivos sensíveis à interação com alguma forma de energia do ambiente podendo ser luminosa, térmica, cinética, entre outras, relacionando informações sobre uma grandeza física que precisa ser mensurada, como: temperatura, pressão, velocidade, corrente, etc. O sinal de saída deve ser manipulado antes da sua leitura no sistema de controle. A qualidade das informações com um mínimo de manipulação do sistema depende da interação do sensor com o analito, o sensor é unido a um transdutor, que converte a interação analito-sensor em um sinal analítico mensurável (RODRIGUES et al., 2018). Os sensores apresentam boa aceitação no mercado por ser um modelo limpo para aplicações analíticas, ou seja, não produz resíduos, são rápidos nas análises, tem

baixo custo de produção, são precisos e seletivos e com uma alta sensibilidade (RUIZ, 2015). Atualmente existem vários tipos de sensores, podendo ser citados os sensores eletroquímicos, sensores ópticos, amperométricos, piezo elétricos.

Uma classe interessante a ser destacada são os biossensores que são dispositivos que fazem uso de materiais biológicos, tais como, proteínas, enzimas, anticorpos, DNA e células, acoplados em um transdutor. Em relação aos métodos convencionais, os biossensores oferecem vantagens, como baixo custo, resposta rápida, portabilidade, fácil manuseio e as etapas de tratamentos das amostras não são tão complexas, além de poderem ser miniaturizados. Os biossensores podem ser melhores ainda do que os sensores, pois apresentam características excelentes como: seletividade, reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade e linearidade (BHALLA et al., 2016).

Recentemente uma nova classe de biossensores vem ganhando destaque na literatura são os biossensores fotoeletroquímicos, devido apresentarem excelentes propriedades como boa estabilidade, seletividade e robustez, estes dispositivos combinam propriedades das técnicas fotoquímica/eletroquímica. Para elaboração de um biossensor fotoeletroquímico é de extrema importância a escolha adequada dos materiais fotoativos ou as combinações destes. Materiais como óxidos metálicos, nanomateriais de carbono, quantum dots, halogenetos, complexos inorgânicos, são exemplos de compostos fotoativos utilizados no desenvolvimento desses dispositivos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de Próstata

O câncer de próstata é mais frequente em homens de idade mais avançada entre 55 anos em diante, mas também pode surgir por histórico familiar e por problemas de saúde como obesidade e sobrepeso, é uma das principais causas de mortes em homens. Esse câncer ocorre na próstata, que é uma glândula que está localizada abaixo da bexiga juntamente com a uretra, canal que liga a bexiga ao orifício externo do pênis. Estimasse que em cada 100 mil homens, 66,12 apresentam o câncer de próstata (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Algumas células podem se multiplicar muito rápido descontroladamente formando tumores que podem ser benignos ou malignos, conhecido como câncer, em alguns casos o câncer de próstata pode crescer sem causar sérios danos e seu crescimento é lento, já em outros casos seu crescimento é rápido, podendo se espalhar para outros órgãos causando a morte (VIEIRA, 2012), esse fenômeno é conhecido como metástase.

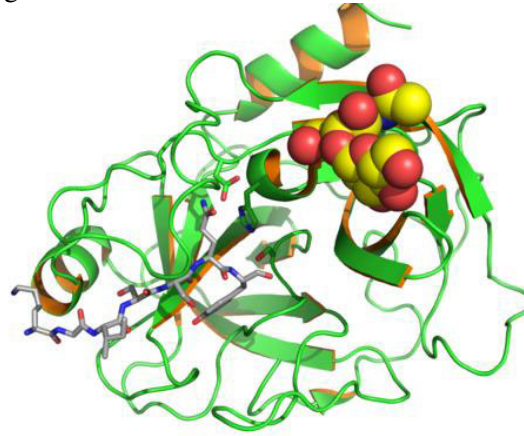
O diagnóstico precoce dessa doença evita muitas mortes aos homens, aumentando suas chances de cura antes que se manifeste por outros órgãos, levando assim ao óbito (CASTANHO e BARROS, 2007). A causa de muitas mortes é o diagnóstico tardio da doença, homens com idade entre 45 e 50 anos têm o preconceito e medo do exame de detecção da doença, o toque renal. Barros 2007 diz que, a falta de conhecimentos, preconceito ao exame, a falta de procedimentos tanto sensíveis como específico que possa identificar o tumor ainda na sua fase microscópica são alguns dos motivos do diagnóstico tardio da doença.

Alguns autores relatam que o exame de toque renal tem uma ideia que pode chegar a ser uma violação e até comprometer a masculinidade dos homens. Independente do exame ser eficaz, aspectos simbólicos interferem na decisão de se fazer o diagnóstico criando assim uma barreira entre os homens (NASCIMENTO, 2000; GOMES, 2018).

O PSA (antígeno específico da próstata) é uma molécula produzida na próstata e tem como principal função liquefazer o coágulo seminal Figura 1, sua presença no plasma é normalmente pequena, quando o indivíduo está com CP a produção desse antígeno é maior. Assim foi desenvolvido o exame PSA, um tipo de exame de sangue que analisa a quantidade de antígeno específico prostático presente no sangue. A detecção do PSA só foi possível após o isolamento e a purificação do mesmo, em virtude disso, foi possível o desenvolvimento de métodos imunológicos. Esse método tinha uma sensibilidade de 5.000 a 1 ng/mL, atualmente a detecção quantitativa do PSA é feita com ajuda de

computadores que utilizam técnicas imunológicas, essas técnicas são altamente sensíveis com pelo menos 0,001 ng/mL, ajudando a análise do PSA em muitos fluidos biológicos extraprostático (SAWAYA e ROLIM, 2004).

Figura 1- Estrutura tridimensional do PSA.



Fonte: WIKIPEDIA, 2019.

O PSA é um excelente e importante marcador para determinar e detectar o estágio e monitorar o câncer de próstata, ajuda a diferenciar as patologias prostática benigno e maligno e descarta as biópsias desnecessárias, tendo em mente que com o aumento da idade seus níveis aumentam (CONTE et al., 2010). A concentração de PSA no soro humano é < 4 ng/mL para pessoas saudáveis, sua detecção no sangue é importante para o diagnóstico do CP (LEI et al, 2019).

Exames de prevenção são opções para que no futuro os homens não sejam diagnosticados com essa doença. Estilos de vida mais saudáveis como: evitar o consumo exagerado de bebidas alcoólicas, não fumar, manter a massa corporal adequada, praticar exercícios físicos com frequência e sempre ter uma alimentação saudável, contribuem para evitar o aparecimento da doença. Os sinais mais frequentes dessa doença é dificuldade de urinar, sangramento na urina, necessidade de urinar diversas vezes, entre outros sintomas. Para a detecção são feitos exames tanto de sangue PSA como o exame de toque retal.

