



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES E IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO
PARA DETECÇÃO DE ANALITOS RELACIONADOS À DOENÇA DE PARKINSON**

Gabriela Carolina Mauruto de Oliveira*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz

*** bolsista FAPESP- 2017/17572-8**

SÃO CARLOS - SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabriela Carolina Mauruto de Oliveira, realizada em 31/05/2019:

Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz
UFSCar

Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
UNESP

Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes
UFSCar

“Quando acreditamos apaixonadamente em algo que ainda não existe, nós o criamos. O inexistente é o que não desejamos o suficiente.”

Franz Kafka

“Nascemos para manifestar a glória do Universo que está dentro de nós. Não está apenas em um de nós: está em todos nós. E conforme deixamos nossa própria luz brilhar, inconscientemente damos às outras pessoas permissão para fazer o mesmo. E conforme nos libertamos do nosso medo, nossa presença, automaticamente, libera os outros.”

Nelson Mandela

Para aqueles que AINDA não chegaram onde cheguei; para aqueles que lutam para mudar vidas; para aqueles que persistem na construção de uma educação que permita não apenas sonhar, mas realizar.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmão pela paciência e incentivo durante todos esses anos, me possibilitando continuar a fazer o que sempre amei – estudar;

Agradeço à minha família de sangue, que sempre demonstrou orgulho pelas minhas escolhas e interesse no que fiz, faço e pretendo ainda fazer;

Agradeço à minha família, não de sangue, mas de coração - amigos, colegas, companheiros e conhecidos – que entraram na minha vida, seja para ficar ou por um breve instante, que me incentivaram, me apoiaram e me mostraram o quão rica é uma vida junto aqueles que pensam diferente de mim. Eu cresci, errei, acertei e amadureci e devo muito disso a vocês:

Agradeço àquelas que me ensinaram a ser mais paciente e extrovertida, dividindo não apenas meus doces mas também um teto e boas lembranças. Se hoje eu não paro de falar, a culpa é de vocês: Heloísa, Izadora, Tainá, Bruna, Camila e Tamires.

Agradeço aos amigos e colegas de graduação que mantiveram-se perto, mesmo com a dificuldade da distância física. Peço perdão pelos longos períodos em que esqueci de responder e digo obrigada, por continuarem a conversa como se nada tivesse ocorrido: Raphael e Caroline.

Agradeço aos amigos e colegas de longa data, em especial aqueles que trilharam comigo alguma das minhas etapas na “eterna vida de estudante”. Deixo aqui meu obrigada pelos pequenos e grandes incentivos ao qual foram importantes para as decisões que tomei até aqui: aos meus colegas do SENAI, em especial à Lilian pelo apoio, pelas conversas tolas e pela casa e boa comida durante às visitas. À Júlia, minha melhor lembrança da ETECAP.

Agradeço aos amigos e colegas, que apesar da pouca convivência, mostraram-se sempre presentes. Espero sempre ser alguém a quem vocês possam recorrer nos bons e maus momentos: à minha equipe da Sustec Jr., que me ensinou os desafios da boa liderança.

Agradeço a todos que fizeram parte da equipe LSNano durante meus quase 4 anos de laboratório. Se hoje termino mais essa etapa, aqui com vocês, muito devo ao ambiente em que construímos, as risadas que demos, aos interesses que compartilhamos, aos litros de café que consumimos somados aos muito doces e claro, ao extenso conhecimento sobre astrologia que juntos adquirimos. A companhia de vocês foi um parâmetro essencial para meus reprodutíveis

picos de felicidade semanais: Jéssica, Luiz, Isabela, Naiara, Karina, Marina, Jéferson, Daniel, Rafaela, Lê Zaccarin, Matheus, Túlio, Vinícius, Joyce e Jodar.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Janegitz, meu orientador, pelas oportunidades nesses quase 4 anos e pelos auxílios dados sejam profissionais ou pessoais;

Agradeço ao Prof. Dr. Nirton Cristi, meu co-orientador, pelos auxílios durante o mestrado;

Agradeço a Laís Brazaca pelas dúvidas tiradas durante o desenvolvimento do imunossensor, ao Dr. Paulo Raymundo que cedeu as folhas de EcoPET utilizadas na fabricação dos eletrodos de platina. Agradeço também a Cristiane Kalinke da UFPR, pelas medidas de MEV dos eletrodos serigrafados.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001- pela bolsa concedida entre junho a novembro de 2017.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 2017/17572-8 - pela bolsa de concedida entre o período de 01/12/2017 a 31/05/2019.

Agradeço à equipe do Laboratório de Microfabricação, localizado dentro das instalações do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), que possibilitou o desenvolvimento dos eletrodos de platina utilizados nesse trabalho, em especial à Maria Helena Piazzetta por todo acompanhamento.

Agradeço aos professores da banca examinadora por terem aceitado o convite de estar aqui hoje.

Por fim, agradeço a tudo e a todos que de alguma forma construíram escadas para que eu chegasse até aqui. Me transformarei em degraus para que possam atingir seus objetivos também.

Agradeço.

LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine sérum albumine</i>)
CDR's	Regiões determinantes de complementariedade (<i>Complementary-determining regions</i>)
CV	Voltametria cíclica (<i>Cyclic voltammetry</i>)
CYS	Cisteamina (<i>Cysteamine</i>)
DA	Dopamina
DPV	Voltametria de pulso diferencial (<i>Differential pulse voltammetry</i>)
EDC-NHS	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/N-hydroxysuccinimide
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>)
GA	Gluteraldeído (<i>Gluteraldehyde</i>)
HB	Hemoglobina
HMDS	<i>Hexamethyldisilazane</i>
LDAC	Leucodopaminocromo
LOD	Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
LSV	Voltametria de varredura linear (<i>Linear sweep voltammetry</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura (<i>Scanning electron microscopy</i>)
NP	Esmalte para unhas (<i>Nail polish</i>)
o-DAQ	Dopamina orto-quinona
PAV	Verniz automotivo de poliuretano (<i>Polyurethane automotive varnish</i>)
PD	Doença de Parkinson (<i>Parkinson's disease</i>)
PEN	Poli(naftalato de etileno)
PET	Poli(tereftalato de etileno)
POC	Ponto de atendimento (<i>Point-of-care</i>)
SAM	Monocamadas auto-organizadas (<i>Self-assembled monolayer</i>)
SD	Desvio padrão (<i>Standard deviation</i>)
SPE	Eletrodo impresso (<i>Screen-printed electrode</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (<i>Square wave voltammetry</i>)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores em porcentagem da quantidade de grafite utilizada na composição das tintas considerando o peso da base polimérica e o peso final da tinta.....	52
TABELA 2 - Formulações de tintas condutoras avaliadas	65
TABELA 3 - Tabela contendo os valores de recuperação de DA em amostras de urina sintética para LUV e ESP.	82
TABELA 4 - Valores de interferência eletroquímica obtidos para diferentes compostos presentes em amostras reais de urina.....	83
TABELA 5 - Comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com outros similares encontrados na literatura.....	84
TABELA 6 - Tabela contendo os valores de recuperação de DA em amostras de urina sintética em eletrodos de platina.....	97
TABELA 7 - Parâmetros otimizados e informações obtidas na construção e aplicação do biossensor	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema genérico de um sensor eletroquímico. Fonte: Autoria própria.....	23
FIGURA 2 - Esquema genérico de um biossensor eletroquímico. Fonte: Autoria própria.	24
FIGURA 3 - Imagem ilustrativa dos três principais tipos de configurações de imunossensores: sanduíche, competitivo e não marcado. Fonte: Autoria própria.	26
FIGURA 4 - Estrutura genérica de um anticorpo. Fonte: Autoria própria, baseada em (Hoffman <i>et al.</i> , 2016); (Thermofischer) e; (Flaherty, 2012).	27
FIGURA 5 - Esquema de ligação para formação da monocamada utilizando cistamina e glutaraldeído. Fonte: Autoria própria.....	30
FIGURA 6 - Ilustrações genéricas de um circuito de Warburg e um diagrama de Nyquist contendo os valores de R_s – resistência da solução; R_{ct} - resistência à transferência de carga; C_d - capacitância da dupla camada e; W - impedância de Warburg.....	34
FIGURA 7 - Esquema genérico do interior de um equipamento de <i>sputtering</i> onde os átomos neutros de argônio (●) adentram o sistema e colidem com elétrons livres circulantes (●) transformando esses átomos em íons argônio carregados positivamente (●); os íons positivos, ao colidirem com a placa metálica (cátodo) ocasionam a ejeção de átomos neutros do material metálico (●) que depositam-se sobre a superfície do substrato formando um filme. A colisão entre o íon positivo na placa também libera elétrons livres (●), que alimentam o plasma do sistema. Fonte: Autoria própria.....	41
FIGURA 8 - Esquema com as principais etapas no processo de fotolitografia: (A) substrato sólido liso com posterior (B) deposição do fotorresiste, podendo ser de caráter positivo (solubilizando na presença da luz UV) ou negativo (polimerizando na presença de luz UV). (C) Uma fotomáscara contendo o padrão desejado é obtida, podendo ser de campo escuro (como mostrada na imagem) ou de campo claro. (D) Posteriormente há o alinhamento da fotomáscara sobre a superfície com posterior exposição do conjunto a luz UV por tempo pré determinado. (E) No caso do uso do fotorresiste positivo as áreas expostas ficam solubilizadas, podendo ser (F) reveladas por solução reveladora complementar que retira o polímero solubilizado formando aberturas no exato desenho do padrão desejado. Fonte: Autoria própria.....	43
FIGURA 9 - Esquema da reação de oxidação da dopamina.....	46

FIGURA 10 - <i>Desing</i> das máscaras utilizadas para obter o padrão dos eletrodos sobre esparadrapo (A) e luva (B).	54
FIGURA 11 – (A) Foto ilustrativa do sistema de contato entre os eletrodos descartáveis com o potenciostato utilizando <i>plugs</i> do tipo jacaré conectados individualmente aos eletrodos de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo pseudorreferência. Na imagem um eletrodo sobre suporte de esparadrapo ao qual foi depositada uma gota de 90 μL de solução equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. (B) Sistema de contato para o eletrodo de platina utilizando <i>plugs</i> do tipo banana acoplados a regiões de contato elétrico independentes. Esse sistema foi baseado no trabalho de (Orzari <i>et al.</i> , 2018), que também é fonte da imagem.	55
FIGURA 12 - Ilustração das etapas do processo de obtenção dos eletrodos impressos em luva nitrílica e esparadrapo: (1) Produção da tinta condutora em SpeedMixer; (2) Obtenção das máscaras em papel adesivo; (3) Preparo dos suportes para o processo de serigrafia; (4) Processo de serigrafia utilizando tinta condutora e espátula de alumínio; (5) Pintura do eletrodo psudorreferência com tinta de prata; (6) Obtenção dos eletrodos LUV e ESP, após secagem da tinta; (7) Caracterizações eletroquímicas em potenciostato.	57
Figura 13. (A) Ilustração do processo de estiramento das luvas realizado a fim de avaliar o comportamento dos substratos e da tinta após sofrer tensão mecânica. Foi fixado um estiramento 60 % maior do comprimento normal do eletrodo a fim de padronizar os resultado; (B) Processo de dobra dos eletrodos em esparadrapo.	58
FIGURA 14 - Processo de obtenção dos eletrodos de platina onde: (1) Limpeza do BioPET com solução de isopropanol e acetona; (2A) Utilização de <i>spin coater</i> de bancada para (2B) Espalhamento do HMDS sobre o substrato e; (2C) Espalhamento do fotorresiste sobre o substrato;(3) Exposição do substrato + máscara de campo escuro à luz UV para sensibilização do fotorresiste; (4) Etapa de revelação para formação do padrão do eletrodo; (5) Obtenção do substrato com as áreas foto-moldadas; (6) Metalização do substrato foto-moldado, com platina, por pulverização catódica; (7) Etapa de <i>Lift-off</i> para limpeza do excesso de material metalizado; (8) Obtenção dos eletrodos de platina.	60
FIGURA 15 - Eletrodo de platina flexível produzido sobre folhas de BioPET.	61
FIGURA 16 - Voltamogramas cíclicos obtidos de (A) eletrodo em luva nitrílica e (B) eletrodo em esparadrapo, utilizando diferentes concentrações de grafite em pó: (●) 43, (●) 46 e (●) 48 %, na tinta condutora a base de esmalte para unhas e glicerol. Medidas realizadas na presença de	

dopamina $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,7), $\nu = 100$ mV s ⁻¹	69
FIGURA 17 - Imagens dos eletrodos (A) LUV; (B) ESP e; (C) LUV com delimitador de gota.	70
FIGURA 18 - Imagens da tinta serigrafada sobre a superfície luva nitrílica em ampliações de (A) 32 x e (B) 500 x.....	71
FIGURA 19 - Imagens da tinta serigrafada sobre a superfície de esparadrapo em ampliações de (A) 32 x e (B) 500 x.....	71
FIGURA 20 - Espectros de EDS obtidos para (A) tinta condutora composta de esmalte para unhas, grafite e glicerol; (B) esparadrapo impermeável e; (C) luva nitrílica.....	73
FIGURA 21 - Voltamogramas cíclicos de LUV (●) e ESP (●) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,7), $\nu = 50$ mV s ⁻¹	74
Figura 22 - Voltamogramas cíclicos de LUV (●) e ESP (●) na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , preparada em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , $\nu = 50$ mV s ⁻¹	74
FIGURA 23 - Voltamogramas cíclicos de (A) ESP e (B) LUV obtidos a partir de medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,7) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ para as velocidades de varredura de 50; 75;100; 125; 150; 175 e 200 mV s ⁻¹ . Gráfico de pontos I vs. $\nu^{1/2}$ para (A1) LUV e (B1) ESP.	76
FIGURA 24 - Voltamogramas cíclicos de (A) LUV e (B) ESP realizadas em solução em KCl 0,1 mol L ⁻¹ na presença de para a velocidades de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ para as velocidades de varredura de 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 mV s ⁻¹ . Gráfico de pontos I vs. $\nu^{1/2}$ para (A1) LUV e (B1) ESP.	77
FIGURA 25 - Voltamogramas obtidos para (A) LUV e (B) ESP utilizando as técnicas de DPV (●), SWV (●) e LSV (●) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,5). DPV: $\Delta E_s = 5$ mV; $a = 0,025$ V; tempo de modulação=0,05 s e $t = 0,5$ s; SWV: $\Delta E_s = 5$ mV; $a = 0,02$ V; $f = 25$ Hz e; LSV: $\nu = 0,05$ V/s e $\Delta E_s = 2,4$ mV.....	78
FIGURA 26 - (A) Voltamogramas lineares obtidos para diferentes velocidades de varredura em ESP, na presença de DA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,5); (B) Gráfico de pontos.....	79

FIGURA 27 - Voltamogramas lineares obtidos para diferentes velocidades de varredura em LUV na presença de DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5); (B) Gráfico de pontos.	80
FIGURA 28 - (A) Voltamogramas lineares de LUV obtidos a partir de uma gota de $80 \mu\text{L}$ de solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) na presença de diferentes concentrações de DA: (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $7,5 \times 10^{-6}$ (c) $2,5 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $5,0 \times 10^{-5}$; (f) $7,5 \times 10^{-5}$; (g) $9,0 \times 10^{-5}$; (h) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Curva analítica obtida para dopamina utilizando LUV. ...	81
FIGURA 29 - (A) Voltamogramas lineares de ESP obtidos a partir de uma gota de $90 \mu\text{L}$ de solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) na presença de diferentes concentrações de dopamina: (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $6,5 \times 10^{-6}$; (c) $7,5 \times 10^{-6}$; (d) $1,0 \times 10^{-5}$; (e) $2,5 \times 10^{-5}$; (f) $4,0 \times 10^{-5}$ e; (g) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Curva analítica obtida para dopamina utilizando ESP.	81
FIGURA 30 - Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de HB 10 mg mL^{-1} preparada em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ para LUV (●) e ESP (●).	85
FIGURA 31 - Voltamogramas utilizando as técnicas de (●) SWV e (●) DPV na presença de HB $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).	87
FIGURA 32 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na presença de diferentes concentrações de HB: (1) $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$; (2) $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (3) $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (4) $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$; (5) $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (6) 10 mg mL^{-1} , preparadas em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e (B) Curva analítica de HB obtida em ESP.	87
FIGURA 33 - Voltametria cíclica utilizando eletrodo de platina na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	90
FIGURA 34 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo de platina a partir de uma gota de $35 \mu\text{L}$ de solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes velocidades de varredura: 20,30,40,50,75,100,150,200,250,300 e 350 mV s^{-1} . (B) Gráfico de pontos I vs. $\nu^{1/2}$, a partir da triplicata das medidas para cada velocidade. ...	91
FIGURA 35 - Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de platina flexível em meio contendo H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, onde (1) Pico de dessorção do hidrogênio; (2) adsorção do hidrogênio e; (3) Formação de óxidos.	92
FIGURA 36 - Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo de platina a partir de uma gota de $35 \mu\text{L}$ de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 para diferentes	

velocidades de varredura: 10; 20; 30; 40; 50 ;60; 70; 80; 90 e 100 mV s ⁻¹ . (B) Gráfico de pontos I _p vs. v ^{1/2} para medidas em triplicata.....	93
Figura 37. Ilustração indicando os processos que ocorrem durante a oxidação da dopamina obtendo-se as espécies (1) dopaminoquinona; (2) leucodopaminocromo e; (3) dopaminocromo.	94
Figura 38. (A) Voltametria cíclica utilizando eletrodo de platina na presença de DA 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH 7,0, v = 50 mV s ⁻¹ . (B) Reação de oxidação da dopamina.	95
FIGURA 39 - Voltamogramas obtidos na presença de DA 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ , pH 7,0 utilizando as técnicas de (●) DPV e (●) SWV. Parâmetros utilizados - DPV: ΔE _s = 0,005 V; a = 0,025 V; t = 0,05 s; t: 0,5 s; SWV: ΔE _s = 0,005 V ; a = 0,02V; f = 25 Hz.....	95
FIGURA 40 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir de uma solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ (pH 6,5) na presença de diferentes concentrações de dopamina: (a) 3,5 × 10 ⁻⁵ ; (b) 5,0 × 10 ⁻⁵ ; (c) 8,0 × 10 ⁻⁵ ; (d) 9,0 × 10 ⁻⁵ ; (e) 1,0 × 10 ⁻⁴ ; (f) 2,5 × 10 ⁻⁴ ; (g) 5,0 × 10 ⁻⁴ ; (h) 8,0 × 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; (B) Curva analítica obtida para DA. Parâmetros de SWV: ΔE _s : 0,005 V; a: 0,02V; f: 25 Hz.....	96
Figura 41. Processo de tensão mecânica aplicada sobre os eletrodos de platina através de dobras consecutivas.	98
FIGURA 42 – (A) Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ do (●) eletrodo de platina (Pt), (●) Pt -CYS, (●) Pt-CYS-GA (1h) e (●) Pt-CYS-GA (2h). (B) Gráfico de barras	101
FIGURA 43 - Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ mostrando a resposta obtida para soluções de GA preparadas em (●) água Mili-Q, (●) tampão fosfato pH 4,4, (●) tampão fosfato pH 7,0 e, (●) tampão fosfato pH 8,6.....	102
FIGURA 44 - Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 × 10 ⁻³ mol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ do (●) eletrodo de platina (Pt), (●) Pt -CYS, (●) Pt-CYS-GA, (●) Pt-CYS-GA-AB e (●) Pt-CYS-GA-AB-AT.	104

FIGURA 45 - Circuito equivalente representando a formação do imunocomplexo sobre a superfície do eletrodo de platina.....	105
FIGURA 46 - Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para as concentrações de (●) $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (●) $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (●) $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (●) $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (●) $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo anti-PARK7/DJ-1.	106
FIGURA 47 - Estudo do tempo ideal de interação entre anti-PARK7/DJ-1 e a superfície do eletrodo considerando o valor de R_{ct} , na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	107
FIGURA 48 - (A) Esquema de preparo do imunossensor onde: (I) Interação do grupo tiol de CYS com a superfície metálica; (II) Interação do GA com CYS; (III) imobilização do anticorpo (AB) sobre o eletrodo, por meio da interação dos seus grupos amina com o grupo carboxila de GA; (IV) interação do BSA com as extremidades livres do agente reticulante e; (V) formação do complexo antígeno-anticorpo. (B) Princípio de funcionamento do biossensor ao qual a resistência a transferência de carga aumenta à medida que novas interações com a superfície são adicionadas, formando um bloqueio à transferência eletrônica.	108
FIGURA 49 - Diagramas de Nyquist e curva de calibração para o imunossensor construído sobre eletrodo de platina para as concentrações de, (●) 40 ng mL^{-1} , (●) 65 ng mL^{-1} , (●) 90 ng mL^{-1} e (●) 150 ng mL^{-1} , (●) 175 ng mL^{-1} , mostrando aumento do valor de R_{ct} quando comparados ao (●) anticorpo.....	109
FIGURA 50 - Diagramas de Nyquist e relação da concentração de proteína e R_{ct} para o imunossensor construído sobre eletrodo de platina para as concentrações de, (●) 40 ng mL^{-1} e (●) 120 ng mL^{-1} , mostrando aumento do valor de R_{ct} quando comparados ao (●) anticorpo e ao BSA (●). Gráfico de barras mostrando o aumento significativo nos valores de R_{ct} para as duas concentrações estudadas. Medidas realizadas na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	110
FIGURA 51 - Diagramas de Nyquist obtidos para os estudos de repetibilidade ($n = 3$) e reprodutibilidade ($n = 4$) do biossensor na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	112
Figura 52. Imagens de MEV do (A) eletrodo de platina não modificado no aumento de 35 x; (B e C) eletrodo de platina não modificado no aumento de 500 x e 1000 x com destaque para regiões com imperfeições no filme metálico; (D) eletrodo de platina modificado, na presença	

do imuno-complexo no aumento de 20k vezes; (E) mapeamento químico com destaque para as regiões predominantes dos elementos platina (amarelo) e carbono (rosa) e; (F) gráfico de EDS com a distribuição dos elementos Pt, C e Cr sobre a superfície do eletrodo. 115

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES E IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE ANALITOS RELACIONADOS À DOENÇA DE PARKINSON. As evoluções trazidas ao longo dos últimos anos no setor médico envolvem tecnologias capazes de fornecer respostas confiáveis, rápidas e de fácil acessibilidade a problemáticas antes muito complexas e dispendiosas. As tecnologias *point-of-care* e vestíveis encabeçam essas inovações, buscando dispositivos flexíveis e capazes de atender a detecções em cenários diversos. Cada vez mais a busca por novos materiais de fácil acesso e manuseio além de um baixo custo vem sendo investigados e, na área dos sensores eletroquímicos não é diferente. Neste trabalho, três novas arquiteturas de sensores e imunossensor eletroquímicos foram desenvolvidos sobre as superfícies flexíveis de luva nitrílica e esparadrapo, utilizando a técnica de serigrafia pela deposição de tinta condutora de grafite e; sobre BioPET, utilizando fotolitografia e pulverização catódica, a fim de formar uma superfície metálica de platina (Pt). Os sensores em luva e esparadrapo foram submetidos a avaliações voltamétricas na presença de marcadores biológicos relacionados a doença de Parkinson, utilizando voltametria linear e voltametria de pulso diferencial, respectivamente, para a caracterização e detecção de dopamina e hemoglobina. Para dopamina foram obtidas linearidades dentro das faixas de concentração entre $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente para luva e esparadrapo bem como limites de detecção de $4,2 \times 10^{-7}$ e $7,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, com aplicação de sucesso em amostras de urina sintética. Hemoglobina foi detectada sobre a superfície de esparadrapo, ao qual obteve-se uma faixa linear de 1,0 a 10 mg mL⁻¹ e um limite de detecção de 0,77 mg mL⁻¹. Já para os eletrodos de platina um sensor de dopamina e um imunossensor para a proteína PARK7/DJ-1 foram construídos. Através da metodologia de montagem de monocamadas auto-organizadas, utilizando cistamina e glutaraldeído, a imobilização do anticorpo anti-PARK7/DJ-1 foi realizada. Otimizações de parâmetros de tempo de interação e concentração foram realizadas e, através o uso da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, um imunossensor detectou com sucesso a proteína alvo PARK7/DJ-1, obtendo-se uma faixa de trabalho entre 40 e 175 ng mL⁻¹ e um limite de detecção de 7,5 ng mL⁻¹. Testes manuais de tensão mecânica foram realizados tanto para os eletrodos serigrafados quanto para o eletrodo de platina, e ambos apresentaram boa reprodutibilidade da resposta eletroquímica após torcidos, comprovando o caráter flexível dos dispositivos. Eletrodos em luva e esparadrapo mostraram ser uma interessante alternativa como sensores vestíveis, inovando na utilização materiais flexíveis rotineiros bem como, o

eletrodo de platina mostrou ser um interessante meio para a construção de biossensores, possibilitando a imobilização eficaz dos elementos biológicos sobre sua superfície.

Palavras-chave: eletrodo vestível; imunossensor eletroquímico; hemoglobina; doença de Parkinson

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A SENSOR AND ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR DETECTION OF ANALYTES RELATED TO PARKINSON DISEASE. The evolutions that have arisen in the medical field, over the last few years, reflect in reliable, accessible and fast response technologies aimed at with problems that are very complex and expensive. Point-of-care and wearable technologies spearhead these innovations, seeking flexible devices who fit the several detection scenarios. The search for new easy access materials and handling as well as a low-cost have been investigated in the electrochemical field. In this work, two electrochemical sensors were developed on flexible nitrile glove and flexible adhesive tape, using the screen printing technique for the deposition of graphite conductive ink. Also, a sensor and an immunosensor were constructed by photolithography and platinum cathodic sputtering, on BioPET sheets. Glove and adhesive tape sensors were evaluated by voltammetry in the presence of biological markers related to Parkinson's disease, using linear voltammetry and differential pulse voltammetry, respectively, for characterization and detection of dopamine and hemoglobin. For dopamine, there were linear ranges between 5.0×10^{-6} to 1.0×10^{-4} mol L⁻¹ and 5.0×10^{-6} to 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, respectively, for glove and adhesive and detection limits of 4.2×10^{-7} and 7.2×10^{-7} molL⁻¹. with successful application in synthetic urine samples. Hemoglobin was detected on adhesive tape, a linear range of 1.0 to 10 mg mL⁻¹ and a detection limit of 0.77 mg mL⁻¹ was obtained. The platinum electrodes was used for a dopamine detection and an immunosensor for a PARK7 / DJ-1 protein. Self-assembled monolayers (SAM) were formed using cystamine and glutaraldehyde to anti-PARK7 / DJ-1 antibody immobilization on the platinum electrode surface. Interface optimizations of interaction time and concentration were performed and the EIS technique was used as an electrochemical technique to detect PARK7 / DJ-1 protein, obtaining a working range between 40 and 175 ngmL⁻¹ and a limit of detection of 7.5 ng mL⁻¹. Mechanical stress tests were applied in the screen-printed electrodes and platinum electrodes, and both showed good reproducibility of the electrochemical response after twisting, proving the glove and adhesive tape flexibility. The glove and adhesive tape electrodes showed to be an interesting alternative as wearable sensors,

innovating in the incorporation of flexible materials routine. The platinum electrode was a useful device for the construction of biosensors, enabling an effective immobilization of the biological elements on its surface.

Keywords: Wearable electrodes; electrochemical immunosensor; hemoglobin; Parkinson disease

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1.1. Eletroquímica	22
1.1.1. Sensores e biossensores eletroquímicos	23
1.1.2. Imunossensores.....	24
1.1.3. Ferramentas eletroquímicas	30
1.2. Tecnologia de impressão de eletrodos	36
1.3. Produção de eletrodos por deposição de filmes metálicos	40
1.4. Doença de Parkinson.....	43
1.4.1. Marcadores eletroativos e biomarcadores para doenças	44
1.4.1.1. Dopamina	45
1.4.1.2. Hemoglobina	47
1.4.1.3. Proteína PARK 7/DJ-1	48
OBJETIVOS GERAIS	50
2.1. Objetivo geral	50
2.2. Objetivos específicos	50
EXPERIMENTAL	52
3.1. Reagentes e soluções	52
3.3. Equipamentos, materiais e metodologias utilizadas	54
3.3.1. Design dos eletrodos e materiais de suporte	54
3.3.3. Preparo das tintas condutoras e montagem dos eletrodos serigrafados.....	55
3.3.4. Avaliação da resistência a tensão mecânica	58
3.3.5. Produção dos eletrodos de platina.....	58
3.3.7. Caracterizações eletroquímicas dos eletrodos	62
Capítulo 1.....	64
Sensores flexíveis descartáveis fabricados sobre a superfície de luva nitrílica e esparadrapo utilizando tinta condutora a base de esmalte para unhas e glicerol aplicados na detecção eletroquímica de dopamina e hemoglobina.	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Desenvolvimento da tinta condutora	64
4.2. Avaliação das tintas sobre o material de suporte	65
4.3. Otimização da tinta condutora	68
4.4. Caracterizações morfológicas	70
4.5. Caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos	73
4.6. Caracterização e detecção de HB utilizando ESP	85
Capítulo 2.....	90
Desenvolvimento de eletrodos de platina flexíveis sobre a superfície de folhas de EcoPET	

caracterizados na presença de dopamina e utilizados no desenvolvimento de um imunossensor para detecção da proteína PARK7/DJ-1.....	90
RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1. <i>Caracterização eletroquímica dos eletrodos de platina</i>	90
5.2. <i>Avaliação mecânica dos eletrodos de platina</i>	97
5.3. <i>Construção do imunossensor eletroquímico para detecção da proteína PARK7/DJ-1</i>	98
5.3.1. <i>Construção da monocamada auto-organizada</i>	99
5.3.2. <i>Imobilização do anticorpo</i>	102
5.3.3. <i>Detecção de PARK7/DJ-1</i>	108
5.3.4. <i>Caracterizações morfológicas</i>	113
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
PERPECTIVAS SOBRE O TRABALHO	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
ANEXOS	142

INTRODUÇÃO

1.1. Eletroquímica

A eletroquímica pode ser definida como um campo que relaciona efeitos químicos e elétricos, podendo ser utilizada para entender as alterações químicas causadas em um sistema a partir da passagem de corrente elétrica, corrente essa que pode ser gerada através de reações químicas. (Bard e Faulkner, 2000) As reações de oxirredução são utilizadas a fim de conhecer o material de estudo durante os processos de perda e ganho de elétrons, tornando essa técnica interessante para obtenção de informações como concentração de espécies, cinética, mecanismos de reação, dentre outros comportamentos da espécie em solução. Essas reações ocorrem na presença de eletrodos, que são interligados tanto em solução – via transporte iônico – quanto externamente – via fios elétricos, por exemplo - tornando possível o transporte da carga. (Brett e Brett 1993) Utilizando-se de um controlador de potencial – chamado de potenciostato – o sistema de interesse pode ser avaliado sob vários contextos, possibilitando o desenvolvimento de diferentes estudos e a construção de diferentes tecnologias para uso comercial. (Nasirpouri, 2017) As técnicas eletroquímicas apresentam vantagens quando comparadas a outras técnicas de finalidades similares, como a espectroscopia por exemplo, fornecendo respostas mais rápidas, além de uma perspectiva diferente para os mesmos parâmetros. (Gladysz e Michl, 1990; Nasirpouri, 2017)

Ainda hoje as técnicas de detecção mais utilizadas envolvem metodologias muito caras – como o caso das cromatografias - o que continua a encarecer certas análises. Utilizando-se de algumas propriedades intrínsecas das moléculas – com foco aqui para características eletrônicas ativas – algumas técnicas foram desenvolvidas e aprimoradas, em busca de facilitar e simplificar esses processos. A área da eletroquímica é extensivamente utilizada para finalidades de detecção, utilizando-se de reações de oxirredução para compreender o comportamento destas moléculas sobre superfícies condutoras. Graças a uma metodologia que possibilita a obtenção de respostas rápidas e relativamente de fácil interpretação, a eletroquímica vem ganhando espaço nas áreas de meio ambiente – na detecção de contaminantes emergentes (Hernandez-Vargas *et al.*, 2018); na área clínica, com foco para detecções de biomoléculas (Labib *et al.*, 2016) e contaminantes biológicos (Mishra, G. K. *et al.*, 2018) e; na área industrial, auxiliando no controle de qualidade (Ampelli *et al.*, 2014).

1.1.1. Sensores e biossensores eletroquímicos

Com a capacidade de realizar medições do analito diretamente na amostra, de forma contínua e reversível, os sensores eletroquímicos consistem de um elemento de transdução que interage com o analito alvo gerando alterações químicas que podem ser traduzidas por esse elemento em sinais elétricos mensuráveis. (Wang, 2006) Comparado a outros tipos de sensores químicos (ópticos, de massa e térmicos, por exemplo), os sensores eletroquímicos tem destaque devido à sua rapidez na geração de resposta, simplicidade experimental e relativo baixo custo – quando comparados a métodos convencionais. Isso torna viável que dispositivos deste porte possam ser otimizados e comercializados para os mais diversos fins. (Stradiotto *et al.*, 2003) Unidas a essas características tem-se a versatilidade e alta sensibilidade analítica, possibilitado uma aplicabilidade para diferentes tipos de amostras e detecção de concentrações relativamente baixas. A Figura 1 mostra um esquema genérico de um sensor eletroquímico:

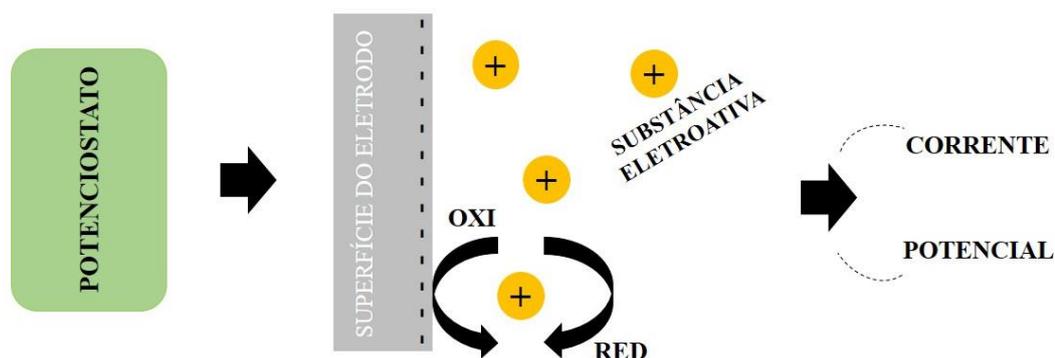


FIGURA 1 - Esquema genérico de um sensor eletroquímico. Fonte: Autoria própria.

Buscando tornar os sensores eletroquímicos cada vez mais específicos, outros tipos de dispositivos começaram a ser desenvolvidos, utilizando-se de elementos biológicos para esse fim. Os chamados biossensores eletroquímicos são uma classe de sensores que transformam eventos de reconhecimento biológico em propriedades elétricas. (Hammond *et al.*, 2016) A utilização de elementos biológicos, tais como anticorpos, sequências de DNA e RNA, células, enzimas e micro-organismos sobre a superfície dos transdutores possibilitam um aumento na seletividade destes sensores, devido às suas características de compatibilidade e complementaridade. (Abdulbari e Basheer, 2017) Uma das possíveis classificações para os biossensores baseia-se no tipo de elemento biológico utilizado, tendo destaque dentro das análises médicas os chamados imunossensores. O funcionamento dos biossensores

eletroquímicos baseiam-se na modificação da superfície do transdutor pelo elemento biológico, possibilitando que essa modificação possa ser detectada por interações eletroquímicas na presença de uma substância eletroativa. (Kimmel *et al.*, 2012) Os biossensores possuem uma variada aplicabilidade (Mehrotra, 2016), como na indústria alimentícia para detecção de contaminantes (Thakur e Ragavan, 2013) ou na detecção de poluentes ambientais (Justino *et al.*, 2017), porém, seu destaque envolve a detecção de biomarcadores ligados a doenças. (Patel *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017; Alhadrami, 2018) A Figura 2 mostra um esquema genérico de um biossensor:

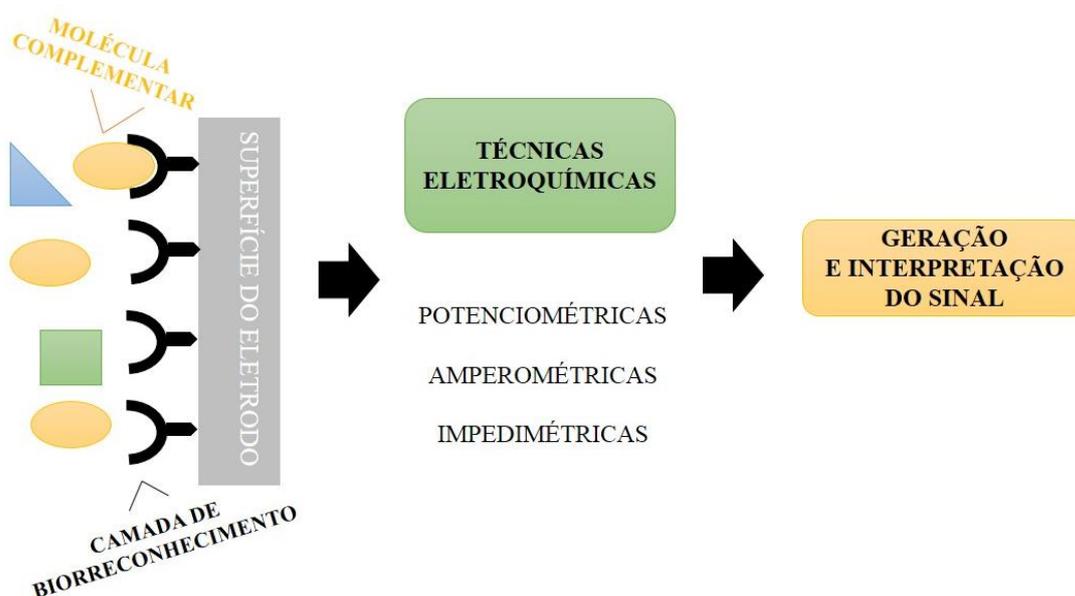


FIGURA 2 - Esquema genérico de um biossensor eletroquímico. Fonte: Autoria própria.

1.1.2. *Imunossensores*

O princípio base do imunossensor utiliza-se da especificidade que o sistema imunológico possui no reconhecimento de moléculas proteicas denominadas de antígenos. Dentre os elementos de reconhecimento há destaque para os anticorpos, providos de uma alta especificidade mesmo em baixas concentrações, o que os tornam importantes biomarcadores na construção dos biossensores. (Moina e Ybarra, 2012) A presença de anticorpos livres, em níveis normais ou anormais, em fluidos biológicos, tais como sangue, urina, suor, saliva e fluido cefalorraquidiano são uma importante via para identificação de uma diversidade de patologias, podendo ser utilizados como biomarcadores para diagnóstico e monitoramento destas doenças. (Piro e Reisberg, 2017)

Os imunossensores eletroquímicos são dispositivos que fornecem respostas analíticas a partir de diferentes alterações de propriedade ou geração de sinal que ocorrem após a formação de um complexo antígeno-anticorpo. Essas alterações podem ser detectadas e convertidas, com auxílio de um transdutor, em sinais elétricos mensuráveis. (Luppa *et al.*, 2001) Os imunossensores podem ser classificados como diretos – sem o uso de marcação, denominado de *label-free* – e indiretos, ao qual lança-se mão da marcação do material biológico – com enzimas, compostos fluorescentes e eletroativos, por exemplo – a fim de direcionar o fator gerador de sinal.

Dentre os imunossensores indiretos, as configurações mais utilizadas são as do tipo sanduíche e do tipo competitivo. Dispositivos do tipo sanduíche baseiam-se na imobilização do antígeno ou do anticorpo sobre a superfície do transdutor com posterior monitoramento da formação do complexo antígeno-anticorpo através de um sistema composto por um elemento complementar marcado que será responsável por gerar o sinal a ser detectado. No imunossensor competitivo há a presença do antígeno marcado e do antígeno livre, responsáveis por prover a competição pelo sítio de ligação do anticorpo imobilizado. A formação do complexo é medida através do marcador, ao qual a grandeza de medida é inversamente proporcional a concentração de antígeno livre. O princípio dessa técnica baseia-se na maior afinidade do anticorpo livre, quando comparado ao anticorpo marcado devido. (Riccardi *et al.*, 2002; Nunes, 2005) Já os imunossensores *label-free* baseiam-se na imobilização do material e formação do complexo sem a presença de marcadores, utilizando-se uma sonda eletroquímica a fim de captar as mudanças obtidas sobre a superfície do transdutor ocasionando uma supressão de sinal elétrico. (Liu e Saltman, 1996) A detecção direta tem como vantagem uma redução de custos e de tempo de preparo, possibilitando um dispositivo mais acessível e simplificado quando comparada as configurações sanduíche e competitivo. (Cristea *et al.*, 2015) Isso mostra ser uma interessante via de detecção para materiais biológicos passíveis de serem imobilizados ou adsorvidos sobre superfícies sólidas. A Figura 3 ilustra as principais características das configurações de imunossensores acima mencionadas.

