



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Rodrigo Vieira Blasques

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS
DESCARTÁVEIS E REUTILIZÁVEIS PARA DETECÇÃO DE
BIOMARCADORES DE INTERESSE CLÍNICO**

Araras, SP

2023

Rodrigo Vieira Blasques

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS
DESCARTÁVEIS E REUTILIZÁVEIS PARA DETECÇÃO DE
BIOMARCADORES DE INTERESSE CLÍNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de São Carlos, para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Campos
Janegitz

**Bolsista CAPES – Processo n°:
88887.504861/2020-00**

Araras, SP

2023

Blasques, Rodrigo Vieira

Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos descartáveis e reutilizáveis para detecção de biomarcadores de interesse clínico / Rodrigo Vieira Blasques -- 2023.
238f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Bruno Campos Janegitz

Banca Examinadora: Márcio Fernando Bergamini, Tiago Almeida Silva, Marco Antonio dos Santos Farias, Marystela Ferreira

Bibliografia

1. Biomarcadores de Interesse Clínico . 2. (Bio)sensores Eletroquímicos . 3. Point-of-Care. I. Blasques, Rodrigo Vieira. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rodrigo Vieira Blasques, realizada em 08/11/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz (UFSCar)

Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini (UFPR)

Prof. Dr. Tiago Almeida Silva (UFV)

Prof. Dr. Marco Antonio dos Santos Farias (UFSCar)

Profa. Dra. Marystela Ferreira (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

Dedico este trabalho a minha mãe, Valdineia, por todos os esforços e lutas realizados
diante dos intempéries da vida para que eu pudesse ter a melhor criação.
Dedico em memória do meu pai, Roberto Blasques, que combateu o bom combate, mas
nunca se deixou abater por nenhuma doença e dificuldade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo conhecimento, sustento e paciência dados até esse momento.

A minha mãe, Valdineia, por todo seu amor, carinho e esforços realizados para que eu pudesse ter a melhor educação.

Ao meu padrasto, Daniel, pelas cobranças árduas nos estudos, pelas orientações e lições de vida.

Em memória do meu pai, Roberto Blasques, que combateu o bom combate durante este trabalho e que infelizmente não conseguiu vibrar mais uma vez por uma conquista minha. Apenas queria lhe dizer que consegui.

A Abigail, meu amor, carinho e compreensão em meus momentos de estresse e dificuldades, sempre me apoiando e sendo suporte.

Ao meu grande amigo, Jorge Felipe, pela amizade de mais de 15 anos, pelas conversas, risadas e, principalmente, por todo o apoio dado pela sua família quando mais precisei.

Aos amigos da Assembleia de Deus: Edy, Poli e Amanda pelas orientações, conselhos e amizade.

Aos amigos e professores que sempre me incentivaram e deram suporte desde o período da graduação: Gilvanda Nunes, Nestor Filho, Paulo Villis e Paulo Brasil.

Ao Daniel Cardoso e Vinicius pela amizade e convívio mais próximo. Agradeço também pelos convites aos finais de semana para sair e conhecer novos lugares e poder distrair um pouco. Espero que vocês alcancem seus objetivos pessoais e profissionais com grande êxito.

A Jéssica Stefano pela amizade e grande ajuda com suas orientações e correções nos artigos científicos. Espero também que tenha grande êxito na vida.

Aos demais integrantes do LSNano em que pude compartilhar bons cafés da tarde e dar algumas risadas: Luiz Otávio, Wilson, Luiz Ricardo, Jéssica Camargo, Paulo, Cris, Jéferson e Rafaela.

Ao Prof. Dr. Bruno Janegitz, pela orientação científica e pelos auxílios profissionais, contribuindo para o início da minha trajetória acadêmica.

A Laís Brazaca pelas dúvidas tiradas e correções de alguns trabalhos desenvolvidos em conjunto.

Ao professor, Dr. Thiago Paixão e equipe de laboratório, pela recepção e ajuda durante estadia de curto período no IQ/USP para o desenvolvimento de parte de uma pesquisa deste trabalho.

Aos funcionários da UFSCar (campus Araras), desde o tio do “joinha” da portaria pelo bom dia dado e conversas, até os técnicos de laboratório pela colaboração em análises morfológicas dos materiais desenvolvidos neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM-So) da Universidade Federal de São Carlos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Processo n°: 88887.504861/2020-00) pela bolsa de doutorado concedida.

*O temor do Senhor é o princípio da ciência; os loucos desprezam a
sabedoria e a instrução.*

Provérbios 1:7

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS E REUTILIZÁVEIS PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DE INTERESSE CLÍNICO.

Nos últimos anos, a busca por novos dispositivos eletroquímicos que permitam a realização de análises confiáveis, rápidas, acessíveis, com alta sensibilidade, e portabilidade tem sido requerida. Além disso, possibilitam análises *point-of-care*, o que permite o monitoramento clínico descentralizado, o que diminui o custo assistencial e proporciona uma melhora na qualidade de vida de saúde dos seres humanos. Nesse contexto, no primeiro capítulo detalha-se o desenvolvimento de um sensor eletroquímico descartável de baixo custo e fácil produção composto por uma tinta condutora modificada com azul da Prússia para a detecção enzimática e não enzimática dos biomarcadores ácido úrico, peróxido de hidrogênio e glicose. O sensor desenvolvido foi aplicado como um sensor vestível em um dispositivo impresso em 3D para o monitoramento em tempo real de fluido biológico sintético. O custo estimado por unidade de sensor e biossensor foi de R\$ 4,71 e para o biossensor foi de R\$ 6,89, o que torna essas plataformas atrativas diante dos testes laboratoriais tradicionais. O segundo capítulo trata do desenvolvimento de um sensor e imunossensor eletroquímico para a detecção da L-Cisteína (L-Cys) e da proteína *Spike* do vírus SARS-CoV-2. A aplicabilidade do imunossensor para detecção da proteína *Spike* foi comprovada em amostras sintéticas de saliva, demonstrando assim sua eficiência em relação à técnica padrão-ouro de RT-PCR. Baixos LOD foram demonstrados para a L-Cys ($0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) e proteína *Spike* ($0,7$ e $1,0 \text{ pmol L}^{-1}$). O terceiro capítulo descreve uso de folhas de árvores caídas da espécie *Persea americana Mill* como substrato para a fabricação de sensores eletroquímicos através do uso de lasers CO_2 . A aplicação do sensor para a detecção de dopamina (DA) demonstrou características analíticas interessantes como boa repetibilidade e reprodutibilidade, com valores de 1,46% e 6,47%, respectivamente. A utilização desse tipo de substrato apresenta abordagem inovadora e de alto potencial como uma alternativa sustentável e ecológica aos substratos de sensores tradicionais. Por fim, o quarto capítulo descreve a obtenção de plataformas de fácil produção, reutilizáveis e de baixo custo para o desenvolvimento de dispositivos analíticos com características adequadas para análises multiplexadas. A detecção de L-Dopa e DA apresentou baixos valores de LOD de $0,11$ e $0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$,

respectivamente. Deste modo, espera-se que os novos dispositivos aqui apresentados auxiliem em diagnósticos mais acessíveis e com melhor custo-benefício para a população.

Palavras-chave: Tinta condutora; (bio)sensor; biomarcador; imunossensor eletroquímico; laser CO₂; plataforma reutilizável; *point-of-care*.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DISPOSABLE AND REUSABLE ELECTROCHEMICAL DEVICES FOR THE DETECTION OF BIOMARKERS OF CLINICAL INTEREST.

In recent years, the search for new electrochemical devices that allow reliable, fast, easily accessible, highly sensitive, miniaturized and portable analyses has been required. Furthermore, they enable point-of-care analysis, which allows decentralized clinical monitoring, which decreases the cost and provides an improvement in the quality of health life of the human being. In this context, the first chapter details the development of a low-cost, easy-to-produce disposable electrochemical sensor composed of a conductive ink modified with Prussian blue for the enzymatic and non-enzymatic detection of the biomarker's uric acid, hydrogen peroxide and glucose. The sensor developed was applied as a wearable sensor in a 3D-printed device for real-time monitoring of synthetic biological fluid. The estimated cost per sensor and biosensor unit was R\$4.71 and for the biosensor it was R\$6.89, which makes these platforms attractive compared to traditional laboratory tests. The second chapter deals with the development of an electrochemical sensor and immunosensor for the detection of L-Cysteine (L-Cys) and the Spike protein of the SARS-CoV-2 virus. The applicability of the immunosensor for detecting the Spike protein was proven in synthetic saliva samples, thus demonstrating its efficiency in relation to the gold standard RT-PCR technique. Low LODs were demonstrated for L-Cys ($0.7 \mu\text{mol L}^{-1}$) and Spike protein (0.7 and 1.0 pmol L^{-1}). The third chapter describes the use of fallen tree leaves from the *Persea americana* Mill species as a substrate for the manufacture of electrochemical sensors using CO₂ lasers. The application of the sensor for the detection of dopamine (DA) showed interesting analytical characteristics such as good repeatability and reproducibility, with values of 1.46% and 6.47%, respectively. The use of this type of substrate presents an innovative and high-potential approach as a sustainable and ecological alternative to traditional sensor substrates. Finally, the fourth chapter describes how to obtain easy-to-produce, reusable and low-cost platforms for the development of analytical devices with characteristics suitable for multiplexed analysis. The detection of L-Dopa and DA showed low LOD values of 0.11 and $0.26 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. In this way, it is hoped that the new

devices presented here will help make diagnoses more accessible and more cost-effective for the population.