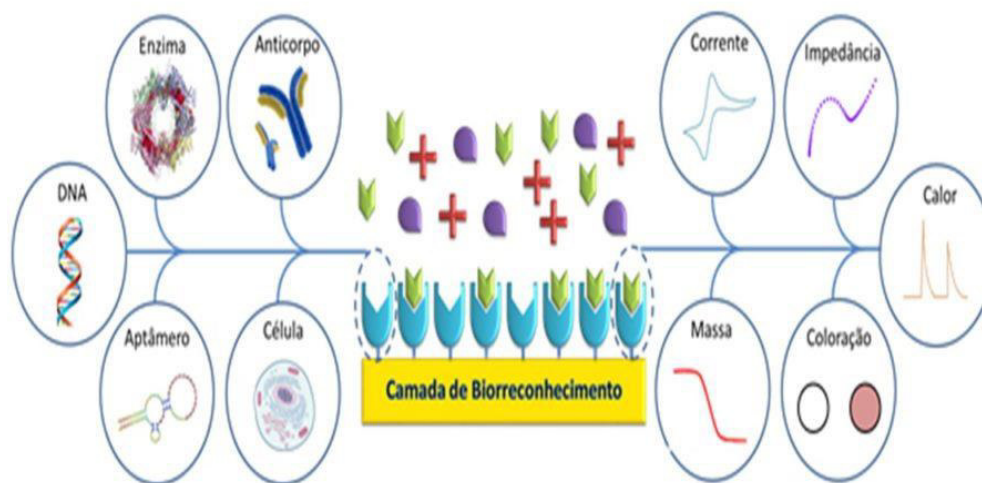
Uma maneira de detectar a concentração do PSA é realizando ensaios imunológicos com seu anticorpo através de uma reação específica antígeno-anticorpo. Sendo assim os biossensores são uma alternativa viável para monitorar esse tipo de reação.

2.2 Biossensores

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) “Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que está em contato direto com o elemento de transdução” (THÉVENOT et al., 2001). O primeiro biossensor foi desenvolvido por Leland C. Clark Jr em 1956 ele é conhecido como “pai dos biossensores” pois criou o biossensor para detecção do oxigênio, sua invenção é chamada de Eletrodo Clark. Apenas em 1975 foi desenvolvido o primeiro biossensor comercial pela Yellow Spring Instruments (YSI).

Um biossensor apresenta os seguintes componentes: analito, a substância a ser analisada; bioreceptor, tem função de reconhecer o analito, exemplos de bioreceptor são: enzimas, DNA, células, anticorpos entre outros, esse processo gera um sinal (luz, potencial, calor, carga, corrente, etc), esquema demonstrado na Figura 2, quando ocorre a interação do bioreceptor com o analito esse processo é chamado de bio-reconhecimento; transdutor, tem o papel de converter um tipo de energia em outra, o transdutor converte o bio-reconhecimento em um sinal mensurável, esse processo é conhecido como sinalização, quase todos os transdutores produzem sinais ópticos ou elétricos que são proporcionais a interação entre o bioreceptor e o analito; eletrônica, tem a função de traduzir o sinal transduzido, ou seja, condiciona os sinais, ampliando e fazendo a conversão do sinal analógico para o formato digital, esses sinais são quantificados; visor, nessa parte ocorre a interação do software com o hardware que mostra os resultados do biossensor para os usuários, esse resultado demonstrado pelo visor pode ser por imagem, numérico, tabular ou gráfico (BHALLA et al., 2016).

Figura 2- Esquema geral de um biossensor.



Fonte: BRAZACA, 2019.

Os biossensores estão cada vez mais sendo utilizados em várias áreas por possuírem grandes vantagens, eles têm baixo custo, alta sensibilidade, alta especificidade, respostas rápidas entre outras vantagens (RODRIGUES et al., 2018). A seletividade é uma das características mais importante de um biossensor, a seletividade estar diretamente envolvida na capacidade de um bioreceptor detectar o analito de interesse tendo na amostra aditivos e contaminantes, um exemplo é a interação de um anticorpos com o antígeno, o processo acontece quando os anticorpos (bioreceptor) são imobilizado no transdutor, uma solução contendo os antígenos é exposta ao transdutor, onde ocorre a interação apenas dos antígenos com os anticorpos. A reprodutibilidade é a capacidade de precisão do biossensor que gera respostas idênticas ou semelhantes a cada vez que a amostra é analisada, tem a capacidade de fornecer um valor médio próximo ao valor real, levando em conta que a amostra será analisada mais de uma vez, sinais de reprodutibilidade fornece altíssima confiança para as respostas de um biossensor. A estabilidade é um recurso crucial quando se usa um biossensor para monitoramento contínuo, a temperatura, a afinidade do bioreceptor e a degradação do bioreceptor podem influenciar na estabilidade do biossensor, por isso devem ser feitas algumas medidas, como, ajuste apropriado de eletrônica para se ter uma resposta estável do sensor. Sensibilidade é a capacidade do biossensor conseguir detectar o analito mesmo em quantidades baixíssimas como ng/mL ou até mesmo fg/mL (BHALLA et al., 2016).

Existem várias classificações de dispositivos do tipo biossensores, eles podem ser classificados de acordo com o material biológico específico, também pode ser classificado pelo tipo de sinal de transdução e até mesmo pela combinação dos dois (THÉVENOT et al., 2001).

2.2.1 Tipos de Biossensores

Biossensores por enzimas – esses biossensores foram projetados em 1967 por Updike e Hicks, esse dispositivo é baseado na imobilização, ou seja, utiliza a adsorção de enzimas por meio de forças de van der Waals, ligações covalentes ou iônicas. As enzimas utilizadas são do tipo amino oxidases, polifenoloxidasas, oxidoredutases e peroxidases.

Biossensores de DNA – são baseados na detecção e quantificação específica de DNA, são bastante utilizados na área da saúde, esse tipo de dispositivo tem a capacidade de diagnosticar com mais rapidez quase todas as doenças, tem também a capacidade de diagnosticar venenos como pesticidas e a resistência a antibióticos (BLAIR e CORRIGAN, 2019).

Biossensores baseados em células – eles foram desenvolvidos por Diviés. Biossensores baseados em tecido tem como base tecido vegetal e animal, o analito pode ser um inibidor, os que são baseados em organelas foram desenvolvidos utilizando cloroplastos, membranas, microsomos e mitocôndrias.

Imunossensores – foram desenvolvidos com base em anticorpos, pois têm uma alta interação com seus antígenos, mesmo que na amostra contenha contaminantes os anticorpos só irão reagir com seus antígenos.

Biossensores magnéticos – são baseados na detecção micro e nanopartículas magnéticas, esses tipos de biossensores são bastantes sensíveis e tem grande potencial em termos de tamanho, neles são utilizados o efeito de magnetorresistência.

Biossensores piezo elétricos – utiliza dois tipos de técnicas, uma por meio da microbalança de cristal de quartzo e a outra por meio de aparelhos de ondas acústicas de superfície, são baseados na mudança da frequência de ressonância de um cristal piezoelétrico.