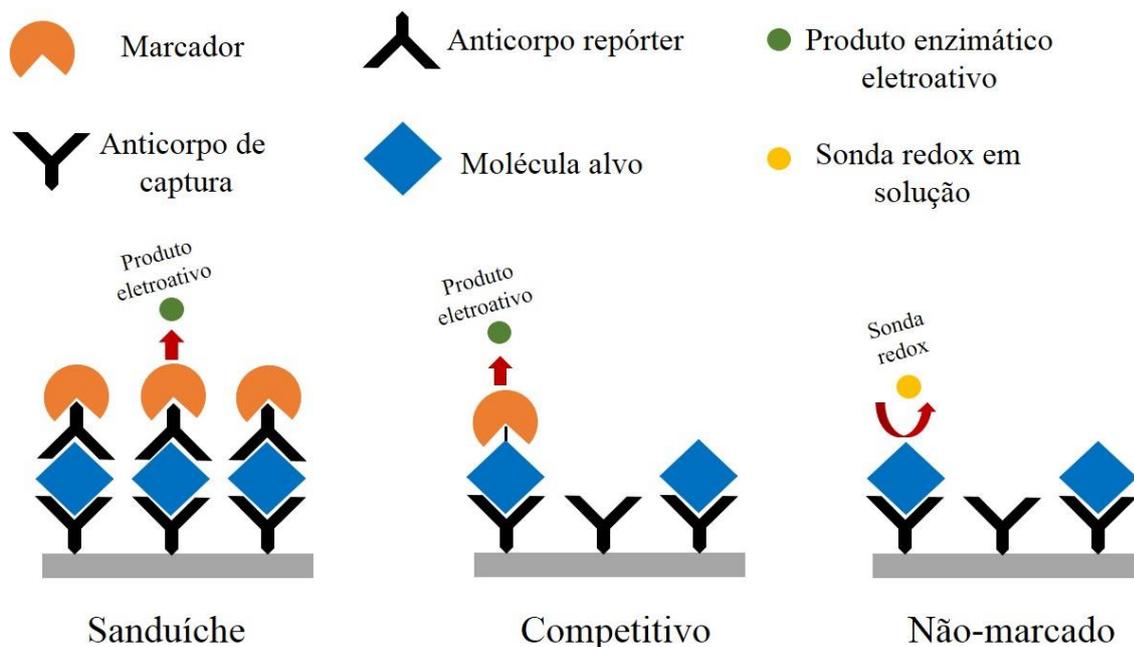


FIGURA 3 - Imagem ilustrativa dos três principais tipos de configurações de imunossensores: sanduíche, competitivo e não marcado. Fonte: Autoria própria.

Anticorpos e proteínas receptoras

Os anticorpos são moléculas proteicas produzidas por células plasmáticas, responsáveis, principalmente, pela neutralização de moléculas estranhas ao organismo, fazendo parte do mecanismo de defesa do corpo. Sua estrutura é formada por pares de cadeias pesadas e leves, formadas por sequências de aminoácidos constantes e variáveis. Nas cadeias pesadas há a presença de regiões constantes, capazes de fornecer flexibilidade à molécula. Nas cadeias leves há a presença de regiões constantes (C_L) e variáveis (V_L), sendo as últimas de grande contribuição para a ligação com o antígeno. A especificidade do anticorpo é determinada através da associação das regiões variáveis de ambas cadeias pesadas e leves, ao qual é formada uma região tridimensional que reproduz estruturalmente a imagem do antígeno. Dentro desta região tridimensional, pequenas regiões hipervariáveis de 10 aminoácidos – denominadas de regiões determinantes de complementariedade (do inglês, *complementarity-determining regions, CDRs*) - determinam o nível de especificidade entre moléculas. (Flaherty, 2012)

A formação do complexo é governada primeiramente pelas propriedades espaciais e temporais de antígeno e do anticorpo. Se tais propriedades coincidem, serão propriedades químicas e físicas, as chamadas forças intermoleculares, é que tornarão funcionais a seletividade e especificidade do complexo. As forças intermoleculares são efetivadas em

decorrência de uma combinação mais atrativa do que repulsiva entre os sítios de ligação. As principais interações que ocorrem durante a formação do complexo são: ligações de hidrogênio, forças iônicas, interações de Van der Waals, interações apolares além dos fatores estéricos. (Brownlee, 2007; Reverberi e Reverberi, 2007) A Figura 4 mostra a estrutura genérica de um anticorpo:

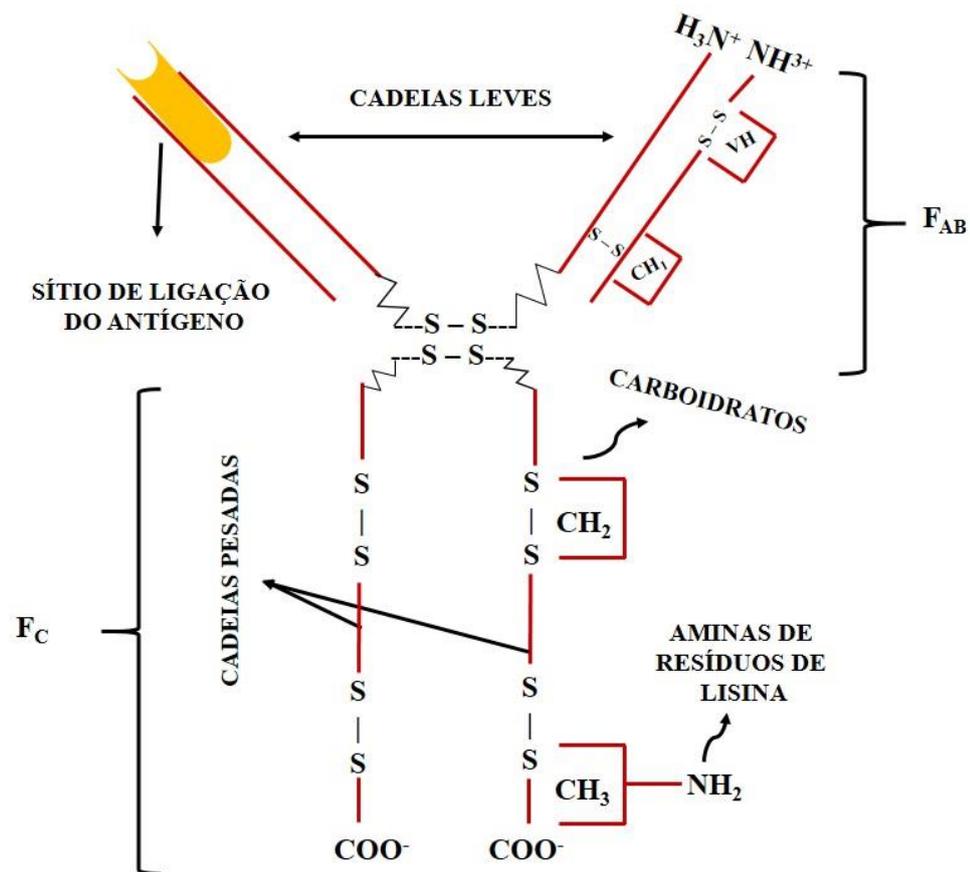


FIGURA 4 - Estrutura genérica de um anticorpo. Fonte: Autoria própria, baseada em (Hoffman *et al.*, 2016); (Thermofischer) e; (Flaherty, 2012).

A utilização do material imunológico como elemento de reconhecimento baseia-se não apenas na sua especificidade durante a formação do complexo imunológico, mas também na disponibilidade comercial, visto que são materiais passíveis de serem fabricados em grande quantidade. A grande desvantagem desse tipo de material, porém, está no seu custo, mostrando-se bem elevado devido à dificuldade na produção e purificação. O pequeno volume de amostra também é outra vantagem a ser considerada, dado que pequenas concentrações tanto do antígeno quanto do anticorpo são suficientes para uma análise efetiva.

Imobilização

A eficácia na construção de um imunossensor está em grande parte ligada ao sucesso na imobilização do material biológico sobre a superfície do transdutor. Quando escolhidos como o material biológico de reconhecimento, os anticorpos necessitam de uma orientação devidamente ajustada, não aleatória, que possibilite que os grupos funcionais neles presentes fiquem livres para que outras ligações possam ocorrer. Orientações inadequadas podem gerar problemas associados à perda de atividade biológica com consequente perda na confiabilidade do sensor. A literatura fornece diversas metodologias de imobilização do anticorpo sobre superfícies sólidas, com sua grande maioria mediadas pelo uso de compostos químicos de reticulação, como é o caso do glutaraldeído o do complexo EDC-NHS. (Lu *et al.*, 1996; Azam *et al.*, 2014)

As metodologias de conjugação tem por finalidade a interação dos grupos funcionais disponíveis na superfície do material biológico com diferentes compostos químicos. A Figura 4 mostra alguns grupos disponíveis sobre a superfície de um anticorpo: amins primárias na região do N-terminal das cadeias polipeptídicas e nas cadeias laterais de resíduos de lisina, na região Fab; grupos carboxílicos presentes na região C-terminal das cadeias polipeptídicas e nas cadeias laterais de ácido aspártico e ácido glutâmico e também as carbonilas criadas a partir da oxidação de grupos carboidratos em glicoproteínas. Com base nesses conhecimentos, seleciona-se a melhor técnica de imobilização a partir das características do material biológico, da superfície a ser imobilizada e dos resultados esperados. (Sesay, 2003; Hermanson, 2013; Dennler *et al.*, 2015) Dentre as técnicas disponíveis, aquelas destinadas a formação de finos filmes funcionais é de grande interesse devido a simplicidade e habilidade de formação de estruturas estáveis e reprodutíveis.

As monocamadas auto-organizadas (do inglês, *self-assembled monolayer*, SAM) são definidas como um conjunto ordenado molecular formados a partir da adsorção espontânea de moléculas sobre uma superfície sólida. Podem ser utilizadas na investigação de interações sobre interfaces utilizando o efeito do aumento da complexidade molecular na estrutura e estabilidade de conjuntos bidimensionais. (Ulman, 1996) Dentre as aplicações das SAMs, a formação de camadas sobre superfícies metálicas é um assunto extensivamente abordado na literatura tendo as monocamadas formadas pela interação ouro-enxofre uma maior visibilidade devido a sua ampla aplicação. (Tam-Chang *et al.*, 1995; Love *et al.*, 2005; Bürgi, 2015) Alguns estudos demonstram diferentes abordagens para a formação de SAMs sobre outras superfícies metálicas diferentes do ouro. Li e colaboradores desenvolveram um estudo para diferentes n-alcaniltióis

buscando a formação de monocamadas sobre finos filmes metálicos e oxidados de platina, estudando os diferentes comportamentos por medições de ângulo de contato com a água, elipsometria e espectroscopia de absorção de reflexão por infravermelho. Os diferentes resultados sugeriram a formação de monocamadas bem organizadas sobre a superfície metálica da platina. Respostas obtidas por espectroscopia de fotoelétrons de raios X (EDX) revelou a formação de ligações metal-tiolato dos grupos tiol nas moléculas de alcanotiol com átomos de Pt da superfície metálica. (Li *et al.*, 2003; Love *et al.*, 2005) Até o momento, a partir de pesquisas nas principais plataformas de publicação, nenhum trabalho abordou a utilização de montagem de SAMs sobre superfície de platina para construção de biossensores eletroquímicos, sendo assim consideramos utilizar esse tipo de estratégia para desenvolver um novo tipo de estrutura sensorial.

Na formação de SAMs sobre superfícies metálicas há a utilização de alguns compostos químicos interessantes a fim de formar a ponte entre o material metálico e o biológico. A seguir discutiremos sobre os selecionados para esse trabalho.

Cistamina

A cistamina (2,2 – diaminoetildissulfeto) é um composto produzido a partir da oxidação da cisteamina (2-aminoetanotiol) na presença de oxigênio ou através da química de Felton na presença de metais de transição. É um importante aliado na conjugação de materiais biológicos sobre superfícies metálicas devido à bem conhecida interação – por meio de adsorção - de seus átomos de enxofre- provenientes de seus grupos tióis- com a superfície do ouro possibilitando que grupos aminos fiquem livres para interagirem com outros grupos de interesse. (Wirde *et al.*, 1999) O trabalho de Katz aborda a interação da cisteamina e cistamina com superfícies de platina através da interação dos grupos tiol e dissulfeto destas moléculas como âncoras nas superfícies metálicas, para o desenvolvimento de um fotobioeletrodo bacteriano pela imobilização de naftoquinona. (Katz e Solov'ev, 1990) Dentre os compostos químicos mais utilizados em união com a cisteamina tem-se o agente de reticulação glutaraldeído.

Glutaraldeído

O glutaraldeído é um agente de reticulação utilizado em uma variedade de aplicações tendo sido consolidado como uma importante via para a formação de SAMs. É um composto dialdeído linear de 5 carbonos, acessível comercialmente, que possui alta reatividade principalmente com grupos amina. (Migneault *et al.*, 2004) Agentes de reticulação são

responsáveis por unir cadeias poliméricas através de ligações covalentes formando um estrutura estável e rígida. (Maitra e Shukla, 2014)

Ligação covalente cruzada

Para que a interação entre superfície / material biológico ocorra, utiliza-se a técnica de ligação covalente cruzada (do inglês, *crosslinking*) ao qual compostos químicos são empregados a fim de formar um sistema de reticulação rígido, capaz de interagir diretamente com os grupos funcionais do anticorpo. (Akyilmaz e Dinçkaya, 2013; Couto *et al.*, 2017) Uma das metodologias mais utilizadas na literatura para a imobilização de materiais biológicos emprega o glutaraldeído, responsável pela formação de uma rede rígida entre o elemento biológico e a superfície metálica. Uma extremidade livre do glutaraldeído liga-se a cistamina – ao qual possui grupos tióis que interagem fortemente com a superfície de determinados metais, como ouro, platina e prata, sendo utilizado para facilitar a interação glutaraldeído metal. Com sua outra extremidade interage aos grupos amino presentes na superfície do material biológico, formando assim uma rede reticulada rígida e estável. (Ulman, 1996) A Figura 5 exemplifica essas ligações:

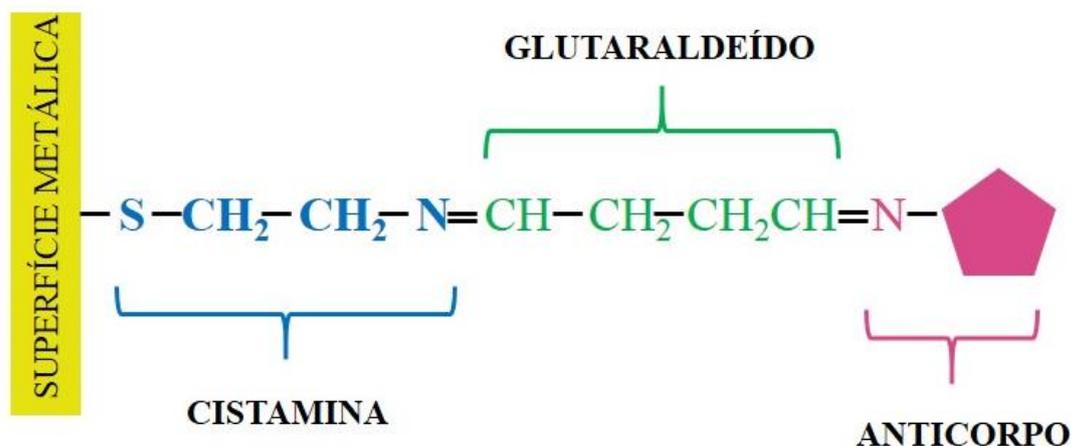


FIGURA 5 - Esquema de ligação para formação da monocamada utilizando cistamina e glutaraldeído. Fonte: Autoria própria.

1.1.3. Ferramentas eletroquímicas

Os sensores e biossensores eletroquímicos podem utilizar-se de diferentes ferramentas para a obtenção, conversão e interpretação de sinais e resultados. No geral existem quatro tipos

diferentes de sensores eletroquímicos, classificados quanto ao parâmetro de detecção utilizado gerando subclassificações a partir destes.

Sensores voltamétricos

Os sensores voltamétricos baseiam-se na resposta de corrente em função do potencial. A diferença nos sensores voltamétricos está no fato de trabalhar-se não com um único potencial constante mas com uma faixa de potencial, tornando essa técnica um estudo em função de uma varredura de potenciais. (Stradiotto *et al.*, 2003; Stoytcheva e Zlatev, 2013) Dependendo da forma como o potencial é aplicado e como o sinal de corrente é obtido classificará as diferentes técnicas voltamétricas utilizadas para o desenvolvimento desses sensores, interferindo na qualidade de informação obtida e na sensibilidade do sinal.

As diferentes técnicas voltamétricas são consideradas técnicas dinâmicas- ao qual há um valor de corrente diferente de 0 - pois forçam a mudança no sistema a partir da aplicação de um potencial. Dentre as vantagens que oferecem pode-se destacar a excelente sensibilidade, possibilitando trabalhar-se em um intervalo linear grande, tempos de análise rápidos, determinação simultânea de diferentes analitos. A facilidade na aplicação de potencial em diferentes tipos de onda é o que torna esse tipo de técnica tão variada.(Bertrand, 1998) A seguir apresenta-se alguns dos diferentes tipos de técnicas voltamétricas.

Voltametria de varredura linear

A LSV é uma técnica ao qual o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho variando linearmente em função do tempo, possibilitando a aplicação de velocidades de varredura relativamente altas. Ao realizar a medida de forma direta, em função do potencial, considera-se a corrente total, seja ela capacitiva ou faradaica, prejudicando algumas vezes em aplicações quantitativas. É uma das técnicas mais simples de serem aplicadas visto que poucos parâmetros de estudos devem ser considerados. (Pacheco *et al.*, 2013)

Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic voltammetry*) baseia-se na aplicação de uma varredura de potenciais em um eletrodo de trabalho – na presença de eletrólito suporte e uma substância eletroativa - a fim de medir-se a corrente resultante. A varredura linear ocorre primeiramente no sentido direto, considerando-se uma janela entre o potencial inicial e o potencial de retorno. Finalizando a medição direta, a varredura é invertida ocorrendo então

uma nova medição entre o potencial de retorno e o potencial final escolhido, que pode ou não coincidir com o valor do potencial inicial. Essa medição direta e indireta é considerada um ciclo e pode ser repetida infinitas vezes. (Silva, 1998) A CV possibilita a obtenção de informações qualitativas do sistema como a termodinâmica de processos redox e a cinética das reações fazendo dela uma importante técnica de caracterização inicial do sistema e do analito. (Pacheco *et al.*, 2013) Outra abordagem interessante dessa técnica é o acompanhamento das respostas de pico de compostos já bem estabelecidos, obtendo-se informações acerca do eletrodo de trabalho e espécies adsorvidas ou modificadoras presentes no mesmo, ao qual é possível observar mudanças no comportamento dos potenciais padrão de oxidação e redução ou na intensidade da corrente de pico.

Técnicas de pulso

As técnicas de pulso baseiam-se na obtenção da resposta em corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial. A largura do pulso e o degrau de potencial – responsável por promover o processo faradaico – serão os responsáveis pelas características de resposta em corrente obtidas. Nessas técnicas a perturbação do potencial não é uma função linear do tempo do experimento, visto que a sistemática para a variação do potencial segue a sequência de pulsos e seu estilo de aplicação. Dentre as técnicas de pulso existentes destacam-se aqui a voltametria de onda quadrada (do inglês *Square wave voltammetry* – SWV) e a voltametria de pulso diferencial (do inglês *Differential pulse voltammetry*– DPV). (Souza *et al.*, 2003)

A SWV é uma técnica das técnicas mais rápidas e sensíveis, apresentando limites de detecção relativamente baixos. (Souza *et al.*, 2003) A característica principal desta técnica conta com a aplicação do pulso na forma de uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada. Aqui, a corrente é lida duas vezes, uma ao final do pulso direto – quando a direção do pulso é igual a direção da varredura – e outra ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária a direção da varredura. O voltamograma obtido consiste na diferença entre essas duas correntes em relação a rampa de potencial aplicado. (Pacheco *et al.*, 2013)

A DPV é caracterizada por iniciar suas medidas em um potencial onde não há processo faradaico. O primeiro par de pulsos consiste em um pulso de potencial E_1 seguido por um pulso diferencial ΔE , para E_2 . Nessa técnica a corrente é medida anteriormente a aplicação do pulso e após o final do pulso. A diferença entre essas medições é determinada e graficada em relação

ao potencial de base. O objetivo da realização de duas medições da corrente é possibilitar a correção da corrente capacitiva, visto que a medida que se aplica o pulso a corrente capacitiva é considerada, porém ocorre sua diminuição exponencial – em relação a diminuição linear da faradaica – que é desconsiderada a partir da escolha de um tempo ideal de leitura. Desconsiderando-se a contribuição da corrente de fundo essa técnica possibilita limites de detecção menores quando comparados a outras técnicas. (Pacheco *et al.*, 2013)

Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *Electrochemical impedance spectroscopy*, EIS) é caracterizado pelo estudo da resposta de um sistema através da aplicação de sinais alternados periódicos de pequena amplitude. As leituras são realizadas para diferentes frequências alternadas, de onde vem o nome espectroscopia de impedância. A resposta obtida contém informações acerca da interface, da estrutura do material e das reações que ali ocorrem, baseadas principalmente na resistência e na capacitância do sistema. É uma técnica muito sensível a interferências externas, principalmente para sistemas que envolvem volumes baixos. (Lasia, 2014)

Diferente do princípio de mensurar resistência em circuitos contínuos, que obedecem a lei de Ohm, a impedância busca mensurar a resistência em circuitos alternados. Em grande parte dos experimentos de EIS na aplicação de sensores eletroquímicos, uma tensão senoidal fixa é aplicada através de um potenciostato em um sistema eletroquímico contendo uma solução de eletrólito na presença da molécula de interesse. Isso possibilita, através da diferença impedimétrica de corrente, classificar diferentes tipos de superfícies modificadas em vista da diferença de condutividade do sistema em relação ao tipo de modificação utilizada. Quando a perturbação é aplicada a uma frequência definida, uma corrente fluirá através do sistema, sendo registrada pelo potenciostato e convertida em um valor de impedância (Z), valor esse constituído de uma componente real (Z') e uma componente imaginário ($-Z''$). Esse processo é repetido para diferentes valores de frequência, fornecendo diferentes valores reais e imaginários para um valor total da impedância. Obtém-se ao final da varredura de frequências dois tipos de diagramas, o de Nyquist, que apresenta os valores reais e imaginários e o diagrama de Bode, fornecendo as informações de frequência e deslocamento de fase. Diferentes componentes contribuem para a impedância geral do circuito e esses componentes podem ser utilizados para a construção de circuitos que caracterizem o sistema estudado. Em um sistema eletroquímico

obtem-se os valores da resistência da solução (R_s), valor da carga da dupla camada sobre a superfície do eletrodo (C_d), resistência a transferência de carga (R_{ct}) e o denominado elemento de Warburg (W). O elemento de Warburg tem como função representar a difusão dos íons durante a reação eletroquímica a baixas frequências visto que em altas frequências essa migração ocorre por períodos de tempo muito longos e o movimento das moléculas em solução muito lento tornando a contribuição de Warburg dispensável. (Lisdar e Schäfer, 2008; Chang e Park, 2010; Macdonald e Johnson, 2018)

Para sistemas biológicos, como o caso dos biossensores o circuito mais utilizado é o de Randles, ao qual possui os valores de R_s , C_d , R_{ct} e W incorporadas. Ao modificar a superfície condutora os valores de impedância se alteram devido à mudança na capacitância da dupla camada e na resistência de transporte de cargas. A medida que mais material é adicionado para alterar essa superfície ou o sistema o valor de R_{ct} aumenta, aumentando também o raio do semicírculo característico de Nyquist. A Figura 6 mostra um esquema genérico do circuito de Randles e o seu respectivo diagrama de Nyquist.

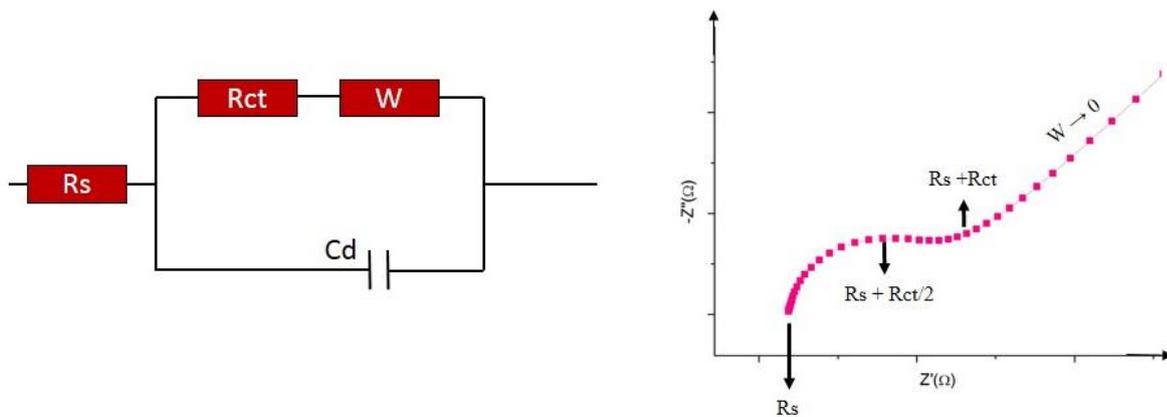


FIGURA 6 - Ilustrações genéricas de um circuito de Warburg e um diagrama de Nyquist contendo os valores de R_s – resistência da solução; R_{ct} - resistência à transferência de carga; C_d - capacitância da dupla camada e; W - impedância de Warburg.

1.2. Eletrodos vestíveis

Com o crescente interesse na obtenção de dispositivos de detecção miniaturizados, capazes de gerar respostas rápidas, sem a necessidade de equipamentos complexos e do deslocamento de amostras, o conceito de dispositivos de ponto de atendimento (do inglês, *point-of-care*,

POC), tem ganhado destaque. Dispositivos POC estão diretamente ligados ao setor clínico, sendo definidos como dispositivos capazes de detectar analitos de forma rápida, com proximidade ao paciente, facilitando o diagnóstico, monitoramento e acompanhamento de doenças. Dentre as vantagens deste tipo de dispositivo têm-se a possibilidade de diagnósticos precoces, baseados em biomarcadores específicos, bem como de monitoramento personalizado permitindo uma melhoria na qualidade de vida do paciente. (Vashist, 2017)

Dispondo dos crescentes estudos em volta dos dispositivos POC outras abordagens começaram a ser desenvolvidas, principalmente com foco para dispositivos mais flexíveis, na busca por um melhor manuseio sem perda na qualidade de detecção. Os chamados eletrodos vestíveis (do inglês, *wearable electrodes*) buscam o desenvolvimento de dispositivos menos invasivos, capazes de realizar funções médicas específicas como o monitoramento ou suporte dentro de longos períodos de tempo. A possibilidade de serem vestíveis os tornam passíveis de serem aplicados tanto no corpo humano de forma direta - no caso de tatuagens sensoriais - bem como suportes que lembrem peças de roupas. (Fotiadis *et al.*, 2006) A ideia de sensores vestíveis possibilita o monitoramento em tempo real de determinadas funções, buscando arquiteturas miniaturizadas e moldáveis. A literatura apresenta uma ampla gama de trabalhos com finalidades vestíveis para detecções médicas, e, dentre as características chave destacam-se a flexibilidade e maleabilidade do sensor, mostrando a importância do material de suporte. (Nag *et al.*, 2017a)

A partir da ideia dos eletrodos vestíveis uma infinidade de aplicações podem ser consideradas desde dispositivos permanentes até dispositivos descartáveis, que podem ser utilizados durante uma detecção específica, e logo após descartados. Um imunossensor vestível foi desenvolvido buscando monitorar o consumo de álcool em suor humano através da detecção e quantificação de um metabólito do etanol. Baseado em eletrodos de ouro e zinco sobre a superfície de poliimida, os dispositivos foram comparados a sensores sobre superfícies de vidro obtendo-se valores de sensibilidade, especificidade e limite de detecção adequados a literatura. (Panneer Selvam *et al.*, 2016) Outro trabalho buscou desenvolver um sensor vestível para a detecção de íons cloreto - a partir da metodologia de *screen-printing* - utilizando-se de diferentes materiais flexíveis – como PET e fibras de tecido impermeáveis. As respostas obtidas mostraram que os diferentes suportes flexíveis eram promissores como sensores vestíveis considerando uma boa reprodutibilidade e repetibilidade das medidas. (Bujes-Garrido e Arcos-Martínez, 2017) Outras aplicações incluem detecções de metabólitos em suor, lágrima e saliva

através de sensores tatuagem, capazes de se fixarem na pele do paciente realizando uma análise *in situ*. (Bandodkar e Wang, 2014; Bandodkar *et al.*, 2015)

Uma parte do trabalho aqui apresentado utilizou-se do conceito dos eletrodos descartáveis buscando dispositivos que possam ser utilizados durante detecções específicas e personalizadas dentro do setor clínico.

1.2. Tecnologia de impressão de eletrodos

Os eletrodos impressos (do inglês *Screen-Printed Electrode, SPE*) são produzidos pela deposição de um filme sobre uma superfície inerte. As tecnologias de impressões vêm ganhando campos diferenciados seja na produção de recursos eletrônicos sobre substratos flexíveis (Khan *et al.*, 2014), seja na produção de eletrodos para dispositivos POC, tendo como destaque as técnicas adaptadas da tradicional serigrafia. Dentre as vantagens, destaca-se a possibilidade de automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência no mesmo suporte.

A serigrafia é uma técnica de história antiga, tendo um passado nas pinturas rupestres de cavernas, passando pelas artes produzidas na antiga China, até chegar ao que hoje conhecemos como uma técnica de reprodução de padrões exatos para uma superfície por meio do arraste de uma tinta através de um molde vazado. (Lengwiler, 2013) Eletrodos impressos por serigrafia possibilitam a produção de dispositivos miniaturizados descartáveis, portáteis, com alta reprodutibilidade, custo acessível, além do uso de materiais diferenciados e novas composições de tintas. Também, possibilita o controle na espessura do padrão; validação estatística devido à replicação dos eletrodos em larga escala e; a incorporação de modificadores diretamente na tinta. (Nascimento e Angnes, 1998) Isso abre caminho para o desenvolvimento de dispositivos mais baratos, com *designs* personalizados para cada tipo de aplicação. (Albareda-Sirvent *et al.*, 2000; Banks, Craig E. *et al.*, 2016)

A técnica mais utilizada para a produção de eletrodos serigrafados baseia-se na deposição de uma tinta condutora – de viscosidade e espalhabilidade adequadas – com auxílio de um rodo sobre a superfície de uma malha pré moldada ou um molde vazado. A tinta depositada sobre o padrão busca a formação de um sistema eletroquímico contendo os eletrodos e a área de detecção. Muitos parâmetros devem ser levados em conta como a escolha da tinta e seus componentes, material de aplicação e etapas necessárias ao processo. (Banks, Craig E. *et al.*, 2016)

A literatura apresenta muitas aplicações para os eletrodos impressos, desde análises ambientais (Hayat e Marty, 2014), análises clínicas (Tonello *et al.*, 2017) e análises em alimentos (Tudorache e Bala, 2007) como também apresenta variações quanto ao estilo de técnica utilizada. Soma-se a isso os diferentes materiais que podem ser utilizados como suportes para esses eletrodos e a ampla gama de possibilidades quanto as tintas e materiais condutores a serem depositados, tem-se uma grande variedade de dispositivos a serem criados e aplicados nos mais diferentes tipos de detecção.

No trabalho de Cinti e colaboradores, diferentes aplicações foram realizadas sobre eletrodos impressos em filme de poliéster utilizando tinta condutora baseada em grafite. A aplicabilidade do dispositivo foi investigada para detecção de arsênico em água de torneira e em amostras de leite, para a detecção de pesticidas organofosforados, através da imobilização da enzima butirilcolinesterase sobre a superfície do eletrodo e na detecção de aflatoxina B1, através do desenvolvimento de um biossensor para inibição de acetilcolinesterase. Uma última aplicação clínica ainda foi realizada através da detecção da glutatona, um biomarcador relacionado ao estresse oxidativo, através da reação de troca tiol-dissulfeto. O trabalho mostrou a versatilidade no uso de eletrodos impressos. (Cinti *et al.*, 2017) Na busca por um sistema de ponto-de-atendimento (POC, do inglês *point-of-care*) que auxiliasse no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer, um biossensor foi construído a fim de identificar a isoforma da proteína p53, identificada como um possível biomarcador para a doença. Para isso foram utilizados sensores impressos com prata, carbono e cloreto de prata a fim de desenhar as linhas condutoras dos eletrodos de trabalho, contra e referência, respectivamente. Conjuntamente a um circuito eletrônico integrado, voltametria de redissolução anódica foi utilizada para caracterizar e quantificar a proteína em solução. (Tonello *et al.*, 2016) Outra aplicação clínica baseia-se no desenvolvimento de imunossensores descartáveis para a detecção da troponina T cardíaca, biomarcador específico para o diagnóstico do infarto agudo do miocárdio. Eletrodos impressos foram produzidos a partir de um compósito de resina epóxi prata, grafite e um mediador redox sobre pastilhas de PET, ao qual foi imobilizado o anticorpo anti-cTnT e incorporadas microesferas de poliestireno de estreptavidina a fim de melhorar a resposta analítica. O fácil preparo e a promessa de ser incorporado a um sistema portátil a funcionalidade do sensor impresso para aplicações clínicas. (Silva *et al.*, 2010)

Tintas condutoras

As tintas condutoras utilizadas para produção de eletrodos impressos podem ser comerciais ou fabricadas em laboratório ao qual as primeiras apresentam composições de conhecimento limitado além de um custo elevado. A possibilidade de produção laboratorial de tintas específicas para cada tipo de aplicação auxilia na obtenção de dispositivos mais acurados, melhor caracterizados e, muitas vezes, com custos reduzidos, quando comparadas às tintas comercializadas. Para fins eletroquímicos a composição da tinta baseia-se na presença de um material condutor, um ligante não condutor (um polímero) e um solvente volátil, quando necessário, obtendo-se, ao final, um produto composto de pequenas partículas condutoras de carga, dispersas em um ligante inerte. (Mettters *et al.*, 2011) Outros compostos podem ser adicionados à tinta a fim de obter-se características específicas, com destaque aqui para os plastificantes, que auxiliam em uma melhor flexibilidade e estabilidade da tinta. (Fletcher, 2015)

Quanto aos materiais poliméricos disponíveis para a produção de tintas condutoras, buscam-se aqueles que apresentam composições inertes eletroquimicamente, bem como um baixo custo de obtenção. Aglutinantes termoplásticos, devido ao seu baixo grau de reticulação, são capazes de formar produtos ligeiramente flexíveis, o que pode vir a fornecer tintas mais maleáveis e melhor trabalháveis. (Eckold, 1994) Dentre os compostos poliméricos utilizados na literatura evidencia-se o uso de poliuretano que apresenta boas respostas a diferentes tipos de detecções. (Dos Santos e Cavalheiro, 2016; Dias *et al.*, 2017; Mattioli *et al.*, 2019) Neste trabalho sugerimos o uso do esmalte para unhas como um interessante candidato, tendo sua principal aplicação no setor cosmético. Sua composição baseia-se em formadores de filme como a nitrocelulose, resinas termoplásticas - com função de conferir flexibilidade ao filme - plastificantes, solventes - responsáveis pela estabilidade da formulação e tempo de secagem -, pigmentos, agentes de suspensão, agentes de brilho e agentes tixotrópicos, conferindo viscosidade e uniformidade à formulação. (López-López *et al.*, 2015) Por ação do uso de diferentes compostos tixotrópicos e plastificantes nas formulações de esmaltes acabam por formar um filme não quebradiço e levemente flexível após a evaporação completa do solvente, proporcionando uma formulação polimérica interessante para os fins aqui propostos. Os diferentes tipos de esmaltes comercializados exigem uma seleção minuciosa da composição e da presença de componentes de interferência eletroativa.

Os materiais derivados de carbono são amplamente utilizados como condutores na produção de eletrodos impressos, devido à sua ampla janela de potenciais eletroquímicos, boa

condutividade elétrica, estabilidade a longo prazo e baixa corrente residual. (McCreery, 2008) Dentre as primeiras tentativas no uso de compostos de carbono depositados sobre superfícies sólidas tem-se as pastas de carbono, produzidas a partir de grandes quantidades de material de carbono. Mesmo com uma ótima resposta condutora, as pastas de carbono são pouco adequadas para aplicações de serigrafia devido às suas características reológicas pouco favoráveis a esse processo. A partir dessa limitação, adaptações foram realizadas na viscosidade das misturas buscando facilitar as deposições a fim de torna-las mais padronizadas. (Martin *et al.*, 2003)

Uma ampla gama de materiais de carbono está disponível na literatura como modificadores de superfícies apresentando boas características condutoras. Destaca-se aqui o grafite, de grande importância em aplicações eletroquímicas devido à presença de planos de camadas paralelas de carbono empilhadas com ligações trigonal sp^2 , conferindo-lhe condutividade térmica e elétrica. (Tee e Tonge, 1963; Łukaszewicz, 2006) Além, materiais de carbono possuem a capacidade de formar complexos de transferência de carga quando em contato com grupos doadores de elétrons. (Cernat *et al.*, 2015)

Substratos flexíveis

A característica de flexibilidade em eletrodos impressos é de relativo interesse na produção de eletrodos vestíveis, devido a necessidade de dispositivos que acompanhem o movimento do paciente. Alta estabilidade térmica e baixo custo também são alguns dos requisitos buscados em materiais de suporte para essa finalidade. (Nag *et al.*, 2017b; Tricoli *et al.*, 2017; Ha *et al.*, 2018) Os materiais suporte utilizados na confecção de eletrodos impressos geralmente necessitam apresentar uma aderência adequada à tinta da serigrafia além de serem eletroquimicamente inertes. (Banks, Craig E. *et al.*, 2016) Diferentes materiais e diferentes composições de tintas podem ser encontradas na literatura para a produção de eletrodos flexíveis, com o intuito de estudar novas arquiteturas sensoriais. (Tonello *et al.*, 2016; Thangamuthu *et al.*, 2018; Tortorich *et al.*, 2018) Dentre os materiais encontrados o poli(naftalato de etileno) - PEN e poli(tereftalato de etileno) – PET apresentam alta flexibilidade apresentando uma boa abordagem como materiais de suporte para o desenvolvimento de eletrodos e sensores flexíveis. (Bandodkar e Wang, 2014; Nayak *et al.*, 2017) Neste trabalho diferentes tipos de materiais flexíveis foram investigados buscando aqueles que se adequassem a técnica de serigrafia e as aplicações como eletrodos vestíveis para o setor clínico.

Aqui, evidencia-se a utilização da luva nitrílica e o esparadrapo impermeável de uso médico por apresentarem características de interesse a construção de eletrodos flexíveis e, até

o momento, pouca ou nenhuma aplicação com finalidade clínica para a área de sensores eletroquímicos. Materiais fabricados com base nitrílica apresentam uma ótima flexibilidade e aderência à superfície da pele humana, segundo fabricantes, devido a sua característica de se moldar a partir do calor corporal, ativando os monômeros do material. Por ser um material sintético elimina problemas relacionados a alergia ao látex, tornando-se um interessante material para uso direto em humanos. (Supermax, 2018) O esparadrapo, é um produto comercial extensivamente conhecido, utilizado em ambientes hospitalares e na realização de curativos caseiros. Possui uma estrutura porosa devido à malha formada pelas fibras de tecido tornando o mesmo um material respirável. Possui boa fixação – em virtude de sua característica adesiva - alta resistência, boa flexibilidade além de ausência de componentes tóxicos, tornando-o interessante para aplicações diretas em humanos. (Czech e Kowalczyk, 2011) São encontrados em diferentes tipos de materiais, sendo os mais comuns produzidos a partir de tecido 100% algodão envolto por uma resina acrílica adesiva a base de látex.

Alguns exemplos podem ser encontrados na literatura para finalidades diversas utilizando luvas nitrílicas como suporte para sensores. Mishra e colaboradores desenvolveram um sistema sensorial flexível descartável sobre a superfície de luva nitrílica roxa como *point-of-use* para aplicações de defesa e segurança alimentar. (Mishra *et al.*, 2017) Bandodkar e colaboradores desenvolveram um *lab-on-a-finger* impresso sobre superfície nitrílica e eletrólito *ionogel* para triagem voltamétrica de resíduos de explosivos. (Bandodkar *et al.*, 2013)

1.3. Produção de eletrodos por deposição de filmes metálicos

Além da técnica comum de impressão a tinta, algumas outras técnicas são encontradas na literatura para formação de filmes finos e desenhos padronizados que podem atender as necessidades para a produção de eletrodos miniaturizados em larga escala. A seguir são apresentadas duas técnicas referentes a produção de finos filmes metálicos e formação de padrões em superfícies sólidas que, quando complementares, possibilitam a produção de eletrodos miniaturizados maleáveis, descartáveis ou não.

Deposição catódica de filmes metálicos

A técnica de pulverização catódica (do inglês *cathodic sputtering technique*) possui aplicação diversa para a formação de finos filmes metálicos utilizando-se de deposição atomística. (Depla *et al.*, 2010; Mattox, 2010) Esta técnica é caracterizada pela presença de uma

espécie ionizada (comumente o gás argônio devido a sua inércia e baixo custo) responsável pelo bombardeamento de um alvo (cátodo), formado do material ao qual deseja-se revestir o substrato. Devido a aceleração dos íons de bombardeio, há a colisão destes com o alvo, gerando uma ejeção de átomos neutros do material alvo que se depositam sobre as superfícies próximas com conseqüente formação do filme. Todo o processo funciona em ambiente submetido à vácuo, possibilitando a livre movimentação das espécies na forma de vapor, sem possíveis colisões com partículas atmosféricas. (Simon, 2012; Sarangan, 2016) A Figura 7 mostra um esquema genérico do interior de uma equipamento de *sputtering* sinalizando as principais etapas do processo.