Keywords: Conductive ink; (bio)sensor; biomarker; electrochemical immunosensor; CO₂ laser; reusable platform; point-of-care.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das diferentes etapas do ciclo de impressão. (a) Estado inicial com pasta/tinta depositada na tela, (b) distribuição de pasta/tinta pela tela para preenchimento de áreas abertas (inundação), (c) impressão no substrato, (d) estado final com camada impressa. Fonte: Moldenhauer et al. (11)..... 37
- Figura 2.** Esquema ilustrativo de fabricação de eletrodos por gravação a laser (a), esboços de designs de eletrodos usados (eletrodo de trabalho WE, contraeletrodo CE, eletrodo de referência RE), superior = design “simples”, inferior = design de 3 eletrodos (b), foto de eletrodos preparados (c). Fonte: Behrent et al. (61). 43
- Figura 3.** Abacateiro localizado no Instituto de Química do Campus USP Butantã. (A) Árvore com folhas verdes. (B) Folha seca. Fonte: Elaborado pelo autor..... 45
- Figura 4.** Representação esquemática da célula unitária ideal do azul da Prússia com octaédrico de Fe^{2+} de spin baixo $(CN)_6$ e Fe^{3+} de spin alto $(NC)_6$. Fonte: Thi et al. (101). 51
- Figura 5.** Representação esquemática de um biossensor. Fonte: Elaborado pelo autor. 53
- Figura 6.** Ilustração da estrutura cristalina da GOx obtida do fungo *Aspergillus niger* a 2,3 Å de resolução. Fonte: Hecht et al. (114). 55
- Figura 7.** Esquema ilustrativo dos tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: ligação covalente, adsorção física, aprisionamento e reticulação. Fonte: Elaborado pelo autor 56
- Figura 8.** Imagem ilustrativa dos três principais tipos de configurações de imunossensores: sanduíche, competitivo e direto. Fonte: Elaborado pelo autor..... 59
- Figura 9.** Estrutura de um anticorpo: (a) representação diagramática de um Ab com diferentes regiões exibidas; (b) vista tridimensional de um Ab (código PDB: 1IGT); (c) isotipos de um Ab. Monômeros (IgD, IgE e IgG), um dímero (IgA) e um pentâmero (IgM) são mostrados. Os círculos indicam a região de interação entre o anticorpo e o antígeno. Fonte: Gopinath et al. (122)..... 60
- Figura 10.** Fórmula estrutural do ácido úrico. Fonte: Elaborado pelo autor. 62
- Figura 11.** Principais fontes intracelulares e extracelulares de ROS envolvidos na progressão e desenvolvimento de câncer. Fonte: Arfin et al. (135). 63
- Figura 12.** Fórmula estrutural cíclica da glicose. Fonte: Elaborado pelo autor..... 65

Figura 13. Fórmula estrutural da L-Cys. Fonte: Elaborado pelo autor.	66
Figura 14. Estrutura viral do SARS-CoV-2. Imagem adaptada de Singh et al. (161)...	67
Figura 15. Mecanismo demonstrando as etapas para a produção de dopamina. Fonte: Elaborado pelo autor.....	69
Figura 16. Preparação do sensor GNP e GNP/PB: (1 e 2) Preparação da tinta condutora. (3) Aplicação de tinta condutora e sensor GNP. (4) Eletrodeposição de filme PB e sensor GNP/PB. (5) Preparação do biossensor GNP/PB/GOx. Fonte: Elaborado pelo autor.....	76
Figura 17. Imagens de MEV de (A) GNP em (1) 60 (2) 1000 (3) e 8000x fatores de ampliação , (B) GNP/PB (1) 60 (2) 1000 (3) e 8000x fatores de ampliação e (C) GNP/PB/GOx (1) 109 (2) 1200 (3) e 20000x fatores de ampliação. Color SEM com a distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo (B3) GNP/PB. Fonte: Elaborado pelo autor.....	82
Figura 18. Espectros EDS e composição elementar em GNP/PB. Fonte: Elaborado pelo autor.....	82
Figura 19. Espectros FTIR para GNP (—) e GNP/PB (—). Fonte: Elaborado pelo autor.	83
Figura 20. Voltamogramas cíclicos em ausência (—) e presença (—) de azul da Prússia em solução de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH = 7,0); velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	84
Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo (A) GNP e (B) GNP/PB em ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ variando a velocidade de varredura em 30, 50, 70, 90, 110, 130, 160, 200 e 250 mV s ⁻¹ . (B) e (D) Gráfico de pontos I vs. v ^{1/2} . Fonte: Elaborado pelo autor.	85
Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos para GNP (—) na presença de 800 μmol L ⁻¹ AU, e para GNP/PB na ausência (—) e presença (—) de 800,0 μmol L ⁻¹ AU, em solução de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0); velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	87
Figura 23. Mecanismo de oxidação do ácido úrico. Fonte: Elaborado pelo autor.	87
Figura 24. Comparação entre técnicas DPV (—) e SWV (—), em solução de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (—) e na presença de AU 50,0 μmol L ⁻¹ em PBS (pH 7,0). Parâmetros SWV: f = 10 Hz, a = 50 mV, step 1 mV; DPV: a = 50 mV, modulation time = 25 ms, v = 10 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	88

Figura 25. Resposta voltamétrica DPV para UA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) obtida em diferentes (A) incremento de potencial (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV). (B) amplitude de modulação (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 mV) e (C) tempo de modulação (5, 10, 20, 25, 30, 40 e 50 ms), e respectivos gráficos de corrente de pico versus parâmetros variados (A'-C'). Fonte: Elaborado pelo autor..... 90

Figura 26. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtido em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em diferentes concentrações de AU ($5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 75,0; 100,0$ e $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Gráfico da corrente de pico versus concentração de ácido úrico, obtido a partir de A. Condições experimentais DPV: amplitude: 80 mV; tempo de modulação \pm : 5 ms; incremento de potencial: 7 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.. 92

Figura 27. (A) Dados de repetibilidade obtidos de voltamogramas de pulso diferencial sucessivos ($n=20$) usando uma solução de AU $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (B) Dados de reprodutibilidade obtidos de voltamogramas de pulso diferencial sucessivos ($n=5$) usando uma solução de AU $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Condições experimentais DPV: amplitude: 80 mV; tempo de modulação: 5 ms; incremento de potencial: 7 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor..... 93

Figura 28. Montagem da pulseira vestível com o eletrodo e conectores e um exemplo de análise do suor na pele humana. Os conectores foram responsáveis por fornecer o contato elétrico e a conexão do sensor ao potenciostato, fechando o sistema eletroquímico. Parâmetros de impressão: extrusão e temperatura da mesa de 200°C e 65°C , respectivamente, com enchimento total. Fonte: Elaborado pelo autor..... 97

Figura 29. Voltamogramas de pulso diferencial com conector de eletrodos serigrafados (linha preta) e pulseira de relógio de pulso (linha vermelha) na presença de AU $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Condições experimentais DPV: amplitude: 80 mV; tempo de modulação: 5 ms; incremento de potencial: 7 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor..... 98

Figura 30. (A) Estudo de potencial para peróxido de hidrogênio $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando eletrodo GNP/PB obtido após medidas cronoamperométricos (duração de 120s; $n=3$) em variados potenciais de trabalho; (B) Registros cronoamperométricos para concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio ($0,0; 400,0; 1000,0$ e $5000,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) no GNP, potencial de trabalho: $-0,3 \text{ V}$ (120 ms); (C) Registros cronoamperométricos para concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio ($100,0$ a $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em GNP/PB, potencial de trabalho: $-0,3 \text{ V}$ (120

ms); (D) Gráfico de corrente de pico versus concentração de peróxido de hidrogênio, obtido a partir de C. Fonte: Elaborado pelo autor.	100
Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos para QT nas concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6% na presença de solução de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo 30 mg mL ⁻¹ GOx; velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.	103
Figura 32. Voltamogramas cíclicos na ausência (—) e na presença (—) de glicose 0,5 mmol L ⁻¹ em solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) utilizando o GNP/PB/GOx; velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.	104
Figura 33. Mecanismo de funcionamento do biossensor GNP/PB/GOx. Fonte: Elaborado pelo autor.	105
Figura 34. Estudo de potencial para glicose 500,0 µmol L ⁻¹ em solução PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) utilizando eletrodo modificado com azul da Prússia obtido após medidas amperométricas (n=3) em potenciais de trabalho variados (-0,4, -0,3, -0,2, -0,1 e 0,0 V) durante 120 s. Fonte: Elaborado pelo autor.	106
Figura 35. (A) Registros cronoamperometricos na ausência (—) e presença de concentrações crescentes de glicose (50,0;100,0; 150,0; 300,0; 400,0 e 500,0 µmol L ⁻¹) em PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) contendo solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ em GNP/PB/GOx, potencial de trabalho: -0,3 V (120 s). (B) Gráfico de corrente versus concentração de glicose, obtido a partir de A. Fonte: Elaborado pelo autor.	107
Figura 36. (A) Dados de repetibilidade obtidos de cronoamperogramas sucessivos (n =10) usando uma solução de glicose 150,0 µmol L ⁻¹ , no GNP/PB/GOx. (B) Dados de reprodutibilidade obtidos de cronoamperogramas sucessivos usando uma solução de glicose 150,0 µmol L ⁻¹ em três biossensores GNP/PB/GOx diferentes; Eletrólito de suporte: solução de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). Potencial de trabalho: -0,3 V (120s). Fonte: Elaborado pelo autor.	110
Figura 37. 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 fotorresiste sobre o substrato;(3) Exposição do substrato + máscara de campo escuro à luz UV para sensibilização. 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 fotorresiste	

sobre o substrato;(3) Exposição do substrato + máscara de campo escuro à luz UV para sensibilização. Fonte: Figura de Oliveira et al. (229).....	116
Figura 38. (A) Eletrodos flexíveis de platina fabricados por fotolitografia em substratos Bio-PET; (B) Processo de estresse mecânico aplicado ao eletrodo. Fonte: Elaborado pelo autor.....	117
Figura 39. Esquema representativo da plataforma de análise clínica impresso em 3D em (A) e as etapas envolvidas na fabricação do imunossensor em (B). Fonte: Elaborado pelo autor.....	120
Figura 40. (A) Imagens MEV do eletrodo de trabalho de platina em diferentes ampliações: 30× (A), 60× (A1), 500× (A2) e 4000× (A3), respectivamente. (B) Imagens MEV do eletrodo de trabalho de platina modificado em diferentes ampliações: 30× (B) e 70× (B1), respectivamente. (C) Espectros EDS com a distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo. (D) Imagens MEV da espessura do filme de Pt. Fonte: Elaborado pelo autor.....	123
Figura 41. Imagens de ângulo de contato (A) antes e (B) após a modificação do sensor. Fonte: Elaborado pelo autor.	124
Figura 42. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de platina flexível em KCl 0,10 mol L ⁻¹ na presença (linha vermelha) e na ausência (linha preta) de uma mistura equimolar de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ ; velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	125
Figura 43. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de platina em mistura equimolar de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,10 mol L ⁻¹ variando a velocidade de varredura em 10, 20, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 160, 200 e 250 mV s ⁻¹ . (B) Gráfico de pontos I versus v ^{1/2} . Fonte: Elaborado pelo autor.	126
Figura 44. Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de platina flexível em meio contendo H ₂ SO ₄ 0,01 mol L ⁻¹ ; velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.	127
Figura 45. Voltamogramas cíclicos na presença (linha vermelha) e ausência (linha preta) de L-Cys 500 μmol L ⁻¹ (PBS pH 6,0); velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	128
Figura 46. Mecanismo de adsorção de L-Cys na superfície do eletrodo de Pt. Fonte: Elaborado pelo autor.....	128