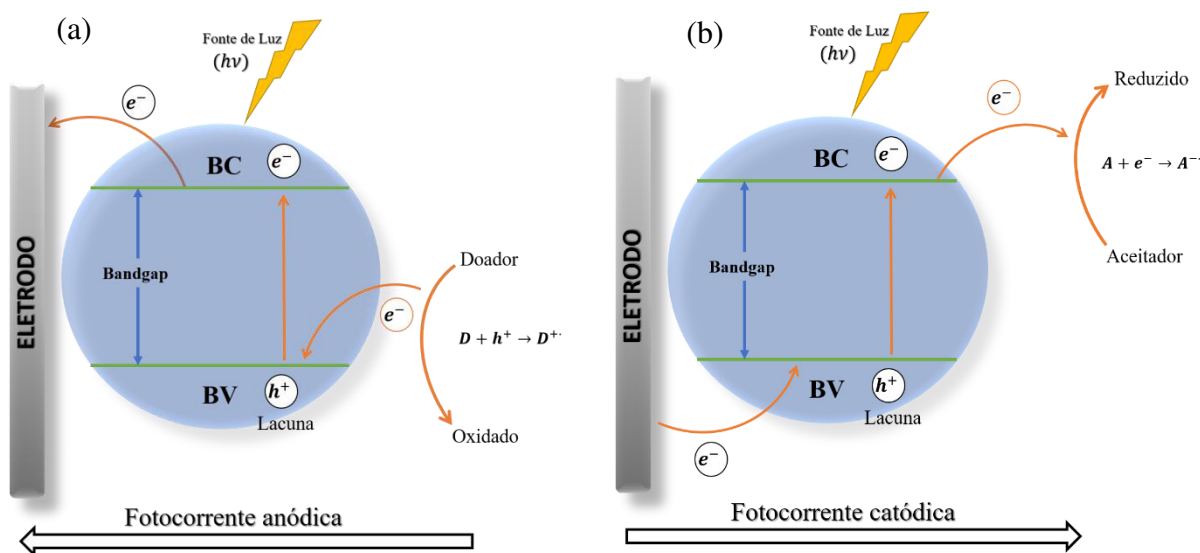
Biossensores ópticos – são feitos por uma fonte de luz, onde gera um feixe de luz com características específicas, utilizando a ajuda de um fotodetector para levar essa luz para um agente modulador.

2.3 Fotoeletroquímica

O Biossensor Fotoeletroquímico (PEC) vem se destacando cada vez mais em relação aos outros biossensores pois eles têm uma alta sensibilidade, uma excelente detecção e separação de sinais da fonte de excitação, são altamente sensíveis graças as baixas respostas de correntes por causa da excitação eletroquímicas com o acoplamento de luz, em comparação aos outros biossensores como o baseado em fluorescência o sistema PEC são melhores, pois não requerem de imagens ótica, o método fotoeletroquímica é muito mais simples, rápido e econômico. Esse dispositivo vem aumentando o interesse na área das pesquisas tendo o alvo em bio-sistema, como antígenos, enzimas, DNA, proteínas entre outros (ATCHUDAN et al., 2019).

O processo fotocatalítico tem início ao se irradiar o material fotoativo com fótons de energia superior ou igual ao band gap (E_g), nesse momento há promoção de elétrons excitados (e^-) para a banda de condução (BC) e formação de lacunas (h^+) na banda de valência (BV). É essencial que haja um processo apropriado para suprimir a recombinação do par e^-_{BC}/h^+_{BV} e assim seja gerada fotocorrente no sistema. A Figura 3, mostra o processo de fotoexcitação em um semiconductor.

Figura 3- Representação esquemática do mecanismo PEC.



Fonte: SAKE, 2017.

O sistema PEC tem como base um eletrodo semiconductor fotoativo do tipo-n ou tipo-p, o eletrodo de trabalho e um contra-eletrodo são feitos pelo um semiconductor ou metal (YI-TONG et al., 2019). A interface de um biossensor fotoeletroquímico são basicamente compostos de materiais foto-eletroativos e receptores biológicos, os matérias

foto-eletoativos servem como um transdutor de energia para gerar fotocorrente após a iluminação, esse transdutor serve para imobilizar o receptor biológico, para melhorar o sensor PEC, podem ser utilizados várias nanopartículas semicondutoras, elas têm mostrado um desempenho de detecção superior, as nanopartículas semicondutoras desenvolvem um papel importante nos biossensores PEC, isso por causa de suas características elétricas e ópticas e por causa de sua estabilidade físico-química (ATCHUDAN et al., 2019).

A bioanálise fotoeletroquímica (PEC) é baseada na iluminação da luz, seu princípio está relacionado com conversão foto-elétrica das espécies semicondutoras com um transdutor. A PEC foi recentemente adaptada para detecção de biomoléculas sensíveis, pois a necessidade de se ter bioanálise com grande poder de sensibilidade, que tenha respostas rápidas e específicas é de grande importância para inúmeras áreas, por exemplo, segurança alimentar, diagnósticos de doenças, monitoramento ambiental e pesquisas de novos medicamentos. A PEC é uma técnica mais simples onde possui instrumentos simples e modos de detecção mais fáceis, onde seu custo é barato, possui alta sensibilidade por causa da energia utilizada como fonte de entrada (excitação) e de saída de sinal (detecção). Comparados com bioanálise óptica, os sensores PEC são mais fáceis e de baixo custo e eles podem ser preparados com técnicas de bancadas (YI-TONG, 2019).

Para que seja possível a construção de biossensores fotoeletroquímicos com boa estabilidade, seletividade e robustez é de extrema importância a escolha adequada dos materiais fotoativos ou as combinações destes. Materiais como óxidos metálicos, nanomateriais de carbono, quantum dots, halogenetos, complexos inorgânicos, são exemplos de compostos fotoativos utilizados no desenvolvimento de biossensores fotoeletroquímicos.

Os semicondutores de óxido de metal em muitos dos casos têm vantagens de manipulações simples, tem baixo custo e grande estabilidade química. O óxido de cobre (CuO) é um típico semicondutor do tipo-p, ele absorve bem a luz visível do espectro solar e isso tem atraído muito a atenção. Os semicondutores do tipo-p têm rápida transferência de elétrons para a solução eletrolítica onde gera um fluxo de fotocorrente catódica (YI-TONG, 2019). O óxido de cobre é um excelente semicondutor com band-gap de 1,34 eV, alta atividade catalítica, não é tóxico, e encontra várias aplicações sendo comumente usado na preparação de catalisadores, sensores de gás, biossensores, semicondutores e

baterias recarregáveis de íons de lítio (CHEN, 2003; CHOWDHURI, 2004; LUQUE et al., 2005; e SUN, 2013).