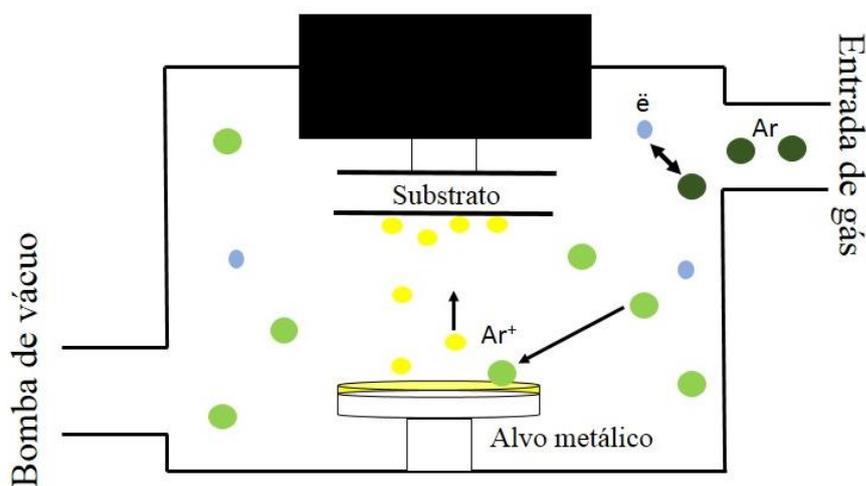


FIGURA 7 - Esquema genérico do interior de um equipamento de *sputtering* onde os átomos neutros de argônio (●) adentram o sistema e colidem com elétrons livres circulantes (●) transformando esses átomos em íons argônio carregados positivamente (●); os íons positivos, ao colidirem com a placa metálica (cátodo) ocasionam a ejeção de átomos neutros do material metálico (●) que depositam-se sobre a superfície do substrato formando um filme. A colisão entre o íon positivo na placa também libera elétrons livres (●), que alimentam o plasma do sistema. Fonte: Autoria própria.

Poucos são os trabalhos encontrados na literatura para a fabricação de eletrodos miniaturizados metálicos com finalidades sensoriais que utilizam-se da deposição catódica. Brett e colaboradores publicaram dois trabalhos devido ao desenvolvimento de um eletrodo metálico de ouro sobre a superfície de PVC utilizando deposição catódica magnética. Com parâmetros previamente otimizados, foram aplicados na obtenção de ligações covalentes enzimáticas, com foco para a glicose oxidase, obtendo-se eletrodos com características

próximas as de eletrodos de ouro convencionais. (Brett *et al.*, 1997) Alguns trabalhos também demonstra a aplicabilidade da técnica na modificação de superfícies de sensores a fim de auxiliar em uma melhor condutividade do dispositivo. (Lee *et al.*, 2007; Rho *et al.*, 2008; Baron *et al.*, 2013; Garcia-Garcia *et al.*, 2016)

Fotolitografia

A fotolitografia é descrita como uma técnica que também atende às necessidades para deposição de filmes metálicos. As primeiras utilizações da técnica datam da década de 1820, ao qual foi utilizado asfalto sírio como o primeiro fotorresiste. Após isso muitas adaptações começaram a ganhar notoriedade até chegar ao que hoje conhecemos com umas das técnicas mais utilizadas para produção de semicondutores e aparelhos eletrônicos. (Willson *et al.*, 1997) Devido a sua capacidade de produzir padrões de desenhos exatos através da exposição a luz, mostrou-se uma interessante alternativa para fabricação de dispositivos miniaturizados com necessidades de delimitação e fabricação de padrões em larga escala. A técnica baseia-se em um processo de transferência de padrões para superfícies lisas através da deposição de uma fina camada de polímero fotossensível – denominados de fotorresiste - capaz de formar uma rede polimérica sobre o material a depender das características desejadas. Fotorresistes positivos e negativos são escolhidos a partir do padrão do desenho desejado, tornando-se solúvel ou insolúvel, respectivamente, quando expostos a luz UV. Fotomáscaras são utilizadas com o padrão desejado a fim de formar o desenho após a exposição a luz. Uma das possíveis utilizações para esse tipo de técnica é a posterior deposição de material metálico, uma vez que após a formação do padrão desejado o mesmo seja capaz de receber a deposição de material particulado. (Berkowski *et al.*, 2005) Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura utilizando a fotolitografia para construção de sensores eletroquímicos. (Kannan *et al.*, 2016; Hondred *et al.*, 2017) A Figura 8 mostra as principais etapas da técnica.

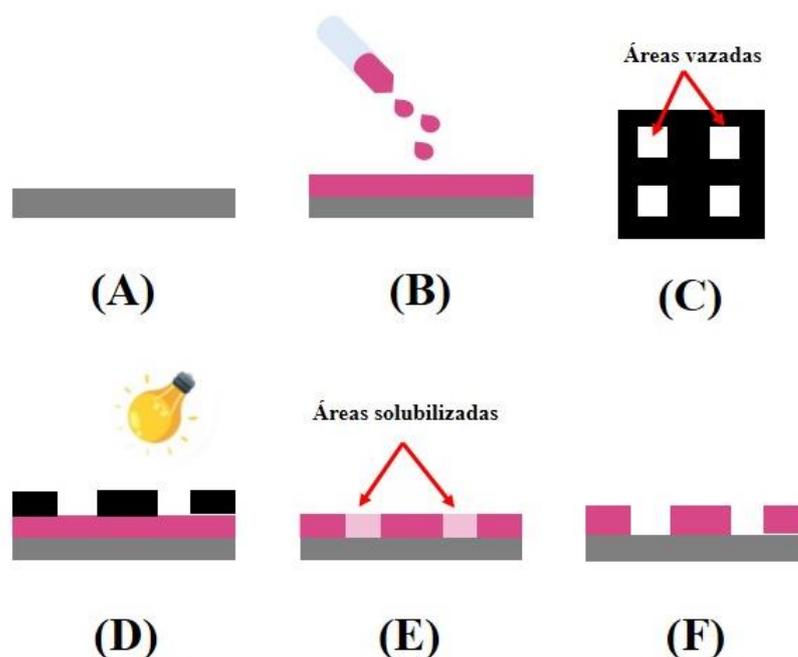


FIGURA 8 - Esquema com as principais etapas no processo de fotolitografia: (A) substrato sólido liso com posterior (B) deposição do fotorresiste, podendo ser de caráter positivo (solubilizando na presença da luz UV) ou negativo (polimerizando na presença de luz UV). (C) Uma fotomáscara contendo o padrão desejado é obtida, podendo ser de campo escuro (como mostrada na imagem) ou de campo claro. (D) Posteriormente há o alinhamento da fotomáscara sobre a superfície com posterior exposição do conjunto a luz UV por tempo pré determinado. (E) No caso do uso do fotorresiste positivo as áreas expostas ficam solubilizadas, podendo ser (F) reveladas por solução reveladora complementar que retira o polímero solubilizado formando aberturas no exato desenho do padrão desejado. Fonte: Autoria própria.

1.4. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (do inglês *Parkinson's Disease*, PD) é o segundo maior distúrbio neurodegenerativo em humanos progredindo a cada ano. Apesar dos números discordantes encontrados devido a escassos levantamentos demográficos sobre a doença, estima-se que a mesma afete atualmente um pouco mais de 1% da população acima dos 65 anos e cerca de 0,3% da população geral, tendo maior incidência entre homens do que mulheres. (Dorsey *et al.*, 2018) A doença ocasiona a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância nigra do cérebro e a presença de altas quantidades da proteína alfa-sinucleína. (Radhakrishnan e Goyal, 2018)

Essa degeneração ocasiona o comprometimento do controle motor além de sintomas não motores como desordens do sono, depressão e hiposmia, sintomas esses que aparecem apenas quando 70-80 % dos neurônios já tenham sido perdidos. A identificação precoce é ainda um desafio e constantemente são buscadas novas estratégias para uma identificação precoce da doença. Suas causas ainda são desconhecidas entretanto, muitos estudos relacionam fatores ambientais à uma predisposição genética ou susceptibilidade a doença. (Beitz, 2014; Rizek *et al.*, 2016; Poewe *et al.*, 2017; Emamzadeh e Surguchov, 2018)

O diagnóstico atual baseia-se primeiramente no histórico clínico, agregando, ao longo do tempo, exames baseados na resposta a agentes dopaminérgicos e no desenvolvimento de flutuações motoras incluindo tremores em repouso, rigidez, instabilidade postural e lentidão nos movimentos. Havendo uma progressão gradual dos sintomas e resposta positivas às terapias medicamentosas, o diagnóstico pode ser confirmado. Apesar de bem estabelecidos, muitos dos sintomas apresentados pela doença podem estar presentes em outros tipos e distúrbios neurodegenerativos, ocasionando uma dificuldade na distinção e diagnóstico preciso. (Beitz, 2014; Rizek *et al.*, 2016) Outra importante marca da doença é a identificação, por coloração, da presença dos corpos de Lewi, que identificam os neurônios afetados em todo o sistema nervoso. (Emamzadeh e Surguchov, 2018) Apesar de bem explorados, os métodos de identificação da doença ainda são tardios e pouco seletivos quanto a outros tipos de doenças neurodegenerativas. A necessidade de biomarcadores validados relacionados à patologia é de extrema importância, a fim de auxiliar no seu diagnóstico preciso e precoce.

1.4.1 Marcadores eletroativos e biomarcadores para doenças

Os marcadores e biomarcadores são parâmetros passíveis de serem medidos e avaliados, sendo utilizados como indicadores para respostas normais, patogênicas e farmacológicas do organismo. São substâncias direta ou indiretamente presentes durante a manifestação de uma série de patologias com interessante aplicação em sensores com finalidade médicas. (Selleck *et al.*, 2017) Apresentam, muitas vezes, especificidade e seletividade para determinadas doenças, os tornando elementos-chave para um diagnóstico correto e precoce. (Byrnes e Weigl, 2018) Dentre os potenciais biomarcadores de maior relevância encontram-se os anticorpos, mutações genéticas, proteínas e disfunções enzimáticas. (Ngamchuea *et al.*, 2018) A construção dos biossensores eletroquímicos dispõem desta especificidade para a construção de dispositivos direcionados, promovendo um avanço no diagnóstico clínico personalizado. (Sadana e Sadana, 2014) Alguns biomarcadores promissores para auxiliar no diagnóstico de Parkinson são

encontrados na literatura (Frasier e Kang, 2013; Adams e La Morgia, 2018) e, dentre estes destacou-se aqui as anormalidades ocorridas no gene PARK7, produtor da chamada proteína DJ-1.

Diferente dos biomarcadores, os marcadores eletroquímicos para finalidades clínicas não possuem um caráter exclusivamente biológico, podendo ser qualquer produto produzido partir de determinada ação normal ou anormal no organismo. Na área eletroquímica esses marcadores necessitam ter propriedades eletroativas, o que os tornam eficazes no auxílio e entendimento de certos processos biológicos. Alguns exemplos interessantes e bem abordados na literatura são a dopamina (Fayemi *et al.*, 2018), epinefrina (Tsele *et al.*, 2017) e o estradiol (Mauruto De Oliveira *et al.*, 2017), que apesar que não apresentarem alta seletividade e especificidade, como esperado dos biomarcadores, possuem uma faixa de potencial redox adequada de estudo. Neste trabalho foram estudados os marcadores dopamina, devido ao seu bem conhecido processo redox, a fim de caracterizar ambos sensores, e a hemoglobina, devido à sua complexidade molecular e características eletroativas.

1.4.1.1. Dopamina

A dopamina (DA) é um neurotransmissor da família das catecolaminas, de importância crucial para os humanos. É produzida nas glândulas adrenais e em diversas áreas do cérebro sendo a mais abundante das catecolaminas envolvidas na integração corpo-cérebro bem como precursora de dois neurotransmissores – adrenalina e noradrenalina. Afeta muitos aspectos do sistema cerebral, plasticidade neuronal, organização e controle das respostas de estresse, atenção, aprendizado e memória. Quantidades reduzidas de DA no sistema nervoso central são implicadas como uma das maiores causas de doenças neurológicas como a esquizofrenia e o Parkinson, sendo parte importante no processo de entrega de mensagens extrassinápticas. (Jackowska e Krysinski, 2013) Muitos estudos encontrados na literatura demonstram a importância da dopamina em diversos processos e comportamentos do organismo. (Wise, 2004; Volkow *et al.*, 2017; Mishra, A. *et al.*, 2018) Pode ser encontrada em diferentes fluidos corporais - na urina e no plasma sanguíneo, por exemplo- e essa presença muitas vezes pode ser utilizada como um possível marcador de doenças. Nesses casos o Kit ELISA é um dos imunoenaios mais utilizados para detecção, sendo utilizado como via de parâmetro para o desenvolvimento de outras técnicas. No caso da detecção para a doença de Parkinson o fluido de maior interesse é o líquido cefalorraquidiano, que apresenta dificuldades de coleta e amostragem, devido ao seu caráter invasivo. (Suominen *et al.*, 2013; Phung *et al.*, 2018)

Dentre as patologias associadas à desregulação nos níveis de DA no organismo, destaca-se a doença de Parkinson, ao qual há uma perda de neurônios produtores da substância na região nigra do cérebro e sua consequente redução. (Lotharius e Brundin, 2002) A alteração nos níveis de DA afeta o controle dos movimentos, gerando tremores em repouso, lentidão dos movimentos espontâneos, perda de reflexos posturais, mau equilíbrio e alterações na coordenação motora, reduzindo a qualidade de vida do paciente e podendo levar a morte. (Rizek *et al.*, 2016)

A DA é formada pela descarboxilação da molécula de DOPA, caracterizada pela presença de um anel aromático e um grupo amina primário. De caráter eletroativo, é passível de ser oxidada sob materiais eletródicos obtendo-se uma sensibilidade considerável. (Jackowska e Krysinski, 2013) A detecção da dopamina por via eletroquímica é caracterizada pelo envolvimento de 2 prótons e 2 elétrons em sua reação inicial, para formação da dopamina-o-quinona (Figura 9). Substâncias intermediárias podem ser formadas em reações posteriores, responsáveis estas pelo caráter cumulativo sobre a superfície dos eletrodos. (Bahram *et al.*, 2009)

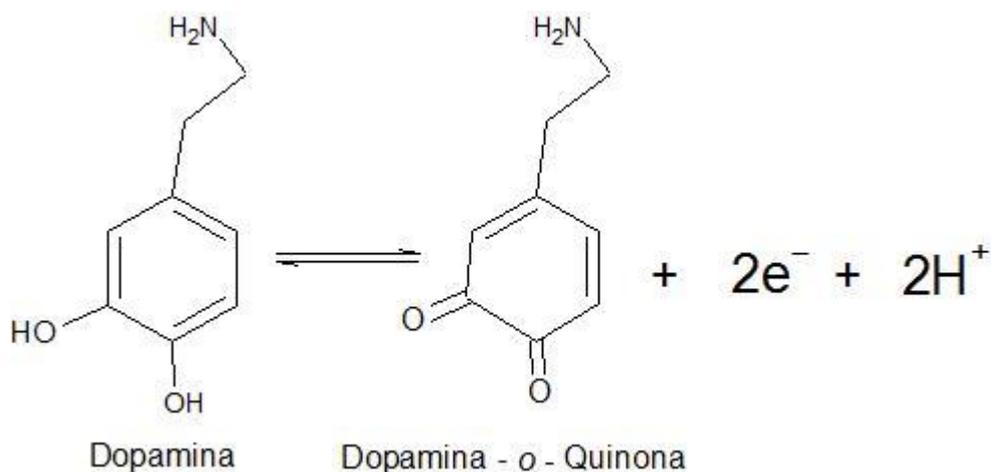


FIGURA 9 - Esquema da reação de oxidação da dopamina.

Devido à sua característica eletroativa e seu processo redox bem conhecido, a dopamina é constantemente encontrada em trabalhos eletroquímicos para o desenvolvimento de sensores e biossensores, seja para sua detecção direta, seja para caracterização de novas arquiteturas sensoriais. (Chen e Peng, 2003; Bucher e Wightman, 2015) Xu e colaboradores desenvolveram um dispositivo eletroquímico descartável para detecção de dopamina utilizando grafeno e

polímero condutor PEDOT. (Xu *et al.*, 2018) No trabalho de Ku e colaboradores o sensor foi desenvolvido sobre eletrodo de carbono impresso modificado com *Nafion*. (Ku *et al.*, 2013) Ambos os trabalhos destacam o aumento no interesse por sensores impressos e descartáveis como alternativa para detecções clínicas.

1.4.1.2.Hemoglobina

A hemoglobina (HB) é uma proteína formada por uma estrutura tetramérica composta por duas cadeias alfa com 141 aminoácidos cada e duas cadeias beta com 146 aminoácidos cada, possuindo elevada importância para o entendimento do funcionamento do grupo de proteínas alostéricas. (Yuan *et al.*, 2015) Está presente dentro de células especializadas, nomeadas de eritrócitos. Os quatro polipeptídios do tetrâmero possuem, cada qual, um grande espaço central no qual está presente um grupo prostético heme, uma molécula de ferro-protoporfirina IX, ligado através de forças não-covalentes. Os átomos de ferro neste ambiente estão principalmente no estado de valência química ferroso (Fe II), coordenados a átomos de hidrogênio. (Schechter, 2008)

Dentre as funções que a HB pode desempenhar no organismo humano, o transporte de gases é a de maior destaque, possibilitando a chegada do oxigênio dos pulmões para os tecidos de todo o corpo e realizando interações com outros tipos de gases. A HB também participa dos processos de manutenção da temperatura corpórea interna, além de ter relações com o envelhecimento e adaptações genéticas. (Giardina *et al.*, 1995)

Algumas doenças estão diretamente relacionadas a níveis anormais ou problemas estruturais da HB, conferindo-lhe uma importância como biomarcador clínico. O grupo das anemias lidera com destaque para a anemia falciforme, proveniente de uma mutação de troca de bases, conferindo a molécula de HB uma estrutura deformada similar a uma foice. Outras doenças relacionadas são as chamadas síndromes de talassemia e a anemia hemolítica, sendo as primeiras diretamente relacionadas à produção de quantidades anômalas da proteína. (Giardina *et al.*, 1995; Marengo-Rowe, 2006; Thomas e Lumb, 2012; Gell, 2018)

Outras relações patológicas para HB são discutidas na revisão de Freed e Chakrabarti, onde evidências correlacionam alterações nos níveis de HB neural a processos neurodegenerativos - como o caso da doença de Parkinson - além de redução da atividade mitocondrial e aumento do estresse oxidativo no cérebro. (Freed e Chakrabarti, 2016) A partir da descoberta da expressão de HB em neurônios e sua participação em processos mitocondriais, um novo caminho foi

aberto para o estudo de patologias ligadas ao cérebro e se essas poderiam ter relação com distúrbios nesta proteína. (Richter *et al.*, 2009) Muitos estudos apresentam resultados, ainda pouco elucidativos, quando a níveis alterados de HB como um possível indicativo para doença de Parkinson, porém em sua maioria, concordam com a afirmativa de que HB é expressa dentro dos neurônios dopaminérgicos (relacionados à doença de Parkinson), desempenhando um papel na manutenção da homeostase do Fe e da mitocôndria. (Savica *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2011; Abbott *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2017) Essas evidências, mesmo ainda pouco elucidativas quanto a relação de HB com a doença de Parkinson, mostram a importância de novas vias de detecção para moléculas complexas. Busca-se auxiliar não apenas no diagnóstico de patologias neurodegenerativas mas também no que se refere a entender o seu mecanismo dentro da região cerebral e seu papel nos diferentes processos do organismo.

Apesar de sua grande importância histórica como molécula biológica a HB possui um interesse menos abrangente na detecção eletroquímica. Em razão de ser uma molécula complexa ao qual o átomo eletroativo de interesse está protegido pela camada molecular e de apresentar características adsorptivas sobre superfícies, ela mostra dificuldades em processos de detecção. A literatura apresenta alguns trabalhos para detecção quantitativa de HB. Toh e colaboradores mostraram a possibilidade da detecção eletroquímica direta de hemoglobina tanto em amostras de sangue como em células vermelhas utilizando eletrodo de carbono vítreo e Nafion. Picos característicos da molécula foram detectados sem a necessidade de pré-tratamentos. (Toh *et al.*, 2014) Outros trabalhos mostram detecções de HB realizando pré-tratamentos de amostra, a fim de tornar o grupo heme mais disponível facilitando assim a transferência de elétrons entre o grupo e o eletrodo. (Li *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2017)

1.4.1.3. Proteína PARK 7/DJ-1

A DJ-1 é uma proteína com funções versáteis, estando expressa normalmente no cérebro e tecidos periféricos e desempenhando um papel de importância na proteção contra o estresse oxidativo. Produzida pelo gene denominado PARK7 foi identificado primeiramente como um oncogene, sendo sua superexpressão relacionada a muitos tipos de cânceres. Além, diversas mutações ocorridas nesse gene foram encontradas em pacientes diagnosticados com doenças de Parkinson. (Ariga e Iguchi-Ariga, 2017)

A presença de elevados níveis de DJ-1 celular estão correlacionados com uma alta tolerância ao estresse oxidativo (Ishiwatari *et al.*, 2015) e, devido à isso, seu excesso, escassez

e/ou inativação podem estar relacionados ao desenvolvimento de algumas doenças, como o caso da diabetes do tipo 2, infertilidade masculina e doenças neurodegenerativas bem como alguns tipos de cânceres, como o endometrial. (Ariga e Iguchi-Ariga, 2017). A relação desta proteína com o Parkinson associa-se ao fato do estresse oxidativo ter um papel de relevância na patogênese da doença, tornando a DJ-1 uma importante via de estudo como também um promissor biomarcador. (Waragai *et al.*, 2006) Estudos que relacionam alterações nos níveis séricos e cerebrais dessa proteína à doença são abordados em muitas revisões, todavia pouco ainda foi elucidado quanto as verdadeiras relações entre molécula/doença. (Waragai *et al.*, 2010; Jiménez-Jiménez *et al.*, 2014) Alguns estudos notáveis mostram que em situações de estresse celular, a DJ-1 pode se tornar um importante sinalizador, devido a sua modificação para a oxDJ-1, referente a oxidação da Cys-106 presente em sua sequência. O aumento nos níveis séricos e em amostras de líquido cefalorraquidiano em pacientes de PD foram relatados, a transformando em um potencial biomarcador para a doença. (Ogawa *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2016) (Lin *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2018)

Muito estudos buscam determinar com eficácia os níveis de DJ-1 e suas alterações no corpo humano porém, ainda hoje, controvérsias nesses valores são encontradas devido às variações de sensibilidade existentes para as diferentes técnicas utilizadas. Dois estudos de relevância são aqui destacados. No estudo de Waragai e colaboradores, os valores encontrados para *imunoblot* utilizando ANOVA como técnica estatística consideraram valores de 0,158 +/- 0,055 ng/ug, para pacientes com a doença e 0,117 +/- 0,027 ng/ug para pacientes sem a doença. (Waragai *et al.*, 2006) No estudo de Hong e colaboradores a técnica de Western Blot foi somada a filtração em gel e espectroscopia de massa para a determinação de DJ-1 e alfa-sinucleína em pacientes com Parkinson, Alzheimer e indivíduos saudáveis. Os valores comparativos nesse estudo mostraram-se dependentes da idade e de influências externas variando entre 30 e 90 ng/mL, considerando *Western Blot* e kit Luminex. (Hong *et al.*, 2010) O estudo de Hong concluiu que variação nas espécie das proteínas e anticorpos, controle inadequado de variáveis e a limitação na população de estudo como fatores consideráveis na obtenção de uma boa imuno quantificação.

OBJETIVOS GERAIS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e caracterização de novas arquiteturas de sensores e imunossensor eletroquímicos flexíveis tendo em vista a detecção de analitos relacionados à doença de Parkinson.

2.2. Objetivos específicos

- A. Desenvolvimento de novas arquiteturas de eletrodos flexíveis descartáveis sobre a superfície de luva nitrílica e esparadrapo utilizando uma nova composição de tinta condutora de produção laboratorial contendo esmalte para unhas, grafite e glicerol;
- B. Aplicação dos sensores em luva e esparadrapo para detecção de dopamina e hemoglobina;
- C. Produção de eletrodos de platina sobre a superfície de folha de BioPET utilizando as técnicas de pulverização catódica e fotolitografia;
- D. Aplicação dos eletrodos de platina para a detecção de dopamina;
- E. Produção de imunossensores sobre a superfície dos eletrodos de platina para detecção da proteína PARK7/DJ-1.

EXPERIMENTAL

3.1.Reagentes e soluções

Sensores flexíveis em luva e esparadrapo

Para a fabricação da tinta condutora foram avaliados 2 tipos diferentes de composições poliméricas: verniz automotivo (do inglês, *polyurethane automotive varnish*, PAV) (Verniz 2K Alto Brilho – Lazzudur, Sherwin-Willians®) e esmalte para unhas (do inglês *nail polish*, NP) (Base Brilho Cuidados, Cora®). Como material condutor foi utilizado grafite em pó (GP) (Fischer Chemical). Para conferir flexibilidade e estabilidade, foram utilizados gelatina incolor em pó (Dr. Oetker) e glicerol (Dinâmica). As soluções de gelatina foram preparadas em base de água para diferentes concentrações. A dopamina (DP), hemoglobina (HB) e demais reagentes utilizados foram obtidos pela Sigma-Aldrich e/ou Fluka, PA.

As proporções de grafite foram calculadas segundo a teoria de percolação. Segundo consultado em (Fletcher, 2015), aconselha-se um mínimo de 64 % de grafite junto a massa de polímero, a fim de apresentar uma incorporação bem-sucedida destas partículas dentro do compósito. As percentagens apresentadas nesse trabalho, dos componentes utilizados na composição da tinta, foram calculadas através da relação com a massa final. Como mostra do na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores em porcentagem da quantidade de grafite utilizada na composição das tintas considerando o peso da base polimérica e o peso final da tinta.

Grafite (%) (Peso do grafite (g) / Peso do esmalte(g))	Grafite (%) (Peso do grafite (g) / Peso final da tinta (g))
65	35
70	37
75	40
80	43
85	46
90	48

Para a detecção de DP, as medidas foram realizadas utilizando solução de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,5, previamente otimizado para ambos substratos). A caracterização

do eletrodo foi também realizada utilizando uma solução KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e uma mistura equimolar de [Fe(CN)₆]³⁻ e [Fe(CN)₆]⁴⁻ 1,0 × 10⁻² mol L⁻¹ como sonda eletroquímica.

Para a detecção de HB, as medidas foram realizadas utilizando solução de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 7,0). A solução foi homogeneizada por agitação mecânica até completa dissolução.

Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água purificada pelo sistema Megapurity, resistividade ≥ 18,0 MΩ cm

Imunossensor

Para a fabricação dos eletrodos de platina pela técnica de fotolitografia, foi utilizado HMDS como reagente de aderência e reagente de fotorresiste positivo AZ4620 com solução reveladora complementar.

Para a caracterização do eletrodo de platina e caracterizações durante o processo de montagem do imunossensor foi utilizada uma solução KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e uma mistura equimolar de [Fe(CN)₆]³⁻ e [Fe(CN)₆]⁴⁻ 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ como sonda eletroquímica. O eletrodo também foi estudado na presença de dopamina 1,0 × 10⁻³ mol L⁻¹ (em tampão fosfato, 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0) aplicando estudo de velocidade, construção de uma curva analítica e aplicações em amostras de urina sintética.

Para a montagem da monocamada auto-organizada foram utilizados os reagentes Cisteamina (95 %) e solução de glutaraldeído (25 % em água) ambos obtidos pela Sigma-Aldrich. Foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) como bloqueador de sítios inespecíficos da Fischer. O anticorpo anti-PARK7/DJ-1 policlonal, foi obtido pela Sigma-Aldrich. A proteína recombinante humana PARK7/DJ-1 foi obtida pela Abnova. Ambos materiais biológicos foram diluídos em tampão Tris-HCl (10 x) (Sigma-Aldrich) e armazenados a temperatura de -4 °C.

3.2. Preparo das amostras

As amostras de urina sintética utilizadas durante a aplicação dos eletrodos impressos e de platina foram preparadas utilizando metodologia adaptada de Laube e colaboradores (Laube *et al.*, 2001). As amostras foram preparadas pela fortificação da amostra com concentrações pré-estabelecidas de dopamina. Foi utilizada a metodologia de adição e recuperação a fim de avaliar a eficácia dos sensores nesse tipo de amostra.

3.3. Equipamentos, materiais e metodologias utilizadas

3.3.1. Design dos eletrodos e materiais de suporte

Para a fabricação dos sensores descartáveis foram avaliados três tipos de substratos: luva nitrílica (Descarpack – Luvas nitrílicas azuis), luva de vinil (Danny, sem pó de amido) e esparadrapo de uso médico (Missner, Impermeável Extra Flexível). Os substratos foram utilizados sem nenhum tipo de pré-tratamento.

Para a fabricação das máscaras vazadas foram elaborados diferentes *designs* de eletrodos para ambos substratos. (Figura 10) O *design* elaborado para o eletrodo em luva teve como base uma possível aplicação vestível como mostrado na Figura 10B. A região aberta foi pensada buscando uma aplicação para análises *in situ* em sangue, ao qual um furo no dedo seria realizado nessa região a fim de preencher a área de trabalho com a amostra para posterior detecção. Além, o recorte possibilita um região livre da tinta, diminuindo a possibilidade de que a mesma seja danificada e interfira durante as análises. O recorte das máscaras foi realizado em impressora de corte Silhouette (modelo Cameo3) gerenciada pelo *software* Studio™. As tintas condutoras foram preparadas e homogeneizadas com auxílio de um centrifugador assimétrico duplo (SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K, FlackTec Inc) com parâmetros previamente estudados.

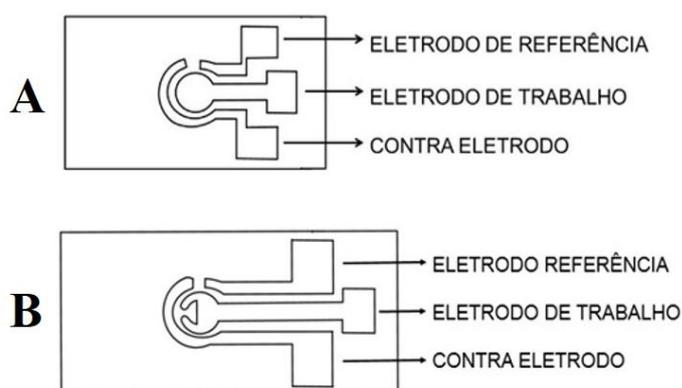


FIGURA 10 - *Design* das máscaras utilizadas para obter o padrão dos eletrodos sobre esparadrapo (A) e luva (B).

Para a fabricação dos eletrodos de platina foram utilizadas folhas de BioPET flexível (BioPET A4, 21 x 29 cm, 125 mm de espessura, ImportNow). O *design* do eletrodo foi desenvolvido pelo Prof. Dr. Nirton Cristi, co-orientador desse trabalho, e a máscara de campo escuro foi impressa pela empresa especializada em fotopltagem DGM Design.

3.3.2. Sistema de contato elétrico

O sistema de contato elétrico entre o dispositivo descartável e o potenciostato foi produzido a partir de *plugs* do tipo jacaré. Já o contato elétrico entre o eletrodo de platina e o potenciostato foi realizado através de um sistema contendo três conectores banana em um acoplador com regiões de contato elétrico independentes para cada eletrodo. O modelo do conector foi retirado de (Orzari *et al.*, 2018). Os dois sistemas são mostrados na Figura 11.

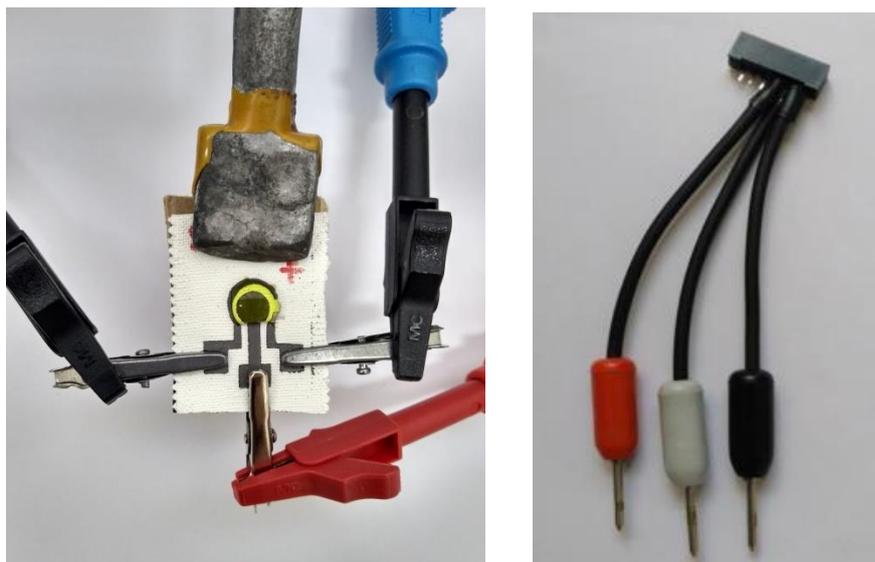


FIGURA 11 – (A) Foto ilustrativa do sistema de contato entre os eletrodos descartáveis com o potenciostato utilizando *plugs* do tipo jacaré conectados individualmente aos eletrodos de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo pseudorreferência. Na imagem um eletrodo sobre suporte de esparadrapo ao qual foi depositada uma gota de 90 μL de solução equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. (B) Sistema de contato para o eletrodo de platina utilizando *plugs* do tipo banana acoplados a regiões de contato elétrico independentes. Esse sistema foi baseado no trabalho de (Orzari *et al.*, 2018), que também é fonte da imagem.

3.3.3. Preparo das tintas condutoras e montagem dos eletrodos serigrafados

O preparo da tinta condutora foi realizado a partir da mistura de diferentes proporções de polímeros e materiais condutores. A homogeneização da tinta foi realizada com auxílio do SpeedMixerTM.

O preparo das máscaras vazadas foi realizado sobre a superfície de folhas de papel adesivo (Colacril, Office CC185). As folhas adesivas foram recortadas com auxílio de uma impressora

de corte, a parte interna das máscaras foi retirada e, individualmente, foram coladas sobre a superfície dos dedos de luva nitrílica e do esparadrapo. Os dedos de luvas nitrílicas foram previamente esticados, a fim de conferir uma superfície lisa e homogênea para deposição da tinta bem como obter dispositivos com uma espessura reprodutível. O esparadrapo foi acondicionado sobre uma superfície lisa a fim de auxiliar durante o processo de serigrafia. Não foram realizados pré-tratamentos em nenhum dos materiais suporte.

O processo de serigrafia ocorreu pela deposição de uma quantidade suficiente de tinta sobre a superfície da máscara, para ambos materiais suporte, seguido de espalhamento da mesma sobre o desenho com o auxílio de uma espátula plana de alumínio. As máscaras foram posteriormente retiradas, antes da secagem da tinta. A secagem da tinta sobre a superfície do material foi realizada durante 6 dias, a temperatura ambiente (25 °C). Ainda com a superfície esticada e utilizando um pincel nº 1, os eletrodos pseudorreferência foram pintados com uma única camada de tinta de prata (Electron Microscopy Sciences). Após 24 horas de secagem completa os dispositivos estavam prontos para as caracterizações morfológicas e eletroquímicas, sendo denominados de LUV e ESP respectivamente para os eletrodos obtidos sobre luva nitrílica e esparadrapo. A Figura 12 ilustra o processo de obtenção da tinta e dos eletrodos serigrafados.

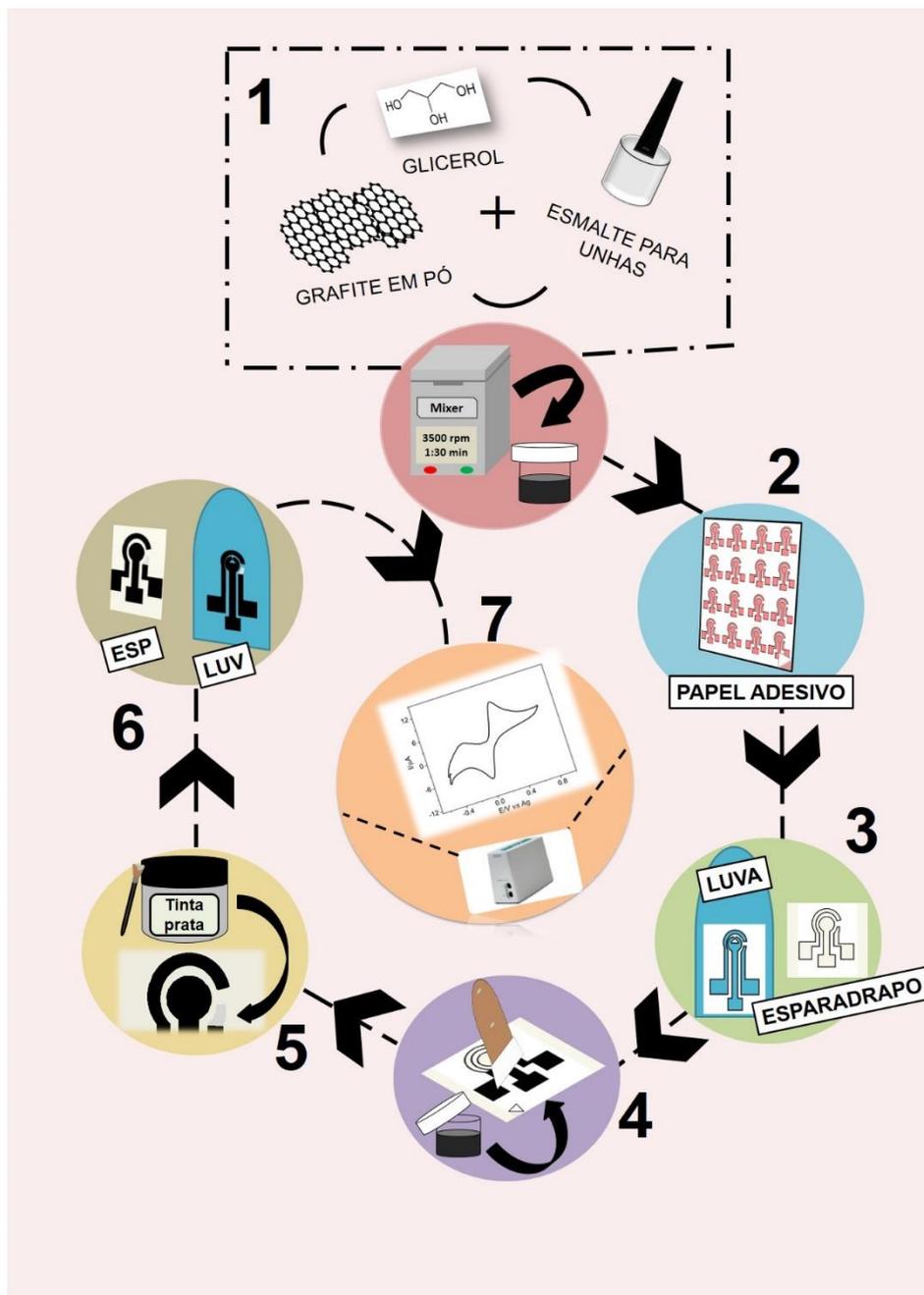


FIGURA 12 - Ilustração das etapas do processo de obtenção dos eletrodos impressos em luva nitrílica e esparadrapo: (1) Produção da tinta condutora em SpeedMixer; (2) Obtenção das máscaras em papel adesivo; (3) Preparo dos suportes para o processo de serigrafia; (4) Processo de serigrafia utilizando tinta condutora e espátula de alumínio; (5) Pintura do eletrodo pseudorreferência com tinta de prata; (6) Obtenção dos eletrodos LUV e ESP, após secagem da tinta; (7) Caracterizações eletroquímicas em potenciostato.

3.3.4. Avaliação da resistência a tensão mecânica

A fim de avaliar a capacidade dos eletrodos e das diferentes formulações de tinta quanto à tensão mecânica exercida durante a movimentação, testes manuais de estiramento e dobra foram realizados para todos os substratos. A Figura 13A mostra o processo de estiramento para as luvas, ao qual foi realizado em 4 direções diferentes. A Figura 13B mostra o processo de dobra do esparadrapo.

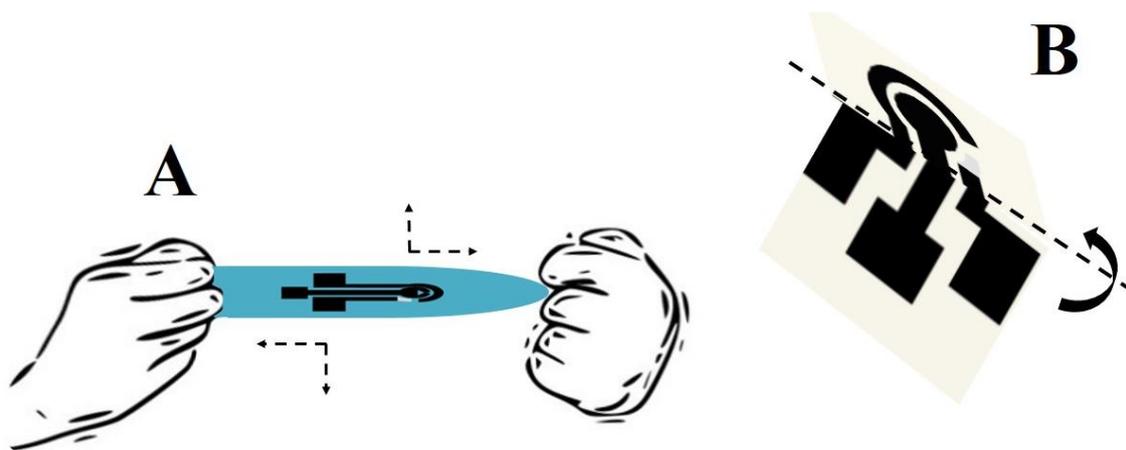


Figura 13. (A) Ilustração do processo de estiramento das luvas realizado a fim de avaliar o comportamento dos substratos e da tinta após sofrer tensão mecânica. Foi fixado um estiramento 60 % maior do comprimento normal do eletrodo a fim de padronizar os resultados; (B) Processo de dobra dos eletrodos em esparadrapo.