Figura 47. Efeito do pH nas características voltamétricas de L-Cys 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.	129
Figura 48. (A) Voltamogramas cíclico Pt/Bio-PET em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) contendo L-Cys 1000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} . (B) Gráfico linear da corrente de oxidação da L-Cys versus velocidade de varredura (V s^{-1}) ^{1/2} . Fonte: Elaborado pelo autor.	130
Figura 49. (A) Registros de cronoamperometria para concentrações crescentes de L-Cys 3,98, 6,96, 9,93, 12,8, 16,8, 20,7, 24,5, 29,4, 34,2 e 39,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 39,0, 58,0, 67,3, 81,5, 95,5, 100,9, 127,0 e 145,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Pt/Bio-PET, potencial de trabalho: 0,55 V; A solução foi agitada a uma taxa de 1000 rpm (B) Gráfico da corrente de pico versus concentração de L-Cys em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0), obtido a partir de A. Fonte: Elaborado pelo autor.....	131
Figura 50. Respostas cronoamperométricas a adições sucessivas de L-Cys 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e várias espécies interferentes (indicadas por setas), incluindo metionina, tirosina, cafeína, ácido cítrico, uréia, glicose e frutose em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0), potencial aplicado: 0,55 V; Sistema sob agitação. Fonte: Elaborado pelo autor.....	132
Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada (A) direto e (B) reverso. (C) Gráfico de corrente de pico após cada etapa de modificação, obtido de A e B. (D) Diagrama de Nyquist. (E) Circuito equivalente utilizado para simulação dos dados experimentais, na presença de pares redox: Rct, resistência à transferência de elétrons; Rs, a resistência da solução eletrolítica; Cdc, é a capacitância de dupla camada e; W, impedância de Warburg; (F) Gráfico de impedância após cada etapa de modificação, obtido de D. Eletrodo impresso em platina (Pt/BioPET), Pt/BioPET-cisteamina (Pt/BioPET-Cys), Pt/BioPET-Cys-glutaraldeído (Pt/BioPET-Cys-GLA), Pt/BioPET-Cys-GLA-anticorpo (Pt/BioPET-Cys-GLA-Ab), Pt/BioPET-Cys-GLA-(BSA)-Ab and Pt/BioPET-Cys-GLA-(BSA) Ab-SARS-CoV-2 Spike Protein (Pt/BioPET-Cys-GLA-(BSA)Ab-Spike). Fonte: Elaborado pelo autor.	137
Figura 52. Simulação de ajuste do circuito equivalente para a primeira e última etapa de modificação do imunossensor. Fonte: Elaborado pelo autor.....	139
Figura 53. Voltamogramas de onda quadrada direto (A-C) e reverso (A'-C'), e respectivos gráficos de corrente de pico em função dos parâmetros variados (A"-C") para 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína Spike em PBS 1x na presença de mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0); amplitude de 20 a 120 mV (A"), frequência de	

20 a 120 Hz (B") e incremento de potencial de 2 a 10 mV (C"). Fonte: Elaborado pelo autor.....	141
Figura 54. Voltamogramas de onda quadrada direto (A) e reverso (C) obtidos para diferentes concentrações de proteína Spike (0,7, 1,0, 3,0, 5,0 e 7,0 pmol L ⁻¹), em presença de [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). (B) e (D) Gráficos de ln de corrente versus log de concentração de proteína Spike. Condições experimentais SWV: amplitude de pulso: 80 mV; frequência: 80 Hz; potencial de passo: 10 mV. Fonte: Elaborado pelo autor.....	142
Figura 55. (A) Gráficos de Nyquist obtidos para diferentes concentrações da proteína Spike (1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 e 30,0 pmol L ⁻¹), em presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,10 mol L ⁻¹ (pH7,0); (B) Gráfico de concentrações de proteína Spike versus NIC%. Sonda redox: [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.....	143
Figura 56. Voltamogramas de onda quadrada direto (A) e reverso (C) obtidos para diferentes concentrações de proteína Spike (0,7, 1,0, 3,0, 5,0 e 7,0 pmol L ⁻¹) em amostras de saliva sintética, com [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0). (B) e (D) Gráficos de ln de corrente versus log de concentração de proteína Spike. Condições experimentais SWV: amplitude de pulso: 80 mV; frequência: 80 Hz; potencial de passo: 10 mV. Fonte: Elaborado pelo autor.	148
Figura 57. (A) Gráficos de Nyquist obtidos para diferentes concentrações da proteína Spike (1,0, 3,0, 5,0 7,0 e 30,0 pmol L ⁻¹) em amostras de saliva, com [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,10 mol L ⁻¹ (pH7,0); (B) Gráfico das concentrações de proteína Spike versus NIC%, obtido de A. Fonte: Elaborado pelo autor.	149
Figura 58. Montagem do dispositivo proposto em impressão 3D para análises clínicas. Fonte: Elaborado pelo autor.	150
Figura 59. Representação do processo de fabricação e geometria dos eletrodos de folha. As folhas foram coletadas do solo a uma distância máxima de 2m da árvore (Etapa 1). Utilizando o software RDWorks 8.0 foi feito o dimensionamento e os eletrodos foram pirolisados com laser de CO ₂ (etapa 2). O eletrodo foi cortado com laser (etapa 3) e após a pirólise, a área da célula eletroquímica foi delimitada com esmalte de unha transparente (etapa 4). Após 10 minutos, o esmalte estava completamente seco e os eletrodos estavam prontos para uso (etapa 5). Fonte: Elaborado pelo autor.....	153

Figura 60. Imagens MEV da (A) Folha não carbonizada com uma ampliação de (A1) 200x, (A2) 500x e (A3) 1000x; (B) Folha carbonizada com uma ampliação de (B1) 22x, (B2) 30x, (B3) 70x, (B4) 3000x. (C1) Interseção entre folha carbonizada e não carbonizada com ampliação de 100x, (C2) Tecnologia ColorSEM mostra carbono, oxigênio e silício na superfície do eletrodo, ampliação de 500x. Fonte: Elaborado pelo autor.....	156
Figura 61. EDS com mapeamento da tecnologia Color SEM da distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo. Fonte: Elaborado pelo autor.....	157
Figura 62. Espectros Raman (A) folha não carbonizada, (B) folha carbonizada e (C) DG Histograma. Fonte: Elaborado pelo autor.....	158
Figura 63. Espectros FTIR de materiais (—) folha ativada por laser e (—) folha não ativada por laser. Fonte: Elaborado pelo autor.....	159
Figura 64. Voltamogramas cíclicos de eletrodos de folhas obtidos na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L ⁻¹ , em solução de KCl 1 mol L ⁻¹ usando carbono (—) e um Ag/AgCl/KCl _{sat} (—) eletrodo de referência. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	160
Figura 65. Voltamogramas cíclicos de eletrodos de folhas produzidos em diferentes condições de carbonização. Os parâmetros incluem (A) potência do laser (B) velocidade de varredura e (C) lacuna de varredura. As medidas eletroquímicas foram registradas em mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L ⁻¹ , em solução de KCl 1 mol L ⁻¹ . Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	161
Figura 66. (A) Curva de polarização de uma seção de carbono de 3 eletrodos de folha a partir da qual a resistência de folha pode ser derivada. (B) Desenho do projeto do eletrodo mostrando o comprimento aproximado do caminho do fluxo de corrente nos eletrodos, usado para calcular a resistência de contato aproximada. (C) Imagem da configuração usada para registrar as curvas de polarização no painel A. O comprimento de cada seção foi medido com paquímetro para calcular a resistência da folha. O valor médio entre os 3 aparelhos foi de 101 Ω mm ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor.....	162
Figura 67. (A) Imagem de eletrodo ativado por laser produzido a partir de folha de árvore caída. (B) Voltamogramas cíclicos do eletrodo na presença (—) e ausência (—) de uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L ⁻¹ ; Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹ . (C) Diagramas de Nyquist de folha de árvore caída na presença de equimolar de	

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹, em KCl 1,0 mol L⁻¹. A inserção apresenta o circuito de Randles correspondente. Fonte: Elaborado pelo autor. 163

Figura 68. (A) Cronoamperograma usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹, em solução de KCl 1 mol L⁻¹ (curvas de decaimento de corrente, $I \times t$). (B) Dependência de I versus $t^{-1/2}$ a partir da equação de Cottrell para o eletrodo (intervalo de tempo utilizado: 10s). Fonte: Elaborado pelo autor..... 164

Figura 69. (A) Medições voltamétricas cíclicas do sensor baseado em folha na presença $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹, em solução de KCl 1 mol L⁻¹ em diferentes velocidades de varredura (6,25 - 100 mV s⁻¹). (B) Relação das correntes de pico anódicas e catódicas versus a raiz quadrada da taxa de varredura ($v^{1/2}$). Fonte: Elaborado pelo autor. 164

Figura 70. Voltamogramas cíclicos de (A) eletrodo de folha e (B) eletrodo de grafite comercial na presença (—) e ausência (—) de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹, em solução de KCl 1,0 mol L⁻¹; Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor. 165

Figura 71. Dados de reprodutibilidade ($n = 5$) obtidos de voltamogramas cíclicos sucessivos usando uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹, em solução de KCl 1 mol L⁻¹; Velocidade de varredura: 20 mV s⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor. 166

Figura 72. (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo na ausência (—) e presença (—) de DA 3,0 mmol L⁻¹ em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); Velocidade de varredura: 50 mV s⁻¹. (B) Possível reação de eletrooxidação de DA. Fonte: Elaborado pelo autor..... 167

Figura 73. Otimização dos parâmetros do LSV através do mapeamento dos experimentos realizados no software STATSTICA® (A) Gráfico 3D referente ao valor atual obtido no LSV. (B) Gráfico 2D referente ao valor da corrente, estrela vermelha posicionada sobre os maiores valores da corrente dentro do intervalo de confiança. Fonte: Elaborado pelo autor. 168