Baseado no que foi apresentado o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor fotoeletroquímico à base de óxido de cobre (Cu_2O) modificado com o anti-PSA para determinação do seu anticorpo. Neste sistema utilizou-se a luz LED visível como fonte de energia.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver uma nova plataforma para a obtenção de um biosensor fotoeletroquímico à base do semicondutor Cu_2O e do material biológico a anti-PSA para a determinação do PSA.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Modificar a superfície do eletrodo de ITO com Cu_2O por eletrodeposição;
- b) Imobilizar o anti-PSA, sobre a superfície do ITO modificado com Cu_2O ;
- c) Estudar as resistências à transferência de carga dos filmes preparados por Espectrometria de Impedância Eletroquímica;
- d) Verificar a resposta fotoamperométrica do sensor anti-PSA- Cu_2O /ITO na ausência e presença do PSA;
- e) Otimizar a resposta fotoeletroquímica do biossensor em termos do pH, solução tampão, tempo de interação e potencial aplicado;
- f) Construir curva analítica para o PSA;
- g) Avaliar a seletividade do biossensor frente às respostas fotoeletroquímicas de espécies interferentes;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagente e Soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. Sulfato de cobre (Sigma), citrato de sódio (Isofar), ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES), fosfatos de sódio monobásico (Isofar), ácido cítrico (Synth), sulfato de sódio (Isofar), ácido ascórbico (Isofar), ácido úrico (Isofar), glicose (Isofar), glutraldeído (Sigma), BSA (Sigma), quitosana (Sigma), anti-PSA e PSA (Sigma). Todas soluções foram preparadas com água purificada num sistema OS100LXE, obtido da companhia GEHAKA (Gehaka Ltd., São Paulo, SP, Brasil).

4.2 Estudos Eletroquímicos e Fotoeletroquímicos

As medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica e as medidas fotoeletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Methrom controlado pelo Software Nova 2.1 conectada a uma célula contendo três eletrodos: Óxido de estanho dopado com índio (ITO) utilizado como eletrodo de trabalho; um fio de ouro, utilizado como contra-eletrodo e o eletrodo de Ag/AgCl (saturado) como eletrodo de referência.

Os espectros de impedância foram obtidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de uma solução de KCl contendo 5 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ numa faixa de frequência de $10 \text{ MHz} - 0,1 \text{ MHz}$, sob amplitude AC de 10 mV .

Para se estabelecer as melhores condições experimentais em relação à atividade fotoeletroquímica do biossensor para determinação do PSA estudou-se os efeitos do pH em diferentes valores (5,0; 5,5; 6,0; 6,6; 7,0; 7,5 e 8,0), solução tampão HEPES, McIlvaine e fosfato, potencial nos valores de $-0,1$, $-0,2$, $-0,3$, $-0,4$ e $-0,5 \text{ V}$, e tempo de incubação nos valores de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min.

Os experimentos de fotoeletroquímica iniciais antes da otimização dos parâmetros operacionais e experimentais foram realizados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato, pH 7,0, aplicando-se um potencial ao eletrodo de trabalho de $-0,2 \text{ V}$, sob aplicação de luz LED, em uma célula de $5,0 \text{ mL}$. Após a otimização dos parâmetros as medidas foram realizadas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão fosfato, pH 5,0, aplicando-se um potencial ao eletrodo de trabalho de $-0,2 \text{ V}$, e tempo de incubação de 15 min.

A curva analítica foi construída utilizando solução padrão de PSA numa faixa de concentração de 1 ng/mL a 1000 ng/mL .

O estudo de possíveis interferentes como BSA, glicose, ácido úrico, ácido ascórbico, foi realizado na presença do biossensor fotoeletroquímico proposto. Avaliou-se a resposta fotoeletroquímica de PSA na presença de cada interferente numa proporção 1:1, 1:10 e 1:100.

Todos os experimentos fotoeletroquímicos foram realizados no interior de uma caixa para controlar a entrada de luz contendo a célula eletroquímica de três eletrodos.

4.3 Construção do sensor fotoeletroquímico anti-PSA/Cu₂O/ITO

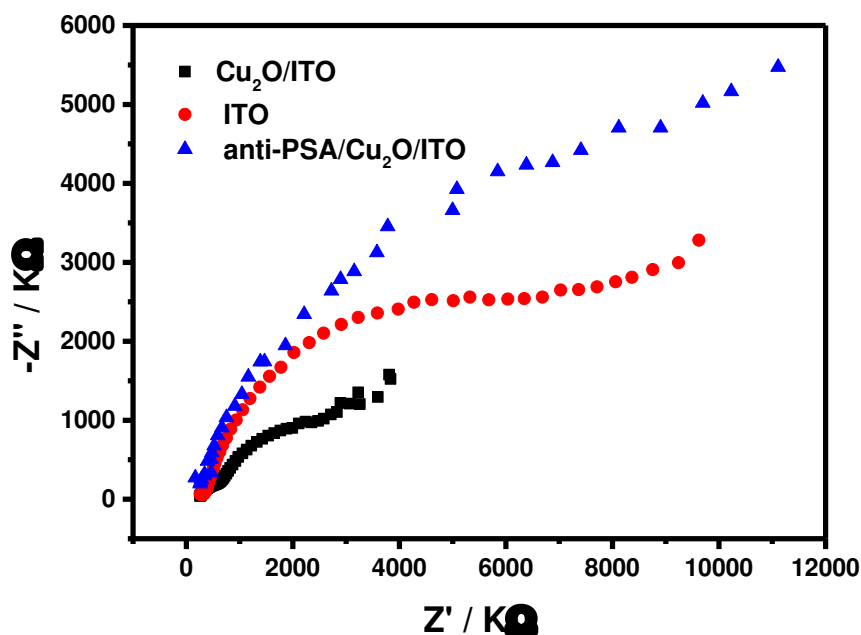
Inicialmente, o eletrodo de ITO foi imerso em uma solução etanólica durante 15 minutos em um ultrassom para remoção de quaisquer espécies adsorvidas e em seguida o eletrodo foi lavado com água destilada. Posteriormente preparou-se 10,0 mL de uma solução aquosa contendo 0,4 mol L⁻¹ de Na₃C₆ H₅O₇ e 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ de CuSO₄, com pH em torno de 5,5, sendo corrigido com ácido tartárico para pH 2,5. A eletrodeposição de Cu₂O foi realizada por amperometria (HOSSAIN et al., 2017), com potencial aplicado -0,5 V, durante 3600 s. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 10 µL da solução contendo 250 µg / mL de Anti-PSA, glutaraldéido 1%, quitosana 0,15%, para garantir a imobilização da enzima sobre a superfície do filme de Cu₂O eletrodepositado em ITO, deixando-o secar a temperatura ambiente, depois o eletrodo modificado foi denominado anti-PSA/Cu₂O/ITO.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do sensor por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Com o objetivo de se obter informações a respeito do sensor proposto utilizou-se a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) para avaliar as resistências à transferência de carga do biossensor fotoeletroquímico e comparar com a resposta EIS do eletrodo ITO e do ITO modificado apenas com o Cu_2O (Figura 4). Com base nos espectros, ao se comparar a R_{tc} apenas do eletrodo ITO (espectro vermelho) com a modificação $\text{Cu}_2\text{O}/\text{ITO}$ (espectro preto) observa-se que a eletrodeposição do Cu_2O melhora significativamente a transferência de carga do sistema proporcionando uma diminuição na impedância quando comparada apenas com a impedância do eletrodo ITO. Ao se comparar a modificação $\text{Cu}_2\text{O}/\text{ITO}$ com a modificação completa Anti-PSA/ $\text{Cu}_2\text{O}/\text{ITO}$ (espectro azul), verifica-se que o Cu_2O apresenta um semicírculo significativamente menor que o do material Anti-PSA/ $\text{Cu}_2\text{O}/\text{ITO}$, mostrando que a imobilização da enzima aumenta a resistência à transferência de carga do filme, entretanto, valores mais altos de R_{tc} após a imobilização de materiais biológicos podem ser esperados, uma vez que aumentam a impedância do sistema (DING, et al., 2005).