3.3.5. Produção dos eletrodos de platina

A técnica de fotolitografia utilizou uma fotoalinhadora Karl Suss MJB3, com tempo de exposição de 30 segundos e *spin coater* de bancada para espalhamento do fotorresiste. Foi realizado tratamento sobre as superfícies reveladas utilizando equipamento de plasma de oxigênio (Barrel Asher Plasma Technology SE80). A técnica de pulverização catódica foi realizada em equipamento Sputtering DC/RF: Balzers (BA510) plasm beam DC sputtering system. Para medição da espessura da superfície metálica depositada sobre os eletrodos foi utilizado perfilômetro (Dektak -150). Todo o processo de produção dos eletrodos de platina foi realizado dentro das instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPem), Campinas,SP.

Inicialmente, as folhas de BioPET flexível foram recortadas em quadrados de 5cm x 5cm e higienizadas utilizando acetona e isopropanol P.A. para retirada das impurezas. A secagem da

superfície foi realizada através de jato direto de nitrogênio, sendo posteriormente armazenadas sobre a superfície de placas de aquecimento a 30 °C.

Sobre a superfície das placas de BioPET foi depositada uma quantidade suficiente de HMDS e, com auxílio de um *spin coater* de bancada foi realizado o espalhamento por toda a superfície do material, por 10 segundos a 3500 rpm. Após, as placas com HMDS receberam cura em placa de aquecimento a temperatura de 90 °C por 10 minutos com posterior resfriamento da superfície.

Após resfriadas, uma quantidade suficiente de fotorresiste positivo foi depositada sobre a superfície da placa de PET. A placa foi submetida a rotação em *spin coater* durante 30 segundos a 5000 rpm, para espalhamento do fotorresiste. Preenchidas, as placas passaram por etapa de cura, em placas de aquecimento durante 10 minutos a 90 °C com posterior resfriamento.

Utilizando uma máscara de campo escuro, as placas de BioPET foram submetidas a exposição a luz UV por uma fotoalinhadora pelo período de 25 segundos a fim de obter o padrão desejado do eletrodo.

Após expostas, as placas foram reveladas utilizando solução reveladora complementar ao fotorresiste, na proporção 1:3 (solução/água ultrapura). As placas de PET foram submersas na solução por um período aproximado de 20 segundos e/ou até a visualização do padrão. As placas foram submetidas a secagem em placa aquecedora a 60° C por 10 minutos. Após secas as placas foram inspecionadas a fim de verificar eficácia na revelação.

Após o processo de fotolitografia, as placas reveladas foram submetidas a banho de plasma de O₂ a 100 mW/100 mThor por 2 minutos, a fim de limpar a superfície de sujidades.

Posteriormente as placas de BioPET reveladas e limpas foram submetidas ao processo de pulverização catódica, buscando a deposição de um fino filme de platina sobre as superfícies foto-moldadas. A espessura de 5 μm da deposição foi obtida por 250 x de cromo e 1500 x de platina depositados. A deposição ocorreu em uma máquina de *sputtering* acoplada a uma câmara de vácuo trabalhando a $2,0 \times 10^2$ mbar.

Obtido o filme de platina, as placas de PET, foram submetidas ao processo de *lift off*, responsável pela retirada de excesso de material de revestimento obtendo-se uma forma final padronizada. As placas foram submetidas a um banho de acetona pura com auxílio de algodão até retirada total do excesso. As placas foram mergulhadas em água deionizada para enxague, mergulhadas em isopropanol puro, secos através de jatos de nitrogênio e chapa aquecedora.

Finalizado, os eletrodos foram cortados individualmente e utilizados para caracterizações morfológicas e eletroquímicas. A Figura 14 ilustra o processo de obtenção dos eletrodos de platina e a Figura 15 mostra o eletrodo finalizado.

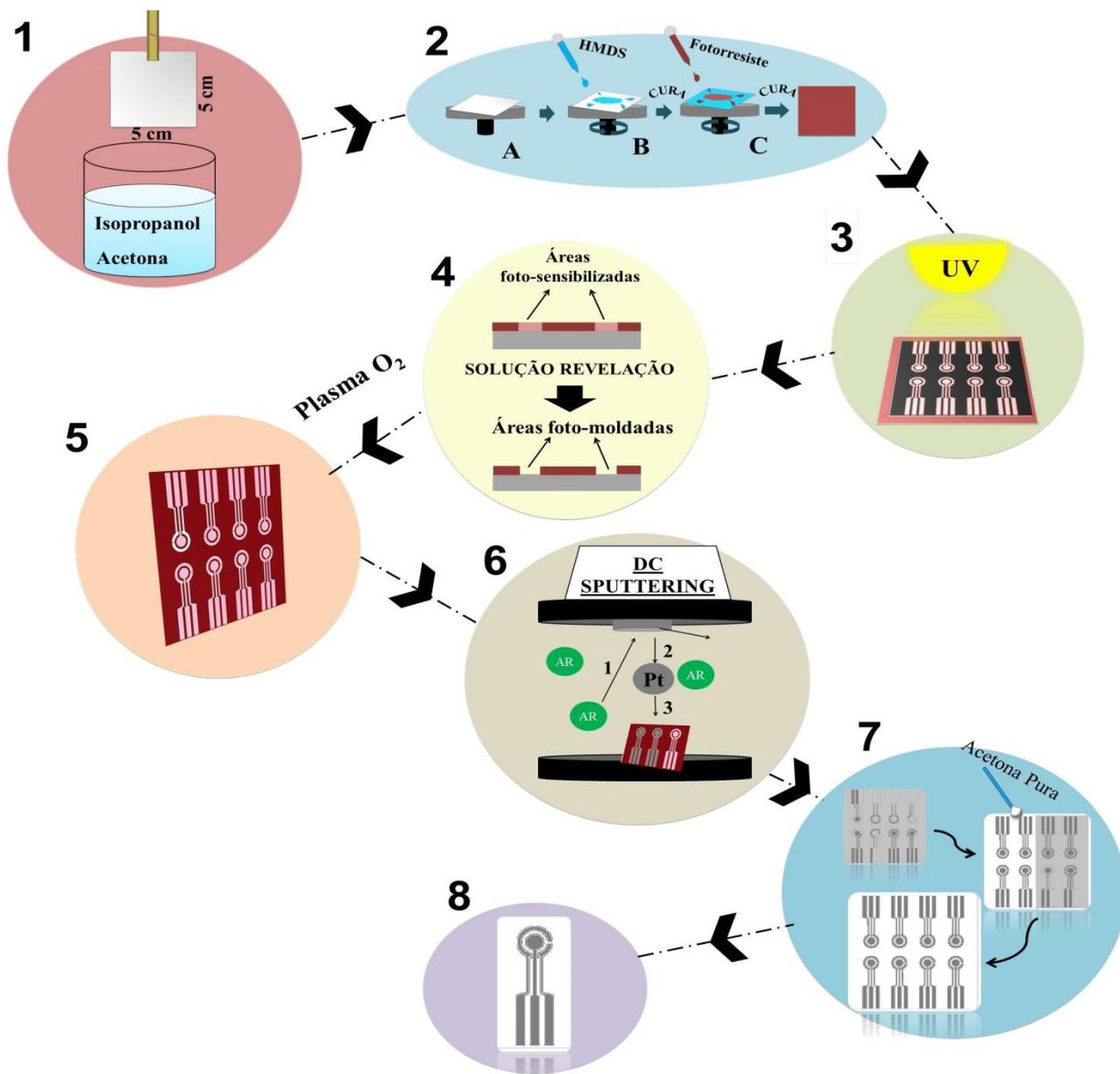


FIGURA 14 - Processo de obtenção dos eletrodos de platina onde: (1) Limpeza do BioPET com solução de isopropanol e acetona; (2A) Utilização de *spin coater* de bancada para (2B) Espalhamento do HMDS sobre o substrato e; (2C) Espalhamento do fotoresiste sobre o substrato;(3) Exposição do substrato + máscara de campo escuro à luz UV para sensibilização

do fotorresiste; (4) Etapa de revelação para formação do padrão do eletrodo; (5) Obtenção do substrato com as áreas foto-moldadas; (6) Metalização do substrato foto-moldado, com platina, por pulverização catódica; (7) Etapa de *Lift-off* para limpeza do excesso de material metalizado; (8) Obtenção dos eletrodos de platina.



FIGURA 15 - Eletrodo de platina flexível produzido sobre folhas de BioPET.

3.3.6. Caracterizações Morfológicas

As caracterizações morfológicas dos eletrodos impressos - microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raio X (EDS) - foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) localizado da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em espectroscópio dispersivo de energia Thermo 200, com resolução 131 eV, acoplado ao microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEJA-3 LMU. O EDS utilizou sistema de análise química tipo EDS (Oxford) com *software* AZ Tech (Advanced) e detector tipo SDD de 80 mm². Os espectros de EDS foram obtidos para regiões com tinta condutora e apenas para o substrato. As amostras não foram submetidas a nenhum tipo de processo prévio ou metalização.

As caracterizações morfológicas do eletrodo de platina foram realizadas dentro das instalações do Laboratório de Caracterização Estrutural – DEMa – UFSCar utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura Philips XL-30 FEG com resolução em 30 KV de 3,5 nm acoplado a um sistema de EDS Bruker. Foram obtidas imagens da estrutura do filme de platina

bem como da sua composição química, baseando em mapeamento de composição e microanálise química através de EDS.

3.3.7. Caracterizações eletroquímicas dos eletrodos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT204 (Metrohm), gerenciado pelo *software* NOVA 2.1.4 e as medidas de impedância foram avaliadas a partir de módulo de impedância FRA32M adquirido pela Metrohm. Foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria linear, voltametria de onda quadrada e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Para caracterizar todos os dispositivos deste trabalho foi utilizada uma solução equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A mesma solução foi utilizada como sonda eletroquímica durante a construção do imunossensor, ao qual foi avaliada a resistência a transferência de carga da sonda com o eletrodos através da técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica. As medidas eletroquímicas utilizando os eletrodos descartáveis foram realizadas a partir da deposição de uma gota de 80 e 90 μL para LUV e ESP, respectivamente, de uma solução contendo o eletrólito suporte e a substância eletroativa. Já para os eletrodos de platina foi utilizada uma gota de 35 μL .

A detecção de hemoglobina foi realizada em meio aeróbico e a solução não foi submetida a nenhum tipo de pré tratamento.

Para a escolha da melhor técnica de detecção – dentre LSV, SWV e DPV – para dopamina no eletrodo de platina, dopamina em ESP e LUV e hemoglobina em ESP, não foram realizadas otimizações dos parâmetros intrínsecos da técnica, sendo considerados os valores fixos disponíveis no *software* NOVA 2.1.4 padrões para a decisão final.

Excluindo os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade aqui contidos, todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Para a construção do imunossensor, as modificações na superfície do eletrodo para formação da monocamada auto-organizada e das etapas posteriores de imobilização e formação do imunocomplexo foram avaliadas mediante a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) através do uso de uma solução equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como sonda eletroquímica. Foi considerado o valor de resistência a

transferência de carga (R_{ct}) como via de comparação entre os diferentes estudos, sendo que esse valor foi obtido de forma manual através do *software* NOVA 2.1.4, utilizando a ferramenta *Electrochemical circle fit e Fit and Simulation*.

CAPÍTULO 1

SENSORES FLEXÍVEIS DESCARTÁVEIS FABRICADOS SOBRE A SUPERFÍCIE DE LUVA NITRÍLICA E ESPARADRAPO UTILIZANDO TINTA CONDUTORA A BASE DE ESMALTE PARA UNHAS E GLICEROL APLICADOS NA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE DOPAMINA E HEMOGLOBINA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento da tinta condutora

Para o desenvolvimento da tinta condutora diferentes formulações foram avaliadas modificando-se o tipo de polímero e o tipo de material plastificante empregados. Os polímeros foram escolhidos devido à sua capacidade de formação de filme e os plastificantes foram devido à sua capacidade de melhorar características de flexibilidade bem como garantir uma adequada formação de filme – quanto a homogeneidade e estabilidade sobre a superfície flexível - diminuindo eventualidades relacionadas a quebra da tinta. O verniz automotivo (PAV) é composto por resina acrílica poliuretana, solventes aromáticos, ésteres e aditivos e a composição do esmalte para unha (NP) pode ser encontrada em anexo. (Anexo 1)

O uso do glicerol nesse trabalho provém de suas características plastificantes para as mais diversas finalidades, baixa toxicidade e baixo custo além de boa fluidez e compatibilidade com diferentes polímeros. Sua combinação única de propriedades físicas e químicas lhe confere diferentes usos comerciais incluindo aplicações como auxiliares na indústria cosmética, higiene pessoal, cuidados pessoais, formulações farmacêuticas e alimentícias. Destaca-se o uso na fabricação de resinas alquídicas, tintas, vernizes e laca com objetivo de conferir flexibilidade, elasticidade e tenacidade uma vez que são produtos ao qual a fragilidade é indesejada. (Division, 1990; Pagliaro e Rossi, 2008) Já o uso da gelatina resultou de seu uso como aditivo e promotor de flexibilidade, ao qual busca-se, através de sua característica de gelatinização e capacidade de formar estruturas estáveis e maleáveis, modificações benéficas na viscosidade e estabilidade da tinta. Dentre suas características de destaque está sua capacidade de formar géis rígidos além da presença de grupos funcionais ácidos e básicos o que possibilita uma diversidade de interações com outros compostos. Destaca-se sua aplicação em embalagens de alimentos, ao qual a gelatina auxilia em uma melhor adesão, coesão e capacidade de formar

películas flexíveis e moldáveis (Ramos *et al.*, 2016) como também na composição de tintas para impressão 3D, conferindo fluidez durante o processo. (Shin e Kang, 2018)

Os testes iniciais das 6 formulações de tintas, dispostas na Tabela 2, foram realizados utilizando 35 % de grafite, proporção padrão utilizada pelo grupo. A quantidade de gelatina e glicerol foi fixada em 1,1 % (massa de plastificante/massa total). As tintas foram preparadas no SpeedMixer, fixando um tempo de 180 segundos a 3500 rpm.

TABELA 2 - Formulações de tintas condutoras avaliadas

Formulação	Polímero	Material Condutor	Plastificante
1	Esmalte para unha	Grafite em pó	Glicerol
2	Esmalte para unha	Grafite em pó	Gelatina
3	Esmalte para unha	Grafite em pó	Ausência
4	Verniz automotivo	Grafite em pó	Ausência
5	Verniz automotivo	Grafite em pó	Glicerol
6	Verniz automotivo	Grafite em pó	Gelatina

A avaliação inicial das tintas foi realizada de forma visual, considerando o comportamento da viscosidade e homogeneidade da tinta. A viscosidade foi avaliada em comparativo a de tintas comerciais, buscando maior facilidade durante o processo de serigrafia. A homogeneidade pretendida baseou-se numa mistura uniforme, sem a presença de particulados ou distinção de fases. Tanto as tintas produzidas com PAV como NP, apresentaram a viscosidade e homogeneidade inicialmente desejadas, todavia uma maior viscosidade e, como consequência, um melhor comportamento durante o processo de arraste foram notados para as formulações a base de NP, a qual foi escolhida para estudos posteriores.

4.2. Avaliação das tintas sobre o material de suporte

Os substratos avaliados foram a luva nitrílica azul, luva de vinil e esparadrapo impermeável de uso clínico utilizando-se como primeiro parâmetro de estudo o comportamento da tinta durante a etapa de arraste sobre a superfície dos materiais. Vale ressaltar que o esparadrapo *Missner*® foi mantido até o final dos experimentos devido às possíveis alterações quanto a diferença de porosidade entre as diferentes marcas. As tintas produzidas com PAV, ao serem submetidas ao contato com os diferentes substratos, apresentaram-se demasiadamente líquidas dificultando o processo de arraste da tinta, independente da presença ou não do agente

plastificante. Diferentemente, as tintas produzidas com NP revelaram um processo mais facilitado, provavelmente devido à presença dos componentes promotores de flexibilidade e tixotrópicos contidos na formulação polimérica comercial.

Tanto para as formulações de NP como para PAV, o uso da gelatina alterou drasticamente a viscosidade desejada, ao qual foi possível observar aglomerados de grafite, semelhantes a bolhas de gel, o que proporcionou perda da fluidez dificultando o arraste da mesma sobre os substratos. Formulações adicionais utilizando diferentes concentrações (para mais e para menos) e diferentes meios de solubilização - meio halogênico (Spitzer-Sonnleitner *et al.*, 2016) e solução ácida (Gobeaux *et al.*, 2010)- foram avaliadas, porém não foram obtidos resultados satisfatórios, adquirindo, em alguns casos, tintas com características quebradiças. Na presença de glicerol nenhuma diferença visual e/ou dificuldades no arraste foram observadas nas formulações, ao qual foi mantida fluidez e viscosidade inicialmente pré-determinadas. Assim, optou-se por dar continuidade com o glicerol para posteriores estudos.

O segundo parâmetro avaliado foi o comportamento da tinta após secagem sobre a superfície do substrato, ao qual foi fixado um período de 24 horas, até completa evaporação do solvente. Tanto para as luvas nitrílicas como para as luvas de vinil, as formulações PAV mostraram-se quebradiças com o mínimo movimento o que pode ter relação com uma baixa quantidade do componente plastificante ou do material condutor, responsável por dar corpo a tinta. Com a movimentação dos materiais, a camada de tinta formada não apresentou boa aderência com as superfícies, sinalizando uma fraca interação entre as tintas PAV e as luvas aqui utilizadas. Para as formulações NP a pouca interação com a superfície de vinil também sobreveio, apresentando aspecto quebradiço com a movimentação do material, similarmente as formulações PAV. Diferentemente, as superfícies nitrílica e do esparadrapo apresentaram uma boa interação com as tintas NP, ao qual, durante os testes de tensão mecânica, não mostraram desprendimento de grandes particulados ou danificações que pudessem vir a comprometer a integridade do processo eletroquímico.

Os resultados obtidos até aqui, considerando o processo de serigrafia e a secagem da tinta sobre o substrato, mostraram que a superfície de vinil não atende aos requisitos necessários para o desenvolvimento do sensor, devido à sua fraca interação com as tintas NP e PAV, sendo então descartada dos próximos estudos.

A terceira avaliação levou em conta o teste de tensão mecânica – executado manualmente – bem como as diferenças obtidas no uso e na ausência do glicerol na formulação. Os materiais

suporte, após secagem da tinta, foram esticados de forma a verificar a capacidade de resistência da formulação sobre o material e se a mesma acompanhava sua flexibilidade. As formulações de PAV apresentaram-se quebradiças, como já mencionado anteriormente, na ausência e também na presença do glicerol. As proporções de glicerol nessas formulações foram alteradas – maiores que 1,1 % e menores que 1,1 % - buscando analisar os efeitos desse componente em conjunto ao PAV. No primeiro caso, não houveram alterações visíveis quando comparada à tinta na ausência do glicerol e, no segundo caso, ocorreu um aumento da fluidez, obtendo-se uma tinta excessivamente líquida. Para ambas houveram dificuldades durante o processo de serigrafia e secagem da tinta. Quanto às formulações de NP, a presença de glicerol alterou moderadamente a resistência do conjunto substrato + tinta durante os teste de tensão mecânica, sendo possível visualizar uma melhoria nesse quesito quando comparado ao conjunto substrato + tinta na ausência do glicerol. Ao serem esticadas, a tinta na presença do glicerol sobre luva nitrílica e esparadrapo não foi danificada, sendo necessária uma deformação com maior grau de tensão para que rachaduras começassem a serem visualizadas.

Como último parâmetro de avaliação, todas as tintas produzidas foram avaliadas quanto a sua resistência a passagem de corrente elétrica, utilizando-se um multímetro digital (Foxlux Fx-MD). Os valores obtidos para as formulações com PAV, independente do substrato, mostraram-se muito altas, com uma média próxima de 1400 ohms. Já as formulações com NP mostraram valores menores, variando nos diferentes substratos, com média de 400 ohms e 500 ohms para esparadrapo e luva de nitrilo, respectivamente e 800 ohms para a luva de vinil. Sendo esse um parâmetro importante a ser considerado na escolha de tintas condutoras para fins eletroquímicos, é possível verificar um melhor comportamento na condutividade para a luva de nitrílo e para o esparadrapo. Através do comparativo realizado até aqui, conclui-se que NP como veículo polimérico em conjunto ao glicerol, como agente plastificante, mostra vantagens para o processo de serigrafia – sobre luva nitrílica e esparadrapo - quando comparado ao PAV. Portanto, o NP foi então escolhido para dar continuidade aos estudos.

Com os resultados obtidos até aqui definiu-se, para fins de otimização, uma formulação contendo NP como veículo polimérico, glicerol como agente plastificante e grafite como material condutor, a ser posteriormente aplicada sobre a superfície de luva nitrílica e esparadrapo.

4.3.Otimização da tinta condutora

Diferentes proporções de grafite e glicerol foram avaliadas, considerando-se as necessidades de viscosidade e resistência a transferência de carga. As concentrações de grafite estudadas foram de 35, 37, 40, 43, 46, e 48 %. As concentrações de glicerol estudadas foram 1,1; 2,7 e 5,3 % e ausência. Devido às propriedades de solvente que o glicerol pode fornecer a mistura, vindo a tornar as tintas menos viscosas, não foram estudadas concentrações acima de 5,3 %. Os estudos iniciais foram realizados utilizando-se dados de resistência à transferência de carga, obtidas por multímetro, ao qual as concentrações de 43, 46 e 48 % não mostraram diferenças quanto ao valor obtido, com uma média de 600 ohms. Já as concentrações de 35, 37 e 40 % apresentaram valores de resistência próximos dos 1600 ohms, indicando que a quantidade de material condutor não foi suficiente para um desempenho condutor adequado. Dentre todas as proporções, 35 e 37 % mostraram-se menos viscosas quando consideradas todas as proporções de glicerol. Durante o processo de arraste, evidenciou-se que maiores proporções de grafite - 43, 46 e 48 % - na presença de menores proporções de glicerol - 1,1 % - apresentavam uma melhor deposição da tinta sobre a área vazada da máscara, não sendo notados problemas quanto ao escoamento da tinta além da área delimitada e danificação do desenho final do eletrodo. A concentração de 40 % de grafite, apesar de apresentar uma viscosidade similar das concentrações acima mencionadas, não acompanhou os menores valores de resistência a transferência de carga, sendo então eliminada das posteriores avaliações.

O glicerol, devido à sua ação solvente, mostrou ser um grande modificador da viscosidade da tinta, independente da proporção de grafite utilizada. Foi observado que concentrações baixas desse composto na formulação da tinta foram eficazes ao proporcionar um leve aumento de flexibilidade, o que pode ser interpretado como uma possível ação plastificante do glicerol na composição da tinta. Quando na presença de 1,1 % de glicerol, foi possível observar uma significativa mudança na resistência a tração mecânica leve, quando comparada a formulação na ausência de glicerol. Em situações de estiramento leve, relacionados ao movimento do sensor quando aplicado a superfície humana em movimento, não houveram problemas quando ao desprendimento de particulados, rachaduras na camada de tinta ou qualquer dano no desenho do eletrodo. Com isso, pode-se concluir que a adição de glicerol à formulação melhora a flexibilidade da tinta, a tornando favorável na aplicável sobre a superfície de substratos flexíveis.

A fim de investigar as alterações no comportamento eletroquímico para as diferentes formulações, utilizou-se DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,7, como sonda eletroquímica, e mediu-se a magnitude de corrente através de voltametria cíclica. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos para esse estudo para ambos materiais de suporte. Devido as características de importância biológica conferidas à DA, considerou-se para esse trabalho utiliza-la como sonda eletroquímica de caráter biológico além da finalidade como analito de detecção.

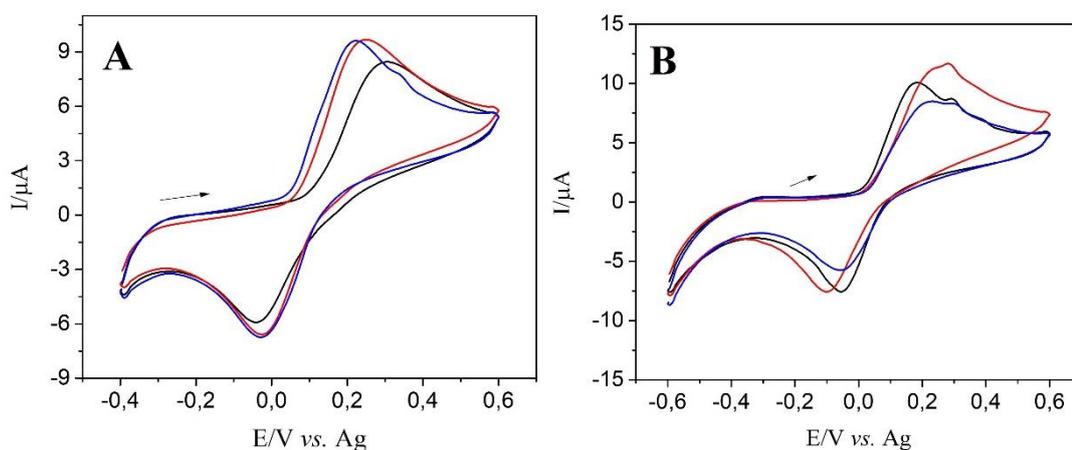


FIGURA 16 - Voltamogramas cíclicos obtidos de (A) eletrodo em luva nitrílica e (B) eletrodo em esparadrapo, utilizando diferentes concentrações de grafite em pó: (●) 43, (●) 46 e (●) 48 %, na tinta condutora a base de esmalte para unhas e glicerol. Medidas realizadas na presença de dopamina $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,7), $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir dos voltamogramas cíclicos obtidos é possível considerar a concentração de 46 % e 48 % como as melhores para luva nitrílica e 46 % para esparadrapo. Os eletrodos produzidos com 48 % de grafite apresentaram, tanto na luva nitrílica como no esparadrapo, desprendimento de particulados o que possibilita interferências durante as medidas eletroquímicas. Esse tipo de característica assemelha-se as chamadas pastas de carbono, ao qual uma grande quantidade de material condutor é adicionado a composição, aumentando a viscosidade e tornando-a menos fluída e com aspecto de uma pasta. Esse tipo de mistura não se adequa ao processo de serigrafia devido ao tempo de secagem muito curto, o que dificulta o processo de arraste da tinta sobre o molde vazado.

Assim, foi definida uma formulação final da tinta condutora baseada em NP contendo 46 % de grafite em pó e 1,1 % de glicerol.

Repetidas medidas de CV foram obtidas, em diferentes eletrodos de luva e esparadrapo, ao qual observou-se uma migração no potencial de pico anódico e catódico na presença da sonda eletroquímica. A fim de verificar se o eletrodo de referência, baseado na tinta de carbono, podia estar originando essa instabilidade, os mesmos pintados manualmente com tinta de prata, utilizando um pincel fino a fim de recobrir toda a superfície de contato com a solução. Os resultados obtidos para os eletrodos pintados mostraram uma tendência mais estável na obtenção do potencial de pico, sugerindo uma melhoria na reprodutibilidade dos dispositivos. A Figura 17 ilustra os eletrodos finais obtidos, nomeados de LUV, para o eletrodo em luva nitrílica e ESP para o eletrodo em esparadrapo. Ressalta-se aqui a necessidade da utilização de um limitador de gota para LUV (Figura 17C), responsável por manter a solução sobre a superfície dos eletrodos durante a análise o que não foi necessário para ESP. O delimitador de gota foi recortado em impressora de corte utilizando papel *contact* fosco.

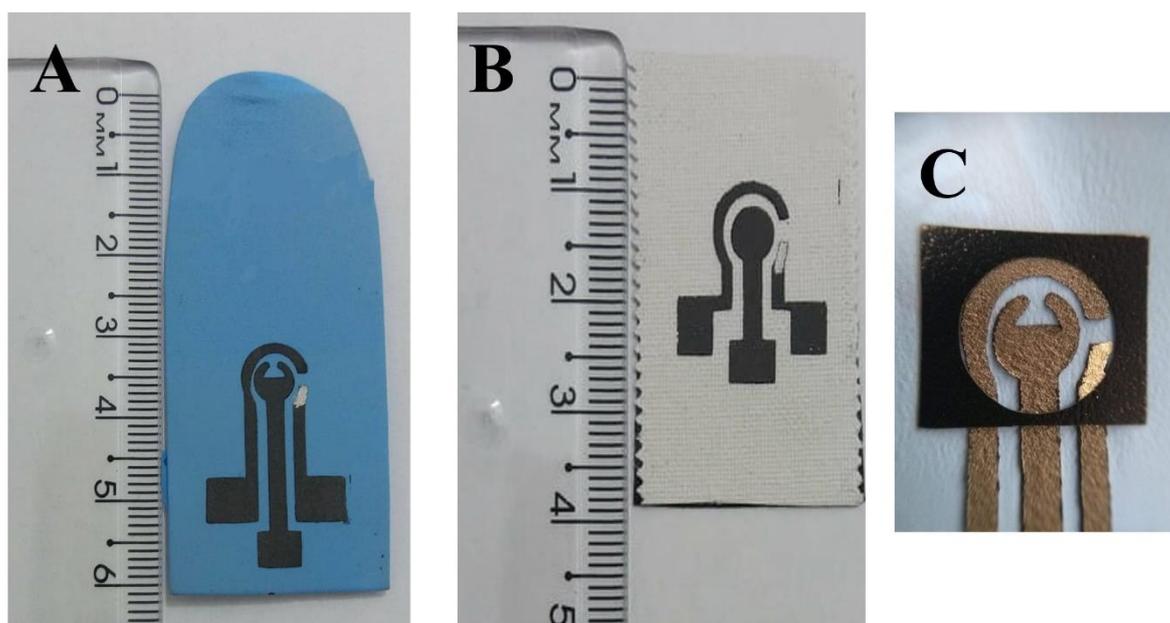


FIGURA 17 - Imagens dos eletrodos (A) LUV; (B) ESP e; (C) LUV com delimitador de gota.

4.4. Caracterizações morfológicas

A partir das imagens obtidas por MEV, foi possível evidenciar que a tinta foi depositada de maneira a cobrir toda a região do desenho do eletrodo, para ambos os materiais de suporte (Figura 18A e 19A). Também, observou-se uma topografia rugosa e porosa ocasionando um aumento da área geométrica do eletrodo. (Figura 18B e 19B) No trabalho de Pradela-Filho e colaboradores é possível observar um comportamento similar nas micrografias obtidas para

uma tinta de esmalte para unhas e grafite. (Pradela-Filho *et al.*, 2017) Outro trabalho utilizando esmalte para unhas como veículo polimérico em tintas também mostrou micrografias similares quanto a rugosidade e porosidade do material. (De Araujo Andreotti *et al.*, 2019)

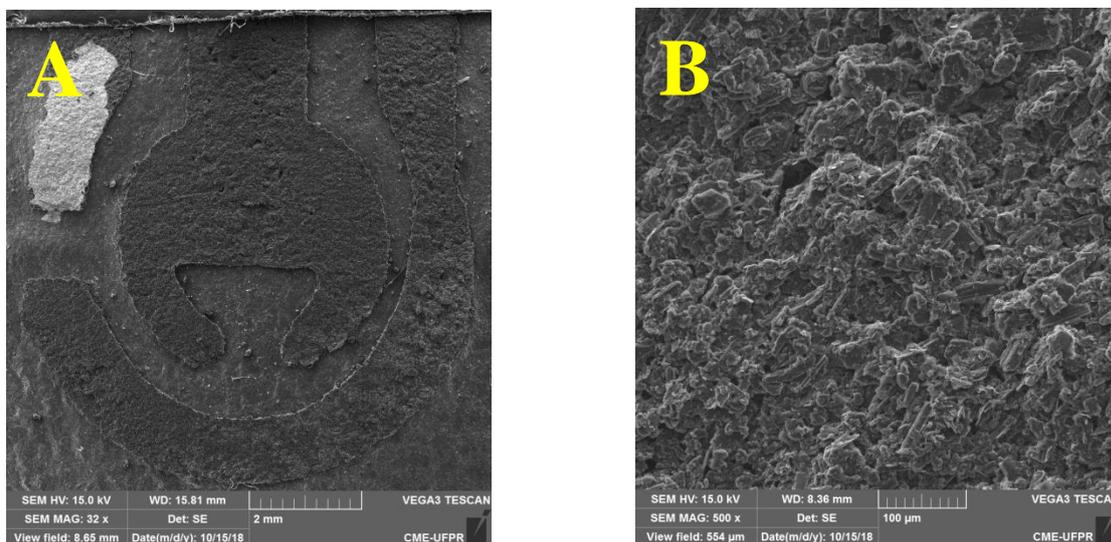


FIGURA 18 - Imagens da tinta serigrafada sobre a superfície luva nitrílica em ampliações de (A) 32 x e (B) 500 x

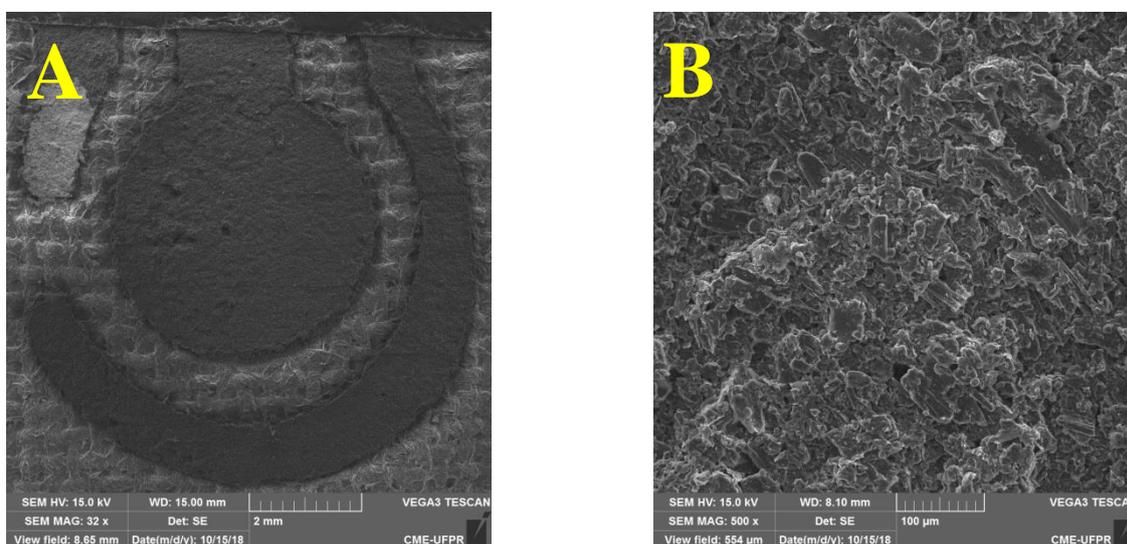
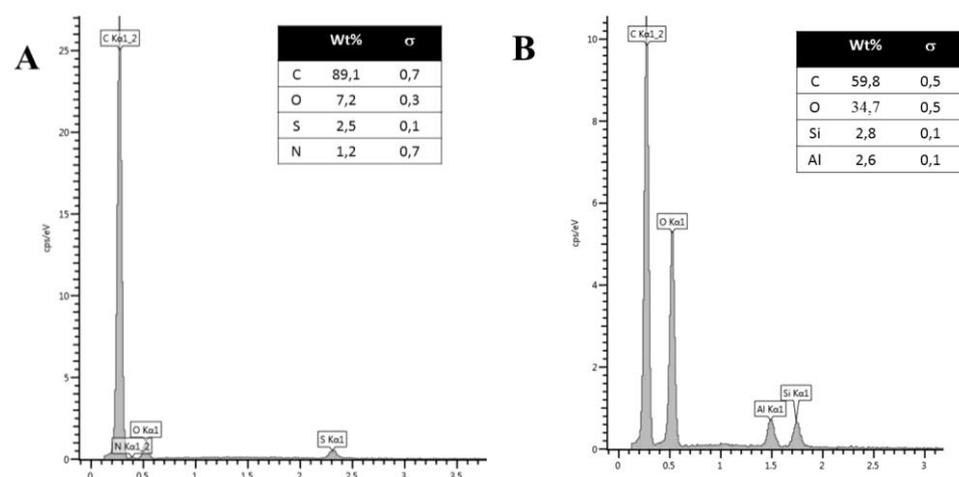


FIGURA 19 - Imagens da tinta serigrafada sobre a superfície de esparadrapo em ampliações de (A) 32 x e (B) 500 x

Medidas de espectroscopia de raios X (do inglês *energy-dispersive X-ray spectroscopy*, EDS) foram realizadas para a tinta e os materiais de suporte. A Figura 20 mostra os espectros obtidos para a tinta condutora e para os substratos. O principal elemento encontrado nas análises

da tinta foi o carbono, correlacionado ao grafite, como já esperado. A presença do nitrogênio e do enxofre é explicada pela presença de duas resinas provenientes do esmalte de unha, a nitrocelulose, resina base da maioria dos esmaltes comerciais (~15 %) e a tosilamida/formaldeído, uma resina termoplástica (~7 %) que, em conjunto com a nitrocelulose, auxilia na formação do filme polimérico do esmalte. (López-López *et al.*, 2015) Quanto à análise da luva nitrílica destaca-se a presença em abundância de C e N devido a um dos monômeros formadores da borracha sintética que origina o material nitrílico, a acrilonitrila ($C\equiv N$), importante componente devido a sua relação direta com a resistência química desse material. (Phalen *et al.*, 2007) Também, o C presente é proveniente do *carbon black* utilizado como composto de preenchimento para elaboração do material. O S é o principal componente utilizado durante o processo de cura de compostos nitrílicos. A presença do Zn está relacionada ao processo de aceleração da etapa de cura do material, onde é utilizado o óxido de zinco. A presença de outros elementos é devido a composição dos agentes vulcânicos utilizados na elaboração do material. (Bawadukji e Jabra, 2017; Linhares *et al.*, 2018) Para o esparadrapo, a alta incidência de C é proveniente do látex, principal matéria- prima do material. (Agrawal e Konno, 2009) Os outros elementos encontrados são de provável proveniência da resina acrílica utilizada nesses materiais responsáveis pela resistência e flexibilidade.



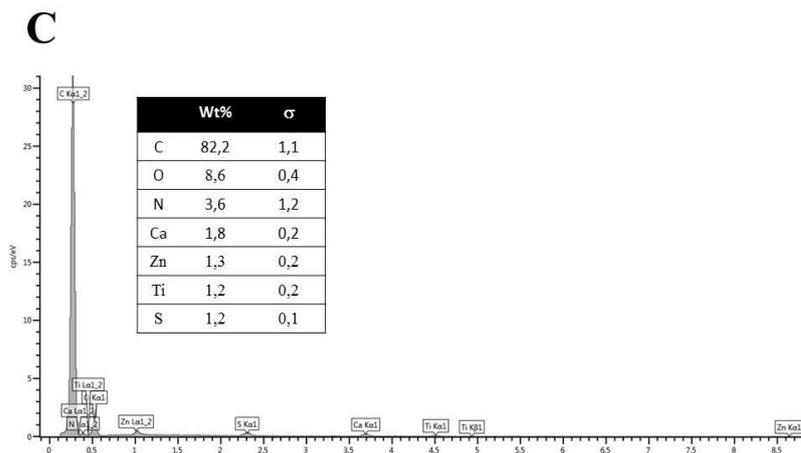


FIGURA 20 - Espectros de EDS obtidos para (A) tinta condutora composta de esmalte para unhas, grafite e glicerol; (B) esparadrapo impermeável e; (C) luva nitrílica.

4.5. Caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos

Com objetivo de demonstrar a funcionalidade dos dispositivos impressos, caracterizações utilizando DA foram realizadas. Medidas de voltametria cíclica foram obtidas para LUV depositando-se uma gota de 80 μL de solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 6,7) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. No dispositivo ESP as medidas foram realizadas depositando-se uma gota de 90 μL da solução tampão fortificada, anteriormente citada.

A partir dos voltamogramas cíclicos obtidos (Figura 21), foram observados picos anódicos e catódicos bem definidos para ambos eletrodos, próximos ao potencial de 0,2 V e 0 V, para oxidação e redução, respectivamente. É possível verificar também que na presença da dopamina LUV mostrou-se mais resistivo que ESP.

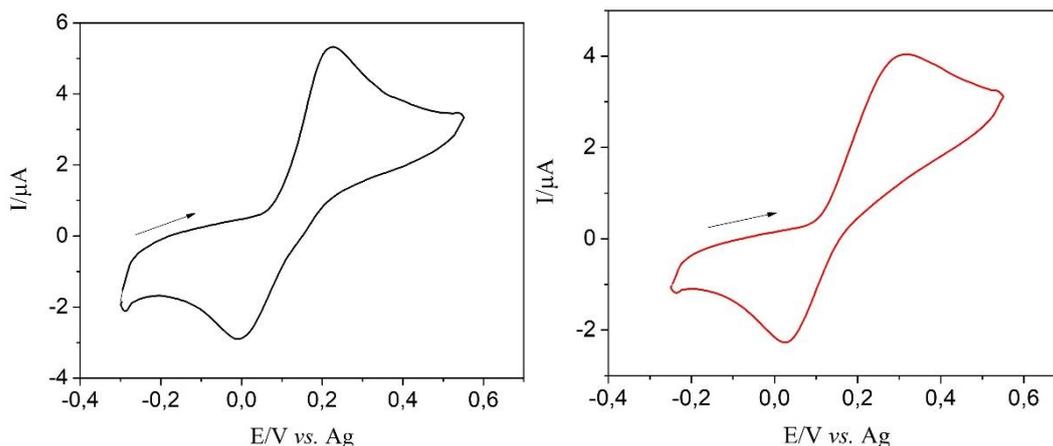


FIGURA 21 - Voltamogramas cíclicos de LUV (●) e ESP (●) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} em solução tampão fosfato $0,2$ mol L^{-1} (pH 6,7), $v = 50$ mV s^{-1} .