Figura 74. (A) Voltamogramas de varredura linear registrados em diferentes concentrações de DA (10,0; 50,0; 300,0; 500,0; 700,0; 1000,0 e 1200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹, passo: 10 mV (B) Gráfico de calibração para DA (I_p versus C_{DA}). Fonte: Elaborado pelo autor. 169

Figura 75. (A) Dados de repetibilidade obtidos a partir de voltamogramas de varredura linear sucessivos ($n = 10$) usando uma solução de DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). (B) Os dados de reprodutibilidade foram obtidos a partir de voltamogramas de varredura linear sucessivos ($n = 5$) usando uma

solução de DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito de suporte: PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.....	169
Figura 76. Dados de interferência obtidos a partir de voltamogramas de varredura linear (n = 3) usando uma proporção de 1:1 (dopamina: interferente); (A) solução de ácido ascórbico + DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) Solução de ácido úrico + DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) solução de Uréia + DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) solução de Creatinina + DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (E) solução de Glucose + DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução de PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.	172
Figura 77. Representação do processo de fabricação do dispositivo para detecção eletroquímica portátil. (A) Preparação dos eletrodos com a tinta condutora composta de NP e grafite. (B) Diferentes sistemas de detecção de analitos. (C) Reutilização da plataforma removendo a tinta condutora. Fonte: Elaborado pelo autor.	178
Figura 78. Montagem do dispositivo portátil proposto em impressão 3D para detecção eletroquímica portátil. (A) Bomba de seringa. (B1) Seringa com PBS. (B2) Seringa com amostra. (C) Válvula injetora comutadora. (D) Dispositivo eletroquímico. (E) Descarte de amostra. Fonte: Elaborado pelo autor.	178
Figura 79. Imagens MEV do eletrodo com uma ampliação de (A) 17x, (B) 250x e (C) 400x. (D) Tecnologia ColorSEM mostra carbono e oxigênio na superfície do eletrodo, ampliação de 1000x. Fonte: Elaborado pelo autor.	181
Figura 80. EDS com mapeamento da tecnologia ColorSEM da distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo. Fonte: Elaborado pelo autor.....	182
Figura 81. Voltamogramas cíclicos para ferrocenometanol 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} variando a velocidade de varredura em 30, 50, 70, 90, 110, 130, 160, 200 e 250 mV s^{-1} . (B) Gráfico de pontos I versus $v^{1/2}$. Fonte: Elaborado pelo autor.	182
Figura 82. Efeito do pH nas características voltamétricas de L-Dopa 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Eletrólito de suporte: solução BR 0,1 mol L^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.....	184
Figura 83. (A) Voltamogramas cíclicos na ausência (—) e presença (—) de L-Dopa 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em BR 0,1 mol L^{-1} (pH 4,0) para o eletrodo proposto; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . (B) Mecanismo eletroquímico de oxirredução da L-Dopa. Fonte: Elaborado pelo autor.	185
Figura 84. Comparação entre as técnicas SWV (—) e DPV (—) na presença de L-Dopa 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e na ausência de L-Dopa (—), usando uma solução BR 0,1 mol L^{-1} (pH	

4,0) para o eletrodo proposto. Parâmetros SWV: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\text{step } 1 \text{ mV}$; Parâmetros DPV: $a = 50 \text{ mV}$, tempo de modulação = 25 ms , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.....	185
Figura 85. Resposta DPV para L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) obtida em diferentes (A) incremento de potencial (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV), (B) amplitude (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV) e (C) tempo de modulação (10, 10, 20, 25, 30, 40 e 50 ms), e respectivos gráficos de corrente de pico versus parâmetros variados (A'-C'). Fonte: Elaborado pelo autor.....	187
Figura 86. (A) Voltamograma de pulso diferencial obtido em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) em diferentes concentrações de L-Dopa ($5,0$; $10,0$; $20,0$; $30,0$; $40,0$; $50,0$; $75,0$; $100,0$; $150,0$; $200,0$; $300,0$; $500,0$; $700,0$ e $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Gráfico da corrente de pico versus concentração de L-Dopa, obtido a partir de A. Condições experimentais DPV: amplitude: 90 mV ; tempo de modulação: 40 ms ; incremento de potencial: 8 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.	189
Figura 87. Dados de repetibilidade obtidos a partir de sucessivos voltamogramas de pulso diferencial ($n = 10$) usando uma solução de L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Fonte: Elaborado pelo autor.....	190
Figura 88. Dados de reprodutibilidade ($n = 5$) obtidos a partir de sucessivos voltamogramas de pulso diferencial ($n = 5$) usando uma solução de L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Sensor 1: (—), sensor 2: (—), sensor 3: (—), sensor 4: (—) e sensor 5: (—); Eletrólito de suporte: solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Fonte: Elaborado pelo autor.	191
Figura 89. (A) Voltamogramas cíclicos na ausência (—) e presença (—) de DA $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) usando o eletrodo proposto; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . (B) Mecanismo eletroquímico de oxirredução de DA. Fonte: Elaborado pelo autor.....	196
Figura 90. Gráfico de potencial aplicado versus altura da corrente de pico. Solução padrão de DA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Potencial aplicado: $0,30$; $0,35$; $0,40$; $0,45$; $0,50$ e $0,60 \text{ V}$; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$. Fonte: Elaborado pelo autor.....	197
Figura 91. Estudo sobre o efeito da vazão no sistema FIA usando uma solução de DA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no eletrodo. Vazão: (a) 50 , (b) 70 , (c) 100 , (d) 150 , (e) 200 e (f) $250 \mu\text{L min}^{-1}$; Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; Potencial aplicado: $0,45 \text{ V}$. Fonte: Elaborado pelo autor.....	197

Figura 92. Otimização do volume de injeção no sistema FIA usando uma solução de DA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no eletrodo; Volume de injeção: (a) 50, (b) 100, (c) 150, (d) 200 e (e) 250 μL ; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Potencial aplicado: 0,45 V. Fonte: Elaborado pelo autor. 198

Figura 93. (A) Amperograma obtido pelo sistema FIA para a determinação de DA em amostras de urina sintética (A1, A2, A3). (B) Curva analítica para DA (I_p versus C_{DA}), obtido de A. Concentração das soluções de DA: (a) 2,0, (b) 5,0, (c) 10,0, (d) 20,0, (e) 30,0, (f) 50,0, (g) 70,0 e (h) 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: 0,45 V; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Volume de injeção: 200 μL . Solução de transporte: PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor. 199

Figura 94. Injeções repetidas ($n = 10$) no sistema FIA usando uma solução padrão de DA $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no eletrodo. Volume de injeção: 200 μL ; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Potencial aplicado: 0,45 V. Fonte: Elaborado pelo autor. 200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de parâmetros e aplicações clínicas de POCDs. Fonte: Elaborado pelo autor.....	47
Tabela 2. Otimização de parâmetros para técnica de voltametria de pulso diferencial. Fonte: Elaborado pelo autor.	91
Tabela 3. Valores de recuperação (n=3) para adições de ácido úrico em amostras de suor sintético. Fonte: Elaborado pelo autor.....	94
Tabela 4. Desempenho analítico do GNP/PB para determinação de AU comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor	95
Tabela 5. Desempenho analítico do GNP/PB para determinação de H ₂ O ₂ comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor	102
Tabela 6. Desempenho analítico do biossensor GNP/PB/GOx para determinação de glicose comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor	108
Tabela 7. Valores de recuperação (n=3) para adições de glicose em amostras de suor sintético. Fonte: Elaborado pelo autor.....	109
Tabela 8. Estudo de seletividade no sinal cronoamperométrico de 50,0 μmol L ⁻¹ de glicose. Fonte: Elaborado pelo autor.	111
Tabela 9. Desempenho analítico Pt/Bio-PET para determinação de L-Cys comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor	134
Tabela 10. Otimização de parâmetros para técnica de voltametria de onda quadrada. Fonte: Elaborado pelo autor.	141
Tabela 11. Desempenho analítico do imunossensor de platina flexível sem rótulo para determinação de SARS-CoV-2 em comparação com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.....	145
Tabela 12. Valores de recuperação (n = 3) para adições de dopamina em soro humano e amostra de urina. Elaborado pelo autor.....	170
Tabela 13. Estudo de possíveis interferentes para quantificação de DA, na proporção 1:1 (dopamina: interferente), presentes nas amostras testadas. Elaborado pelo autor.....	171
Tabela 14. Desempenho analítico do sensor de folha de árvore para determinação de DA comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.....	174
Tabela 15. Parâmetros voltamétricos obtidos para FcMeOH em diferentes velocidades de varredura de potencial (mV s ⁻¹). Fonte: Elaborado pelo autor.	183

Tabela 16. Otimização de parâmetros para técnica de voltametria de pulso diferencial. Fonte: Elaborado pelo autor.	188
Tabela 17. Quantificação de L-Dopa em amostra de fármaco com três níveis diferentes de concentração e a diferença entre a quantidade esperada rotulada. Fonte: Elaborado pelo autor.	191
Tabela 18. Estudo de seletividade no sinal DPV de L-Dopa 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.	192
Tabela 19. Desempenho analítico do sensor proposto para determinação de L-Dopa comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.	194
Tabela 20. Otimização de parâmetros para sistema FIA. Fonte: Elaborado pelo autor.	199
Tabela 21. Valores de recuperação ($n = 3$) para adições de dopamina em amostras de urina sintética. Fonte: Elaborado pelo autor.	200
Tabela 22. Estudo de seletividade no sinal do fiograma de DA 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.	201
Tabela 23. Desempenho analítico do sensor para determinação de dopamina comparado com trabalhos da literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.	203

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU – Ácido úrico

AA – Ácido ascórbico

AChE – Acetilcolinesterase

ACE2 – Enzima conversora de angiotensina

Ag – Prata

Ab – Anticorpo

AuNPs – Nanopartículas de ouro

ABS – Acrilonitrila-butadieno-estireno

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

CK – Creatinoquinase

Cys – Cisteamina (*Cysteamine*)

CV – Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*Differential pulse voltammetry*)

DRX – Difração de raios X

DA – Dopamina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*Electrochemical impedance spectroscopy*)