Figura 4- Diagrama Nyquist realizados em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ para o ITO não modificado (espectro vermelho), ITO modificado com: Cu_2O (espectro preto); anti-PSA/ Cu_2O (espectro azul).

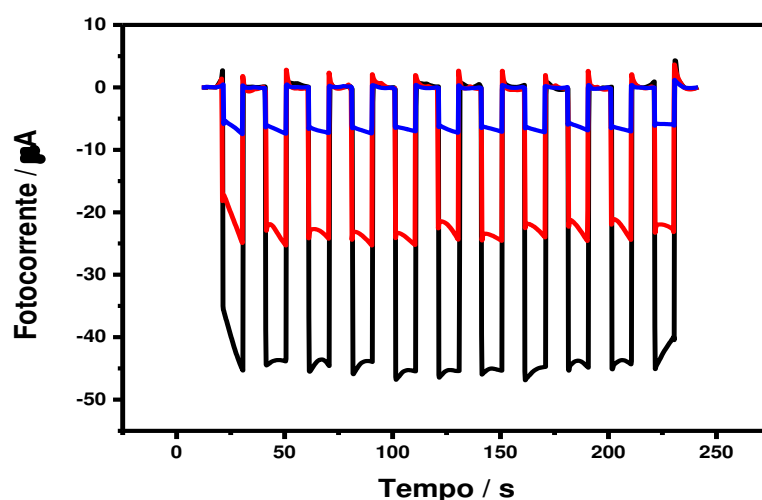


Fonte: ARAÚJO, 2019.

5.2 Comportamento fotoeletroquímico do sensor na ausência e presença do PSA

A Figura 5 mostra as respostas amperométricas para o biossensor anti-PSA/Cu₂O/ITO cujas condições experimentais e operacionais utilizadas foram: 0,1 mol L⁻¹ de uma solução tampão fosfato, pH 7,0, com um potencial aplicado de -0,2 V vs Ag/AgCl. O amperograma em preto apresenta a resposta amperométrica para a modificação Cu₂O/ITO, a qual mostra a maior fotocorrente gerada com valor médio de 45 μA, após a adição de uma alíquota de 10 μL de uma solução contendo 2,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de anti-PSA, amperograma vermelho, a fotocorrente gerada ficou em torno de 22 μA, evidenciando que a imobilização da espécie biológica ocorreu de forma eficiente podendo ser comprovada pela diminuição nos pares elétrons/lacuna foto gerados e conseqüentemente diminuição da fotocorrente, resultado que está de acordo com as respostas de impedância. Em seguida adicionou-se uma alíquota de 1,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ de PSA à modificação anti-PSA/Cu₂O/ITO, após percorrido o tempo de reação entre o PSA e anti-PSA realizou-se a leitura obtendo-se uma fotocorrente no valor de 6 μA, esse menor valor de fotocorrente evidencia que a reação ocorreu de forma efetiva possibilitando assim monitorar a variação da concentração de PSA através da diminuição no valor da fotocorrente.

Figura 5- Resposta fotoeletroquímica do Cu₂O/ITO (amperograma preto), anti-PSA/Cu₂O/ITO (amperograma vermelho) e anti-PSA/Cu₂O/ITO após reação com PSA (amperograma azul), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, potencial aplicado de -0,2 V.

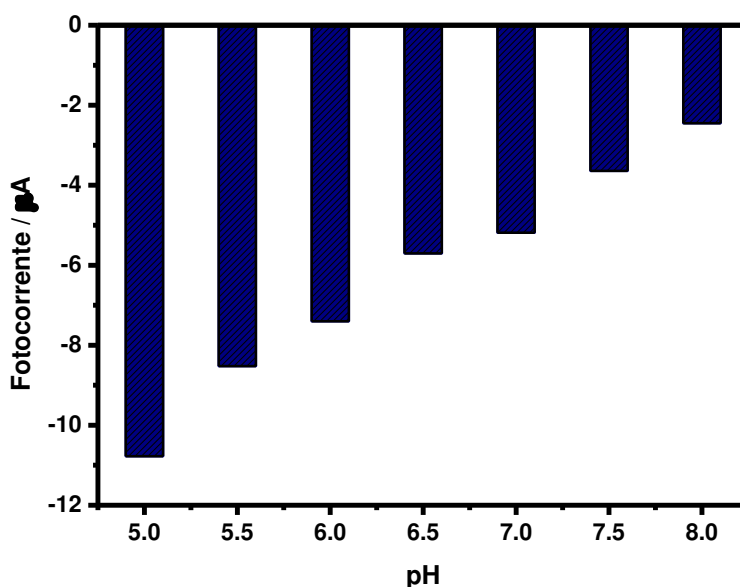


Fonte: ARAÚJO, 2019.

5.3 Influência dos parâmetros experimentais e operacionais na resposta fotoeletroquímica de HQ sobre o biossensor HRP-CuS/FTO

Inicialmente estudou-se a influência do pH do eletrólito que por sua vez é importante para se avaliar o desempenho do biossensor porque a atividade da enzima é muito influenciada por este parâmetro. Assim, a Figura 6 mostra o efeito do pH sobre as fotocorrentes do biossensor empregando-se $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ da solução tampão fostato, com diferentes valores de pH (5,0 a 8,0). De acordo com esta figura observa-se que a resposta fotoeletroquímica do biossensor sofre uma diminuição progressiva e significativa do pH 5,0 ao 8,0. Os maiores valores de fotocorrente foram obtidos em meio ácido e estão relacionados à redução das espécies H^+ para H_2 pelos elétrons fotogerados pela plataforma Cu_2O , por outro lado em um meio alcalino predominam as espécies OH^- que não consomem os elétrons fotogerados havendo assim consequente diminuição da fotocorrente.

Figura 6- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/ Cu_2O /ITO em tampão fostato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH, potencial aplicado de $-0,2 \text{ V}$.