Medidas de CV também foram realizadas na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , solução preparada em KCl $0,1$ mol L^{-1} a fim de verificar possíveis diferenças entre as duas sondas. A Figura 22 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos na velocidade de 50 mV s^{-1} ao qual é possível verificar a obtenção do par redox característico da sonda para ambos substratos. Para LUV um pico de oxidação de corrente $3,3 \times 10^{-5}$ μA foi obtido no potencial de $0,3$ V e um pico de corrente $-2,7 \times 10^{-5}$ μA de redução foi obtido no potencial de $0V$. Para ESP o pico de oxidação foi obtido no potencial de $0,45$ V com corrente de $3,1 \times 10^{-5}$ μA e o pico de redução foi obtido no potencial de $-0,04$ V com corrente de $2,6 \times 10^{-5}$ μA .

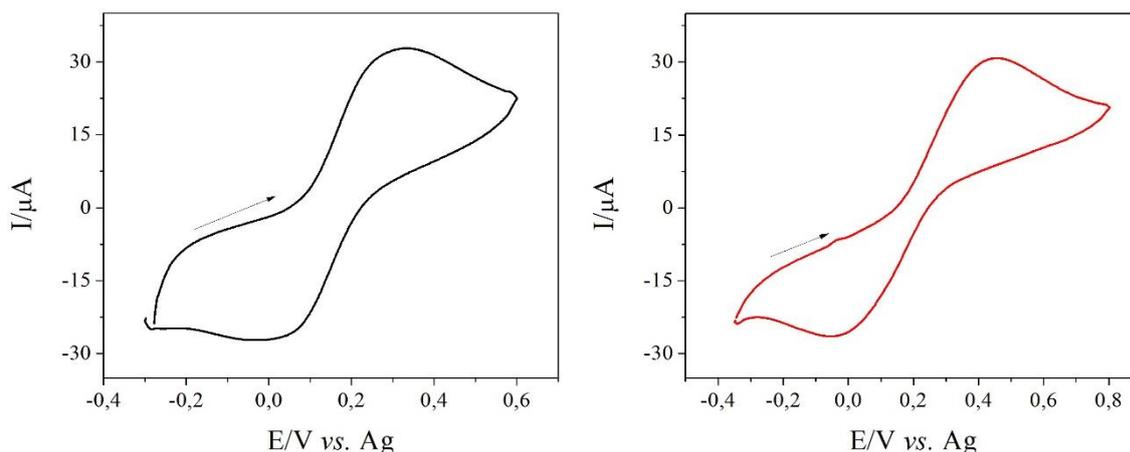


Figura 22 - Voltamogramas cíclicos de LUV (●) e ESP (●) na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , preparada em KCl $0,1$ mol L^{-1} , $v = 50$ mV s^{-1} .

A área eletroativa de ESP e LUV foi estimada através da equação de *Randles-Sevick* (Equação 1), utilizando diversas velocidades de varredura (v) em medidas de voltametria

cíclica. O estudo da área foi realizado a partir de dois tipos de sonda eletroquímica: DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, preparada em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,7) e também para uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 A C D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} \quad (\text{Equação 1})$$

Na equação, I_p refere-se à corrente de pico anódico; A indica a área eletroativa em cm^2 ; C corresponde a concentração da sonda utilizada, em mol cm^{-3} ; D indica o coeficiente de difusão das espécies em solução, (DA: $4,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Nasirizadeh *et al.*, 2013); $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$: $7,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); n refere-se ao número de elétrons transferidos na reação redox e v corresponde a velocidade de varredura. DA foi utilizada a fim de caracterizar os dispositivos utilizando uma sonda redox de caráter biológico. Foi possível observar um comportamento linear através dos gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$, indicando para ambos os dispositivos um processo difusional - tanto da DA como da solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ - sobre a superfície do eletrodo (Figura 23 e 24). A área eletroativa encontrada para LUV foi de $0,2 \text{ cm}^2$ e para ESP foi de $0,1 \text{ cm}^2$, considerando-se ambas as sondas. Apesar da área geométrica para ESP e LUV ser muito semelhante – não igual, devido a abertura presente na área de trabalho de LUV – a área eletroativa mostrou discrepância entre os dispositivos. Uma possível explicação para a perda de área em ESP decorre da característica porosa do esparadrapo. Diferentemente da luva, que possui uma superfície lisa, o esparadrapo possui uma característica evidentemente porosa, devido ao material ser projetado como uma malha trançada de fios de algodão. Durante o processo de arraste da tinta sobre a superfície do material a mesma pode adentrar os poros do esparadrapo tornando-a inacessível como superfície condutora. Essas características de superfície podem ser visualizadas nas imagens de MEV (Figura 18 e 19).

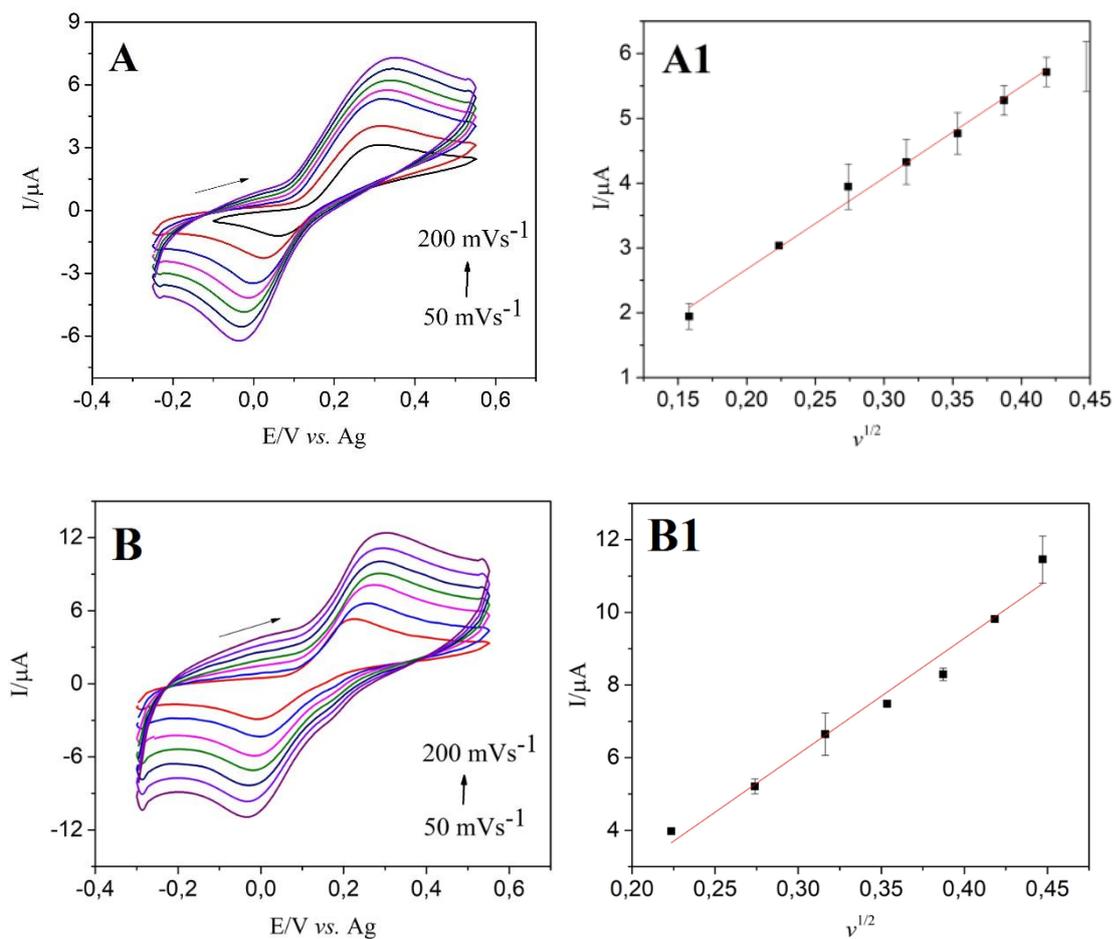


FIGURA 23 - Voltamogramas cíclicos de (A) ESP e (B) LUV obtidos a partir de medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,7) na presença de DA 1,0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ para as velocidades de varredura de 50; 75;100; 125; 150; 175 e 200 mV s⁻¹. Gráfico de pontos I vs. $v^{1/2}$ para (A1) LUV e (B1) ESP.

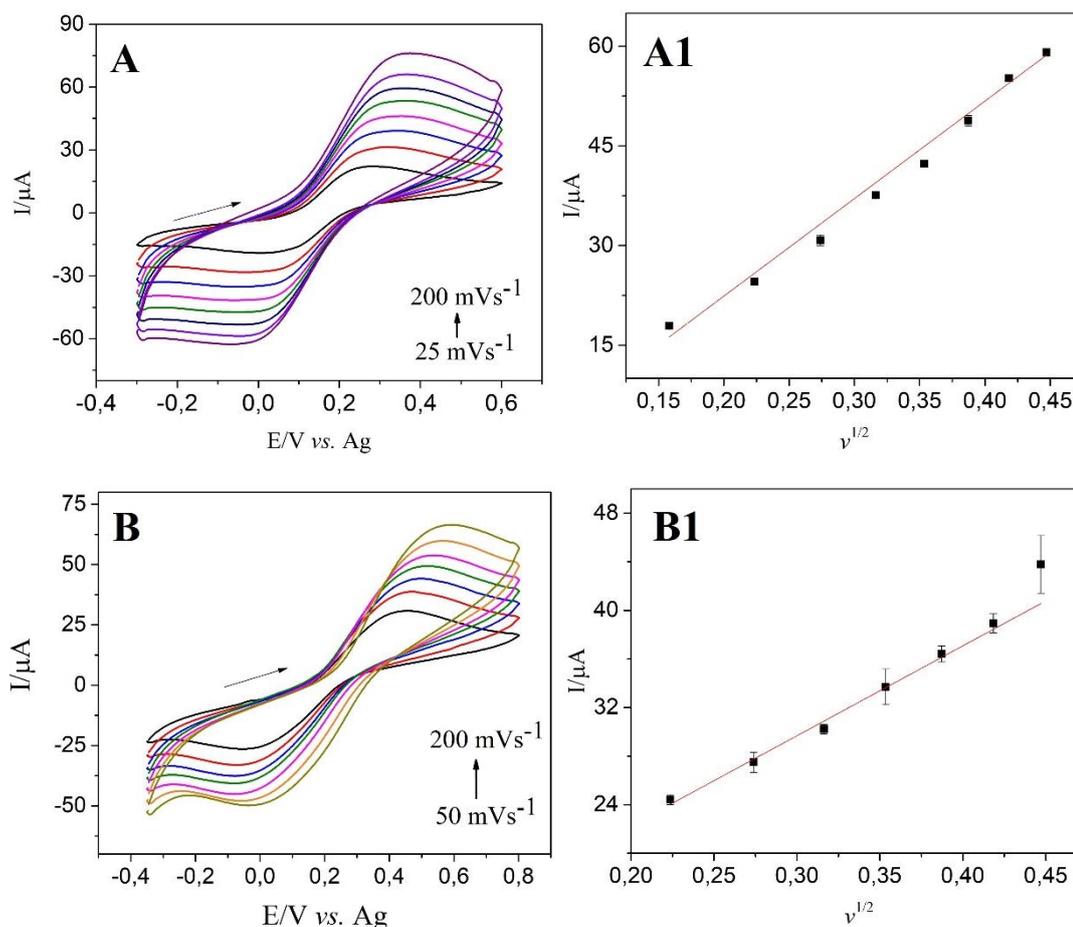


FIGURA 24 - Voltamogramas cíclicos de (A) LUV e (B) ESP realizadas em solução em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de para a velocidades de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para as velocidades de varredura de 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 mV s^{-1} . Gráfico de pontos I vs. $v^{1/2}$ para (A1) LUV e (B1) ESP.

Em razão do processo redox da DA envolver prótons, há necessidade do estudo da influência do pH do eletrólito durante a reação, que pode vir a alterar tanto as correntes quanto os potenciais de pico. O estudo foi realizado pela técnica de voltametria cíclica utilizando solução DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ para os seguintes valores de pH: 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 9,0 e 12,0. Os resultados obtidos demonstraram que a corrente de pico é influenciada pela mudança de pH do meio bem como uma leve migração no potencial de oxirredução. DA apresenta-se na sua forma protonada para valores de pH menores que 7,0, região essa em que pode ser prontamente pré-concentrada sobre a superfície negativa do eletrodo. (Martínez-Huitle *et al.*, 2009) Assim, esperava-se que valores nessa faixa apresentassem melhores comportamentos quanto a transferência de carga. Dentre as melhores respostas, pH 6,5 e 7,0, o pH 6,5 foi escolhido, para ambos substratos, considerando

a corrente de pico relativamente mais alta, bem como melhores definições de picos anódicos e catódicos e um menor valor de desvio padrão entre as triplicatas.

Realizada a otimização do meio reacional, procedeu-se a escolha da melhor técnica voltamétrica para detecção de DA. Foram avaliadas as técnicas de DPV, LSV e SWV em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 25 mostra os voltamogramas obtidos para LUV e ESP, utilizando-se os seguintes parâmetros para cada técnica: DPV: $\Delta E_s=5 \text{ mV}$; $a = 0,025 \text{ V}$; tempo de modulação= $0,05 \text{ s}$ e $t = 0,5 \text{ s}$; SWV: $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$; $a = 0,02 \text{ V}$; $f = 25 \text{ Hz}$ e; LSV: $v = 0,05 \text{ V/s}$ e $\Delta E_s = 2,4 \text{ mV}$. É possível observar que, para ambos substratos, a voltametria linear mostrou resultados promissores quanto a corrente de pico, considerando o pico anódico em $0,3 \text{ V}$. Pode ser observado que para LUV a diferença na intensidade de corrente para SWV e LSV foi baixa, porém levando-se em conta o desvio padrão entre as medidas, concluiu-se que LSV possui melhor estabilidade durante as medidas. Portanto, a LSV foi a técnica voltamétrica escolhida para dar continuidade as caracterizações dos dispositivos.

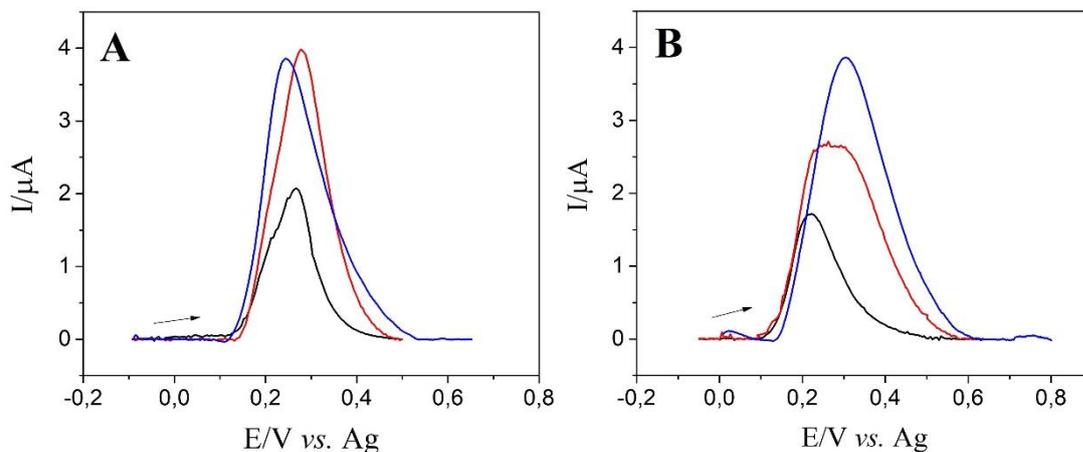


FIGURA 25 - Voltamogramas obtidos para (A) LUV e (B) ESP utilizando as técnicas de DPV (●), SWV (●) e LSV (●) na presença de DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). DPV: $\Delta E_s=5 \text{ mV}$; $a = 0,025 \text{ V}$; tempo de modulação= $0,05 \text{ s}$ e $t = 0,5 \text{ s}$; SWV: $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$; $a = 0,02 \text{ V}$; $f = 25 \text{ Hz}$ e; LSV: $v = 0,05 \text{ V/s}$ e $\Delta E_s = 2,4 \text{ mV}$

Para a técnica de LSV, o parâmetro velocidade foi otimizado devido a influência que o mesmo confere no sinal analítico da medida. Foram realizadas medidas voltamétricas lineares nas velocidades de 10; 35; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 mV s^{-1} . Na presença de DA, o eletrodo LUV apresentou um aumento na corrente de pico anódico até a velocidade de 175 mV s^{-1} .

Vs^{-1} , iniciando um platô de tendência linear a partir de 200 $mV s^{-1}$. Já o eletrodo ESP apresentou um aumento linear até a velocidade de 200 $mV s^{-1}$, porém para essa velocidade apresentou deslocamento do potencial e um alto valor de desvio entre as triplicatas, sendo considerado um resultado pouco reproduzível. Assim, para ambos dispositivos foi selecionada a velocidade de 175 $mV s^{-1}$. As Figuras 26 e 27 mostram os voltamogramas e gráficos obtidos. Nota-se a presença de um pico persistente para todas as medidas em regiões anteriores a 0 V, ao qual podem ser justificados como picos formados a partir de outras reações redox da dopamina. No trabalho de (Caetano *et al.*, 2017) foram apresentadas as reações provenientes de dois pares de picos obtidos durante a oxidação de DA ao qual, durante a formação da dopamina-ortoquinona (o-DAQ), obtém-se resposta na faixa de 0,2 V. No caso da o-DAQ não reduzir novamente a dopamina (sentido reverso da reação), ela pode sofrer uma reação de fechamento de anel levando a formação de leucopaminacromo (LDAC). A LDAC pode ser oxidada produzindo o dopaminocromo, responsável pelo segundo par redox obtido no trabalho citado e, possivelmente, pelo pico da região negativa nos voltamogramas desse trabalho.

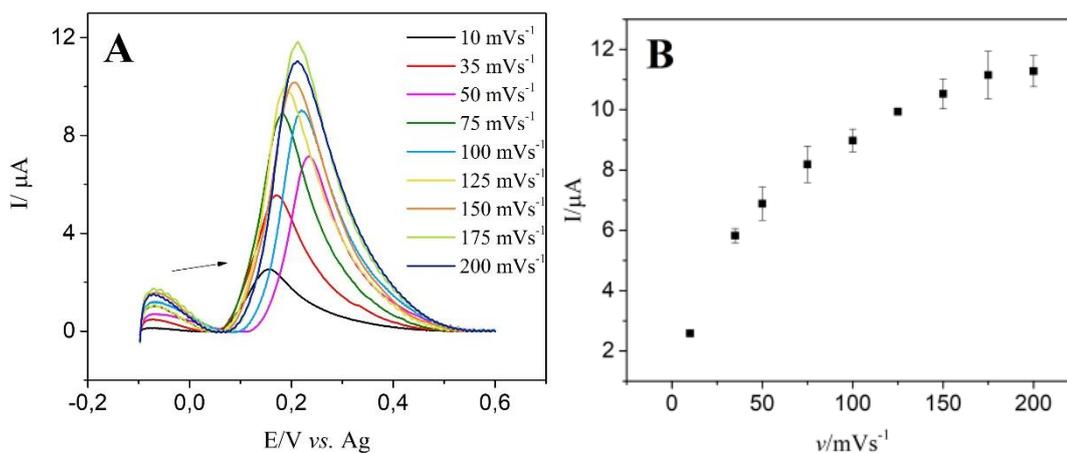


FIGURA 26 - (A) Voltamogramas lineares obtidos para diferentes velocidades de varredura em ESP, na presença de DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5); (B) Gráfico de pontos.

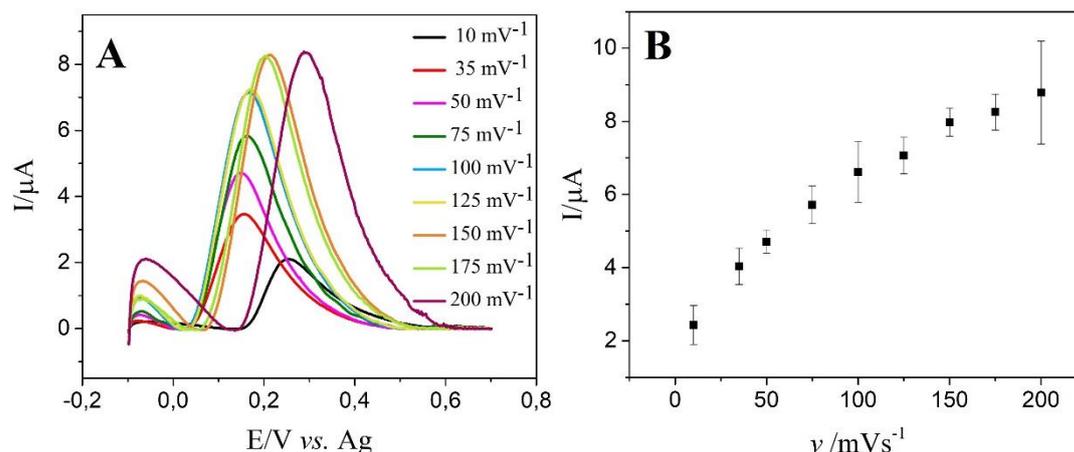


FIGURA 27 - Voltamogramas lineares obtidos para diferentes velocidades de varredura em LUV na presença de DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5); (B) Gráfico de pontos.

As curvas analíticas para ambos eletrodos foram construídas após a otimização dos parâmetros experimentais, utilizando voltametria linear. As medidas foram realizadas na presença de DA preparada em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). Foram definidas diferentes concentrações de DA, dentro do intervalo de $5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para LUV e $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para ESP, obtendo-se um voltamograma para cada concentração (Figura 28A e 29A). As medidas para cada concentração foram obtidas em diferentes eletrodos, sendo possível verificar uma boa reprodutibilidade do sensor. Pode-se observar um aumento linear na corrente de pico com o aumento na concentração de DA para ambos dispositivos (Figura 28B e 29B). LUV apresentou uma correlação linear (r) de 0,999 e ESP uma correlação linear de 0,998. A equação da reta para LUV e ESP encontra-se nas Equações 2 e 3 abaixo, respectivamente.

$$I(A) = 5,46757 \times 10^{-7} + 0,13243 C_{DA}(\text{mol L}^{-1}) \quad \text{Equação 2}$$

$$I(A) = 1,25373 \times 10^{-7} + 0,07417 C_{DA}(\text{mol L}^{-1}) \quad \text{Equação 3}$$

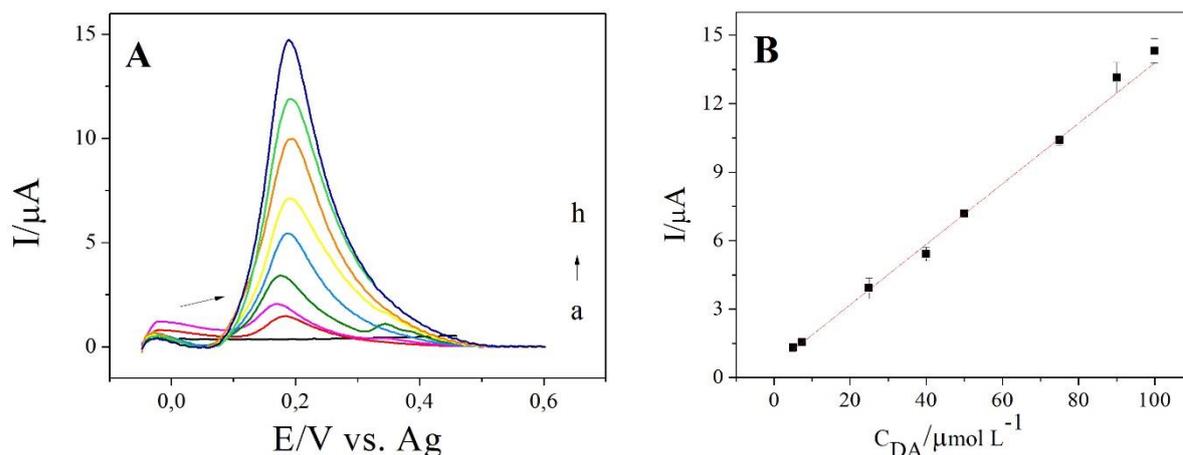


FIGURA 28 - (A) Voltamogramas lineares de LUV obtidos a partir de uma gota de 80 μL de solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 6,5) na presença de diferentes concentrações de DA: (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $7,5 \times 10^{-6}$ (c) $2,5 \times 10^{-5}$; (d) $4,0 \times 10^{-5}$; (e) $5,0 \times 10^{-5}$; (f) $7,5 \times 10^{-5}$; (g) $9,0 \times 10^{-5}$; (h) $1,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} ; (B) Curva analítica obtida para dopamina utilizando LUV.

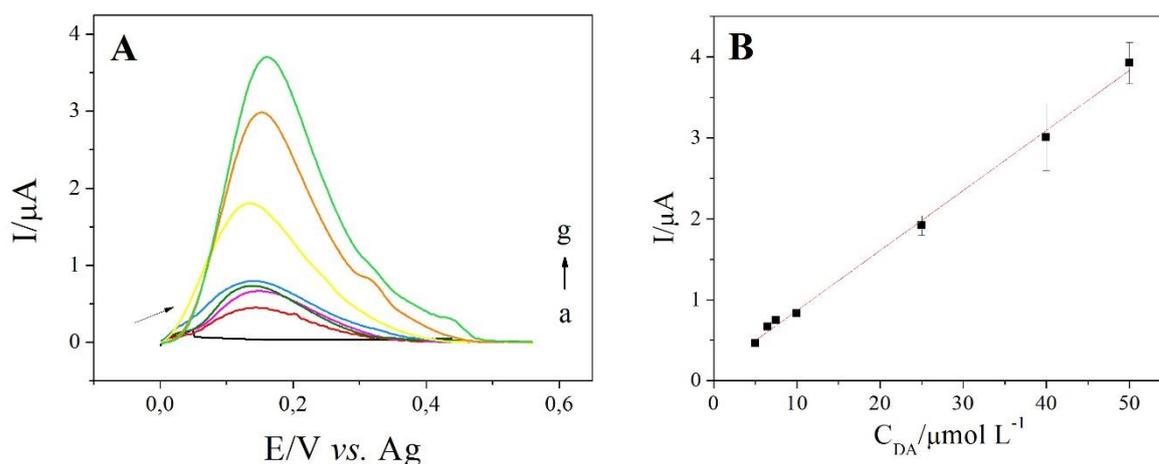


FIGURA 29 - (A) Voltamogramas lineares de ESP obtidos a partir de uma gota de 90 μL de solução tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} (pH 6,5) na presença de diferentes concentrações de dopamina: (a) $5,0 \times 10^{-6}$; (b) $6,5 \times 10^{-6}$; (c) $7,5 \times 10^{-6}$; (d) $1,0 \times 10^{-5}$; (e) $2,5 \times 10^{-5}$; (f) $4,0 \times 10^{-5}$ e; (g) $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} ; (B) Curva analítica obtida para dopamina utilizando ESP.

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) foi calculado a partir da equação $LOD = 3 \times SD / \text{inclinação da curva}$ (onde SD, do inglês *Standard Deviation*, é o desvio da média de 10 medidas na presença do eletrólito sem DP, nas mesmas condições pré-estudadas) a fim de determinar a menor concentração de analito detectável em uma amostra. Para LUV obteve-se um LOD de $4,2 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} e para ESP um LOD de $7,2 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} .

A construção das curvas analíticas para detecção de dopamina adicionaram evidências às diferenças existentes na construção de eletrodos sobre diferentes substratos. Para LUV obteve-se uma melhor distribuição de pontos dentro da faixa linear trabalhada além de uma melhor sensibilidade do dispositivo, considerando a inclinação de ambas as curvas. Apesar de apresentarem similaridades durante as etapas de otimização de parâmetros, mudanças sutis no comportamento eletroquímico e voltamétrico puderam ser visualizados. Deve ser considerado aqui a padronização dos eletrodos, visto que, por passarem por um processo manual de fabricação, tendem a variar seu comportamento eletroquímico entre os dispositivos. Porém, tendo em vista que as considerações aqui abordadas levaram em conta diversas medidas realizadas e que estas seguiram uma tendência quanto as diferenças acima citadas, podemos chegar à conclusão de que o tipo de substrato utilizado pode auxiliar em melhorias no comportamento eletroquímico do eletrodo, seja pela melhor distribuição da tinta sobre a superfície do material seja pelas características de porosidade e melhor compatibilidade substrato/tinta.

Buscando validar e demonstrar a aplicabilidade dos dispositivos, foram preparadas amostras de urina sintética a fim de serem utilizadas em medidas de adição e recuperação de padrão. A Tabela 3 mostra os valores de recuperações obtidas - entre 84,6 e 102 % - pelos dispositivos propostos.

TABELA 3 - Tabela contendo os valores de recuperação de DA em amostras de urina sintética para LUV e ESP.

Amostra	C _{DA} Adicionada (mol L ⁻¹)	C _{DA} Recuperada (mol L ⁻¹)	% Recuperada	
ESP	A	$5,0 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$	84,6
	B	$6,5 \times 10^{-6}$	$6,7 \times 10^{-6}$	103
	C	$7,5 \times 10^{-5}$	$7,4 \times 10^{-5}$	98,8
LUV	D	$2,5 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-5}$	102
	E	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,7 \times 10^{-5}$	91,7
	F	$5,0 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-5}$	99,2

Foram investigadas possibilidades quanto a interferência eletroquímica de alguns compostos presentes na urina durante as determinações de DA na amostra. A Tabela 4 apresenta as porcentagens de interferência obtidas para ambos dispositivos na presença dos interferentes: ureia, creatinina, ácido úrico e ácido ascórbico para concentrações iguais e superiores ao do analito em solução. As medidas foram realizadas em meio contendo dopamina $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,5). A concentração de ureia em solução foi de $1,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (5 vezes maior que DA em solução). A concentração de creatinina utilizada foi de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (10 x mais que DA em solução). As concentrações de ácido úrico e ácido ascórbico foram similares a de DA em solução, $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Os valores obtidos para ácido úrico em ESP e ureia em LUV foram altos, quando comparados aos dos outros compostos estudados. Levando em conta os valores de recuperação obtidos na validação da amostra, ao qual esses compostos estão presentes, em concentrações similares não foram obtidas interferências significativas indicando que não houve efeito de matriz considerável durante as análises.

TABELA 4 - Valores de interferência eletroquímica obtidos para diferentes compostos presentes em amostras reais de urina

	Interferente	% Interferência
ESP	Ureia	3,9
	Creatinina	7,7
	Ác. Úrico	19
	Ác. Ascórbico	2,9
LUV	Uréia	13
	Creatinina	4,2
	Ac. Úrico	5,9
	Ác. Ascórbico	4,8

Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade foram realizados para ambos dispositivos utilizando solução de DA $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,5). Considerou-se nesse estudo o desvio relativo entre a magnitude dos picos de corrente anódica de todas as medidas, a fim de verificar a perda na intensidade de corrente. Cinco medidas consecutivas em um mesmo eletrodo foram realizadas para o estudo de repetibilidade, ao qual obtiveram-se os valores de desvio padrão relativo de 8,7 % e 7,8 % para LUV e ESP,

respectivamente. Para reprodutibilidade, foram realizadas medidas em cinco dispositivos diferentes, ao qual foram obtidos os valores de desvio padrão relativo entre as medidas de 2,8 % e 7,0 %.

A Tabela 5 fornece algumas informações sobre trabalhos na literatura desenvolvidos para detecção de DA utilizando eletrodos impressos. Os valores de LOD e as faixas lineares obtidas nesse trabalho mostraram-se próximos para eletrodos impressos desenvolvidos nos últimos dois anos. Pressuposto que o processo de produção dos eletrodos, neste trabalho, é considerado artesanal e simples, com materiais de fácil obtenção, é possível concluir que LUV e ESP são eficazes na detecção de DA, apresentando um bom limite de detecção, trabalhando dentro de uma faixa linear que atende à literatura.

TABELA 5 - Comparação entre os resultados obtidos neste trabalho com outros similares encontrados na literatura

Sensor	Faixa Linear (mol L ⁻¹)	Limite de detecção	Referência
SPCE/CB-ERGO	4,9 × 10 ⁻⁶ a 1,9 × 10 ⁻⁵	1,5 × 10 ⁻⁶	(Ibáñez-Redín <i>et al.</i> , 2018)
MWCNTs/PPDA/Nafion/ SPE	1,0 × 10 ⁻⁶ a 1,1 × 10 ⁻⁴	1,0 × 10 ⁻⁸	(Singh <i>et al.</i> , 2018)
PEDOT-LSG	1,0 × 10 ⁻⁶ a 1,5 × 10 ⁻⁴	3,3 × 10 ⁻⁷	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
CNIMP	1,0 × 10 ⁻⁵ a 1,0 × 10 ⁻⁴	1,0 × 10 ⁻⁶	(Aneesh e Berchmans, 2017)
p(P3CA)/EOPGE	2,5 × 10 ⁻⁸ a 7,5 × 10 ⁻⁶	2,5 × 10 ⁻⁹	(Özcan <i>et al.</i> , 2017)
LUV	5,0 × 10 ⁻⁶ a 1,0 × 10 ⁻⁴	4,2 × 10 ⁻⁷	Neste trabalho
ESP	5,0 × 10 ⁻⁶ a 5,0 × 10 ⁻⁵	7,2 × 10 ⁻⁷	Neste trabalho

SPCE/CB-ERGO: Eletrodos impressos de pasta de carbono modificado com *carbon black* e grafeno sobre a superfície de PET; MWCNTs/PPDA/Nafion/ SPE: Eletrodo impressos a partir de um nanocompósito de nanotubos de parede múltipla, N'-fenil-p-fenilendiamina e Nafion sobre um substrato de poliéster; PEDOT-LSG: Eletrodos produzidos sobre a superfície de folhas

de poli-imida_baseados em grafeno modificado por PEDOT por tecnologia de laser; CNIMP: eletrodos de papel baseados em tinta de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e surfactante ácido dodecilbenzenico sulfonato de sódio; p(P3CA)/EOPGE: Eletrodos de grafite de lápis preparados por processo de super-oxidação e filmes de ácido pirro-3-carboxílico.

4.6. Caracterização e detecção de HB utilizando ESP

Os dispositivos ESP e LUV foram avaliados para detecção de HB humana, a fim de estudar a aplicabilidade destes sensores para moléculas biológicas mais complexas. A Figura 30 mostra voltamogramas cíclicos obtidos na presença de HB 10 mg mL⁻¹ preparada em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, (pH 7,0). Para ESP é possível observar um par de picos redox quase-reversíveis, no qual o catódico apresenta uma melhor definição na corrente de pico. Esse par redox é atribuído ao íon Fe presente dentro do grupo heme da HB, possibilitando visualizar a reação Fe (III) ⇌ Fe (II) a partir de uma varredura de potenciais. O mesmo não foi observado para LUV, ao qual os pares redox não puderam ser visualizados, concluindo então que dentre os dispositivos, ESP apresenta um comportamento promissor para a detecção dessa molécula e continuará a ser estudado na presença da mesma.

É interessante observar que o ferro apresenta-se no seu estado ferroso normalmente dentro da molécula de HB, porém não foi possível visualizar a reação anódica durante a medida – independente do sentido e varredura utilizado. Esse comportamento pode ser justificado devido às medidas terem sido realizadas em ambiente aeróbico, possibilitando uma interação das moléculas em solução com o oxigênio do ambiente, ocasionando uma mudança na valência do íon antes do início das medidas..

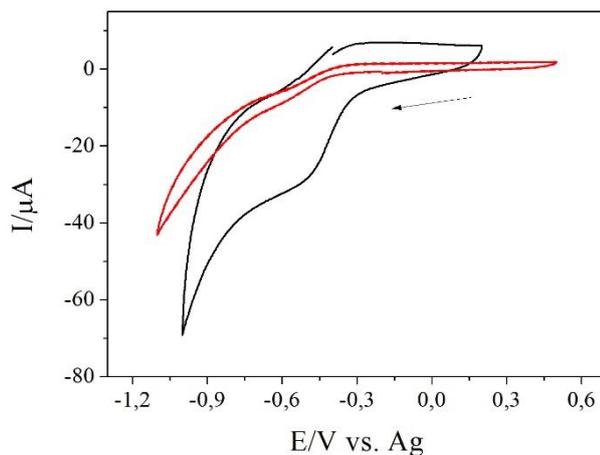


FIGURA 30 - Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de HB 10 mg mL⁻¹ preparada em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ para LUV (●) e ESP (●).

Devido à molécula de hemoglobina ser altamente complexa, contendo o íon condutor dentro de um invólucro proteico denso e hidrofóbico, espera-se, com base da literatura, que a transferência de elétrons seja de forma lenta. Os elétrons que transitam entre o material condutor do eletrodo e o grupo eletroativo, íon ferro, localizado internamente a molécula necessitam vencer a barreira proteica a fim de que a transferência de elétrons seja efetiva. (Hussain *et al.*, 2017) Alguns trabalhos na literatura buscaram compreender o comportamento de HB sobre a eletrodos de carbono utilizando-se de diferentes tipos de superfícies imobilizadoras como filmes de fibroína de seda (Wu *et al.*, 2006) e ovo-fosfatidilcolina, um lipídeo natural (Han *et al.*, 2002). A finalidade desses trabalhos, no entanto, não buscava a detecção direta de HB, mas sim sua utilização como mediadora para a detecção de outros compostos como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio. Até o momento poucos trabalhos foram abordados em literatura buscando desenvolver sensores para detecção direta de hemoglobina –através da atividade do íon Fe - sem modificadores de superfície e/ou facilitadores de transferência eletrônica e, nenhum, até o momento, utilizou sensores descartáveis para essa finalidade. Toh e colaboradores (Toh *et al.*, 2014) realizaram um estudo eletroquímico, utilizando eletrodo de carbono vítreo e voltametria cíclica, a fim de compreender o comportamento do íon ferro presente na hemoglobina, diretamente nas hemácias e no sangue. No trabalho foi possível identificar o pico característico da redução do Fe, também obtido nesse trabalho, bem como a ausência de um pico de oxidação de boa resolução. Os trabalhos que apresentam detecção direta desse analito utilizam outros tipos de processos como microfluídica, amperometria e injeção em fluxo. (Moon *et al.*, 2017)

Avaliaram-se as técnicas de SWV e DPV na presença de HB 2,5 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, ao qual a melhor resposta foi obtida para DPV, como já esperado, devido a técnica se aplicar melhor para reações de cinética lenta (Figura 31). Apesar do também aparecimento dos picos na técnica de SWV, os mesmos não apresentaram uma resolução adequada o suficiente, tornando a técnica ineficaz para a detecção do analito. Os estudos foram prosseguidos pela técnica de DPV, através da otimização da velocidade de trabalho nas velocidades de 10, 35 e 50 mV s⁻¹. Como esperado, à medida que a velocidade aumentou os picos foram perdendo definição e, por consequência, perdendo magnitude de corrente, assim, foi definida como velocidade final 10 mV s⁻¹. Devido ao caráter biológico da molécula e com base na literatura, foi definido o pH 7,0 para todas as medidas com HB.

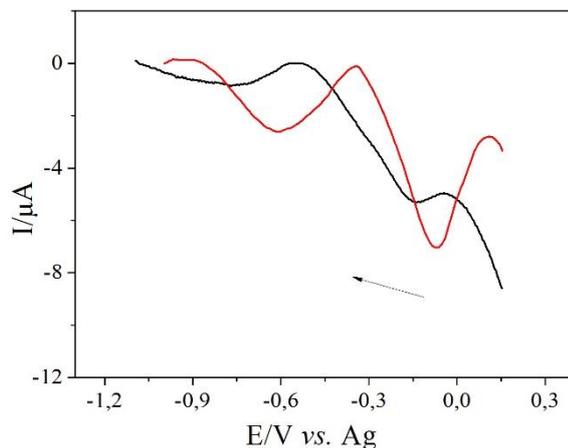


FIGURA 31 - Voltamogramas utilizando as técnicas de (●) SWV e (●) DPV na presença de HB $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

A construção da curva analítica foi realizada utilizando DPV na presença de diferentes concentrações de HB, preparadas em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$. A Figura 32 apresenta os voltamogramas e o comportamento linear obtidos para um intervalo de concentrações de HB entre $1,0$ e 10 mg mL^{-1} . A reta obtida pela curva analítica está indicada na Equação 4, ao qual foi utilizado-se o $\Delta I/A$ em relação às concentrações estudadas:

$$\Delta I(A) = 1,48382 \times 10^{-6} - 5,93365 \times 10^{-7} C_{HB} \text{ mg mL}^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

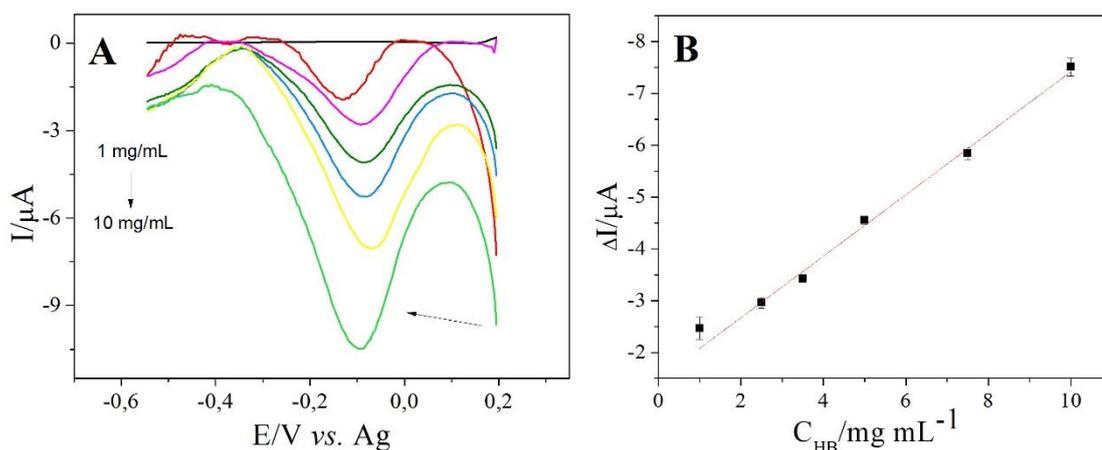


FIGURA 32 - (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na presença de diferentes concentrações de HB: (1) $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$; (2) $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (3) $3,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (4) $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$; (5) $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$; (6) 10 mg mL^{-1} , preparadas em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ e (B) Curva analítica de HB obtida em ESP.