EDS: Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

FAD – Flavina adenina dicuclotídeo

FTIR: Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*)

GOx – Glicose oxidase

GLA – Glutaraldeído (*Gluteraldehyde*)

GNP – Eletrodo à base de esmalte e grafite

GNP/PB – Eletrodo à base de esmalte e grafite modificado com azul da Prússia

GNP/PB/GOx – Eletrodo à base de esmalte e grafite modificado com azul da Prússia e filme de enzima glicose oxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HRP – *Horseradish Peroxidase*

HMDS – *Hexamethyldisilazane*

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

Ig – Imunoglobulina

kDa – Quilodalton

KCl – Cloreto de potássio

KBr – Brometo de potássio

L-Dopa – Levodopa

L-Cys – L-Cisteína (*L-Cysteine*)

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

LSV – Voltametria de varredura linear (*Linear sweep voltammetry*)

LOD – Limite de detecção (*Limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

n – Número de amostras ou análises realizadas

NP – Esmalte para unhas (*Nail polish*)

OMS – Organização mundial da saúde

PEN – poli (naftalato de etileno)

PDMS – plataforma de polidimetilsiloxano

PMMA – Polimetilmetacrilato

PLA – Ácido polilático

Pt – Platina

POCDs – (*point-of-care*)

PVC – Policloreto de vinila

PtNPs – Nanopartículas de platina

PB – Azul da Prússia (*Prussian blue*)

PBS – Tampão fosfato salino

PET – Tereftalato de polietileno

qRT-PCR – Ensaio de reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa em tempo real

QT – Quitosana

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

R_{ct} – Resistência a transferência de carga

R² – Coeficiente de determinação de linearidade

RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

SPE – *Screen-Printed Electrode*

SNC – Sistema nervoso central

SWV – Voltametria de onda quadrada (*Square Wave Voltammetry*)

TCNQ – Tetracianoquinodimetano

UV – Ultravioleta

v – Velocidade de varredura

γ-GT – Glutamiltranspeptidase

μ – micro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	35
1.1 Dispositivos Descartáveis	35
1.2 Tecnologia de Produção de Eletrodos por Serigrafia	36
1.2.1 Tintas Condutoras	39
1.3 Tecnologia de Produção de Eletrodos por Pulverização Catódica e Fotolitografia	40
1.4 Tecnologia de Produção de Eletrodos por Gravação a Laser	42
1.5 Sistemas de Análise Empregando Eletrodos Descartáveis e Reutilizáveis	45
1.5.1 Dispositivos <i>Point-of-care</i> (POCDs)	45
1.5.2 Dispositivos Microfluídicos	47
1.6 Tecnologia de Impressão 3D para Produção de Dispositivos Eletroquímicos	49
1.7 Eletrodos Quimicamente Modificados	50
1.8 Biossensores Eletroquímicos	52
1.8.1 Biossensores Enzimáticos	53
1.9 Imobilização Enzimática.....	55
1.9.1 Imobilização por Ligação Covalente.....	56
1.9.2 Imobilização por Adsorção Física.....	56
1.9.3 Imobilização por Aprisionamento	57
1.9.4 Imobilização por Reticulação	57
1.10 Imunossensores Eletroquímicos	58
1.10.1 Anticorpos e Proteínas Receptoras.....	59
1.11 Biomarcadores de interesse clínico.....	61
1.11.1 Ácido Úrico	62
1.11.2 Peróxido de Hidrogênio	63
1.11.3 Glicose.....	64
1.11.4 L-Cisteína.....	65
1.11.5 Proteína Spike	66
1.11.6 Dopamina	68
1.11.7 L-Dopa	70
OBJETIVOS	72
2.1 Objetivo Geral.....	72

2.2 Objetivos Específicos	72
CAPÍTULO I	74
SENSOR ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL MODIFICADO COM AZUL DA PRÚSSIA PARA DETECÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES DE INTERESSE CLÍNICO	74
MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1 Materiais	74
3.2 Fabricação dos Sensores Descartáveis por Serigrafia.....	74
3.3 Modificação dos Sensores com Azul da Prússia.....	75
3.4 Confeção do Biossensor.....	75
3.5 Caracterização Morfológica e Química dos Sensores	76
3.6 Medidas Eletroquímicas	77
RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1 Caracterização Morfológica e Química	78
4.2 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos GNP e GNP/PB	83
4.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Ácido Úrico.....	86
4.4 Aplicação de GNP/PB como Sensor Vestível	95
4.5 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Peróxido de Hidrogênio	99
4.6 Construção e Avaliação do Biossensor de Glicose.....	102
CONCLUSÕES.....	112
CAPÍTULO II.....	113
DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PLATINA FLEXÍVEIS SOBRE A SUPERFÍCIE DE FOLHAS DE ECOPET APLICADO COMO SENSOR PARA DETECÇÃO DE L-CISTEÍNA E UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR LABEL-FREE PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SPIKE.	113
MATERIAIS E MÉTODOS	113
5.1 Materiais	113
5.2 Fabricação dos Eletrodos de Platina	114
5.3 Caracterização Morfológica e Química dos Sensores	117
5.4 Medidas Eletroquímicas	118
5.5 Fabricação da Plataforma 3D para Medições Eletroquímicas	119
5.6 Confeção do Imunossensor	119
RESULTADOS E DISCUSSÃO	121

6.1 Caracterização Morfológica e Química	121
6.2 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo de Platina	124
6.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de L-Cisteína.....	127
6.4 Construção e Avaliação do Desempenho Eletroquímico do SARS-CoV-2- AB/Pt/Bio-PET como um imunossensor <i>label-free</i>	134
6.5 Determinação Eletroquímica da Proteína <i>Spike</i>	139
6.6 Determinação da Proteína <i>Spike</i> da SARS-CoV-2 em amostra de saliva artificial	147
6.7 Aplicação do dispositivo proposto em impressão 3D para análises clínicas	149
CONCLUSÕES.....	151
CAPÍTULO III	152
FABRICAÇÃO VERDE DE ELETRODOS DE CARBONO DESCARTÁVEIS FEITOS DE FOLHAS DE ÁRVORES CAÍDAS DA ESPÉCIE <i>Persea americana</i> MILL USANDO UM LASER DE CO₂ E SUA APLICAÇÃO ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE DOPAMINA.	152
MATERIAIS E MÉTODOS	152
7.1 Materiais	152
7.2 Fabricação dos Sensores Sustentáveis	152
7.3 Caracterização Morfológica e Química dos Sensores	154
7.4 Medidas Eletroquímicas	154
RESULTADOS E DISCUSSÃO	155
8.1 Caracterização Morfológica e Química	155
8.2 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos	159
8.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Dopamina.....	166
CONCLUSÕES.....	175
CAPÍTULO IV.....	176
NOVA PLATAFORMA REUTILIZÁVEL PARA CONFECÇÃO DE ELETRODOS À BASE DE GRAFITE E SUA APLICAÇÃO ANALÍTICA MULTIVARIADA.....	176
MATERIAIS E MÉTODOS	176
9.1 Materiais	176
9.2 Construção da Plataforma Eletroquímica e Confecção dos Eletrodos.....	176
9.3 Caracterização Morfológica e Eletroquímica dos Sensores.....	179
9.4 Preparo de Amostras	179

RESULTADOS E DISCUSSÃO	181
10.1 Caracterização Morfológica e Eletroquímica	181
10.2 Caracterização e Detecção Eletroquímica de L-Dopa	183
10.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Dopamina em Sistema de Injeção em Fluxo (FIA)	196
CONCLUSÕES.....	204
CONCLUSÃO GERAL	205
INFORMAÇÕES ADICIONAIS	206
13.1 Participação em eventos científicos	206
13.2 Materiais encaminhados para publicação	206
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208

INTRODUÇÃO

1.1 Dispositivos Descartáveis

A disseminação de plataformas eletroquímicas descartáveis de baixo custo tornou-se de grande interesse para análises clínicas. A simplicidade, rapidez de resposta e possibilidade de miniaturização proporcionadas por essas plataformas são características bastante atrativas para sistemas analíticos e atendem aos requisitos para obtenção de dispositivos de ponto atendimento (POCs, do inglês “*point-of-care*”). O uso de POCs permite o monitoramento clínico descentralizado de espécies de grande interesse em análises clínicas, o que pode proporcionar uma melhora na qualidade de vida dos pacientes [1]. Outra vantagem destes dispositivos é que diferente dos eletrodos de carbono vítreo (GCE, do inglês “*glassy carbon electrode*”) não necessitam de tratamento químico para a regeneração da superfície do eletrodo após a análise de analitos de interesse, evitando problemas de envenenamento da superfície do eletrodo, o que diminui o custo com reagentes e tempo de análise.

A escolha do substrato para a produção dos sensores descartáveis deve ser analisada levando em questão a fácil produção, reprodutibilidade e repetibilidade do sensor, produção em larga escala e propriedades físicas e químicas. Nesse sentido, alguns materiais que são utilizados como substratos são descritos na literatura. Por exemplo, Dossi e colaboradores [2] utilizaram o papel de filtro para discriminação de diferentes teores de dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e paracetamol. Chagas *et al.* [3] relatam o uso do papel cromatógrafo para análise quantitativa de potássio e sódio em amostras de lágrimas. Ataíde *et al.* [4] utilizando papel de escritório detectaram, e quantificaram fusosemida em amostra de urina sintética. Orzari *et al.* [5] propuseram a detecção de catecol em amostras ambientais utilizando um dispositivo eletroquímico descartável baseado na pintura do eletrodo a partir da transferência direta do grafite de um lápis, sobre um substrato de papelão. Já Oliveira *et al.* [6] utilizando fita adesiva médica como substrato desenvolveram um sensor eletroquímico para detecção de hemoglobina.

Dentre os substratos citados que podem ser utilizados na confecção de sensores eletroquímicos descartáveis, merece destaque o tereftalato de polietileno (PET) que devido às suas excelentes propriedades, como estabilidade dimensional e boas propriedades de barreira em relação à umidade e gases e flexibilidade, o que pode ser ideal para a construção de sensores vestíveis, por exemplo [7]. Dada as características

vantajosas, o consumo deste tipo de material tende a aumentar no decorrer dos anos levando a uma quantidade elevada de resíduos gerados, sendo descartados de maneira incorreta no meio ambiente. Desse modo, na visão da química verde, o uso de materiais recicláveis é extremamente atrativo devido à elevada disponibilidade, custo relativamente zero e redução dos impactos ambientais.