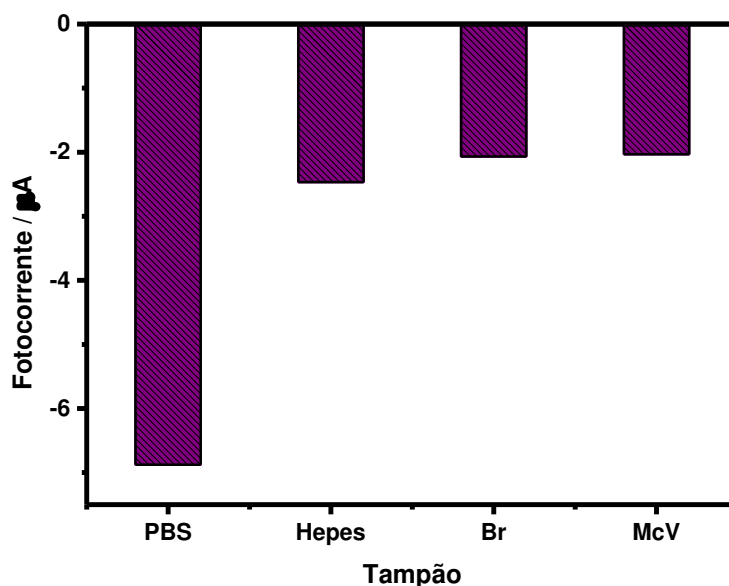


Fonte: ARAÚJO, 2019.

Adicionalmente, para se averiguar o efeito de diferentes tampões sobre a performance fotoeletroquímica do biossensor à base de anti-PSA/ Cu_2O /ITO, quatro soluções eletrolíticas na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,0 foram preparadas HEPES, McIlvaine – MCV, briton robson -br e fosfato - TF. Dentre os tampões estudados (Figura 7), observou-se que o tampão fosfato forneceu as maiores respostas em termos de fotocorrente quando comparado aos outros tampões, que apresentaram valores de fotocorrentes bem próximos. Este resultado pode estar associado à melhor mobilidade

dos íons que compõem esse tampão, possibilitando assim uma melhor difusão destes para a superfície do eletrodo.

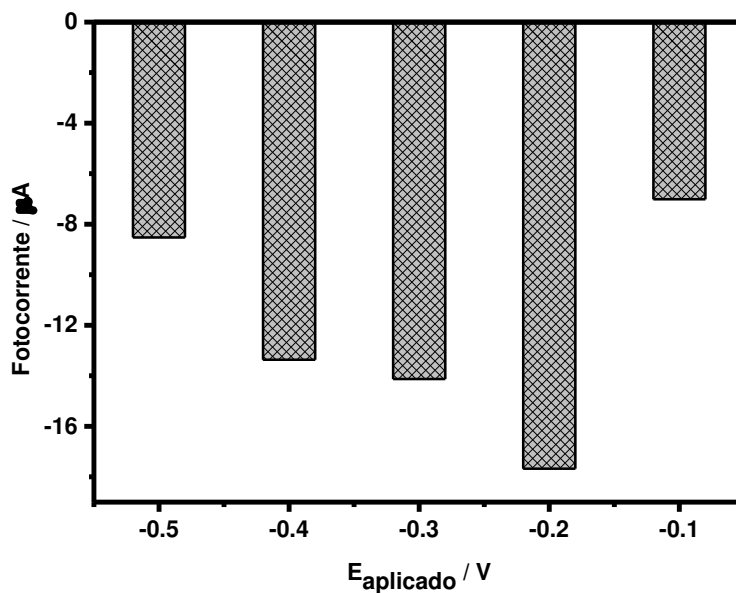
Figura 7- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu₂O/ITO em diferentes tampões na concentração de 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, potencial aplicado de -0,2 V.



Fonte: ARAÚJO, 2019.

Como parâmetro operacional estudou-se o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, que também é um dos parâmetros mais expressivos que pode influenciar significativamente no desempenho analítico de um sensor, e conseqüentemente, na sensibilidade deste. Neste sentido, avaliou-se as fotocorrentes em uma faixa de potencial de -0,1 a -0,5 V em 0,1 mol L⁻¹ de solução TF (pH 5,0), Figura 8. De acordo com os resultados apresentados nesta figura, observa-se que a fotocorrente aumenta de -0,1 a -0,2 V, tendo uma significativa diminuição a partir deste potencial até -0,5 V. Este resultado diretamente relacionado Cu₂O que apresenta boa estabilidade e maior geração de pares elétrons/lacunas nesse valor de potencial -0,2 V, em valores de potencial mais negativos a diminuição na geração do par elétron/lacuna e o material fica menos estável.

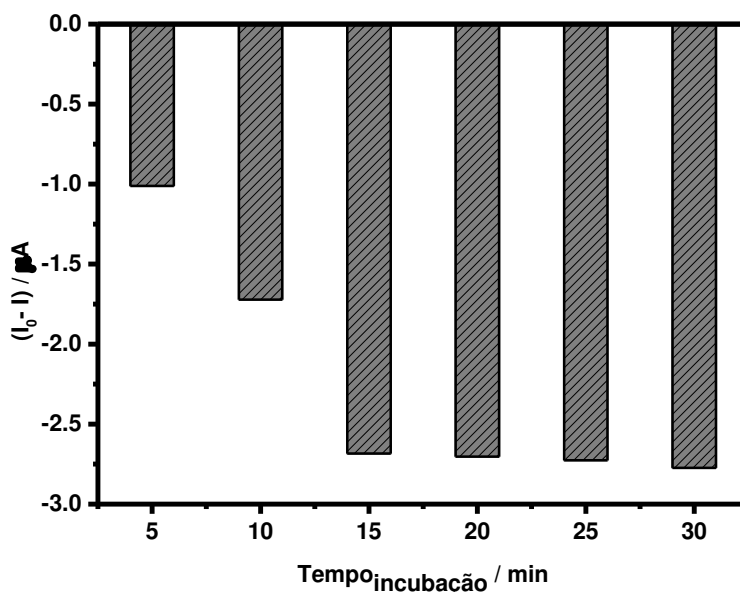
Figura 8- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu₂O/ITO em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, em diferentes valores de potencial.



Fonte: ARAÚJO, 2019.

A Figura 9 mostra os resultados referente ao tempo de imunorreação, que afeta diretamente a sensibilidade do imunoenensaio PEC. Geralmente, a taxa de reação antígeno-anticorpo aumenta com o aumento do tempo, para a imunorreação antígeno-anticorpo. De acordo com os resultados obtidos a fotocorrente aumenta de forma progressiva do tempo de 5 a 15 min, havendo uma estabilização da fotocorrente nos tempos de 15 a 30 min, evidenciando que o tempo máximo para que a reação atinja o equilíbrio dinâmico seja de 15 min, sendo este tempo escolhido para realização dos experimentos posteriores.