O limite de detecção de ESP para HB foi calculado a partir da equação $LOD = 3 \times SD$ da curva / inclinação da curva a fim de determinar a menor concentração de analito detectável em uma amostra. O LOD obtido foi de $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$. Os níveis normais de HB em sangue humano, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, são de 130 mg mL^{-1} para homens acima dos 15 anos; 120 mg mL^{-1} para mulheres não gestantes acima dos 15 anos e; 110 mg mL^{-1} para mulheres gestantes. A faixa linear obtida nesse trabalho não atende aos valores normais encontrados devido a problemas na diluição da HB humana aqui utilizada, que apresenta um fator de solubilidade de até 20 mg mL^{-1} .

A validação da amostra foi realizada através da metodologia de adição e recuperação em amostras aquosas de hemoglobina humana, utilizando concentrações dentro da curva analítica obtida. Foram obtidas porcentagens de recuperação entre 81,5 e 106 %.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PLATINA FLEXÍVEIS SOBRE A SUPERFÍCIE DE FOLHAS DE ECOPET CARACTERIZADOS NA PRESENÇA DE DOPAMINA E UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA PARK7/DJ-1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização eletroquímica dos eletrodos de platina

Os eletrodos de platina foram avaliados por voltametria cíclica na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo de platina não sofreu qualquer pré-tratamento químico e/ou eletroquímico para essa medida. A Figura 33 mostra o voltamograma obtido, com os picos anódico e catódico bem definidos, nos potenciais de $0,07 \text{ V}$ e $-0,07 \text{ V}$ respectivamente, além de uma magnitude alta de corrente, indicando uma boa condutividade elétrica, o que já era esperado por um eletrodo metálico. O valor de ΔE_p ($E_{\text{oxidação}} - E_{\text{redução}}$) foi próximo de $0,9 \text{ mV}$ e a relação entre I_{pc}/I_{pa} foi de $1,02$, indicando reversibilidade da sonda sobre a superfície do eletrodo. Não foram encontrados trabalhos na literatura que abordem a produção de eletrodos de platina pelas técnicas de fotolitografia e pulverização catódica para finalidades clínicas a fim de comparar os valores aqui obtidos.

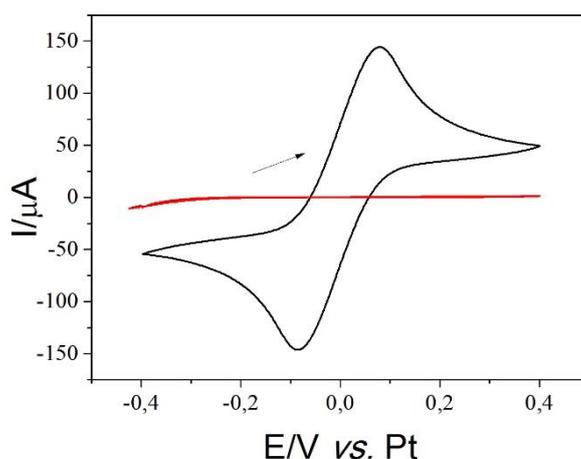


FIGURA 33 - Voltametria cíclica utilizando eletrodo de platina na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A área eletroativa do eletrodo de platina foi estimada através da equação de *Randles-Sevick* (Equação 1). A Figura 34 mostra os voltamogramas cíclicos e o comportamento linear obtidos a partir de uma gota de 35 μL de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura entre 20 e 350 mV s^{-1} . A área ativa obtida foi de $0,08 \text{ cm}^2$ a partir de uma área geométrica de $0,28 \text{ cm}^2$. A redução no valor de área ativa, quando comparada à área geométrica do eletrodo, pode ser consequência de defeitos obtidos durante a formação do filme sobre a superfície do eletrodo.

As caracterizações obtidas até o momento evidenciam a potencialidade do eletrodo de platina para construção de imunossensores, devido a sua elevada condutividade elétrica e boa resolução de pico.

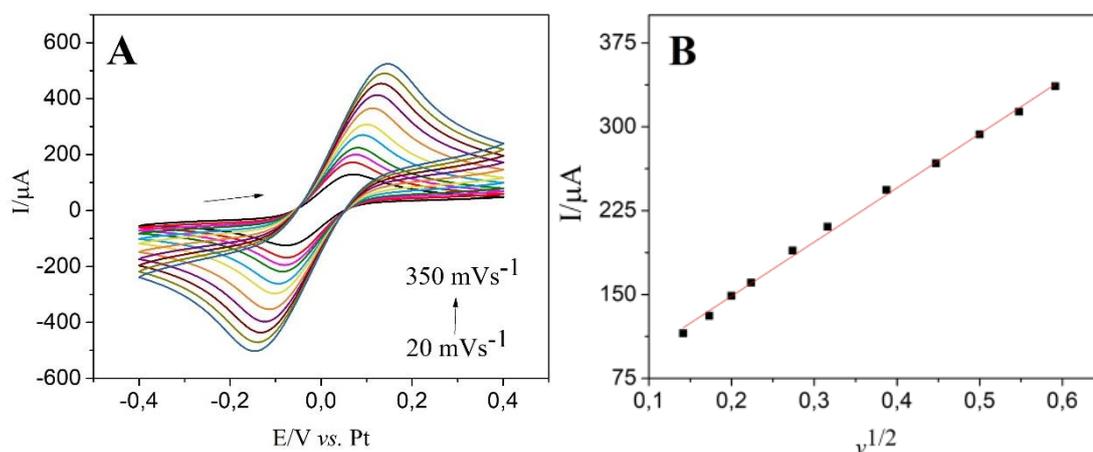


FIGURA 34 - (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo de platina a partir de uma gota de 35 μL de solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para diferentes velocidades de varredura: 20,30,40,50,75,100,150,200,250,300 e 350 mV s^{-1} . (B) Gráfico de pontos I vs. $v^{1/2}$, a partir da triplicata das medidas para cada velocidade.

Foi investigado o comportamento do eletrodo de platina em meio contendo H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ dentro da janela de potenciais entre $-1,0$ e $1,5 \text{ V}$. A Figura 35 mostra alguns dos picos característicos obtidos em um voltamograma cíclico, na velocidade de 100 mV s^{-1} . Comparando o voltamograma obtido com os comportamentos já estabelecidos na literatura evidencia-se nas regiões mais negativas a presença de um pico (1) proveniente da dessorção do hidrogênio e de um pico (2) proveniente da adsorção do hidrogênio. Segundo (Santos e Tremiliosi Filho, 2001) essa região de potenciais é sensível a orientação cristalográfica do material em questão, visto que diferentes estruturas superficiais de átomos apresentam energias distintas de adsorção de hidrogênio, o que justifica as mudanças entre os trabalhos consultados.

Para a região intermediária do voltamograma, ao qual apresenta corrente constante, não há transferência de carga entre o eletrodo e o meio, devido ao comportamento idealmente polarizável, apresentando apenas correntes capacitivas da dupla camada elétrica. As regiões mais positivas do voltamograma são relacionadas a oxidação da platina, dissociação da água e adsorção de espécies oxigenadas sobre a superfície do eletrodo. Observa-se um pico (3) proveniente da formação de óxidos, resultante da reação quase - reversível de formação da PtO (H₂O). (Angerstein-Kozłowska *et al.*, 1973; Poirier e Stoner, 1995; Kodera *et al.*, 2007) O pico característico da primeira etapa de oxidação da platina não pôde ser observado o que pode ser justificado pela decapagem do eletrodo durante as medidas voltamétricas, provavelmente indicando que o filme sobre o eletrodo possui uma espessura muito fina, sendo danificado na presença do meio ácido. As medidas foram realizadas em maiores concentrações de H₂SO₄, porém nenhum pico característico foi obtido devido à danificação do eletrodo ser mais rápida e severa.

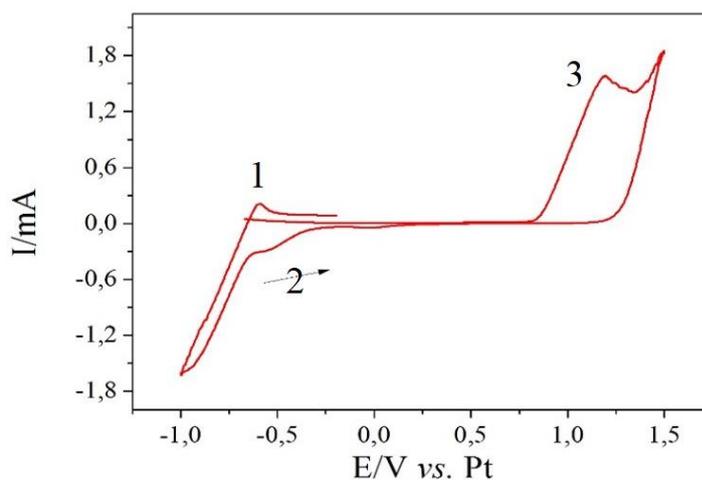


FIGURA 35 - Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de platina flexível em meio contendo H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, onde (1) Pico de dessorção do hidrogênio; (2) adsorção do hidrogênio e; (3) Formação de óxidos.

O eletrodo de platina também foi caracterizado na presença de DA. Foi realizado estudo de velocidades na presença de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0. A Figura 36A mostra os voltamogramas obtidos entre as velocidades de 10 e 100 mV s^{-1} . A Figura 36B mostra a linearidade obtida pela relação entre I_p vs. $\nu^{1/2}$, com um coeficiente de correlação de 0,99, expondo o comportamento difusional desse analito sobre a superfície do eletrodo.

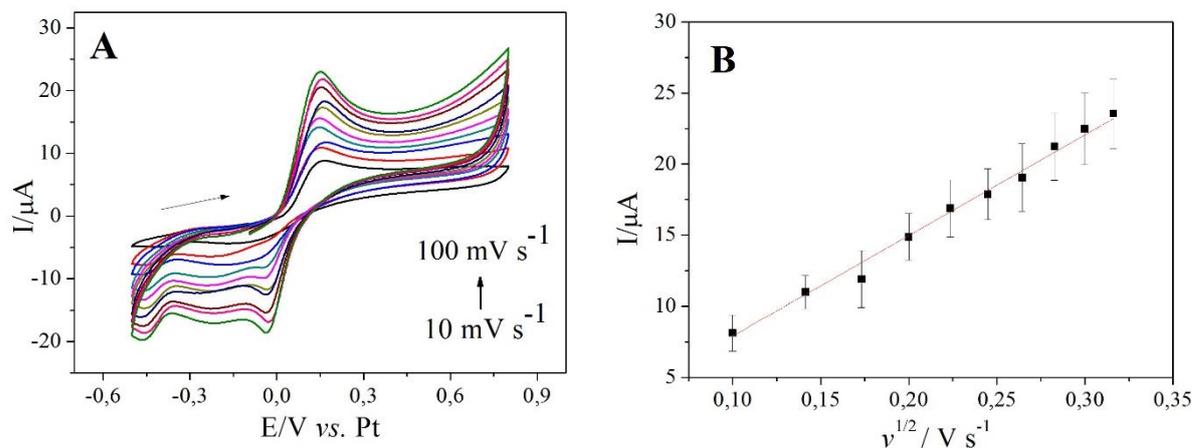


FIGURA 36 - Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo de platina a partir de uma gota de 35 μL de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 para diferentes velocidades de varredura: 10; 20; 30; 40; 50 ;60; 70; 80; 90 e 100 mV s^{-1} . (B) Gráfico de pontos I_p vs. $v^{1/2}$ para medidas em triplicata.

A reação de oxidação da dopamina ocorre através do mecanismo ECE (Figura 37) no qual, inicialmente observa-se a formação da espécie intermediária dopaminoquinona (1) envolvendo a reação de dois elétrons. Essa espécie intermediária passa por uma reação de adição intramolecular devido a desprotonação da amina, resultando em uma reação de ciclização com conseqüente produção do leucodopaminocromo (2), uma espécie mais facilmente oxidada que a DA. Devido a isso, facilmente se transforma em dopaminocromo (3) através da oxidação adicional de dois elétrons. Essa última espécie tem como característica a possibilidade de se polimerizar para compostos semelhantes a melanina sobre a superfície condutora, dificultando a transferência eletrônica. O par redox obtido em CV caracteriza o processo inicial de oxidação da molécula, onde é possível observar o processo reversível, com a presença do pico de redução. (Bahram *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010)

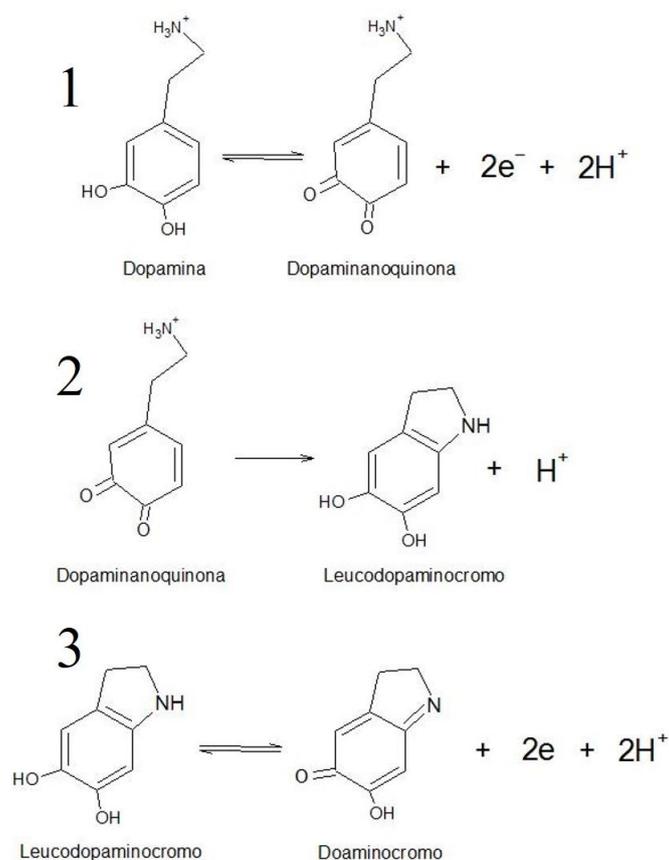


Figura 37. Ilustração indicando os processos que ocorrem durante a oxidação da dopamina obtendo-se as espécies (1) dopaminoquinona; (2) leucodopaminocromo e; (3) dopaminocromo.

A Figura 38 mostra um voltamograma cíclico na velocidade de 50 mV s^{-1} na presença de DA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 indicando o comportamento da molécula sobre a platina, ao qual um par redox de picos bem definidos é observado (I e I'). Esse par de picos é atribuído à formação da dopaminoquinona. Os valores de potencial obtidos foram de $E_a = 0,14 \text{ V}$ para oxidação e $E_c = -0,36 \text{ V}$ para redução enquanto os valores de correntes obtidos foram de $I_{pa} = 1,24 \times 10^{-5} \mu\text{A}$ e $I_{pc} = 8,14 \times 10^{-6} \mu\text{A}$. Outro pico (II) de redução pode ser visualizado no voltamograma, que pode ser atribuído ao processo de formação do dopaminocromo, obtido em $E_c = -0,23 \text{ V}$ com $I_{pc} = 1,04 \times 10^{-6} \mu\text{A}$. A ausência do pico de oxidação pode ser decorrente de uma janela de trabalho que não englobou o potencial dessa molécula. O processo de formação do leucodopaminocromo não pode ser observado por medidas de CV. (Caetano *et al.*, 2017)

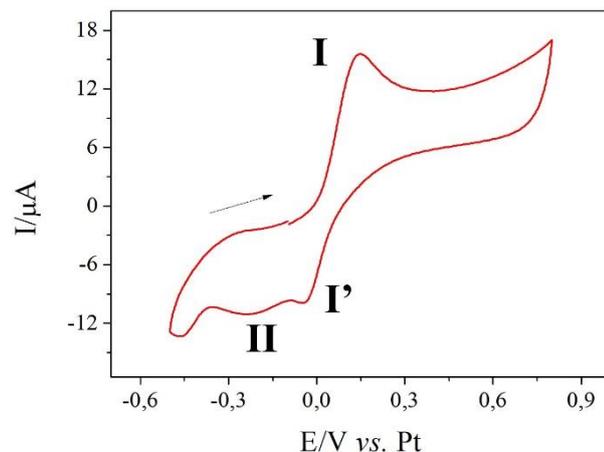


Figura 38. (A) Voltametria cíclica utilizando eletrodo de platina na presença de DA $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, $\nu = 50$ mV s⁻¹. (B) Reação de oxidação da dopamina.

Foi investigada a melhor técnica para detecção de DA. Na presença de DA $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, foram realizadas medidas utilizando as técnicas de DPV e SWV, ao qual foi possível obter uma melhor magnitude de corrente de pico anódica e uma melhor resolução para SWV, como mostrado na Figura 39.

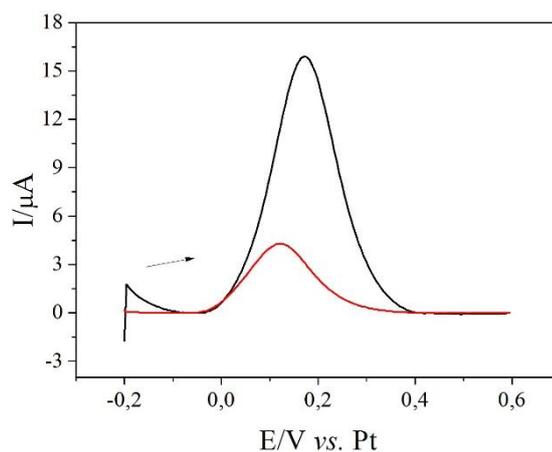


FIGURA 39 - Voltamogramas obtidos na presença de DA $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0 utilizando as técnicas de (●) DPV e (●) SWV. Parâmetros utilizados - DPV: $\Delta E_s = 0,005$ V; $a = 0,025$ V; $t = 0,05$ s; $t = 0,5$ s; SWV: $\Delta E_s = 0,005$ V ; $a = 0,02$ V; $f = 25$ Hz.

Utilizando a técnica de SWV, foi construída uma curva analítica na presença de diferentes concentrações de DA, a fim de mostrar a funcionalidade do eletrodo. Foi obtida uma linearidade, com coeficiente de 0,999 dentro da faixa de concentração de $3,5 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A equação da reta está indicada na Equação 5 e os voltamogramas e comportamento linear podem ser vistos na Figura 40.

$$I(A) = -5,9781 \times 10^{-7} + 0,01857C_{DA}(mg\ ml^{-1}) \quad \text{Equação 5}$$

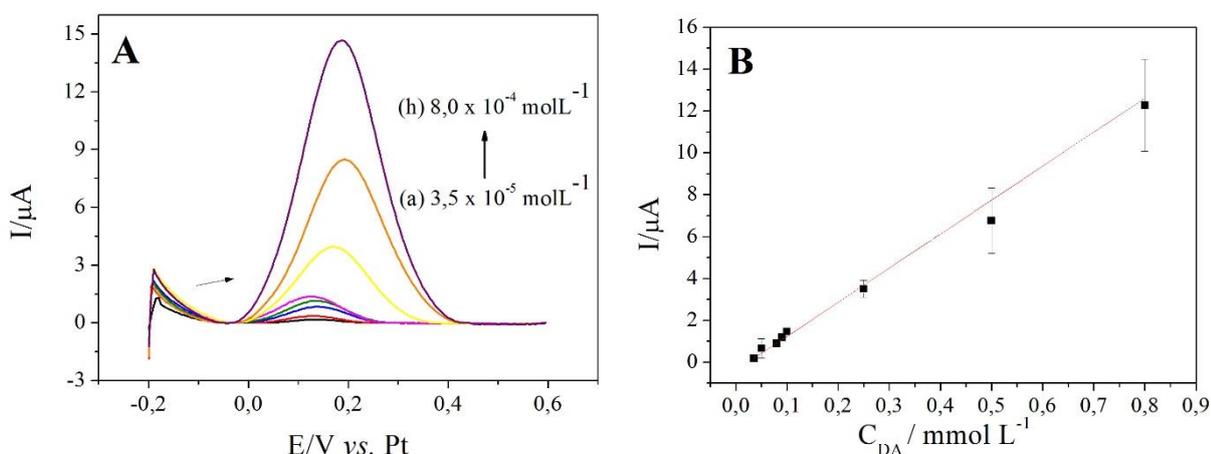


FIGURA 40 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos a partir de uma solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH 6,5) na presença de diferentes concentrações de dopamina: (a) $3,5 \times 10^{-5}$; (b) $5,0 \times 10^{-5}$; (c) $8,0 \times 10^{-5}$; (d) $9,0 \times 10^{-5}$; (e) $1,0 \times 10^{-4}$; (f) $2,5 \times 10^{-4}$; (g) $5,0 \times 10^{-4}$; (h) $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; (B) Curva analítica obtida para DA. Parâmetros de SWV: ΔE_s : 0,005 V; a : 0,02V; f : 25 Hz.

A validação dos eletrodos para esse analito foi realizada utilizando amostras de urina sintética fortificadas com DA utilizando a metodologia de adição e recuperação. A Tabela 6 mostra as concentrações e porcentagens obtidas.

TABELA 6 - Tabela contendo os valores de recuperação de DA em amostras de urina sintética em eletrodos de platina

Amostra	C_{DA} Adicionada (mol L⁻¹)	C_{DA} Recuperada (mol L⁻¹)	% Recuperada
1	$3,5 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-5}$	110
2	$5,0 \times 10^{-5}$	$4,8 \times 10^{-5}$	95,6
3	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-5}$	115
4	$8,0 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-5}$	103
5	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	102

Os resultados obtidos na detecção de DA, utilizando eletrodos flexíveis de platina sobre EcoPET, possibilitaram visualizar sua eficiência como sensor eletroquímico.

5.2. Avaliação mecânica dos eletrodos de platina

Dentre as possíveis modificações realizadas para a obtenção de diferentes tipos de dispositivos sensoriais a variação no substrato possui destaque principalmente quanto a procura por materiais mais acessíveis, com elevada resistência, flexibilidade, maleabilidade e boa interação com uma diversidade de processos. Dentre os materiais comumente utilizados para deposição metálica e fotolitografia estão o vidro (Ketov *et al.*, 2017) e a cerâmica (Kelly e Arnell, 2000) devido a boa aderência à pulverização metálica. Porém, sua alta rigidez impossibilita aplicações que necessitam de flexibilidade. Dentre os eletrodos flexíveis encontrados na literatura, destacam-se aqueles produzidos sobre a superfície de PET, (Reddy *et al.*, 2010; Narakathu *et al.*, 2013; Economou *et al.*, 2018) um polímero termoplástico de amplo uso pertencente à família dos polímeros de poliéster. Como uma alternativa mais sustentável, o EcoPET ou BioPET tem sua produção baseada em matérias-primas de origem vegetal, diferente dos derivados de petróleo da versão convencional, apresentando características similares de flexibilidade e maleabilidade, o tornando um relevante substituto. Apesar de ainda ser pouco explorado no Brasil, a versão mais sustentável do PET apresenta propriedades interessantes para ser utilizado como substrato flexível para sensores eletroquímicos. (Abipet, 2012; Storz, 2013)

Os eletrodos de platina foram avaliados quanto ao seu caráter flexível utilizando torção manual dos eletrodos. A Figura 41 mostra os teste realizados no dispositivo, ao qual foram

dobrados 10 vezes consecutivas, a fim de verificar possíveis danos sobre a superfície do material. Voltametria cíclica foi realizada em seguida aos testes mecânicos, na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com intenção de avaliar a perda de atividade de detecção após as dobras. Após as dobras nenhuma alteração física foi encontrada no eletrodo bem como, nenhuma modificação na magnitude de corrente, durante as medidas de CV, foi obtida, comprovando assim o caráter flexível dos eletrodos de platina aqui preparados.

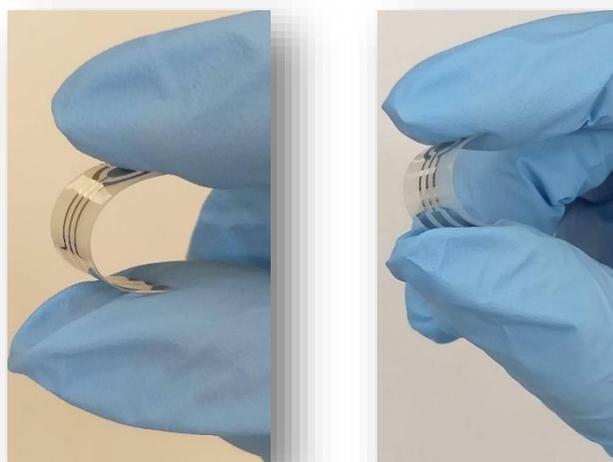


Figura 41. Processo de tensão mecânica aplicada sobre os eletrodos de platina através de dobras consecutivas.

5.3. Construção do imunossensor eletroquímico para detecção da proteína PARK7/DJ-1

A principal via para o diagnóstico da doença de Parkinson continua a ser marcada pela presença de distúrbios motores, sendo definido como o principal marcador para a doença. Porém, a sobreposição de sintomas com outras doenças degenerativas ainda é muito comum, o que proporciona diagnósticos errôneos e, até o momento, a autópsia continua a ser o momento definitivo para confirmação da doença. Outra questão de grande importância é o fato de que os sintomas motores começam a ficar presentes em estágios avançados da doença, ao qual mais de 50 % dos neurônios dopaminérgicos já estão perdidos, e com isso, algumas limitações para possíveis terapias ocorrem. (Delenclos *et al.*, 2016) A busca por biomarcadores que possibilitem diagnósticos cada vez mais precisos é de grande importância dentro do grupo das doenças neurodegenerativas. Uma vez que esses biomarcadores possam ser aplicados em tecnologias de rápida resposta, acessíveis, apresentando reprodutibilidade e acurácia – como o

caso dos biossensores eletroquímicos - se tornam de grande valia para o auxílio na melhoria de qualidade de vida dos pacientes e para o diagnóstico precoce. (Chahine e Stern, 2017)

A Proteína PARK7/DJ-1 foi escolhida nesse trabalho devido à sua frequente abordagem na literatura como um possível biomarcador para a doença de Parkinson, biomarcador esse passível de ser utilizado para diagnóstico precoce da doença de Parkinson familiar.(Canet-Avilés *et al.*, 2004; Ariga *et al.*, 2013) Utilizada como elemento de bioreconhecimento, a proteína pode formar imunocomplexos com seu anticorpo complementar, possibilitando estudar de forma quantitativa e qualitativa a presença de seus níveis anormais no organismo.

Como observação, as Figuras inseridas a partir daqui estão em tamanho aumentado, em relação ao restante do trabalho a fim de facilitar a identificação das informações nelas inseridas.

5.3.1. Construção da monocamada auto-organizada

Dentro do campo dos sensores eletroquímicos, há a presença dos chamados biossensores, dispositivos que respondem na presença de um elemento biológico, responsável por tornar o sistema seletivo e específico para o analito de interesse. Diferentes tipos de elementos biológicos podem ser utilizados como sequências de DNA, microorganismos, enzimas e, com destaque para esse trabalho, elementos imunológicos. (Grieshaber *et al.*, 2008) Chamados de imunossensores, são biossensores ao qual um anticorpo ou antígeno é imobilizado sobre a superfície do eletrodo, buscando a formação de um imunocomplexo com seu elemento complementar. (Santana *et al.*, 2017) Dentro do campo dos biossensores, os classificados como diretos apresentam grandes vantagens de custo e simplicidade, visto não precisarem de elementos adicionais que auxiliem na detecção da molécula alvo. Imunossensores diretos – ou não-marcados – tem como princípio a supressão de sinal de corrente à medida que o imunocomplexo é formado sobre a superfície do eletrodo, formando uma barreira à transferência eletrônica. Para que a formação do imunocomplexo seja eficaz, a imobilização do material biológico deve ser eficiente e, para isso, algumas metodologias de modificação da superfície do eletrodo são utilizadas.(Moina e Ybarra, 2012; Cristea *et al.*, 2015)

A etapa de imobilização do anticorpo inicia-se pela construção de uma rede rígida de reticulação ao qual possui o objetivo de ceder grupos funcionais que auxiliem na ligação entre a superfície metálica e o material biológico. A metodologia aqui utilizada é bem difundida na

literatura, baseando-se na construção de uma monocamada formada pela interação entre a cistamina (CYS) e o glutaraldeído (GA), geralmente utilizada para eletrodos de ouro. Primeiramente CYS foi adsorvida pela superfície de platina através de seus grupos tiol. Essa interação é bem difundida para superfícies de ouro, mas pode ser justificada da mesma forma para superfícies de platina, como visto no estudo de (Lang *et al.*, 1998). Nas superfícies de ouro, a formação da interação grupo tiol-metal ocorre primeiramente pela formação de ligações coordenadas entre -SH e ouro. Posteriormente ocorre dissociação dessa ligação, resultando em um radical tiila e consequente formação da ligação covalente ouro-tiolato. (Xue *et al.*, 2014) Ligadas à superfície metálica, as moléculas de CYS fornecem grupos amino primário livres em sua outra extremidade, ao qual interagem com uma das extremidades de carbonila do glutaraldeído. Já na outra extremidade de GA um grupo aldeído fica livre para realizar a ligação com o grupo amina presente na molécula do anticorpo. (Ferreira *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2014) Os estudos para montagem da monocamada auto-organizadas utilizou as concentrações de 10 mmol L⁻¹ e 5,0 mmol L⁻¹ para CYS e GA respectivamente, ao qual foram baseadas em trabalhos anteriores do grupo.

Os estudos para montagem da monocamada auto-organizadas utilizou as concentrações de 10 mmol L⁻¹ e 5,0 mmol L⁻¹ para CYS e GA respectivamente, ao qual foram baseadas em trabalhos anteriores do grupo.

Inicialmente 8 µL de solução de CYS 10 mmol L⁻¹ foram gotejadas sobre a superfície de trabalho do eletrodo, à temperatura ambiente (27°C), com tempo de interação de 1 hora. Após, a superfície foi lavada indiretamente com tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0 a fim de retirar o excesso de solução. O primeiro parâmetro estudado foi o tempo de interação de GA com a superfície modificada do eletrodo. A otimização do tempo de interação é de grande importância a fim de garantir que toda a superfície do eletrodo fique recoberta pelo modificante. Outro ponto importante a ser considerado aqui é o mínimo tempo de produção do dispositivo garantindo um dispositivo mais acessível. Um volume de 8 µL de solução de GA 5,0 mmol L⁻¹ foi gotejada sobre a superfície de trabalho modificada com CYS. Foram avaliados dois tempos de interação, 1 e 2 horas, em vista da mudança significativa de resistência a transferência elétrica para esse parâmetro. Medidas de EIS, na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, foram utilizadas a fim de investigar o comportamento para os diferentes tempos, como mostrado na Figura 42. É possível observar que um maior tempo de interação do glutaraldeído com a superfície aumenta o arco de resistividade, retardando o efeito de difusão. Essa avaliação possibilitou verificar que um controle falho durante o tempo de interação de GA pode afetar

diretamente a padronização dos resultados, sucedendo em modificações posteriores mais resistivas. A partir disso foi fixado o tempo de interação do GA em 1 hora.

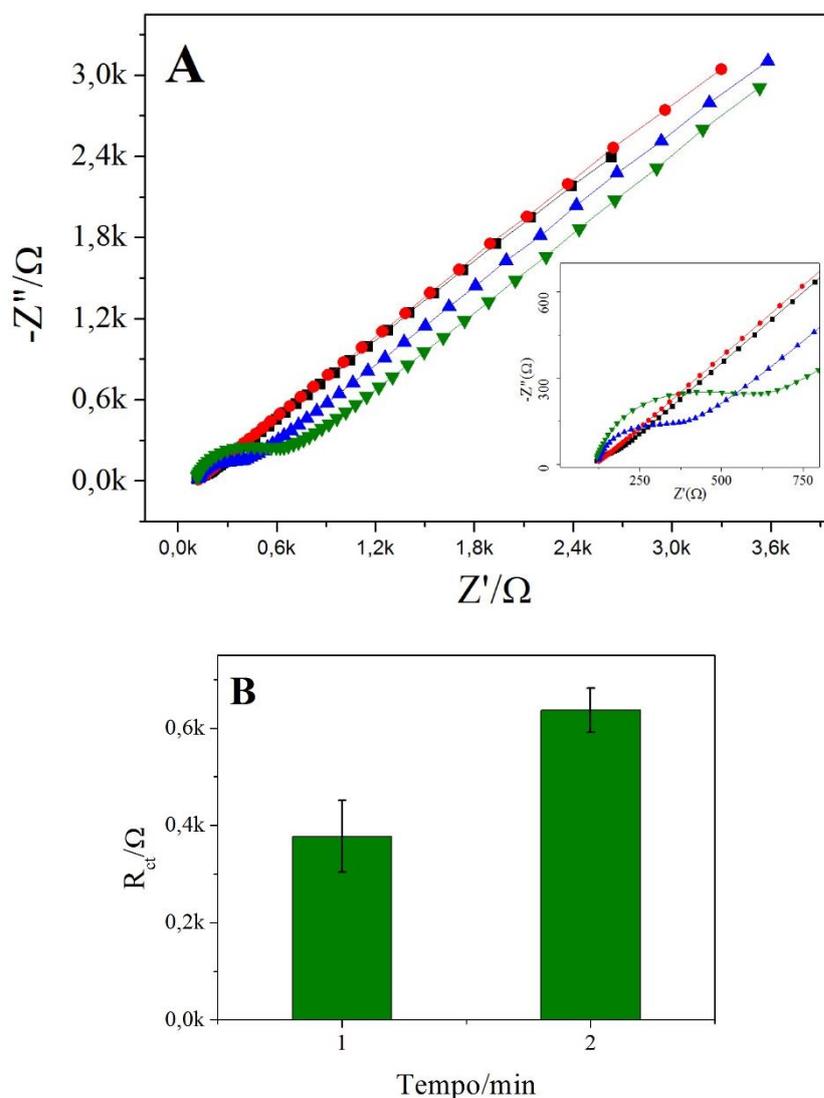


FIGURA 42 – (A) Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do (●) eletrodo de platina (Pt), (●) Pt -CYS, (●) Pt-CYS-GA (1h) e (●) Pt-CYS-GA (2h). (B) Gráfico de barras

Ainda relacionado ao GA, a literatura apresenta informações quanto a interferência que o solvente tem sobre o comportamento do GA e sua função de reticulação. (Jones, 1974) No trabalho de (Migneault *et al.*, 2004) é apontada a faixa ampla de pH – pH maiores que 3,0 - ao qual o glutaraldeído reage reversivelmente com grupos amino. Porém a estreita faixa entre pH 7,0 e 9,0 é uma exceção, onde apenas uma pequena reversibilidade é observada. A Figura 43 mostra os diagramas de Nyquist obtidos para um estudo considerando soluções de GA

preparadas em água Milli-Q e tampões fosfato 0,2 mol L⁻¹ nos pH 4,4; 7,0 e 8,6. O comportamento obtido mostra que soluções de GA preparadas em pH 8,6 apresentam um semicírculo com diâmetro maior, em relação às outras soluções, supondo-se que a rede de reticulação formada sobre o eletrodo foi melhor estruturada e assim, a resistência sobre o eletrodo foi maior. Isso ajuda na afirmação da eficácia da ligação do GA às moléculas de CYS presentes sobre o eletrodo. Outra observação de importância para esta questão baseia-se na repetibilidade para os diferentes pH. Os pHs 7,0 e 8,6 mostraram uma melhor repetibilidade do comportamento quanto comparado as soluções em pH ácido e em água Milli-Q não tamponada. Isso pode ser devido ao fato do pH 8,6 estar dentro da faixa de pouca reversibilidade, discutida acima, impossibilitando a quebra de possíveis ligações com a superfície e assim, tornando essa interação mais estável.

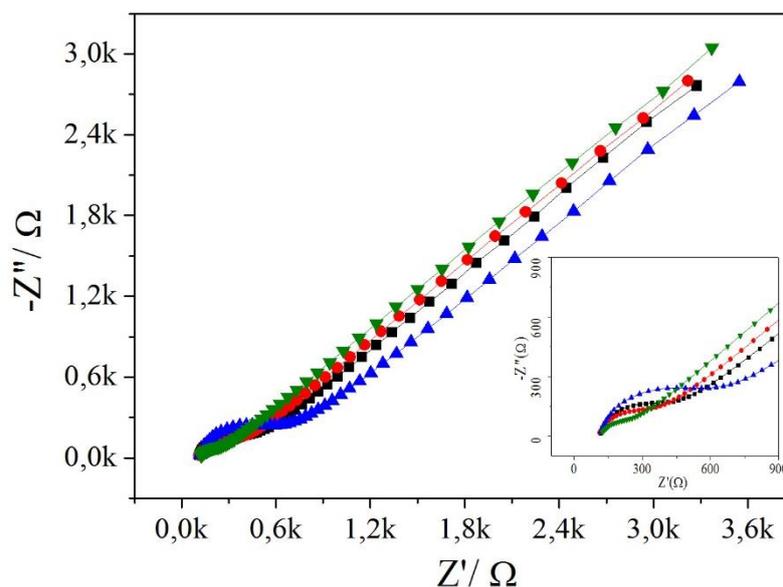


FIGURA 43 - Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ mostrando a resposta obtida para soluções de GA preparadas em (●) água Mili-Q, (●) tampão fosfato pH 4,4, (●) tampão fosfato pH 7,0 e, (●) tampão fosfato pH 8,6.

5.3.2. Imobilização do anticorpo

Os testes posteriores buscaram investigar a eficácia na formação da SAM realizando a imobilização do anticorpo (AB) e posterior formação do complexo antígeno-anticorpo. A imobilização do anti-PARK7/DJ-1 ocorreu através do gotejamento de 8 μL da solução do AB

4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a superfície do eletrodo de trabalho por um tempo de interação de 2 horas. Os parâmetros iniciais de estudo - tempo e concentração - foram baseados em trabalhos anteriores do grupo (Figueiredo *et al.*, 2015; Brazaca *et al.*, 2018) e metodologias de análises já comercializadas – KIT ELISA - considerando as concentrações de analito a serem detectadas. Após a imobilização do anticorpo e de lavagem com tampão (para retirada do excesso de

solução), foi gotejado um volume de 8 μL de solução de proteína PARK7/DJ-1 90 ng mL^{-1} sobre a superfície do eletrodo de trabalho por um tempo de interação de 2 horas.

EIS foi utilizada para avaliar a resposta a resistência de transferência de carga após a interação de cada componente com a superfície metálica. Na Figura 44 são mostrados os diagramas de Nyquist obtidos após a imobilização do anticorpo e formação do complexo. Constatou-se um comportamento similar de melhoria da transferência de carga, quando na presença da cistamina, isto é, uma prevalência do efeito difusivo sobre o resistivo. Esse comportamento está ligado a protonação da amina em solução, que proporciona a formação de uma camada de carga positiva e consequente atração da sonda eletroquímica, ocasionando uma pequena diminuição no valor da impedância. (Figueiredo *et al.*, 2015) Quando adicionado o glutaraldeído, o arco de resistividade aumenta, indicando um bloqueio a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo de platina e a solução. A medida que a imobilização do anticorpo é realizada e a interação com a proteína ocorre, o arco de resistividade continua a aumentar, indicando um bloqueio na transferência de carga, o que pode ser interpretado como uma eficiente formação da monocamada auto-organizada bem como do imunocomplexo.

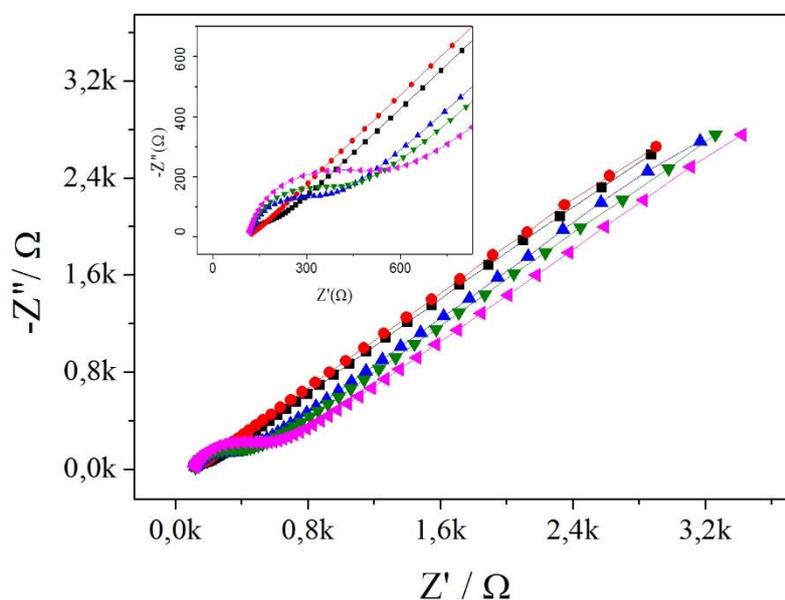


FIGURA 44 - Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ do (●) eletrodo de platina (Pt), (●) Pt -CYS, (●) Pt-CYS-GA, (●) Pt-CYS-GA-AB e (●) Pt-CYS-GA-AB-AT.