1.2 Tecnologia de Produção de Eletrodos por Serigrafia

A tecnologia de impressão de eletrodos por serigrafia (do inglês, “*Screen-Printed Electrode*”, *SPE*) tem sido utilizada em larga escala na última década [8]. Utilizando substratos descartáveis e com superfície inerte, é realizada a deposição de um filme de tinta condutora através do uso de uma máscara ou tela adequada, definindo o *design* do sensor para cada tipo de aplicação. A precisão da impressão é influenciada por características como o formato da tela ou máscara e transferência da tinta [9]. Outros fatores também afetam a impressão dos eletrodos, como as propriedades da tinta e substrato utilizado, velocidade do raspador, interferência do ambiente externo (temperatura e umidade), afetando diretamente na resolução da impressão [10]. A Figura 1 apresenta as etapas envolvidas no ciclo de impressão para produção de eletrodos. Inicialmente é realizado a deposição da tinta sobre a superfície do substrato previamente definido, nesta etapa há também a definição do *design* de impressão através da utilização de máscaras. Em seguida, a tinta depositada preenche as áreas abertas definidas pelas máscaras. Por fim, é realizado a remoção das máscaras do substrato, formando então a camada impressa.

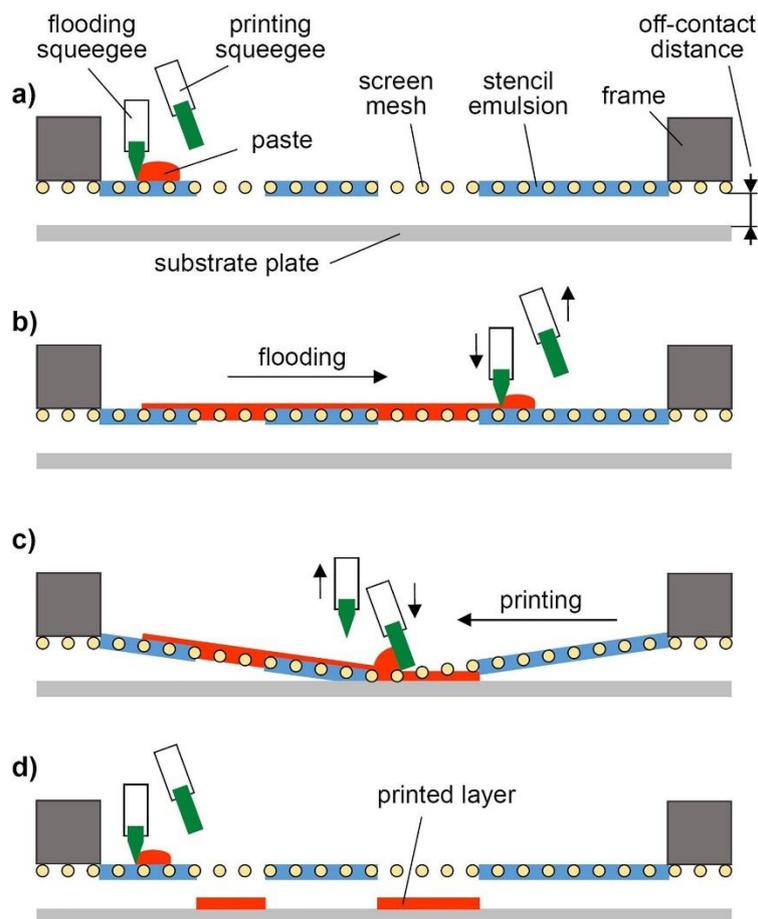


Figura 1. Representação esquemática das diferentes etapas do ciclo de impressão. (a) Estado inicial com pasta/tinta depositada na tela, (b) distribuição de pasta/tinta pela tela para preenchimento de áreas abertas (inundação), (c) impressão no substrato, (d) estado final com camada impressa. Fonte: Moldenhauer *et al.* [11].

Esta técnica permite a confecção de sistemas eletroquímicos mais completos e robustos, contendo o eletrodo de trabalho, referência e eletrodo auxiliar no mesmo substrato, diferentemente dos sistemas convencionais [12]. Além disso, os SPE permitem a produção de dispositivos miniaturizados, vestíveis e portáteis, com relativo baixo custo, facilidade de produção em massa, reprodutibilidade, possibilitando também a incorporação de modificadores diretamente na tinta [13].

Tem-se o conhecimento da serigrafia datada da China antiga como uma técnica para produção de artes em roupas através do tingimento [14]. Em seguida, por volta do ano de 1468, Johannes Gutenberg traz a primeira contribuição para a impressão através da utilização de uma tinta à base de óleo e ainda a utilização de uma prensa de madeira similar à prensa de parafuso agrícola do período. Tal feito permitiu a produção em massa

de livros impressos. Já no início do século XX a tecnologia de serigrafia foi voltada para o campo da indústria eletrônica com a fabricação de circuitos condutores, transistores de filmes finos, produção de células solares e dispositivos eletrônicos [15]. Desde então, o uso da tecnologia tem sido exaustivamente empregada na eletroanalítica para o desenvolvimento de novos sensores e biossensores. A título de exemplo, o mercado dispõe de eletrodos comerciais com diferentes formulações e que podem ser vendidos diretamente ao público com ou sem modificações em sua superfície, por exemplo, aqueles comercializados pela empresa DropSens®.

A literatura apresenta diversas aplicações desses dispositivos na eletroanalítica, desde análises clínicas [16], ambientais [17] e alimentícia [18] como a detecção de diferentes tipos de analitos através de diversas técnicas. Diversos materiais podem ser utilizados para a confecção deste dispositivos, como materiais carbonáceos, nanopartículas de ouro (AuNPs), nanopartículas de platina (PtNPs), entre outros [19-21]. No trabalho de Rendí e colaboradores, foi realizada a modificação de eletrodos impressos com filmes nanoestruturados de carbono para a detecção do biomarcador de câncer pancreático CA19-9. A incorporação de nano-cebola de carbono por se tratar de um material alótropo do carbono que consistem em uma estrutura concêntrica de fulereno multicamada, com propriedades interessantes, como alta área superficial e condutividade elétrica [22], demonstrou alta versatilidade na detecção CA19-9 em lisados de células inteiras de adenocarcinoma colorretal [23]. Durai *et al.* [24] aplicaram SPEs modificados à base de ferro em sistema POCDs, para a detecção em níveis traço danos no DNA através do biomarcador 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina em biofluidos humanos. Outro trabalho utilizando POCDs foi realizado no diagnóstico precoce da doença de Alzheimer, aplicando sensores impressos com carbono, prata e cloreto de prata. O biossensor foi capaz de identificar a isoforma da proteína p53, biomarcador da doença com alta precisão [25]. Eletrodos descartáveis, com sensibilidade aprimorada através de modificação de sua superfície, foram aplicados na detecção individual e simultânea de pesticidas fenobucard, carbaril e carbosulfan. O sensor descartável foi confeccionado usando apenas tinta de carbono para impressão em papel transparente de baixo custo [26]. O sensor foi capaz de determinar os três pesticidas em amostras de arroz e água, se apresentando como uma ferramenta promissora no controle ambiental de resíduos de pesticidas para diferentes amostras agrícolas. Outro trabalho foi realizado para a detecção de pesticidas organofosforados em amostras de água, porém, através da imobilização da enzima acetilcolinesterase (AChE) [27]. Utilizando SPCEs de tinta de carbono sem modificação

e explorando-se um novo ensaio voltamétrico, foi realizada a detecção simultânea de vitaminas tiamina, riboflavina e piridoxina em produtos farmacêuticos e alimentícios [28].

1.2.1 Tintas Condutoras

Para a confecção de eletrodos descartáveis é primordial a utilização de tintas condutoras, pois determinam o desempenho elétrico e mecânico dos sensores eletroquímicos. Além disso, as tintas condutoras devem possuir flexibilidade, possibilidade de miniaturização durante o processo de impressão, leveza e biocompatibilidade, que são requisitos desejáveis no desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos [29]. Ademais, graças a estas propriedades o crescimento no desenvolvimento de tintas condutoras teve um aumento significativo nos últimos anos [30, 31]. Esta procura se deve a fabricação de dispositivos eletrônicos, incluindo células fotovoltaicas, diodos orgânicos emissores de luz, displays e eletrodos flexíveis [32, 33].

A produção de tintas condutoras começa com a escolha do solvente ou mistura de solventes apropriados, que são compostos por aglutinantes termoplásticos e surfactantes ou polímeros que atuam como estabilizadores [31]. Eles são capazes de formar produtos flexíveis, tendo um importante papel no desenvolvimento de sensores vestíveis. Dentre os materiais condutores para a produção das tintas, encontra-se nanopartículas metálicas (óxidos de cobre, titânio, estanho e ferro), materiais de carbono (grafeno, grafite, nanotubos de carbono e outros alótropos do carbono) e materiais poliméricos (polipirrol, polianilina e polietilenodioxitiofeno) [29, 30]. Tintas isolantes poliméricas também são encontradas na literatura [14, 34, 35]. Huang e colaboradores [36] estudaram diferentes processos de impressão a jato de tinta à base de grafeno. O estudo avaliou o efeito da utilização de uma e mais camadas de tinta em relação à condutividade elétrica, sendo aplicada em seguida como um sensor não enzimático. Já Li e Chen [37] trabalharam com a síntese de uma tinta condutora utilizando nanopartículas de cobre de tamanho de 2,5 nm. Tintas com tamanho de nanopartículas menores que 10 nm apresentam uma melhor uniformidade no momento de deposição sob o substrato. Além disso, favorece o aumento da área superficial específica, sendo interessante em processos de modificação com (bio)materiais para sensores eletroquímicos.

O uso de diferentes materiais no processo de produção de tintas condutoras torna inviável na confecção de dispositivos em regiões pouco desenvolvidas. A toxicidade

também é outra problemática uma vez que causa danos ambientais. Outro ponto está relacionado a durabilidade destes materiais. Por exemplo, tintas condutoras de cobre estão suscetíveis a oxidação de maneira mais acentuada, comprometendo assim a condutividade e estabilidade dos dispositivos. Dessa forma, a procura por materiais que supram estas desvantagens são requisitados.