Figura 9- Resposta fotoeletroquímica do biossensor anti-PSA/Cu₂O/ITO em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, para diferentes tempos de imunorreação, potencial aplicado de -0,2 V.

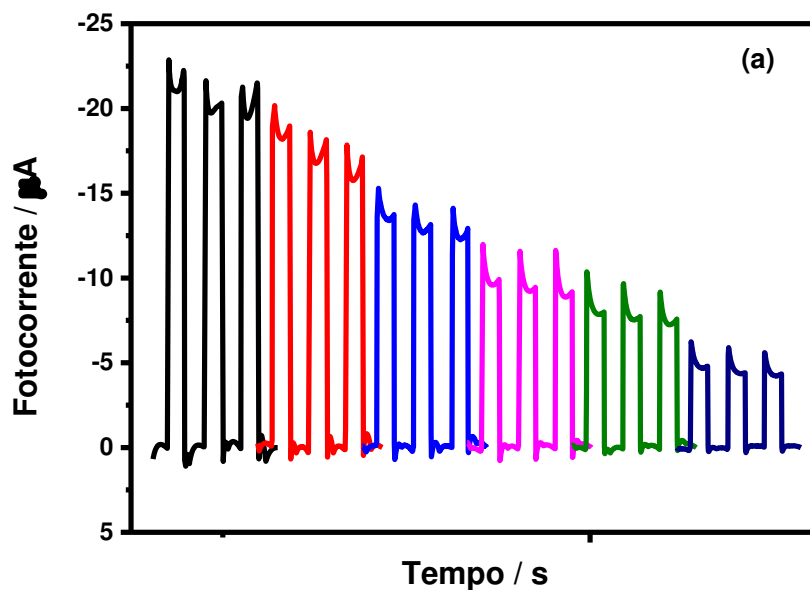


Fonte: ARAÚJO, 2019.

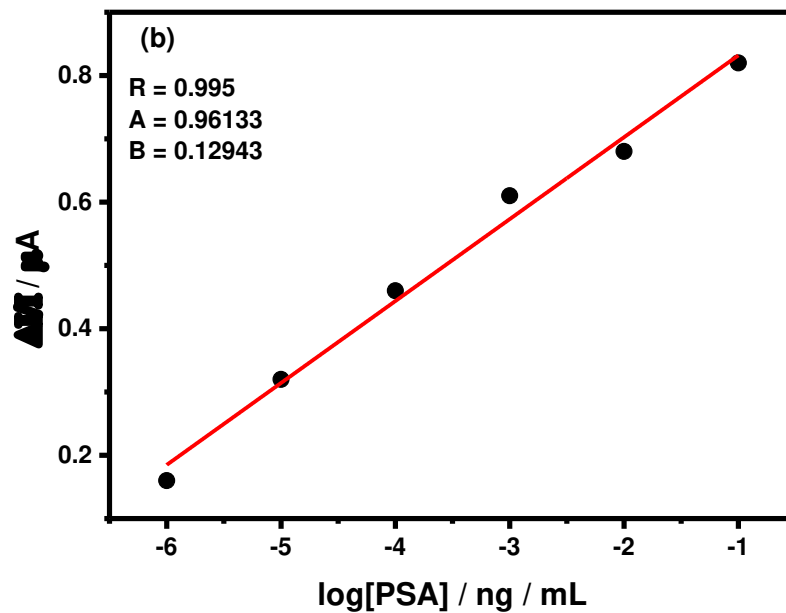
5.4 Desempenho analítico do biossensor fotoeletroquímico para determinação de PSA

Após a determinação das condições ótimas em termos dos parâmetros experimentais e operacionais, avaliou-se o desempenho analítico do biossensor fotoeletroquímico anti-PSA/Cu₂O/ITO, mediante a estratégia desenvolvida baseada na variação da fotocorrente de inibição calculada por $\Delta I = I_0 - I$ (fotocorrentes antes e após a adição do PSA, respectivamente), em função de adições sucessivas de alíquotas da solução de PSA, em 0,1 mol L⁻¹ de solução TF, pH 5. Os resultados são mostrados na Figura 10 em que há uma diminuição da fotocorrente à medida que a concentração do analito é aumentada na célula eletroquímica. A curva de calibração referente a este processo encontra-se na figura inserida a qual mostra uma relação linear entre a fotocorrente e o log da concentração de PSA em uma faixa de concentração de 1 ng / mL a 1000 ng / mL, com limite de detecção de 1,0 ng / mL e $r^2 = 0,995$. A equação de regressão obtida foi $\Delta I / \mu A = 0,96133 - 0,12943 \log([PSA]) / \text{ng/mL}$.

Figura 10- (a) Amperogramas referente à diferentes concentrações de PSA em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0. (b) curva analítica. Estudos conduzidos sob condições experimentais e operacionais otimizadas.
 $E_{\text{appl.}} = -0,2 \text{ V}$



Fonte: ARAÚJO, 2019.

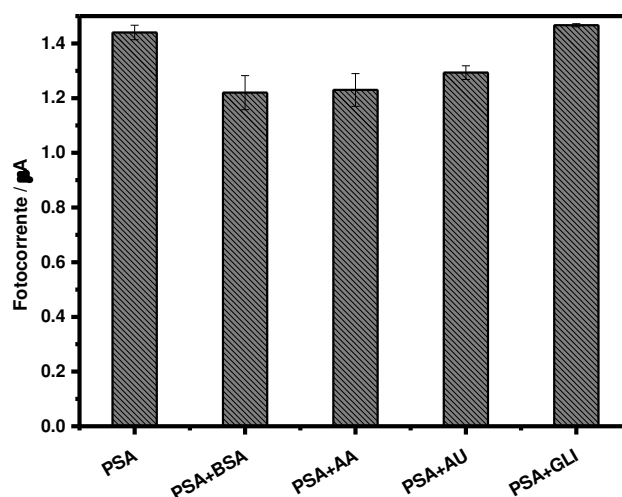


Fonte: ARAÚJO, 2019.

5.5 Estudo da seletividade do sensor

O estudo de possíveis interferentes presentes em amostras que contem PSA foi realizado na presença do biossensor fotoeletroquímico proposto. Neste estudo avaliou-se a resposta fotoeletroquímica do PSA na presença de cada interferente numa proporção 1:1 e 1:10 e verificou-se que a variação nas fotocorrentes foi inferior a 5%. Também avaliou-se a resposta do PSA contendo o interferente numa concentração 100 vezes maior (Figura 11). De acordo com esta figura foi possível calcular a percentagem da interferência de cada espécie frente a resposta do PSA. Observou-se que a espécie que menos interferiu na determinação do analito foi a glicose com uma porcentagem de 1,8 %. Os outros compostos apresentaram interferência de 10,2 % para ácido úrico, 14,6 % para ácido ascórbico e 15% para BSA, sugerindo que o sensor é influenciado por essas espécies numa concentração 100 vezes maior.