A Figura 45 ilustra o circuito equivalente que representa a formação do complexo antígeno-anticorpo sobre a superfície do eletrodo de platina. Os valores de resistência obtidos são determinados a partir do ajuste de determinados pontos no diagrama de Nyquist ao circuito do tipo Randles. É possível extrair desse esquema informações de relevância como o valor da resistência da solução trabalhada (R_s), valor da resistência à transferência de carga (R_{ct}) e valor da capacitância da dupla camada (C_{dc}) além da impedância de Warburg (W) – referente ao comportamento difusional das espécies eletroativas.

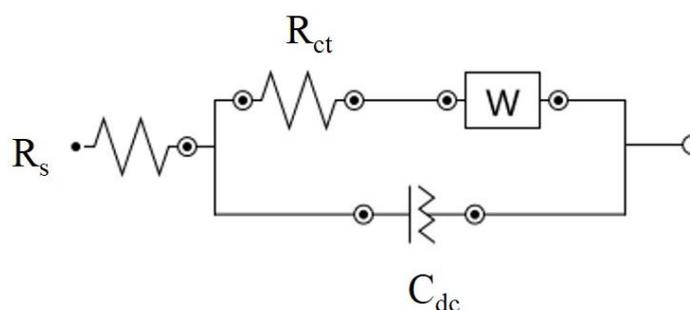


FIGURA 45 - Circuito equivalente representando a formação do imunocomplexo sobre a superfície do eletrodo de platina.

Posteriormente a comprovação da eficácia da ligação do anticorpo sobre a superfície do eletrodo, buscou-se otimizar sua concentração de trabalho. A otimização da concentração é fundamental para a obtenção de um sensor eficiente posto que a modificação utilizando concentrações abaixo da necessária pode gerar uma superfície com moléculas muito distantes entre si, possibilitando que reações inespecíficas ocorram, seja com moléculas interferentes, seja com outras camadas imobilizadas. Já para soluções muito acima do necessário, as moléculas tendem a ficarem agrupadas, possibilitando um impedimento estérico e das interações necessárias para a que a imobilização ocorra. Foram estudadas as concentrações de 1; 2; 4; 6 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Brazaca, 2015). A Figura 46 mostra os diagramas de Nyquist das diferentes concentrações estudadas e o gráfico de pontos, considerando R_{ct} . Foi selecionada a concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ devido ao maior pico referente a R_{ct} , que garante a modificação da superfície do eletrodo, possivelmente garantindo uma maior sensibilidade ao sensor.

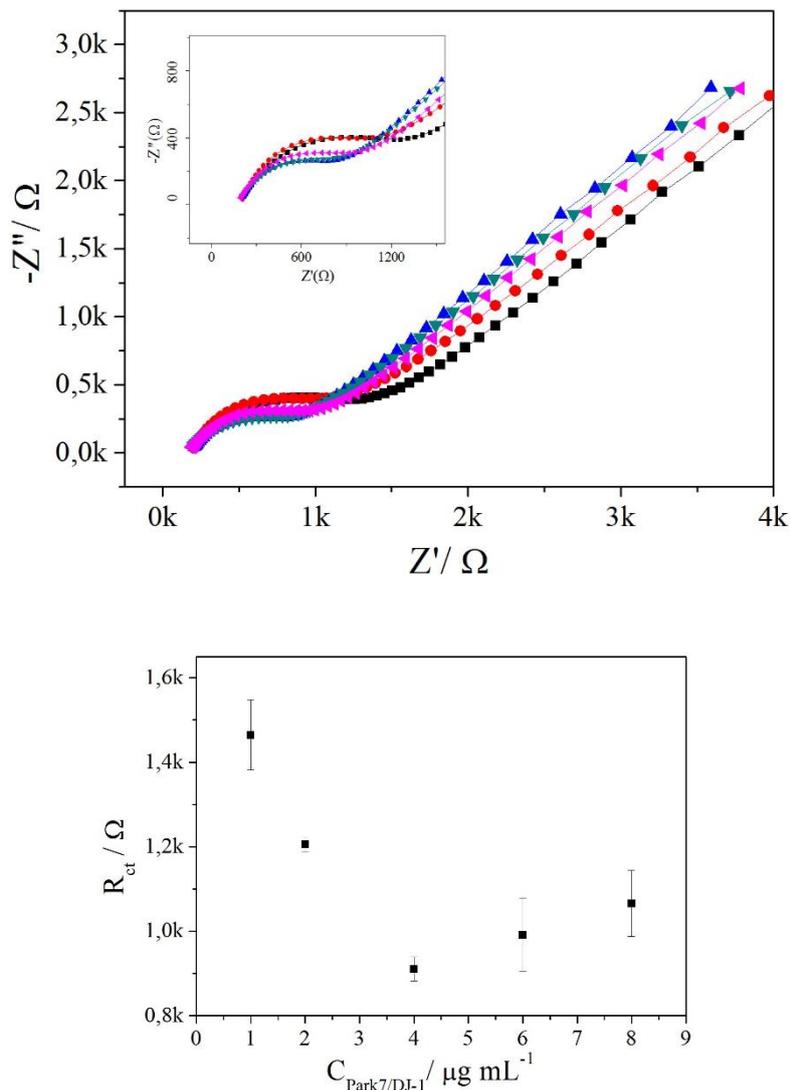


FIGURA 46 - Diagramas de Nyquist no potencial de 0,03 V na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para as concentrações de (●) $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (●) $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, (●) $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (●) $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e (●) $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo anti-PARK7/DJ-1.

Outro parâmetro estudado para a otimização do imunossensor foi a investigação do tempo de interação do anticorpo sobre a superfície do eletrodo. Utilizando a concentração previamente otimizada de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anticorpo, foram realizadas medidas na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 47 mostra a resposta obtida em R_{ct} para os diferentes tempos estudados. Observa-se que houve uma tendência de aumento da resistência à medida que o tempo aumentou, indicando que mais moléculas do anticorpo foram incorporadas a superfície do eletrodo. O tempo final escolhido foi de 90 minutos. Tempos maiores não foram avaliados considerando o tempo de produção do sensor, ao qual maiores

tempos de interação geram dispositivos mais demorados e menos acessíveis. Também, com base na literatura, poucos imunossensores utilizam tempos maiores que 2 horas.

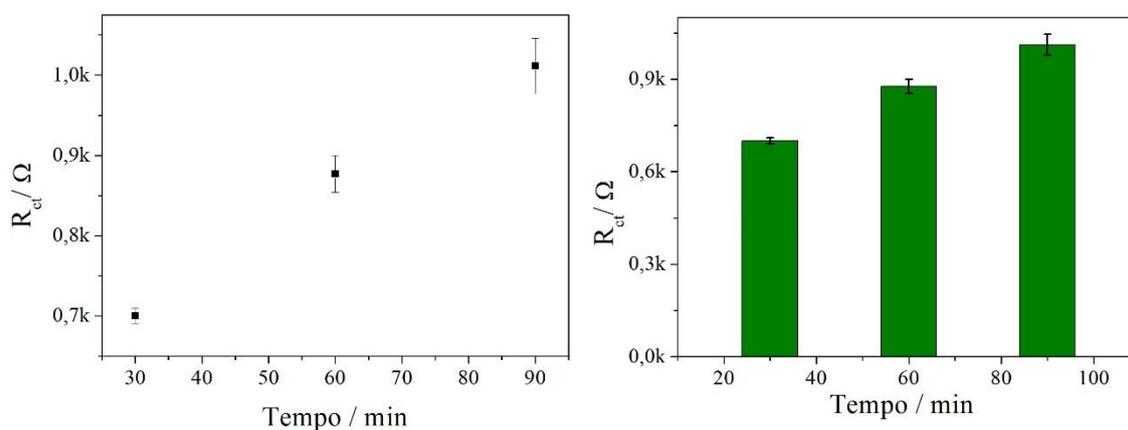


FIGURA 47 - Estudo do tempo ideal de interação entre anti-PARK7/DJ-1 e a superfície do eletrodo considerando o valor de R_{ct} , na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

5.3.3. Detecção de PARK7/DJ-1

A Figura 48A mostra o esquema de modificação do eletrodo de platina buscando a detecção da proteína PARK7/DJ1-1 utilizando os parâmetros anteriormente otimizados e as concentrações pré-determinadas. A medida que os elementos de formação da monocamada, o anticorpo e a proteína interagem com a superfície do eletrodo o valor de R_{ct} tende a aumentar (Figura 48B), indicando uma maior dificuldade na transferência à passagem de carga, sugerindo uma eficaz modificação, imobilização e detecção da proteína alvo.

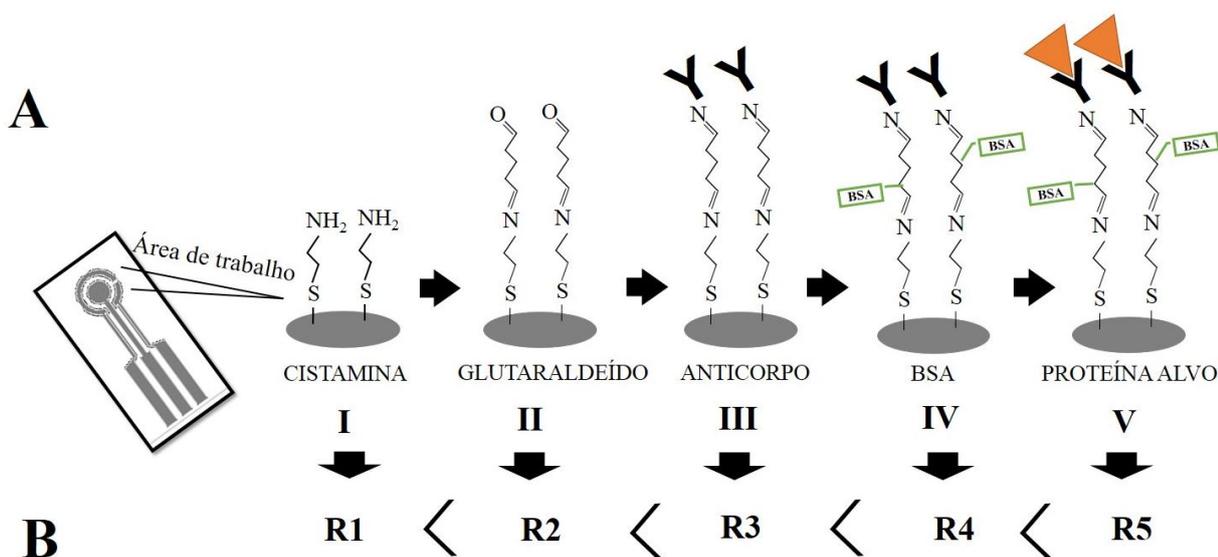


FIGURA 48 - (A) Esquema de preparo do imunossensor onde: (I) Interação do grupo tiol de CYS com a superfície metálica; (II) Interação do GA com CYS; (III) imobilização do anticorpo (AB) sobre o eletrodo, por meio da interação dos seus grupos amina com o grupo carboxila de GA; (IV) interação do BSA com as extremidades livres do agente reticulante e; (V) formação do complexo antígeno-anticorpo. (B) Princípio de funcionamento do biossensor ao qual a resistência a transferência de carga aumenta à medida que novas interações com a superfície são adicionadas, formando um bloqueio à transferência eletrônica.

Levando em conta essa relação, foi investigado o comportamento do sensor frente à diferentes concentrações de PARK7/DJ-1, incluindo os níveis considerados normais e anormais presentes na literatura. Uma curva analítica foi construída, obtendo-se um comportamento linear dentro da faixa de 40 ng mL⁻¹ a 150 ng mL⁻¹. A Equação 6 mostra a equação da reta obtida para essa curva, com um coeficiente de correlação de 0,978. A Figura 49 mostra os

Diagramas de Nyquist para diferentes concentrações da proteína. É possível ver um aumento no valor de R_{ct} a medida que a concentração da proteína aumenta, indicando uma formação eficaz do complexo antígeno-anticorpo.

$$I(A) = 234,24 + 4,82[\text{PARK7/DJ-1}](ng\ ml^{-1})$$

Equação

6

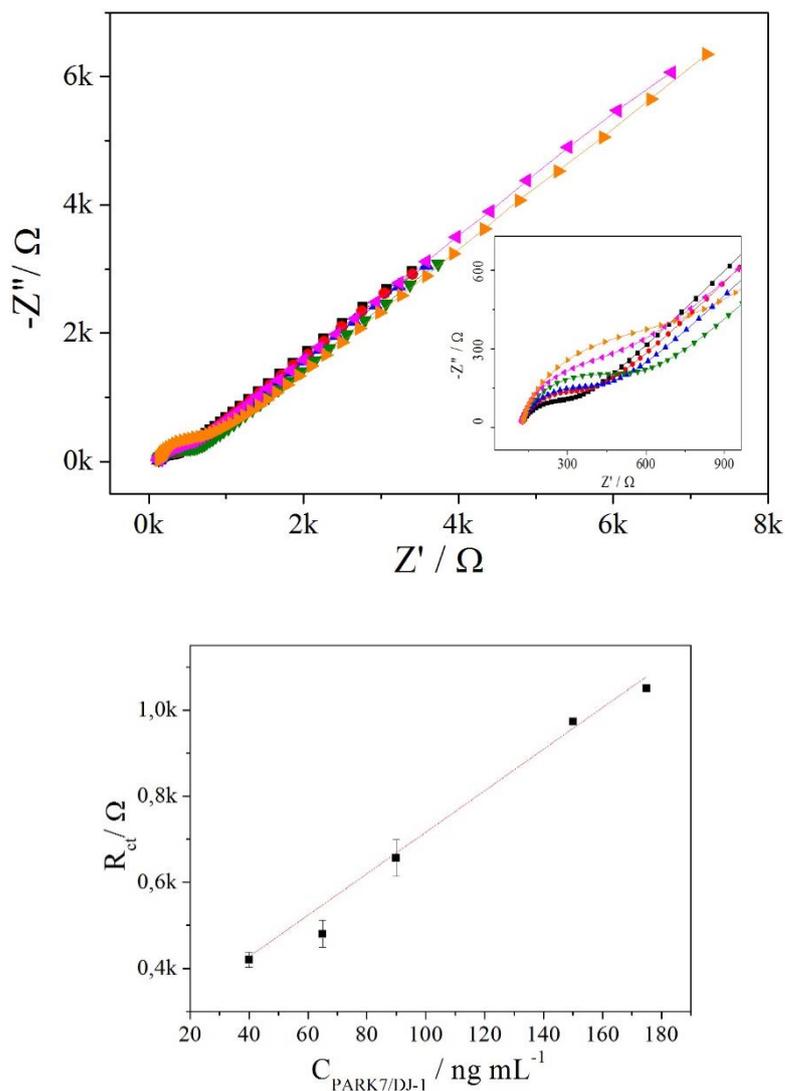


FIGURA 49 - Diagramas de Nyquist e curva de calibração para o imunossensor construído sobre eletrodo de platina para as concentrações de, (●) 40 $ng\ mL^{-1}$, (●) 65 $ng\ mL^{-1}$, (●) 90 $ng\ mL^{-1}$ e (●) 150 $ng\ mL^{-1}$, (●) 175 $ng\ mL^{-1}$, mostrando aumento do valor de R_{ct} quando comparados ao (●) anticorpo.

Estudos foram realizados na presença de BSA a fim de aumentar a seletividade do biossensor. O BSA é utilizado como bloqueador de sítios inespecíficos, interagindo com as extremidades livres dos agentes de reticulação, auxiliando em uma melhor seletividade do

biossensor. O BSA foi preparado em tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹, pH 7,0, utilizando-se um tempo de interação de 10 minutos. A Figura 50 mostra os diagramas de Nyquist para as concentrações de 40 e 120 ng mL⁻¹ de proteína na presença do agente de bloqueio. É possível verificar um aumento no valor de R_{ct} na presença do BSA, o que provem da carga negativa que apresenta quando em pH neutro. Para as duas concentrações estudadas houve aumento no valor de R_{ct}, indicando eficácia na ligação da proteína com a superfície do eletrodo, mesmo na presença do BSA.

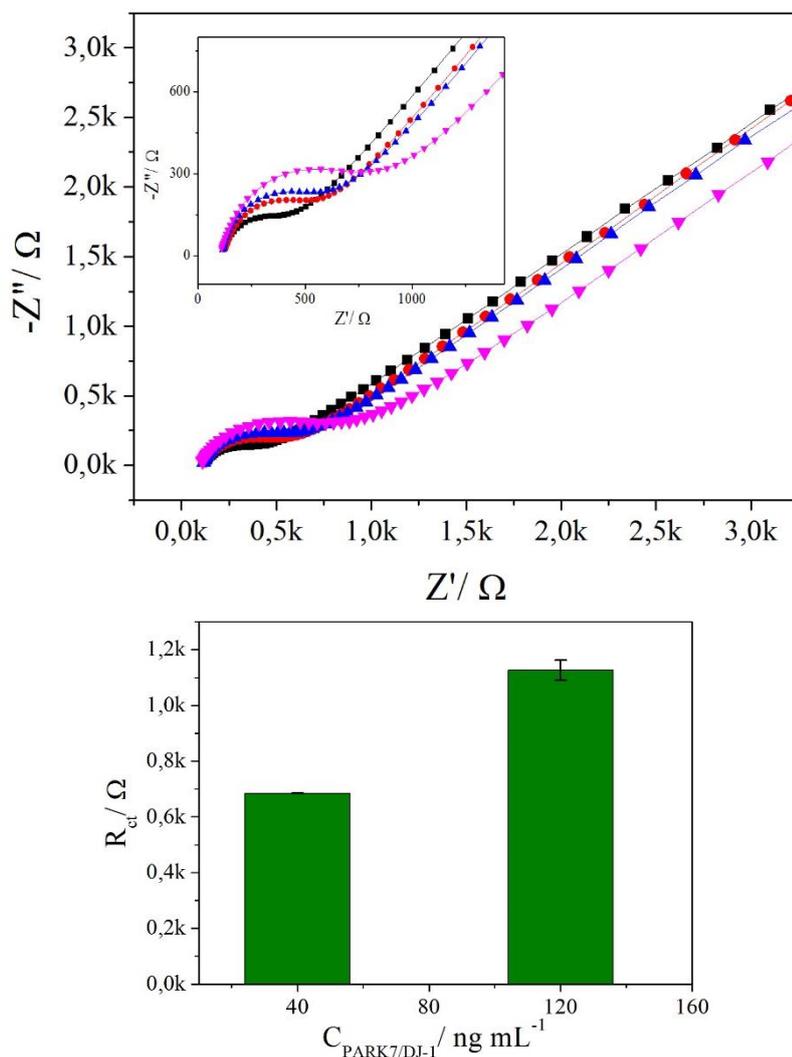


FIGURA 50 - Diagramas de Nyquist e relação da concentração de proteína e R_{ct} para o imunossensor construído sobre eletrodo de platina para as concentrações de, (●) 40 ng mL⁻¹ e (▲) 120 ng mL⁻¹, mostrando aumento do valor de R_{ct} quando comparados ao (●) anticorpo e ao BSA (●). Gráfico de barras mostrando o aumento significativo nos valores de R_{ct} para as duas concentrações estudadas. Medidas realizadas na presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0×10⁻³ mol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹

Quanto aos resultados obtidos até aqui, é possível afirmar que a modificação da superfície do eletrodo de platina com agente reticulante e imobilização do anticorpo anti-PARK7/DJ-1 foi capaz de detectar com sucesso a presença da proteína PARK7/DJ-1, tornando esse biossensor, em primeiro lugar, um dispositivo qualitativo para essa molécula. A construção de uma curva de calibração englobando as concentrações reais da proteína torna promissor o uso deste biossensor na detecção de níveis anormais de PARK7/DJ-1 no organismo humano. A Tabela 7 mostra os parâmetros finais utilizados para construção do imunossensor e as informações obtidas durante os estudos de detecção.

TABELA 7 - Parâmetros otimizados e informações obtidas na construção e aplicação do biossensor

	Reagente	Concentração	Tempo
Parâmetros de otimização selecionados	Cisteamina	10 mmol L ⁻¹	60 min
	Glutaraldeído	2,5%	60 min
	Anti PARK7/DJ-1	1 µg mL ⁻¹	90 min
	BSA	0,01 mol L ⁻¹	10 min
	Curva de calibração	Faixa Linear de trabalho	R²
Deteção da PARK7/DJ-1	Sem BSA	40 ng mL ⁻¹ a 150 ng mL ⁻¹	R ² = 0,978.

A reprodutibilidade do biossensor foi avaliada na concentração de 90 ng mL⁻¹ da proteína, através da comparação das medidas de 4 eletrodos distintos realizadas em diferentes dias. Para a repetibilidade, foram realizadas 3 medidas consecutivas, em um mesmo eletrodo, na concentração de 65 ng mL⁻¹ da proteína. A Figura 51 mostra os diagramas de Nyquist obtidos para as medidas para ambos os estudos.

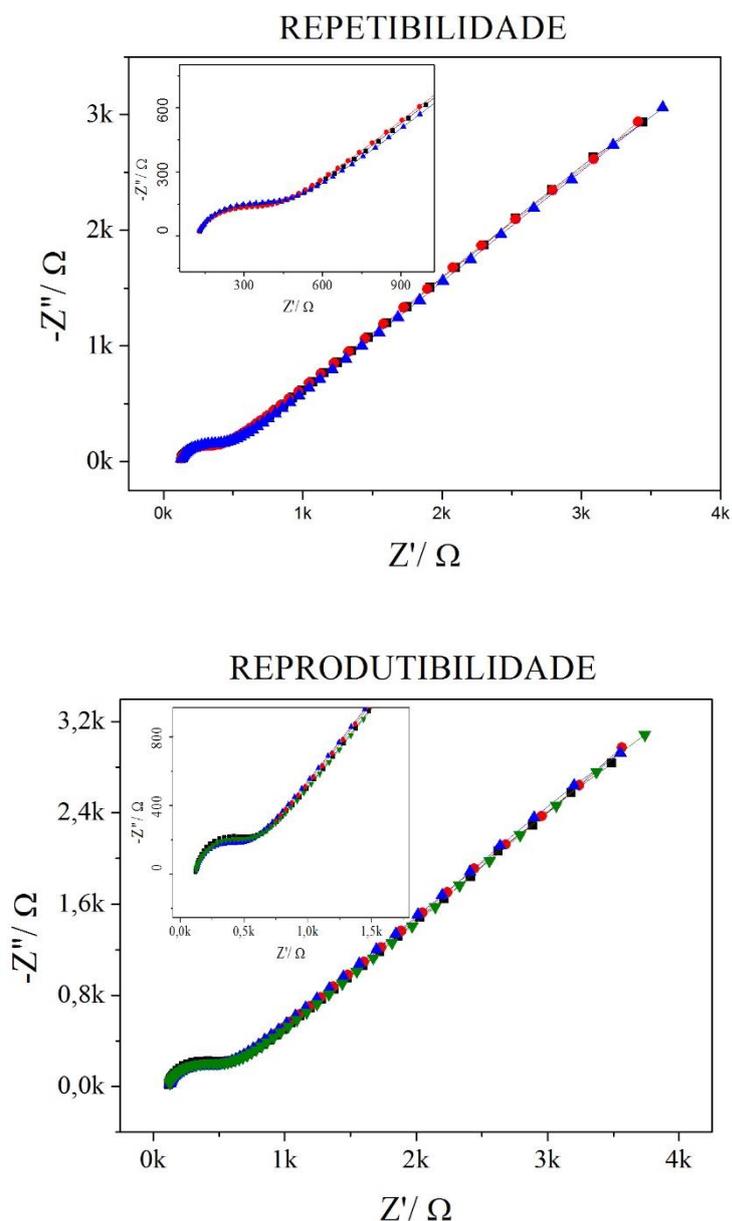


FIGURA 51 - Diagramas de Nyquist obtidos para os estudos de repetibilidade ($n = 3$) e reprodutibilidade ($n = 4$) do biossensor na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em KCl $0,1$ mol L^{-1} .

Respectivamente para repetibilidade ($n = 3$) e reprodutibilidade ($n = 4$), foram obtidos os valores de desvio padrão relativo (do inglês *relative standard deviation*, RSD) de 6,6 % e 5,3 %, valores esses que encontram-se de acordo com os trabalhos em literatura para imunossensores, na faixa de concentração aqui trabalhada. (Brazaca *et al.*, 2016; Brazaca *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2018) Para que esses valores conseguissem atingir porcentagens menores pode ser considerado como fonte do erro principalmente a obtenção manual dos valores de R_{ct} – através do software NOVA – o que impossibilita uma padronização

nessa etapa além de diferenças no preparo das soluções de modificadores, anticorpo e proteína, ao qual foram preparadas diariamente para o uso. Devido a técnica ser sensível quanto às mínimas interferências externas, espera-se que a melhoria nessas, e outras questões capazes de ocasionar perturbações do sistema, possam melhorar a reprodutibilidade do dispositivo.

5.3.4. Caracterizações morfológicas

As caracterizações morfológicas foram realizadas tanto no eletrodo não modificado de platina quanto no imunossensor já finalizado, buscando investigar a homogeneidade na produção do eletrodo de platina e as mudanças ocorridas sobre a sua superfície após a imobilização do material biológico. A Figura 52A mostra a imagem da superfície do eletrodo de platina, no aumento de 35 vezes, indicando uma homogeneidade na deposição do metal sobre toda a extensão do eletrodo de trabalho. Porém, maiores aproximações possibilitaram presenciar imperfeições em algumas regiões, como buracos - ao qual a platina não foi depositada (Figura 52B) - bem como acúmulo de platina, formando depósitos de metal em alto relevo (Figura 52C). Essas imperfeições podem ocasionar alguns contratemplos como: problemas na reprodutibilidade do sensor, devido a interferência que a ausência e o excesso de platina pode ocasionar durante a transferência de carga; problemas durante a imobilização do material biológico, ocorrendo perdas do mesmo nas regiões sem a presença da platina; acúmulo de material com possível atividade de interferência, principalmente sobre as superfícies de PET expostas; respostas variadas para uma mesma modificação da superfície impossibilitando uma padronização ideal para construção do imunossensor. Apesar das imperfeições visualizadas, a maior parte da superfície da platina mostrou-se homogênea e lisa, possibilitando concluir que as técnicas de fotolitografia e pulverização catódica são vias interessantes para a produção de eletrodos sobre superfícies lisas e flexíveis. Melhorias na otimização de parâmetros de processo como tempo de pulverização ou tempo de exposição na presença da máscara seriam algumas opções a serem consideradas. Outra opção seria a utilização de um equipamento de *sputtering* na presença de um campo magnético, possibilitando um melhor direcionamento das partículas durante a pulverização. Imagens de MEV foram obtidas para os imunossensores, na presença do imuno-complexo (Figura 52D). É possível observar a formação de um filme particulado sobre a superfície da platina, indicando uma possível modificação da superfície do eletrodo. Técnicas com um maior aumento são necessárias a fim de obter caracterizações mais específicas sobre a composição do filme e sua integridade.

Medidas de EDS e mapeamento químico foram realizados a fim de complementar os resultados obtidos em MEV. A Figura 52E mostra o mapeamento realizado na superfície da imperfeição da Figura 52B o que possibilitou verificar uma maior concentração do elemento C na região danificada e uma menor presença de Pt, indicando uma exposição da folha de EcoPET pela falha na pulverização do metal. A Figura 52F mostra a distribuição dos elementos na superfície do eletrodo, com destaque para o carbono do material polimérico, cromo, utilizado a fim de dar aderência a platina e diminuir a possibilidade de corrosão do metal superficial e platina.

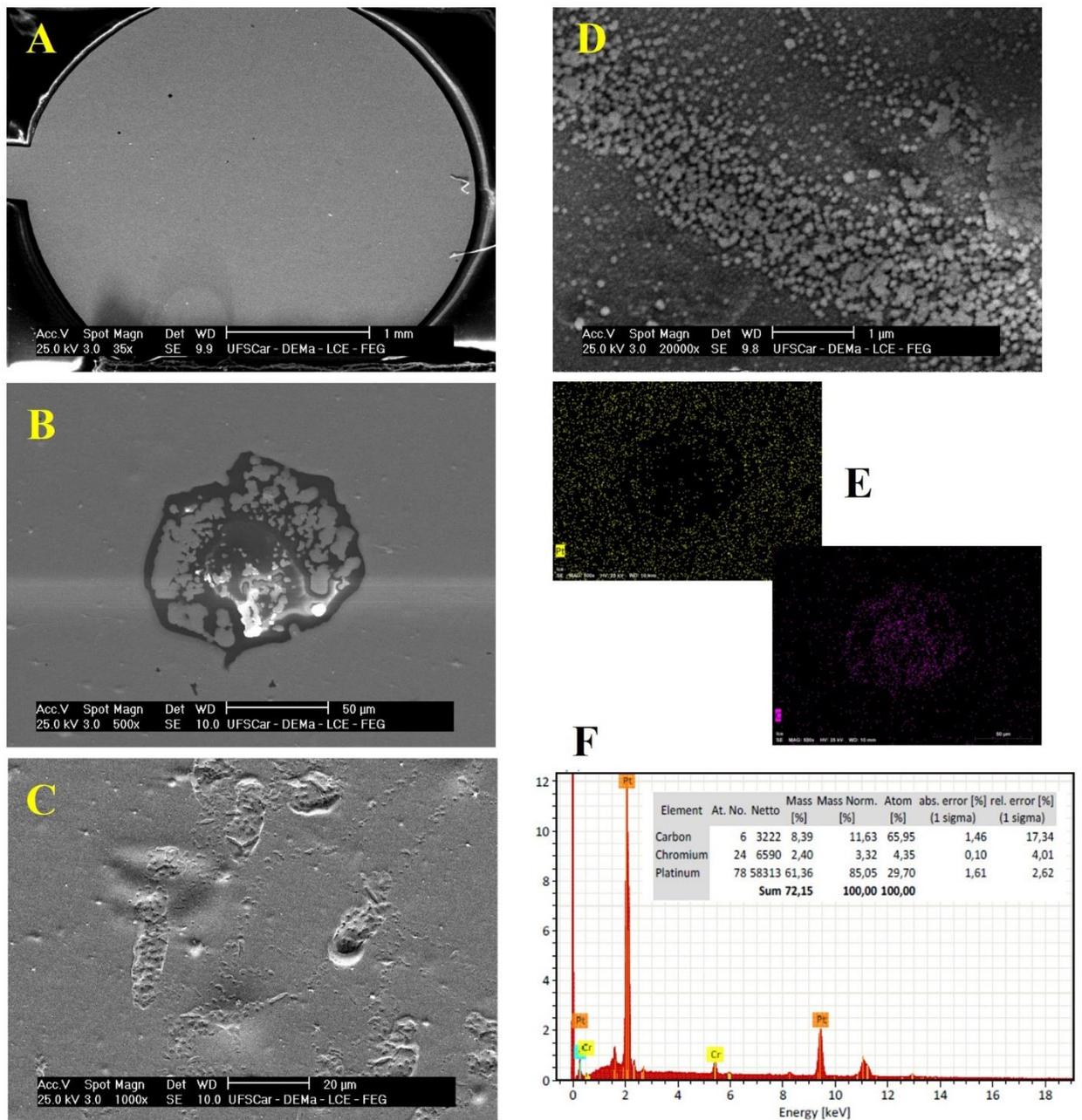


Figura 52. Imagens de MEV do (A) eletrodo de platina não modificado no aumento de 35 x; (B e C) eletrodo de platina não modificado no aumento de 500 x e 1000 x com destaque para regiões com imperfeições no filme metálico; (D) eletrodo de platina modificado, na presença do imuno-complexo no aumento de 20k vezes; (E) mapeamento químico com destaque para as regiões predominantes dos elementos platina (amarelo) e carbono (rosa) e; (F) gráfico de EDS com a distribuição dos elementos Pt, C e Cr sobre a superfície do eletrodo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho buscou-se o desenvolvimento de diferentes tipos de sensores e biossensor com finalidades clínicas com foco para marcadores e biomarcadores relacionados a doença de Parkinson. Os estudos basearam-se na obtenção de dispositivos flexíveis que possibilitassem uma futura aplicação *in situ*, tendo como uma das bases a tecnologia dos eletrodos vestíveis.

A utilização da luva nitrílica como substrato para o desenvolvimento de dispositivos com finalidades vestíveis mostrou-se promissora visto que atende as exigências de flexibilidade, estabilidade e não toxicidade necessárias para esse tipo de sensor. O desenvolvimento de uma tinta laboratorial composta por glicerol – como substância de função plastificante – mostrou ser adequada para esse tipo de material, apresentando uma boa interação entre ambos. O glicerol possibilitou que a tinta apresentasse movimentação similar ao substrato, concedendo a mesma flexibilidade o suficiente para que o conjunto substrato + tinta fosse passível de ser aplicado como dispositivo vestível, sem perda da qualidade de detecção ou craquelamento da tinta. Os resultados obtidos durante a detecção de dopamina mostraram que essa nova arquitetura sensorial é capaz de realizar medidas reprodutíveis, abrindo portas para ser utilizada para outras finalidade.

A utilização do esparadrapo como substrato flexível possibilitou verificar a capacidade que superfícies porosas possuem na detecção de diferentes substâncias. O comportamento durante a etapa de serigrafia, para luva nitrílica e esparadrapo, foi diferenciada devido a presença de poros na fita adesiva médica, tornando a disposição da tinta sobre os materiais distinta e ocasionando diferentes valores quanto à área eletroativa estimada, por exemplo. Essa diferença de interação tinta - substrato também foi verificada durante a detecção de hemoglobina, ao qual ambos substratos mostraram comportamentos muito distintos. O eletrodo de esparadrapo forneceu boas respostas tanto para dopamina quanto para hemoglobina, mostrando ser um dispositivo promissor para detecções eletroquímicas e, além, devido a suas características maleáveis, um interessante substrato para outros tipos e detecções.

A produção de eletrodos de finos filmes de platina sobre a superfície de folhas de BioPET ainda não havia sido abordada em literatura, utilizando as técnicas de fotolitografia e pulverização catódica. Os eletrodos obtidos no trabalho apesar de apresentarem imperfeições microscópicas, mostraram ser reprodutíveis, sendo que essa reprodutibilidade pode ser melhorada através de otimizações em parâmetros de produção.

Quanto ao desenvolvimento do imunossensor, a utilização da metodologia de formação de monocamadas auto-organizadas foi eficiente para a imobilização do anticorpo anti-PARK7/DJ-1 sobre a superfície do eletrodo, mostrando boa reprodutibilidade em todas as etapas de modificação da superfície. Ressalta-se aqui a importância no preparo das soluções de glutaraldeído, visto ser uma reagente complexo, formando diferentes subprodutos a medida que o pH do meio é alterado. Tendo em vista a boa condutividade da platina, foi possível distinguir as diferentes respostas das concentrações de proteína analisadas, a partir da resistência a passagem de corrente.

A utilização de materiais flexíveis como base para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos vem aumentando e, com isso, os trabalhos aqui apresentados são de grande importância a fim de adicionar evidências positivas sobre esse tipo de dispositivo. Por fim, o trabalho foi concluído com a obtenção de dois sensores vestíveis produzidos pela técnica de serigrafia com tintas condutoras a base de esmalte, capazes de detectar com sucesso dopamina e hemoglobina em solução bem como, com a obtenção de um imunossensor sobre eletrodos flexíveis de platina, para a detecção do biomarcador de Parkinson PARK7/DJ-1. Ambos eletrodos mostraram ser aplicáveis para análises *in situ*, possibilitando serem uma alternativa para a detecção desses analitos.

PERPECTIVAS SOBRE O TRABALHO

Os estudos aqui desenvolvidos abrem a possibilidade para que novos tipos de eletrodos vestíveis possam ser desenvolvidos utilizando diferentes tipos de substratos com caráter flexível, bem como novas formulações de tintas condutoras, buscando redução de custos e aplicações diversas, considerando componentes acessíveis e de baixa toxicidade.

Otimizações nos dispositivos aqui desenvolvidos podem ser consideradas a fim de aplicá-los como uma tecnologia *point-of-care*, considerando o desenvolvimento de um sistema completo que possa ser utilizado diretamente no paciente, sem a necessidade de aparelhagem complexa.

Por fim, otimizações no processo das técnicas de fotolitografia e *cathodic sputtering* podem fornecer eletrodos melhor padronizados, possibilitando que outros biossensores possam ser desenvolvidos sobre substratos flexíveis metalizados, garantindo um novo tipo de dispositivo para a imobilização de materiais biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, R. D. et al. Late-life hemoglobin and the incidence of Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging**, v. 33, n. 5, p. 914-920, 2012 Disponível em: < 10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.023 >.

ABDULBARI, H. A.; BASHEER, E. A. M. Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication. **Chem. Bio. Eng. Reviews**, v. 4, n. 2, p. 92-105, 2017 Disponível em: < doi:10.1002/cben.201600009 >.

ABIPET. Resina PET - Fabricação. 2012. Disponível em: < <http://www.abipet.org.br/index.html?method=mostrarInstitucional&id=65> >. Acesso em: 04 abril.

ADAMS, J. L.; LA MORGIA, C. The search for Parkinson disease biomarkers. **Neurology**, v. 91, n. 11, p. 493-494, 2018 Disponível em: < 10.1212/WNL.00000000000006148 >.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p. 311-331, 2009 Disponível em: < 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120307 >.

AKYILMAZ, E.; DINÇKAYA, E. A novel non-competitive amperometric immunosensor by using thiourea-glutaraldehyde-modified gold electrode for immunoglobulin M detection. **Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.**, v. 41, n. 6, p. 389-394, 2013 Disponível em: < 10.3109/21691401.2012.761227 >.

ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sens. Actuators, B**, v. 69, n. 1, p. 153-163, 2000 Disponível em: < 10.1016/S0925-4005(00)00536-0 >.

ALHADRAMI, H. A. Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 65, n. 3, p. 497-508, 2018 Disponível em: < 10.1002/bab.1621 >.

AMPELLI, C. et al. Novel electrochemical sensors for safety and control in fermentation processes. **Chem. Eng. Trans**, v. 36, p. 319-324, 2014 Disponível em: < 10.3303/CET1436054 >.

ANEESH, K.; BERCHMANS, S. Highly selective sensing of dopamine using carbon nanotube ink doped with anionic surfactant modified disposable paper electrode. **J. Solid State Electrochem.**, v. 21, n. 5, p. 1263-1271, 2017 Disponível em: < 10.1007/s10008-016-3482-2 >.

ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, H.; CONWAY, B. E.; SHARP, W. B. A. The real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces: Part I. Resolution of component processes. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.**, v. 43, n. 1, p. 9-36, 1973 Disponível em: < 10.1016/S0022-0728(73)80307-9 >.

ARIGA, H.; IGUCHI-ARIGA, S. M. M. **DJ-1/PARK7 Protein: Parkinson's Disease, Cancer and Oxidative Stress-Induced Diseases**. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2017. ISBN 978-981-10-6583-5. Disponível em: < 10.1007/978-981-10-6583-5 >

ARIGA, H. et al. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. **Oxid. Med. Cell. Longevity**, v. 2013, p. 683920-683920, 2013 Disponível em: < 10.1155/2013/683920 >.

AZAM, M. S. et al. Review: Advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants **Nusantara Bioscience** v. 6, n. 2, p. 186-195 2014 Disponível em: < 10.13057/nusbiosci/n060212 >.

BAHRAM, M.; FARHADI, K.; ARJMAND, F. Voltammetric determination of dopamine in the presence of ascorbic and uric acids using partial least squares regression: determination of dopamine in human urine and plasma. **Cent. Eur. J. Chem.**, v. 7, n. 3, p. 524-531, 2009 Disponível em: < 10.2478/s11532-009-0057-4 >.

BANDODKAR, A. J.; JIA, W.; WANG, J. Tattoo-Based Wearable Electrochemical Devices: A Review. **Electroanalysis**, v. 27, n. 3, p. 562-572, 2015 Disponível em: < 10.1002/elan.201400537 >.

BANDODKAR, A. J. et al. Solid-state Forensic Finger sensor for integrated sampling and detection of gunshot residue and explosives: towards 'Lab-on-a-finger'. **Analyst**, v. 138, n. 18, p. 5288-5295, 2013 Disponível em: < 10.1039/c3an01179h >.

BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. **Trends Biotechnol.**, v. 32, n. 7, p. 363-371, 2014 Disponível em: < 10.1016/j.tibtech.2014.04.005 >.

BANKS, C. E.; FOSTER, C. W.; KADARA, R. O. Fundamentals of Screen-Printing Electrochemical Architectures. In: (Ed.). **Screen-Printing Electrochemical Architectures**: Springer International Publishing, 2016. cap. 2, p.13-23. (SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology).10.1007/978-3-319-25193-6

BANKS, C. E.; FOSTER, C. W.; KADARA, R. O. **Screen-Printing Electrochemical Architectures**. Springer International Publishing, 2016. ISBN 978-3-319-25193-6. Disponível em: < 10.1007/978-3-319-25193-6 >

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2. John Wiley & Sons, 2000. ISBN 978-0-471-04372-0.

BARON, J.; SILVA-BERMUDEZ, P.; RODIL, S. Sputtered Bismuth thin films as trace metal electrochemical sensors. **MRS Online Proc. Libr.**, v. 1477, 2013 Disponível em: < 10.1557/opl.2012.1722 >.