Nesse sentido, pela experiência do grupo de pesquisa na produção de tintas condutoras, sugere-se nesse trabalho o uso do grafite e esmalte de unha para a produção de tintas condutoras frente às problemáticas apresentadas. O grafite apresenta boa condutividade elétrica, estabilidade, baixa corrente residual e uma ampla janela de potencial [38], o que o torna interessante na aplicação para detecção de diversos analitos. O esmalte para unhas (“*nail polish*”, NP) sendo um composto polimérico que apresenta em sua formulação a nitrocelulose que possui baixa toxicidade e rápida absorção, secagem e boa formação de filmes; resinas termoplásticas que conferem flexibilidade a tinta e agentes de suspensão que ajudam na uniformidade e boa viscosidade ao material, o que se apresenta promissor para a fabricação de tintas condutoras de grafite [39].

1.3 Tecnologia de Produção de Eletrodos por Pulverização Catódica e Fotolitografia

Além da tecnologia de impressão de eletrodos a base de tintas condutoras para a produção de sensores descartáveis, outras técnicas e metodologias são encontradas na literatura [40-43]. A técnica de pulverização catódica (do inglês, “*cathodic sputtering technique*”) consiste na remoção de átomos de uma superfície (substrato) alvo por intermédio do bombardeamento de partículas energéticas através da diferença de potencial. Descoberta pelo físico inglês W.R. Groove em 1852 e desenvolvida como uma técnica de deposição de filmes finos por Irving Langmuir em 1920, a pulverização catódica tornou-se uma técnica aliada na produção de dispositivos eletrônicos, sendo uma técnica menos dispendiosa [44].

O processo tem início em câmaras de vácuo utilizando um gás inerte, como o argônio, por exemplo, em baixa pressão. A exposição do gás a uma fonte de excitação elétrica é responsável pela retirada de elétrons que constituem o gás, gerando íons positivos, elétrons e átomos neutros, que formam um plasma. A partir desse momento as partículas energéticas geradas são aceleradas e bombardeiam o alvo metálico fazendo com que os átomos sejam ejetados em direções aleatórias. Uma parte dos átomos ejetados colide com a superfície do substrato utilizado, formando o filme fino de interesse [45].

Importante ressaltar que este processo de colisão não depende apenas da energia e massa dos íons, mas também de algumas propriedades do substrato, como a textura, massa dos átomos, orientação e estrutura eletrônica [46].

Apesar da deposição de filmes por *sputtering* apresentar vantagens; tais como: deposição uniforme, possibilidade de deposição de filmes compostos (óxidos, carbetos, nitretos e fluoretos), aplicável a materiais isolantes e refratários, excelente aderência ao substrato e controle de parâmetros de crescimento do filme [47], poucos trabalhos são encontrados na literatura para a confecção de eletrodos para fins eletroanalíticos. Kokkinos e colaboradores [48] desenvolveram um dispositivo miniaturizado flexível para determinação ultrasensível *in situ* de mutações do DNA. O filme fino depositado no substrato flexível de poli-imida era composto por Bi, Ag e Pt. Parâmetros para a fabricação do sensor foram estudados; tais como: dimensões do substrato, tamanho e espessura do filme de Bi (200 a 800 nm), demonstrando que a reprodutibilidade do sensor é diretamente afetada. No trabalho de Brett *et al.* [49] foi demonstrado o desenvolvimento de um eletrodo metálico de (Au) sobre a superfície de um substrato de PVC. Aproveitando as reações de bioconjugação e alta área superficial do Au, foram realizadas imobilizações enzimáticas, com foco para a glicose oxidase. Mais recentemente, um trabalho do grupo em um trabalho realizado por Oliveira *et al.* [50] foram confeccionados eletrodos flexíveis de Pt para detecção de biomarcadores da doença de Parkinson. O poli (tereftalato de etileno) (Bio-PET) foi utilizado como substrato para a produção dos sensores devido às suas propriedades mecânicas e térmicas, aliadas ao seu baixo custo [51].

A fotolitografia também é uma técnica conhecida na fabricação de eletrodos através da deposição de um filme fino. A técnica data da década de 1817 com Joseph Nicephore Niepce ao pesquisar formas de tornar permanente em um substrato uma imagem observada em uma câmera escura. Para isso Niepce utilizou como substrato placas de vidro, pedras calcárias, placas de cobre e estanho. Após adaptações no decorrer dos anos tem sido utilizada na fabricação de aparelhos eletrônicos e semicondutores [52]. O método consiste na aplicação de uma camada homogênea de um polímero fotossensível e de uma película sobre o substrato com padrões de desenhos previamente definidos após a exposição a luz UV. Além disso, o processo permite resultados com resolução de filmes de até 20 μm [53], o que é essencial na produção de sensores flexíveis. As propriedades do polímero também devem ser levadas em conta, tais como: ter vida longa na ausência de luz, apresentar boa aderência ao substrato, fácil reprodutibilidade e boa resolução,

garantir uma máscara estável ao tratamento pretendido e ser de fácil remoção após o processo de deposição [54].

Uma das aplicações da técnica é na utilização para posterior deposição de filmes finos metálicos por *sputtering*, uma vez que após a formação do padrão desejado na superfície do substrato o mesmo é capaz de receber a deposição do filme particulado. A partir destas características a técnica tem sido utilizada no desenvolvimento de dispositivos miniaturizados e com fabricação em larga escala. Dessa forma, alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura para a construção de sensores eletroquímicos. Kannan *et al.* [55] utilizaram eletrodos de Pt padronizados por fotolitografia e modificados com nanotubos de carbono. Hondred *et al.* [56] prepararam eletrodos em fase de solução de tintas de grafeno utilizando a fotolitografia. A resolução do filme de tinta de 20 μm permitiu flexibilidade ao sensor. Purwidyantri *et al.* [57] desenvolveram um eletrodo nanoporoso contendo matrizes de Au altamente ordenadas para detecção eletroquímica da *Staphylococcus aureus*. Desse modo, é possível observar a utilização da técnica na construção de diferentes plataformas e dispositivos eletroanalíticos para fins ambientais, clínicos e industriais.

1.4 Tecnologia de Produção de Eletrodos por Gravação a Laser

A tecnologia de produção de eletrodos por gravação a laser é uma nova técnica para produzir sensores de baixo custo, alto desempenho e de maneira sustentável. O método se mostra eficiente em termos de recursos, pois não necessita de nenhuma matéria-prima específica, e qualquer superfície carbonácea funcionaria como um ótimo substrato [58]. Em comparação com outras abordagens para a produção de eletrodos, a fabricação de eletrodos por laser é uma síntese verde de etapa única. Dessa forma, sua fabricação é instantânea e prova ser ambientalmente benigna, pois não requer nenhum tratamento químico, gastando muita energia e tempo na recuperação de produtos químicos ou solventes descartados [59].

O processo baseia-se em focalizar um feixe de laser para criar uma microestrutura em um substrato com *design* previamente definido, que pode então ser usado como eletrodo. Dentre os tipos de lasers empregados para a fabricação de filmes percussores de carbono, tem-se os lasers de pulso ultravioleta ultracurto, lasers de diodo azul-violeta/azul, lasers pulsados de infravermelho próximo e lasers de CO₂ de onda contínua/pulsada de infravermelho médio [60]. No entanto, nem todos os lasers são

adequados para formar filmes precursores de carbono, ou mesmo filmes de alta qualidade, que requerem comprimentos de onda específicos e densidade de energia laser apropriada, sendo assim escolha do laser escolhida depende do tipo de substrato e aplicação. Além disso, após a escolha do laser alguns parâmetros influenciam o resultado de processamento, como a potência do laser, o tamanho do feixe de laser na superfície do substrato, velocidade de gravação do laser (velocidade de varredura) e distância focal [61]. Estes parâmetros dão origem a diferentes estruturas no regime nano e micrômetro, bem como diferenças no espectro Raman, condutividade elétrica e hidrofiliicidade da interface do substrato. Também influenciam na transferência de elétrons e área eletroativa do eletrodo, tornando-o ideal para uso em diversas aplicações, como baterias, supercapacitores e (bio)sensores eletroquímicos [60, 62, 63]. Um esquema de fabricação e dois exemplos de projetos de eletrodos por gravação a laser de eletrodos são mostrados na Figura 2.

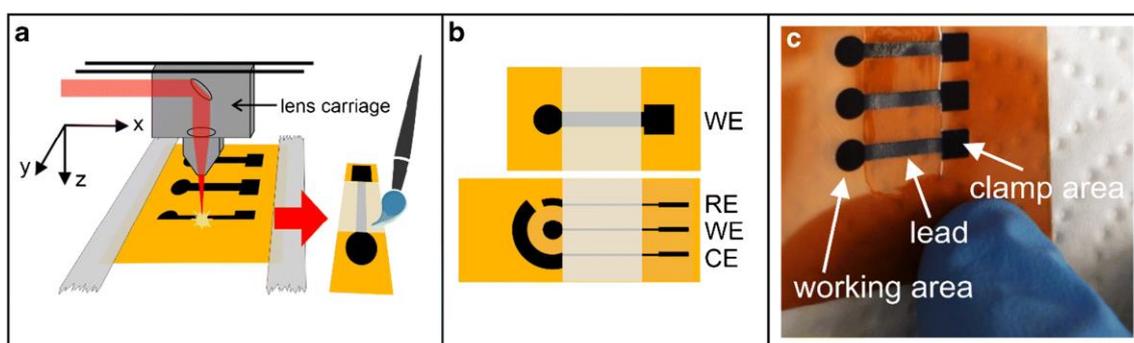


Figura 2. Esquema ilustrativo de fabricação de eletrodos por gravação a laser (a), esboços de designs de eletrodos usados (eletrodo de trabalho WE, contraeletrodo CE, eletrodo de referência RE), superior = design “simples”, inferior = design de 3 eletrodos (b), foto de eletrodos preparados (c). Fonte: Behrent *et al.* [61].