Figura 11- Efeito de alguns interferentes que podem influenciar na resposta do PSA.



Fonte: ARAÚJO, 2019.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a análise e o estudo de todas as etapas dos experimentos pode-se concluir que a eletrodeposição do óxido de cobre sobre o eletrodo de ITO mostrou-se ser uma plataforma adequada para a imobilização do material biológico anti-PSA, possibilitando a elaboração de um biossensor estável para realização das medidas.

A imobilização do material biológico anti-PSA sobre o óxido de cobre provocou um aumento na resistência a transferência de carga do sistema, assim como diminui o número de pares elétrons/lacunas fotogerados no processo fotoeletroquímico.

As condições ótimas para se obter as maiores fotocorrentes gerada pelo sistema proposto foram conseguidas aplicando-se um potencial de -0,2 V, pois pode-se observar com os experimentos que utilizando de valores potencial mais negativo ocorreu uma diminuição na foto-corrente. Com um tempo de incubação de 15 min, para ocorrer a reação total do anti-PSA com o PSA em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0.

Este trabalho mostrou que o biossensor fotoeletroquímico pode ser utilizado em amostras biológicas para o monitoramento do PSA, facilitando na detecção do câncer de próstata, pois a maioria dos homens tem grande receio em realizar o exame toque retal para a análise da próstata.

O biossensor elaborado mostrou-se eficiente e seletivo na determinação do PSA, pois na realização dos experimentos observou-se que alguns possíveis interferentes em amostras de PSA tem uma interferência mínima, confirmando assim que o biossensor elaborado tem grande potencial para aplicação em amostras que contenham o analito.

REFERÊNCIAS

- AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAI, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 21, n. 8, p. 1405 - 1423, 2006.
- ATCHUDAN, R., MUTHUCHAMY, N., NESAKUMAR, T., IMMANUEL, J. E., PERUMAL, S., VINODH, R., HYUN, K. P., ROK, Y. L. An ultrasensitive photoelectrochemical biosensor for glucose based on bio-derived nitrogen-doped carbon sheets wrapped titanium dioxide nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 126, p. 160-169, 2019.
- BHALLA, N., JOLLY, P., FORMISANO, N., and ESTRELA, P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem*. 60(1): 1–8, 2016.
- BLAIR, E. O., CORRIGAN, D. K. A review of microfabricated electrochemical biosensors for DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 134, p. 57-67, 2019.
- CASTANHO, M. J. P.; BARROS, L. C. Prognóstico de Câncer de Próstata: Probabilidade e Possibilidade, v. 8, n. 3, p. 371-379, 2007.
- CELINE I.L. Justino, ARMANDO C. Duarte, TERESA A. P. Rocha-Santos - Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. v. 85, Part A, p. 36-60, 2016.
- CHE, J. et al. Temperature dependence of field emission from cupric oxide nanobelt films. *Appl. Phys. Lett.* 83, 746–748, 2003.
- CHOWDHURI, A. et al. Response speed of SnO₂-based H₂S gas sensors with CuO nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* 84, 1180–1182, 2004.
- CONTE, D. L.; SARQUIZ, M.; LARA, G. M.; TAVARES, R. G. Avaliação dos Níveis Séricos de PSA total e PSA livre em uma Amostra da População de Novo Hamburgo, RS, ed. 101, NewsLab, 2010.
- DING, S.J., CHANG, B.W., WU, C.C.; LAI, M.F., CHANG, H.C. ., Electrochemical evaluation of avidin-biotin interaction on self-assembled gold electrodes, *Electrochim. Acta*. v. 50, n. 18, p. 3660-3666, 2005.
- FERRO, R. Furtado... [et al.]. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical. v.177, 2008.
- GOMES, Romeu et al. As arranhaduras da masculinidade: uma discussão sobre o toque retal como medida de prevenção do cancer prostático. *Ciência e Saúde Coletiva*. p. 1975-1984, 2018.

- HOSSAIN, MD. A., AL-GAASHANI, R., HAMOUDIA, H., MARRI, M. J. AL, HUSSEIN, I. A., BELAIDI, A., MERZOUGUI, B. A., ALHARBI, F. H., TABET, N. Controlled growth of Cu₂O thin films by electrodeposition approach. *Materials Science in Semiconductor Processing* 63 203–211, 2017.
- INCA. Ministerio da Saúde. Câncer de próstata: vamos falar sobre isso?. Rio de Janeiro, 2017.
- LEI, Q., WANG, Y., DONG, W., SOL, H., LV, J., LI, H. Self-powered electrochromic sensing for visual determination of PSA in serum using PB as an indicator. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. v. 839, p. 108-11515, 2019.
- LUQUE, G. L.; Rodriguez, M. C. & Rivas, G. A. Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix. *Talanta*. 66, 467–471, 2005.
- MINISTERIO DA SAÚDE. Câncer de Próstata. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-prostata>>. Acesso em 05 de Junho de 2019.
- NASCIMENTO, Marcos Roberto. Câncer de Próstata e Masculinidade: motivações e barreiras para a realização do diagnóstico precoce da doença. In. Encontro de Estudos Populacionais da ABEP, XII. Caxambu: ABEP. p. 1-18, 2000.
- RIBOVSKI, L. A label-free electrochemical DNA sensor to identify breast cancer susceptibility. *Microchemical Journal*. v. 133, p. 37-42, 2017.
- RODRIGUES, H., SILVA L., SAIBROSADA, J. S., AIRTON, E. de O. F., RONALDO, P. S. T., EIRAS, C. L., CUNHA, C. N. Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 108, p. 27-37, 2018.
- RUIZ, F. S., GUSTAVO, M. X. Sensores eletroquímicos. *Grandes áreas Da Nanociência e Suas Aplicações*. v. 2, p. 189, 191-217, 2015.
- SAWAYA, M. C. T.; ROLIM, M. R. S. Antígeno Específico da Próstata em Fluidos Biológicos: Aplicação Forense Prostate-Specific Antigen in Biologics Fluids: Forensic Application. *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 109-116, Jul.- Dez./2004 - ISSN: 1518-5192.
- SUN, C. L. et al. Ultrasensitive and highly stable nonenzymatic glucose sensor by a CuO/graphene-modified screen-printed carbon electrode integrated with flow-injection analysis. *Electrochem. Commun.* 30, 91–94, 2013.

THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A., WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 16, p. 121-131, Issues 1–2, 2001.

VIEIRA, C. G.; ARAÚJO, W. S.; VARGAS, D. R. M. O homem e o câncer de próstata: prováveis reações diante de um possível diagnóstico. *Revista Científica do IITPAC*, v. 5, n.1, Pub.3, 2012.

YI-TONG, X., SI-YUAN, Y., YUAN-CHENG, Z., GAO-CHAO, F., DE-MAN, H., QU, P., WEI-WEI, Z. Cathodic photoelectrochemical bioanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. v.114, p. 81-88, 2019.