BAWADUKJI, N. A.; JABRA, R. Formulation, Preparation, and Mechanical Characterization of Nitrile-Butadiene Rubber (NBR) Composites. **Mater. Sci.: Indian J.**, v. 15, n. 1, p. 116, 2017

BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 6, p. 65-74, 2014 Disponível em: < 10.2741/S415 >.

BERKOWSKI, K. L. et al. Introduction to Photolithography: Preparation of Microscale Polymer Silhouettes. **J. Chem. Educ.**, v. 82, n. 9, p. 1365, 2005 Disponível em: < 10.1021/ed082p1365 >.

BERTRAND, M. J. Voltammetric Techniques. In: SETTLE, F. A. (Ed.). **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**: American Chemical Society, v.120, 1998. p.709-725.10.1021/ja975671k

BRAZACA, L. C. **Desenvolvimento de um sistema para o diagnóstico precoce do diabetes mellitus tipo 2**. 2015. (Mestrado). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP)

BRAZACA, L. C. et al. An antibody-based platform for melatonin quantification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 94-100, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.colsurfb.2018.07.006 >.

BRAZACA, L. C. et al. Transmembrane Protein-Based Electrochemical Biosensor for Adiponectin Hormone Quantification. **Chem. Electro. Chem.**, v. 3, n. 6, p. 1006-1011, 2016 Disponível em: < 10.1002/celec.201600099 >.

BRETT, A. M. O.; MATYSIK, F.-M.; VIEIRA, M. T. Thin-film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection. **Electroanalysis**, v. 9, n. 3, p. 209-212, 1997 Disponível em: < 10.1002/elan.1140090304 >.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications** OUP Oxford, 1993. ISBN 978-0198553885.

BROWNLEE, J. **Antigen-antibody interaction**. Faculty of Information and Communication Technologies, Swinburne University of Technology. Melbourne, Australia. 2007. (Technical Report 070427A)

BUCHER, E. S.; WIGHTMAN, R. M. Electrochemical Analysis of Neurotransmitters. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 8, p. 239-261, 2015 Disponível em: < 10.1146/annurev-anchem-071114-040426 >.

BUJES-GARRIDO, J.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Development of a wearable electrochemical sensor for voltammetric determination of chloride ions. **Sens. Actuators, B**, v. 240, p. 224-228, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.snb.2016.08.119 >.

BÜRGI, T. Properties of the gold-sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. **Nanoscale**, v. 7, n. 38, p. 15553-15567, 2015 Disponível em: < 10.1039/C5NR03497C >.

BYRNES, S. A.; WEIGL, B. H. Selecting analytical biomarkers for diagnostic applications: a first principles approach. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2018 Disponível em: < 10.1080/14737159.2018.1412258 >.

CAETANO, F. R. et al. Gold nanoparticles supported on multi-walled carbon nanotubes produced by biphasic modified method and dopamine sensing application. **Sens. Actuators, B**, v. 243, p. 43-50, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.snb.2016.11.096 >.

CANET-AVILÉS, R. M. et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 24, p. 9103-9108, 2004 Disponível em: < 10.1073/pnas.0402959101 >.

CERNAT, A. et al. Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 886, p. 16-28, 2015 Disponível em: < 10.1016/j.aca.2015.05.044 >.

CHAHINE, L. M.; STERN, M. B. Parkinson's Disease Biomarkers: Where Are We and Where Do We Go Next? **Mov. Disord.(clinical practice)**, v. 4, n. 6, p. 796-805, 2017 Disponível em: < 10.1002/mdc3.12545 >.

CHANG, B.-Y.; PARK, S.-M. Electrochemical Impedance Spectroscopy. **Annu. Rev. Anal. Chem.**, v. 3, n. 1, p. 207-229, 2010 Disponível em: < 10.1146/annurev.anchem.012809.102211 >.

CHEN, S.-M.; PENG, K.-T. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films. **J. Electroanal. Chem.**, v. 547, n. 2, p. 179-189, 2003 Disponível em: < 10.1016/S0022-0728(03)00220-1 >.

CINTI, S.; MOSCONE, D.; ARDUINI, F. Screen-printed electrodes as versatile electrochemical sensors and biosensors. 2017 IEEE East-West Design & Test Symposium (EWDTS), 2017, 29 Sept.-2 Oct. 2017. p.1-4.10.1109/EWDTS.2017.8110130

COUTO, R. A. S. et al. SAM-Based Immunosensor for the Analysis of Thyroxine (T4). **J. Electrochem. Soc.**, v. 164, n. 4, p. B103-B106, 2017 Disponível em: < 10.1149/2.0561704jes >.

CRISTEA, C. et al. Immunosensors. In: RINKEN, T. (Ed.). **Biosensors - Micro and Nanoscale Applications**: IntechOpen, 2015.10.5772/60524

CZECH, Z.; KOWALCZYK, A. Pressure-Sensitive Adhesives for Medical Applications. In: AKYAR, I. (Ed.). **Wide Spectra of Quality Control**: InTech, 2011. cap. 17.10.5772/23827

DE ARAUJO ANDREOTTI, I. A. et al. Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. **J. Electroanal. Chem.**, v. 840, p. 109-116, 2019 Disponível em: < 10.1016/j.jelechem.2019.03.059 >.

DELENCLOS, M. et al. Biomarkers in Parkinson's disease: Advances and strategies. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 22 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S106-S110, 2016 Disponível em: < 10.1016/j.parkreldis.2015.09.048 >.

DENG, Q. et al. Lower hemoglobin levels in patients with parkinson's disease are associated with disease severity and iron metabolism. **Brain Res.**, v. 1655, p. 145-151, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.brainres.2016.11.007 >.

DENNLER, P.; FISCHER, E.; SCHIBLI, R. Antibody Conjugates: From Heterogeneous Populations to Defined Reagents. **Antibodies**, v. 4, n. 3, p. 197-224, 2015 Disponível em: < 10.3390/antib4030197 >.

DEPLA, D.; MAHIEU, S.; GREENE, J. E. Sputter Deposition Processes. In: MARTIN, P. M. (Ed.). **Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings** 3. Boston: William Andrew Publishing, 2010. cap. 5, p.253-296.10.1016/B978-0-8155-2031-3.00005-3

DIAS, I. A. R. B. et al. Determination of Epinephrine at a Screen-Printed Composite Electrode Based on Graphite and Polyurethane. **J. Anal. Bioanal. Tech.**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2017 Disponível em: < 10.4172/2155-9872.1000350 >.

DIVISION, G. O. **Glycerine: an overview**. Terms, technical data, properties, performance. New York. 1990

DORSEY, E. R. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol.**, v. 17, n. 11, p. 939-953, 2018 Disponível em: < 10.1016/S1474-4422(18)30295-3 >. Acesso em: 2019/04/05.

DOS SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determination of Hydroquinone with a Carbon Nanotube/Polyurethane Resin Composite Electrode. **Anal. Lett.**, v. 49, n. 10, p. 1513-1525, 2016 Disponível em: < 10.1080/00032719.2015.1113416 >.

ECKOLD, G. Materials and Properties. In: ECKOLD, G. (Ed.). **Design and Manufacture of Composite Structures**: Woodhead Publishing, 1994. cap. 2, p.20-48.10.1533/9781845698560.20

ECONOMOU, A.; KOKKINOS, C.; PRODRMIDIS, M. Flexible plastic, paper and textile lab-on-a chip platforms for electrochemical biosensing. **Lab on a Chip**, v. 18, n. 13, p. 1812-1830, 2018 Disponível em: < 10.1039/C8LC00025E >.

EMAMZADEH, F. N.; SURGUCHOV, A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. **Front. Neurosci.**, v. 12, p. 612-612, 2018 Disponível em: < 10.3389/fnins.2018.00612 >.

FAYEMI, O. E. et al. Electrochemical sensor for the detection of dopamine in real samples using polyaniline/NiO, ZnO, and Fe3O4 nanocomposites on glassy carbon electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 818, p. 236-249, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.jelechem.2018.02.027 >.

FERREIRA, A. A. P. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. **J. Electroanal. Chem.**, v. 634, n. 2, p. 111-122, 2009 Disponível em: < 10.1016/j.jelechem.2009.07.018 >.

FERRER, I. et al. Neuronal Hemoglobin is Reduced in Alzheimer's Disease, Argyrophilic Grain Disease, Parkinson's Disease, and Dementia with Lewy Bodies. **J. Alzheimer's Dis.**, v. 23, n. 3, p. 537-550, 2011 Disponível em: < 10.3233/JAD-2010-101485 >.

FIGUEIREDO, A. et al. Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 7865, 2015 Disponível em: < 10.1038/srep07865 >.

FLAHERTY, D. K. Antibodies. In: FLAHERTY, D. K. (Ed.). **Immunology for Pharmacy**. Saint Louis: Mosby, 2012. cap. 9, p.70-78.10.1016/B978-0-323-06947-2.10009-4

FLETCHER, S. Screen-Printed Carbon Electrodes. In: ALKIRE, R. C.;BARLETT, P. N., *et al* (Ed.). **Electrochemistry of carbon electrodes**. Weinheim: Wiley, 2015. p.425-444.10.1002/9783527697489.ch12

FOTIADIS, D. I.; GLAROS, C.; LIKAS, A. Wearable Medical Devices. In: AKAY, M. (Ed.). **Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering**, 2006.10.1002/9780471740360.ebs1326

FRASIER, M.; KANG, U. J. Parkinson's Disease Biomarkers: Resources for Discovery and Validation. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, p. 241, 2013 Disponível em: < 10.1038/npp.2013.246 >.

FREED, J.; CHAKRABARTI, L. Defining a role for hemoglobin in Parkinson's disease. **NPJ Parkinsons Dis.**, v. 2, p. 16021, 2016 Disponível em: < 10.1038/npparkd.2016.21 >.

GARCIA-GARCIA, F. J. et al. Non-enzymatic Glucose electrochemical sensor made of porous NiO thin films prepared by reactive magnetron sputtering at oblique angles. **Electrochim. Acta**, v. 201, p. 38-44, 2016 Disponível em: < 10.1016/j.electacta.2016.03.193 >.

GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells, Mol., Dis.**, v. 70, p. 13-42, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.bcmed.2017.10.006 >.

GIARDINA, B. et al. The Multiple Functions of Hemoglobin. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 3, p. 165-196, 1995 Disponível em: < 10.3109/10409239509085142 >.

GLADYSZ, J.; MICHL, J. Electrochemistry - An Introduction. **Chem. Rev.**, v. 90, n. 5, p. 689-689, 1990 Disponível em: < 10.1021/cr00103a600 >.

GOBEAUX, F. et al. Power law rheology and strain-induced yielding in acidic solutions of type I-collagen. **Soft Matter**, v. 6, n. 16, p. 3769-3777, 2010 Disponível em: < 10.1039/B922151D >.

GRAHAM, J.; HOBSON, D.; PONNAMPALAM, A. High affinity hemoglobin and Parkinson's disease. **Med. Hypotheses**, v. 83, n. 6, p. 819-821, 2014 Disponível em: < 10.1016/j.mehy.2014.10.016 >.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008 Disponível em: < 10.3390/s80314000 >.

HA, M.; LIM, S.; KO, H. Wearable and flexible sensors for user-interactive health-monitoring devices. **J. Mater. Chem. B**, v. 6, n. 24, p. 4043-4064, 2018 Disponível em: < 10.1039/c8tb01063c >.

HAMMOND, JULES L. et al. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays Biochem.**, v. 60, n. 1, p. 69-80, 2016 Disponível em: < 10.1042/ebc20150008 >.

HAN, X. et al. Direct electrochemistry of hemoglobin in egg-phosphatidylcholine films and its catalysis to H₂O₂. **Biosens. Bioelectron.**, v. 17, n. 9, p. 741-746, 2002 Disponível em: < 10.1016/S0956-5663(02)00052-0 >.

HAYAT, A.; MARTY, J. L. Disposable screen printed electrochemical sensors: tools for environmental monitoring. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 6, p. 10432-10453, 2014 Disponível em: < 10.3390/s140610432 >.

HERMANSON, G. T. Antibody Modification and Conjugation. In: (Ed.). **Bioconjugate Techniques** Elsevier, 2013. p.867-920.10.1016/b978-0-12-382239-0.00020-0

HERNANDEZ-VARGAS, G. et al. Electrochemical Biosensors: A Solution to Pollution Detection with Reference to Environmental Contaminants. **Biosensors**, v. 8, n. 2, p. 29, 2018 Disponível em: < 10.3390/bios8020029 >.

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F. G.; CHALASANI, G. B Cells, Antibodies, and More. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 1, p. 137-154, 2016 Disponível em: < 10.2215/cjn.09430915 >.

HONDRED, J. A. et al. High-Resolution Graphene Films for Electrochemical Sensing via Inkjet Maskless Lithography. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 10, n. 13, p. 11125–11134, 2017 Disponível em: < 10.1021/acsnano.7b03554.s003 >.

HONG, Z. et al. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. **Brain**, v. 133, n. Pt 3, p. 713-726, 2010 Disponível em: < 10.1093/brain/awq008 >.

HUANG, Y. et al. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 2375, 2017 Disponível em: < 10.3390/s17102375 >.

HUSSAIN, K. K. et al. Electrochemical Detection of Hemoglobin: A Review. **Electroanalysis**, v. 29, n. 10, p. 2190-2199, 2017 Disponível em: < doi:10.1002/elan.201700308 >.

IBÁÑEZ-REDÍN, G. et al. Low-cost screen-printed electrodes based on electrochemically reduced graphene oxide-carbon black nanocomposites for dopamine, epinephrine and paracetamol detection. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 515, p. 101-108, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.jcis.2017.12.085 >.

ISHIWATARI, S. et al. The protective role of DJ-1 in ultraviolet-induced damage of human skin: DJ-1 levels in the stratum corneum as an indicator of antioxidative defense. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 307, n. 10, p. 925-935, 2015 Disponível em: < 10.1007/s00403-015-1605-8 >.

JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, n. 11, p. 3753-3771, 2013 Disponível em: < 10.1007/s00216-012-6578-2 >.

JANG, J. et al. Oxidized DJ-1 Levels in Urine Samples as a Putative Biomarker for Parkinson's Disease. **Parkinson's Dis.**, v. 2018, p. 9, 2018 Disponível em: < 10.1155/2018/1241757 >.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J. et al. Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease. **Front. Cell. Neurosci.**, v. 8, n. 369, 2014 Disponível em: < 10.3389/fncel.2014.00369 >.

JONES, G. J. Polymerization of glutaraldehyde at fixative pH. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 22, n. 9, p. 911-913, 1974 Disponível em: < 10.1177/22.9.911 >.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 12, p. 2918, 2017 Disponível em: < 10.3390/s17122918 >.

KANNAN, P. K. et al. Electrochemical sensing of bisphenol using a multilayer graphene nanobelt modified photolithography patterned platinum electrode. **Nanotechnology**, v. 27, n. 37, 2016 Disponível em: < 10.1088 / 0957-4484 / 27/37/375504 >.

KATZ, E. Y.; SOLOV'EV, A. A. Chemical modification of platinum and gold electrodes by naphthoquinones using amines containing sulphhydryl or disulphide groups. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.**, v. 291, n. 1, p. 171-186, 1990 Disponível em: < 10.1016/0022-0728(90)87185-M >.

KELLY, P. J.; ARNELL, R. D. Magnetron sputtering: a review of recent developments and applications. **Vacuum**, v. 56, n. 3, p. 159-172, 2000 Disponível em: < 10.1016/S0042-207X(99)00189-X >.

KETOV, S. V. et al. Formation of nanostructured metallic glass thin films upon sputtering. **Heliyon**, v. 3, n. 1, p. e00228, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.heliyon.2016.e00228 >.

KHAN, S.; DAHIYA, R.; LORENZELLI, L. Technologies for Printing Sensors and Electronics Over Large Flexible Substrates: A Review. **IEEE Sens. J.**, v. PP, 2014 Disponível em: < 10.1109/jsen.2014.2375203 >.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Anal. Chem.**, v. 84, n. 2, p. 685-707, 2012 Disponível em: < 10.1021/ac202878q >.

KODERA, F. et al. Electrochemical corrosion of platinum electrode in concentrated sulfuric acid. **J. Power Sources**, v. 172, n. 2, p. 698-703, 2007 Disponível em: < 10.1016/j.jpowsour.2007.05.016 >.

KU, S.; PALANISAMY, S.; CHEN, S.-M. Highly selective dopamine electrochemical sensor based on electrochemically pretreated graphite and nafion composite modified screen printed carbon electrode. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 411, p. 182-186, 2013 Disponível em: < 10.1016/j.jcis.2013.08.029 >.

LABIB, M.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. **Chem. Rev.**, v. 116, n. 16, p. 9001-9090, 2016 Disponível em: < 10.1021/acs.chemrev.6b00220 >.

LANG, P. et al. Self-assembled alkylthiols monolayers onto platinum; Influence of the adsorbed oxygen. **J. Electroanal. Chem.**, v. 441, n. 1, p. 83-93, 1998 Disponível em: < 10.1016/S0022-0728(97)00421-X >.

LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications**. 1. New York: Springer-Verlag New York, 2014. 367 ISBN 9780306469169. Disponível em: < 10.1007/0-306-46916-2_2 >

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **J. Cryst. Growth**, v. 233, n. 1, p. 367-374, 2001 Disponível em: < 10.1016/S0022-0248(01)01547-0 >.

LEE, C.-H. et al. Comparison of amperometric biosensors fabricated by palladium sputtering, palladium electrodeposition and Nafion/carbon nanotube casting on screen-printed carbon electrodes. **Biosens. Bioelectron.**, v. 22, n. 6, p. 877-884, 2007 Disponível em: < 10.1016/j.bios.2006.03.008 >.

LENGWILER, G. **A history of screen printing : how an art evolved into an industry**. 1. Ohio ST Media Group International, 2013. 485 ISBN 9780944094747. Disponível em: < 10.1017/alj.2015.11 >

LI, X. et al. Effective Electrochemical Method for Investigation of Hemoglobin Unfolding Based on the Redox Property of Heme Groups at Glassy Carbon Electrodes. **Anal. Chem.**, v. 81, n. 20, p. 8557-8563, 2009 Disponível em: < 10.1021/ac9015215 >.

LI, Z.; CHANG, S.-C.; WILLIAMS, R. S. Self-Assembly of Alkanethiol Molecules onto Platinum and Platinum Oxide Surfaces. **Langmuir**, v. 19, n. 17, p. 6744-6749, 2003 Disponível em: < 10.1021/la034245b >.

LIN, X. et al. DJ-1 isoforms in whole blood as potential biomarkers of Parkinson disease. **Sci. Rep.**, v. 2, p. 954, 2012 Disponível em: < 10.1038/srep00954 >.

LINHARES, F. N. et al. Nitrile rubber and carboxylated nitrile rubber resistance to soybean biodiesel. **Polímeros**, v. 28, n. 1, p. 23-29, 2018 Disponível em: < 10.1590/0104-1428.09816 >.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008 Disponível em: < 10.1007/s00216-008-1970-7 >.

LIU, B. L.; SALTMAN, M. A. Immunosensor Technology: Historical Perspective and Future Outlook. **Lab. Med.**, v. 27, n. 2, p. 109-115, 1996 Disponível em: < 10.1093/labmed/27.2.109 >.

LÓPEZ-LÓPEZ, M.; VAZ, J.; GARCÍA-RUIZ, C. Confocal Raman spectroscopy for the analysis of nail polish evidence. **Talanta**, v. 138, p. 155-162, 2015 Disponível em: < 10.1016/j.talanta.2015.02.031 >.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, p. 932, 2002 Disponível em: < 10.1038/nrn983 >.

LOVE, J. C. et al. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 4, p. 1103-1170, 2005 Disponível em: < 10.1021/cr0300789 >.

LU, B.; SMYTH, M. R.; O'KENNEDY, R. Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. **Analyst**, v. 121, n. 3, p. 29R-32R, 1996 Disponível em: < 10.1039/AN996210029R >.

ŁUKASZEWICZ, J. P. Carbon Materials for Chemical Sensors: A Review. **Sens. Lett.**, v. 4, n. 2, p. 53-98, 2006 Disponível em: < 10.1166/sl.2006.020 >.

LUPPA, P. B.; SOKOLL, L. J.; CHAN, D. W. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta**, v. 314, n. 1, p. 1-26, 2001 Disponível em: < 10.1016/S0009-8981(01)00629-5 >.

MACDONALD, J. R.; JOHNSON, W. B. Fundamentals of Impedance Spectroscopy. In: BARSOUKOV, E. e MACDONALD, J. R. (Ed.). **Impedance Spectroscopy**: John Wiley & Sons, Inc, 2018. cap. 1, p.1-20.10.1002/9781119381860.ch1

MAITRA, J.; SHUKLA, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. **Am. J. Polym. Sci.**, v. 4, n. 2, p. 25-31, 2014 Disponível em: < 10.5923 / j.ajps.20140402.01 >.

MARENGO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 19, n. 3, p. 239-245, 2006 Disponível em: < 10.1080/08998280.2006.11928171 >.

MARTIN, A. et al. Graphite pastes in thick film sensors area. *Electronic Devices and Systems - XVII IMEKO World Congress 2003, Dubrovnik, Croatia.* p.2148 - 2152

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; CERRO-LOPEZ, M.; QUIROZ, M. A. Electrochemical behaviour of dopamine at covalent modified glassy carbon electrode with l-cysteine: preliminary results. **Mater. Res.**, v. 12, n. 4, p. 375-384, 2009 Disponível em: < 10.1590/S1516-14392009000400002 >.

MATTIOLI, I. A. et al. Electrochemical investigation of a graphite-polyurethane composite electrode modified with electrodeposited gold nanoparticles in the voltammetric determination of tryptophan. **J. Electroanal. Chem.**, v. 835, p. 212-219, 2019 Disponível em: < 10.1016/j.jelechem.2018.12.056 >.

MATTOX, D. M. **Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing.** 2. Boston: William Andrew Publishing, 2010. 1-24 ISBN 978-0-8155-2037-5. Disponível em: < 10.1016/B978-0-8155-2037-5.00001-0 >

MAURUTO DE OLIVEIRA, G. C. et al. Tapioca Biofilm Containing Nitrogen-doped Titanium Dioxide Nanoparticles for Electrochemical Detection of 17- β Estradiol. **Electroanalysis**, v. 29, n. 11, p. 2638-2645, 2017 Disponível em: < 10.1002/elan.201700392 >.

MCCREERY, R. L. *Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry.* **Chem. Rev.**, v. 108, n. 7, p. 2646-2687, 2008 Disponível em: < 10.1021/cr068076m >.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **J. Oral Biol. Craniofac. Res.**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016 Disponível em: < 10.1016/j.jobcr.2015.12.002 >.

METTERS, J. P.; KADARA, R. O.; BANKS, C. E. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. **Analyst**, v. 136, n. 6, p. 1067-1076, 2011 Disponível em: < 10.1039/c0an00894j >.

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, 2004 Disponível em: < 10.2144/04375rv01 >.

MISHRA, A.; SINGH, S.; SHUKLA, S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. **J. Exp. Neurosci.**, v. 12, p. 1179069518779829, 2018 Disponível em: < 10.1177/1179069518779829 >.

MISHRA, G. K. et al. Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 9, p. 141, 2018 Disponível em: < 10.3390/foods7090141 >.

MISHRA, R. K. et al. Wearable Flexible and Stretchable Glove Biosensor for On-Site Detection of Organophosphorus Chemical Threats. **ACS Sensors**, v. 2, n. 4, p. 553-561, 2017 Disponível em: < 10.1021/acssensors.7b00051 >.

MOINA, C.; YBARRA, G. Fundamentals and Applications of Immunosensors. In: CHIU, N. (Ed.). **Advances in Immunoassay Technology**: IntechOpen, 2012.10.5772/1967

MOON, J.-M. et al. A disposable amperometric dual-sensor for the detection of hemoglobin and glycated hemoglobin in a finger prick blood sample. **Biosens. Bioelectron.**, v. 91, p. 128-135, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.bios.2016.12.038 >.

NAG, A.; MUKHOPADHYAY, S. C.; KOSEL, J. Wearable Flexible Sensors: A Review. **IEEE Sens. J.**, v. 17, n. 13, p. 3949-3960, 2017a Disponível em: < 10.1109/JSEN.2017.2705700 >.

NAG, A.; MUKHOPADHYAY, S. C.; KOSEL, J. Wearable Flexible Sensors: A Review. **IEEE Sensors Journal**, v. 17, n. 13, p. 3949-3960, 2017b Disponível em: < 10.1109/jsen.2017.2705700 >.

NARAKATHU, B. B. et al. Novel fully screen printed flexible electrochemical sensor for the investigation of electron transfer between thiol functionalized viologen and gold clusters. **Sens. Actuators, B**, v. 176, p. 768-774, 2013 Disponível em: < 10.1016/j.snb.2012.10.069 >.

NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Quim. Nova**, v. 21, p. 614-629, 1998 Disponível em: < 10.1590/S0100-40421998000500014. >.

NASIRIZADEH, N. et al. Developing a sensor for the simultaneous determination of dopamine, acetaminophen and tryptophan in pharmaceutical samples using a multi-walled carbon nanotube and oxadiazole modified glassy carbon electrode. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 11, p. 1846-1856, 2013 Disponível em: < 10.5935/0103-5053.20130230 >.

NASIRPOURI, F. An Overview to Electrochemistry. In: (Ed.). **Electrodeposition of Nanostructured Materials**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p.43-73.10.1007/978-3-319-44920-3_2

NAYAK, S. et al. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. **Anal. Chem.**, v. 89, n. 1, p. 102-123, 2017 Disponível em: < 10.1021/acs.analchem.6b04630 >.

NGAMCHUEA, K. et al. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers – a tutorial review. **Analyst**, v. 143, n. 1, p. 81-99, 2018 Disponível em: < 10.1039/c7an01571b >.

NUNES, G. S. Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 462-471, 2005 Disponível em: < 10.1590/S0100-40422005000300018. >.

OGAWA, I. et al. The significance of oxidized DJ-1 protein (oxDJ-1) as a biomarker for Parkinson's disease. **Brain Nerve**, v. 66, p. 471-477, 2014 Disponível em: < 10.11477/mf.1416101775 >.

ORZARI, L. O. et al. Disposable electrode obtained by pencil drawing on corrugated fiberboard substrate. **Sens. Actuators, B**, v. 264, p. 20-26, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.snb.2018.02.162 >.

ÖZCAN, A.; İLKBAS, S.; ATILIR ÖZCAN, A. Development of a disposable and low-cost electrochemical sensor for dopamine detection based on poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-modified electrochemically over-oxidized pencil graphite electrode. **Talanta**, v. 165, p. 489-495, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.talanta.2017.01.007 >.

PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013 Disponível em: < 10.5935/1984-6835.20130040 >.

PAGLIARO, M.; ROSSI, M. Glycerol: properties and production. In: ROSSI, M. (Ed.). **The future of glycerol: New usages for a versatile raw material**: Royal Society of Chemistry, 2008. p.104.10.1039/9781849731089-00001

PANNEER SELVAM, A. et al. A wearable biochemical sensor for monitoring alcohol consumption lifestyle through Ethyl glucuronide (EtG) detection in human sweat. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 23111, 2016 Disponível em: < 10.1038/srep23111 >.

PATEL, S. et al. Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis. **Biochem. Res. Int.**, v. 2016, p. 3130469, 2016 Disponível em: < 10.1155/2016/3130469 >.

PHALEN, R. N. et al. Acrylonitrile content as a predictor of the captan permeation resistance for disposablenitrile rubber gloves. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 103, n. 3, p. 2057-2063, 2007 Disponível em: < doi:10.1002/app.25349 >.

PHUNG, V.-D. et al. Reliable and quantitative SERS detection of dopamine levels in human blood plasma using a plasmonic Au/Ag nanocluster substrate. **Nanoscale**, v. 10, n. 47, p. 22493-22503, 2018 Disponível em: < 10.1039/C8NR06444J >.

PIRO, B.; REISBERG, S. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 4, p. 794, 2017 Disponível em: < 10.3390/s17040794 >.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 3, p. 17013, 2017 Disponível em: < 10.1038/nrdp.2017.13 >.

POIRIER, J. A.; STONER, G. E. Oxygen Reduction Behavior of Thin-Film Platinum and Platinum-Rhodium Electrocatalysts in Sulfuric Acid. **J. Electrochem. Soc.**, v. 142, n. 4, p. 1127-1132, 1995 Disponível em: < 10.1149/1.2044140 >.

PRADELA-FILHO, L. A. et al. Nail polish and carbon powder: An attractive mixture to prepare paper-based electrodes. **Electrochim. Acta**, v. 258, p. 786-792, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.electacta.2017.11.127 >.

RADHAKRISHNAN, D. M.; GOYAL, V. Parkinson's disease: A review. **Neurol. India**, v. 66, n. 7, p. 26-35, 2018 Disponível em: < 10.4103/0028-3886.226451 >.

RAMOS, M. et al. Gelatin-Based Films and Coatings for Food Packaging Applications. **Coatings**, v. 6, n. 4, p. 41, 2016 Disponível em: < 10.3390/coatings6040041 >.

REDDY, A. S. G. et al. Printed electrochemical based biosensors on flexible substrates. **SENSORS**, 2010 IEEE, 2010, Kona, HI, USA. IEEE, 1-4 Nov. 2010. p.1596-1600.10.1109/ICSENS.2010.5690281

REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood Transfus.**, v. 5, n. 4, p. 227-240, 2007 Disponível em: < 10.2450/2007.0047-07 >.

RHO, S. et al. Electrochemical DNA biosensors based on thin gold films sputtered on capacitive nanoporous niobium oxide. **Biosens. Bioelectron.**, v. 23, n. 6, p. 852-856, 2008 Disponível em: < 10.1016/j.bios.2007.09.001 >.

RICCARDI, C. D. S.; COSTA, P. I. D.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002 Disponível em: < 10.1590/S0100-40422002000200020 >.

RICHTER, F. et al. Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains. **J. Comp. Neurol.**, v. 515, n. 5, p. 538-547, 2009 Disponível em: < 10.1002/cne.22062 >.

RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **CMAJ** v. 188, n. 16, p. 1157-1165, 2016 Disponível em: < 10.1503/cmaj.151179 >.

SADANA, A.; SADANA, N. **Biomarkers and biosensors: Detection and binding to biosensor surfaces and biomarkers applications**. 1. Elsevier Science, 2014. 702 ISBN 978-0-444-53794-2. Disponível em: < 10.1016/C2010-0-66521-7 >

SAITO, Y. et al. Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 30793-30793, 2016 Disponível em: < 10.1038/srep30793 >.

SANTANA, L. K. L. et al. Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 31-41, 2017 Disponível em: < scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/10/v6-n1-31-41-2017.pdf >.

SANTOS, V. P. D.; TREMILIOSI FILHO, G. Correlação entre a estrutura atômica superficial e o processo de adsorção-dessorção reversível de hidrogênio em eletrodos monocristalinos Pt(111), Pt(100) e Pt(110). **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p. 856-863, 2001 Disponível em: < [10.1590/S0100-40422001000600024](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000600024) >.

SARANGAN, A. Nanofabrication. In: HAUS, J. W. (Ed.). **Fundamentals and Applications of Nanophotonics**: Woodhead Publishing, 2016. cap. 5, p.149-184.10.1016/B978-1-78242-464-2.00005-1

SAVICA, R. et al. Anemia or low hemoglobin levels preceding Parkinson disease: a case-control study. **Neurology**, v. 73, n. 17, p. 1381-1387, 2009 Disponível em: < [10.1212/WNL.0b013e3181bd80c1](http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181bd80c1) >.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008 Disponível em: < [10.1182/blood-2008-04-078188](http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188) >.

SELLECK, M. J.; SENTHIL, M.; WALL, N. R. Making Meaningful Clinical Use of Biomarkers. **Biomarker Insights**, v. 12, p. 1-7, 2017 Disponível em: < [10.1177/1177271917715236](http://dx.doi.org/10.1177/1177271917715236) >.

SESAY, M. Monoclonal Antibody Conjugation via Chemical Modification. **BioPharm Int.**, v. 16, n. 12, 2003

SHIN, J. H.; KANG, H.-W. The Development of Gelatin-Based Bio-Ink for Use in 3D Hybrid Bioprinting. **Int. J. Pr. Eng. Man-Gt.**, v. 19, n. 5, p. 767-771, 2018 Disponível em: < [10.1007/s12541-018-0092-1](http://dx.doi.org/10.1007/s12541-018-0092-1) >.

SILVA, B. V. M. et al. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosens. Bioelectron.**, v. 26, n. 3, p. 1062-1067, 2010 Disponível em: < [10.1016/j.bios.2010.08.051](http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.051) >.

SILVA, M. F. C. G. **Voltametria Cíclica — Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electronica**. Boletim da sociedade portuguesa de química: Fundação para ciência e tecnologia. 70: 20-26 p. 1998.

SIMON, A. H. Sputter Processing. In: SESHAN, K. (Ed.). **Handbook of Thin Film Deposition (Third Edition)**. Oxford: William Andrew Publishing, 2012. cap. 4, p.55-88.10.1016/B978-1-4377-7873-1.00004-8

SINGH, M. et al. Highly sensitive and selective determination of dopamine using screen-printed electrodes modified with nanocomposite of N'-phenyl-p-phenylenediamine/multiwalled carbon nanotubes/nafion. **Mater. Res. Bull.**, v. 101, p. 253-263, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.materresbull.2018.01.011 >.

SOUZA, D. D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003 Disponível em: < 10.1590/S0100-40422003000100015 >.

SPITZER-SONNLEITNER, B.; KEMPE, A.; LACKNER, M. Influence of Halide Solutions on Collagen Networks: Measurements of Physical Properties by Atomic Force Microscopy. **Biotechnol. Res. Int.**, v. 2016, p. 4956756-4956756, 2016 Disponível em: < 10.1155/2016/4956756 >.

STORZ, H. V., KLAUS-DIETER Bio-based plastics: status, challenges and trends. **Appl Agric Forestry Res**, v. 63, n. 4, p. 321-332, 2013 Disponível em: < 10.3220/LBF_2013_321-332 >.

STOYTCHIEVA, M.; ZLATEV, R. Electrochemical Sensors for Environmental Analysis. In: OTA, K.-I.; KREYSA, G., *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Applied Electrochemistry 1**. Verlag - New York: Springer, 2013.10.1007/SpringerReference_303978

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003 Disponível em: < 10.1590/S0103-50532003000200003 >.

SUN, B. et al. A novel electrochemical immunosensor based on PG for early screening of depression markers-heat shock protein 70. **Biosens. Bioelectron.**, v. 111, p. 34-40, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.bios.2018.03.049 >.

SUOMINEN, T. et al. Determination of Serotonin and Dopamine Metabolites in Human Brain Microdialysis and Cerebrospinal Fluid Samples by UPLC-MS/MS: Discovery of Intact Glucuronide and Sulfate Conjugates. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e68007-e68007, 2013 Disponível em: < 10.1371/journal.pone.0068007 >.

SUPERMAX. Luvas de nitrilo: o que há de tão especial nelas? , 2018. Disponível em: < <http://supermax-brasil.com/index.php/2018/11/14/luvas-de-nitrilo-o-que-ha-de-tao-especial-nelas/> >. Acesso em: 4 abril.

TAM-CHANG, S.-W. et al. Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Alkanethiols with the Structure RNHCOCH₂SH. **Langmuir**, v. 11, n. 11, p. 4371-4382, 1995 Disponível em: < 10.1021/la00011a033 >.

TEE, P. A. H.; TONGE, B. L. The physical and chemical character of graphite. **J. Chem. Educ.**, v. 40, n. 3, p. 117, 1963 Disponível em: < 10.1021/ed040p117 >.

THAKUR, M. S.; RAGAVAN, K. V. Biosensors in food processing. **J. Food Sci. Technol.**, v. 50, n. 4, p. 625-641, 2013 Disponível em: < 10.1007/s13197-012-0783-z >.

THANGAMUTHU, M. et al. Electrochemical Sensor for Bilirubin Detection Using Screen Printed Electrodes Functionalized with Carbon Nanotubes and Graphene. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 3, p. 800, 2018 Disponível em: < 10.3390/s18030800 >.

THERMOFISCHER. Overview of Crosslinking and Protein Modification. Thermo Fischer Scientific Website, Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-crosslinking-protein-modification.html> >. Acesso em: 02/april.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of haemoglobin. **CEACCP**, v. 12, n. 5, p. 251-256, 2012 Disponível em: < 10.1093/bjaceaccp/mks025 >.

TOH, R. J. et al. Direct In Vivo Electrochemical Detection of Haemoglobin in Red Blood Cells. **Sci. Rep.**, v. 4, p. 6209, 2014 Disponível em: < 10.1038/srep06209 >.

TONELLO, S. et al. Wireless Point-of-Care Platform With Screen-Printed Sensors for Biomarkers Detection. **IEEE Trans. Instrum. Meas.**, v. 66, n. 9, p. 2448-2455, 2017 Disponível em: < 10.1109/TIM.2017.2692308 >.

TONELLO, S. et al. Screen-Printed Biosensors for the Early Detection of Biomarkers Related to Alzheimer Disease: Preliminary Results. **Procedia Eng.**, v. 168, p. 147-150, 2016 Disponível em: < 10.1016/j.proeng.2016.11.182 >.

TORTORICH, R.; SHAMKHALICHENAR, H.; CHOI, J.-W. Inkjet-Printed and Paper-Based Electrochemical Sensors. **Appl. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 288, 2018 Disponível em: < 10.3390/app8020288 >.

TRICOLI, A.; NASIRI, N.; DE, S. Wearable and Miniaturized Sensor Technologies for Personalized and Preventive Medicine. **Adv. Funct. Mater.**, v. 27, n. 15, p. 1605271, 2017 Disponível em: < 10.1002/adfm.201605271 >.

TSELE, T. P. et al. Electrochemical detection of Epinephrine using Polyaniline nanocomposite films doped with TiO₂ and RuO₂ Nanoparticles on Multi-walled Carbon Nanotube. **Electrochim. Acta**, v. 243, p. 331-348, 2017 Disponível em: < 10.1016/j.electacta.2017.05.031 >.

TUDORACHE, M.; BALA, C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 388, n. 3, p. 565-578, 2007 Disponível em: < 10.1007/s00216-007-1293-0 >.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996 Disponível em: < 10.1021/cr9502357 >.

VASHIST, S. K. Point-of-Care Diagnostics: Recent Advances and Trends. **Biosensors**, v. 7, n. 4, p. 62, 2017 Disponível em: < 10.3390/bios7040062 >.

VIEIRA, N. C. S. et al. Label-free electrical recognition of a dengue virus protein using the SEG-FET simplified measurement system. **Anal. Methods**, v. 6, n. 22, p. 8882-8885, 2014 Disponível em: < 10.1039/C4AY01803F >.

VOLKOW, N. D.; WISE, R. A.; BALER, R. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 18, p. 741, 2017 Disponível em: < 10.1038/nrn.2017.130 >.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 3. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 978-0-471-67879-3.

WARAGAI, M. et al. α -Synuclein and DJ-1 as potential biological fluid biomarkers for Parkinson's Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, n. 11, p. 4257-4266, 2010 Disponível em: < 10.3390/ijms11114257 >.

WARAGAI, M. et al. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 345, n. 3, p. 967-972, 2006 Disponível em: < 10.1016/j.bbrc.2006.05.011 >.

WILLSON, C. G.; DAMMEL, R. R.; REISER, A. Photoresist materials: a historical perspective. *Optical Microlithography X*, 1997, Santa Clara, CA, United States. SPIE.10.1117/12.275984

WIRDE, M.; GELIUS, U.; NYHOLM, L. Self-Assembled Monolayers of Cystamine and Cysteamine on Gold Studied by XPS and Voltammetry. **Langmuir**, v. 15, n. 19, p. 6370-6378, 1999 Disponível em: < 10.1021/la9903245 >.

WISE, R. A. Dopamine, learning and motivation. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 483, 2004 Disponível em: < 10.1038/nrn1406 >.

WU, Y.; SHEN, Q.; HU, S. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme-proteins in regenerated silk fibroin film. **Anal. Chim. Acta**, v. 558, n. 1, p. 179-186, 2006 Disponível em: < 10.1016/j.aca.2005.11.031 >.

XU, G. et al. Sensitive, selective, disposable electrochemical dopamine sensor based on PEDOT-modified laser scribed graphene. **Biosens. Bioelectron.**, v. 107, p. 184-191, 2018 Disponível em: < 10.1016/j.bios.2018.02.031 >.

XUE, Y. et al. Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. **Nat. Commun.**, v. 5, p. 4348, 2014 Disponível em: < 10.1038/ncomms5348 >.

YUAN, Y. et al. New Look at Hemoglobin Allostery. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1702-1724, 2015 Disponível em: < 10.1021/cr500495x >.

ZENG, Y. et al. A sensitive label-free electrochemical immunosensor for detection of cytokeratin 19 fragment antigen 21-1 based on 3D graphene with gold nanoparticle modified electrode. **Talanta**, v. 178, p. 122-128, 2018 Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.020> >.

ZHENG, M. et al. Electrochemical behavior of dopamine in the presence of phosphonate and the determination of dopamine at phosphonate modified zirconia films electrode with highly antifouling capability. **Electrochim. Acta**, v. 55, n. 16, p. 4789-4798, 2010 Disponível em: < 10.1016/j.electacta.2010.03.037 >.

ANEXOS

Anexo 1 – Tabela de composição do esmalte Base Brilho Cuidados, Cora®

Composição do esmalte Cora[®] Base Brilho – com nanotecnologia	
Acetato de butilo	Acetato de etilo
Nitrocelulose	Citrato de acetil tributilo
Tolueno	Álcool isopropílico
Estearalcônio	Resina de tosilamida/formaldeído
Sílica hidratada	Hectorita alcoólica
Pode conter outros componentes	Óleo mineral