Dentre as aplicações da gravação a laser, a fabricação de sensores eletroquímicos merece destaque e alguns trabalhos são encontrados na literatura. Por exemplo, Costa *et al.* [64] demonstraram que o substrato de poli-imida comercial pode ser convertido em filmes porosos de grafeno em um processo único e escalonável usando um laser infravermelho (IR) de CO₂. Os eletrodos produzidos foram aplicados na detecção de múltiplos analitos como ácido úrico, nitrito, peróxido de hidrogênio e ciprofloxacina. De Araujo *et al.* [65] desenvolveram eletrodos nanoestruturados em dispositivos baseados em papel. O custo estimado de produção do eletrodo foi de USD 0,025 por dispositivo, considerando o custo do papelão; tubo do laser de CO₂ e sua vida útil projetada; cola para

delimitação de área; e tinta prateada. Em outro trabalho, Zhang *et al.* [66] desenvolveram eletrodos de grafeno 3D para microsupercapacitores. Os autores utilizaram uma tinta à base de lignina e álcool polivinílico (PVA) para produzir filmes finos por revestimento de lâmina seguido de gravação a laser para fabricação dos eletrodos. Os eletrodos demonstram condutividade de até $66,2 \text{ S cm}^{-1}$ e têm uma alta área de superfície específica ($338,3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Estas características demonstraram que a lignina pode ser usada diretamente para produção de eletrodos microsupercapacitores sem a necessidade de aglutinantes e coletores de corrente.

Outros componentes são ricos precursores de carbono, como a celulose e hemicelulose [67], e estão presentes em folhas de árvores [68-70]. No entanto, o processo de gravação a laser pode alcançar rapidamente um grau relativamente alto de grafitação em materiais lignocelulósicos. Um exemplo disso foi realizado por Ye *et al.* [71] que demonstraram que a estrutura de lignocelulose reticulada inerente à madeira pode ser transformada em grafeno poroso usando gravação a laser de CO_2 . Nesse sentido, aproveitando as propriedades lignocelulósicas, é proposto pela primeira vez a fabricação de eletrodos a partir de folhas secas caídas de árvores da espécie *Persea americana Mill* (Figura 3). A *Persea americana Mill* conhecida popularmente como abacateiro possui folhas coriáceas, lanceoladas e lustrosas, flores pequenas (5 mm a 10 mm de diâmetro) de um verde esbranquiçado e folhas simples, com 10 a 30 cm de comprimento x 3,5 a 19 cm de largura [72]. Além disso, este tipo de espécie de árvore apresenta folhas consistentes, resistentes e flexíveis, o que a torna um substrato de interesse para confecção de eletrodos.

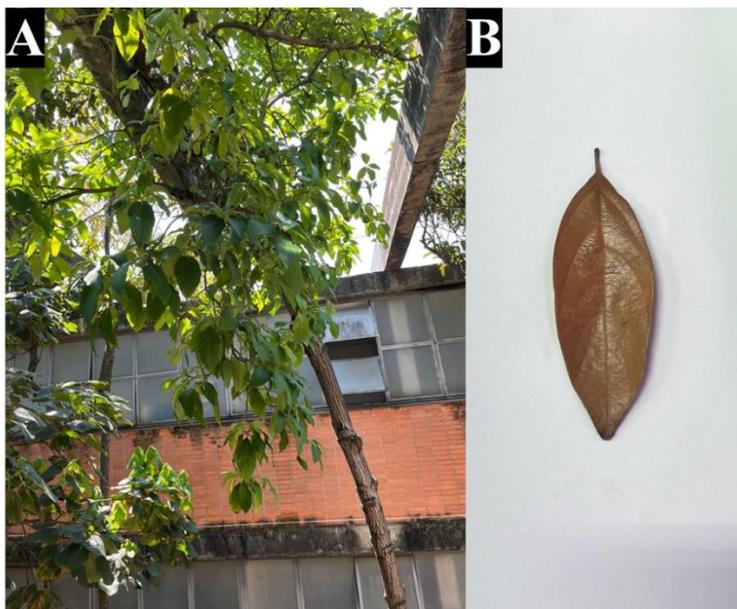


Figura 3. Abacateiro localizado no Instituto de Química do Campus USP Butantã. (A) Árvore com folhas verdes. (B) Folha seca. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.5 Sistemas de Análise Empregando Eletrodos Descartáveis e Reutilizáveis

1.5.1 Dispositivos *Point-of-care* (POCDs)

Dispositivos eletroanalíticos que possam ser utilizados em regiões pouco desenvolvidas e com um baixo custo tem sido requeridos frente aos testes convencionais como ELISA (do inglês, “*Enzyme-linked immunosorbent assay*”), ensaios de reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR, do inglês “*Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction*”), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS, do inglês “*Liquid chromatography-mass spectrometry*) e radioimunoensaio (RIA, do inglês “*Radioimmunoassay*”). Estes métodos apresentam desvantagens quanto a complexidade das análises, alto custo com reagentes e pessoal especializado, além de não preencherem os requisitos essenciais para utilização imediata próximo ao paciente. Nesse sentido, os dispositivos para análises *point-of-care* surge como uma alternativa para estas problemáticas, permitindo um melhor diagnóstico e monitoramento de doenças.

No Brasil, os testes e dispositivos POCDs são conhecidos por “*Testes Laboratoriais Remotos*” de acordo com a norma regulamentadora da RDC 302/2005 da ANVISA. Esta norma prevê um comitê para análise da implantação e gestão das

tecnologias. Já a sua certificação é conferida pela ISO 9001/2015, a qual é responsável pela análise e garantia da qualidade dos processos internos e segurança dos resultados. Quanto a classificação, os dispositivos POCDs podem ser classificados de duas maneiras, como dispositivos de mão ou dispositivos de porte de bancada. Em relação aos dispositivos de mão, estes são desenvolvidos por técnicas de microfabricação, levando a automatização do sistema desde o preparo da amostra, análise e detecção do sinal qualitativo ou quantitativo. Já os dispositivos de pequeno porte de bancada são versões miniaturizadas de equipamentos laboratoriais em tamanho e complexidade [73].

Os POCDs podem ser classificados em três gerações [74]: A primeira geração constitui em testes qualitativos discriminando resultados positivos ou negativos. O princípio de detecção é simplesmente baseado em reações de indicadores químicos e/ou reações imunológicas, como a imunocromatografia de fluxo lateral, tendo o teste de gravidez adquirido em farmácia como o mais popular. A segunda geração corresponde a análises quantitativas, sendo utilizado tiras de teste integradas a equipamentos portáteis, robustos e de fácil manuseio. As tiras são usadas de modo específico, portando reagentes e elementos microssistemicos, como os biossensores e sistemas microfluidicos. O teste mais conhecido para esse tipo de geração é a análise de açúcar no sangue utilizando glicosímetros. Já os de terceira geração são mais recentes e vem ganhando espaço, pois utilizam equipamentos como os *smartphones* relógios de pulso que permitem a análise e diagnóstico em tempo real [73, 75]. A Tabela 1 mostra alguns parâmetros e aplicações clínicas de POCDs.

Tabela 1. Lista de parâmetros e aplicações clínicas de POCDs. Fonte: Elaborado pelo autor.

Aplicação clínica	Parâmetro
Enzimas	Amilase, fosfatase alcalina, CK, AST, ALT, γ -GT
Metabólitos	Colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeos, creatinina, uréia, ácido úrico, bilirrubina, lactato, amônia
Diabetes <i>mellitus</i>	Glicose, HbA _{1c} , microalbumina
Agentes infecciosos	HIV, mononucleose infecciosa, <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Plasmodium falciparum e vivax</i> , Influenza A e B, <i>Streptococcus A e B</i> , SARS-CoV-2
Teste de gravidez	Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)
Frações de hemoglobina	CO-Oximetria
Monitoramento de drogas terapêuticas, triagem de drogas de abuso	Drogas terapêuticas, álcool, anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepínicos, canabinóides, cocaína, metadona, opiáceos
Análise com fita para urina	Ácido ascórbico, glicose, bilirrubina, cetona, gravidade específica, sangue, pH, proteína, urobilinogênio, leucócitos, microalbumina (MA), anti-VC, nitrito
Eletrólitos	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ⁺⁺
Reumatologia	Anticorpos contra vimentina citrulinada mutada (anti-MCV)
Diagnóstico <i>in vitro</i> de alergia	IgE específica para alergia

Fonte: Luppá *et al.* [76]

1.5.2 Dispositivos Microfluídicos

Com a miniaturização dos dispositivos eletroanalíticos, a microfluídica tem ganhado espaço por ser uma importante ferramenta para análises e diagnósticos clínicos, uma vez que oferece vantagens como utilização pequenos volumes de reagentes, fácil

automação, portabilidade, rapidez e boa reprodutibilidade. Um sistema microfluídico é uma ciência que combina a utilização de microcanais na ordem de 10 a 100 μm e microcâmaras representadas por materiais como plásticos, polímeros, sílico e metais [77]. Combinado a estas características, o sensoriamento eletroquímico desempenha um papel importante no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos. Whitesides, por exemplo reportou diversas contribuições no campo da análise molecular, biologia molecular e microeletrônica através da microfluídica [78].

Para ser considerado um sistema microfluídico alguns componentes devem estar presentes como: canais microfluídicos, reservatórios e instrumentos que proporcionem a propulsão dos fluidos [79]. Além disso, diversas formas de detecção podem ser acopladas aos sistemas microfluídicos, como a fluorimétrica, colorimétrica e eletroquímica. Dentre estas, destaca-se a eletroquímica com a utilização de eletrodos e microeletrodos acoplados aos sistemas microfluídicos, possibilitando uma maior versatilidade destes sistemas. Além do mais, as técnicas eletroquímicas acopladas a estes sistemas incluem a amperometria; voltametria cíclica; coulometria e potenciometria, o que aumenta e melhora a faixa de trabalho para diversos analitos. Também devem apresentar propriedades elétricas, facilidade de fabricação e integração entre bombas, microválculas e detectores.

Entre os materiais amplamente utilizados para a construção de dispositivos microfluídicos, o polimetilmetacrilato (PMMA), conhecido popularmente por acrílico, tem sido bastante empregado devido ao seu baixo custo, propriedades mecânicas e a adequação ao processo de corte a laser. Além disso, o PMMA por não ser um material poroso, permite evitar a contaminação dos sensores por adsorção ou absorção. Utilizado como substrato o PMMA permite a confecção de moldes para eletrodos ou microeletrodos através do desgaste da superfície. Por exemplo, no trabalho de Carlos *et al.* [80] foi desenvolvido um microimunossensor, onde anticorpos monoclonais dirigidos contra o explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) foram conduzidos pelo microimunossensor multicanal.

A vedação dos sistemas microfluidicos é outro ponto que merece atenção, pois permitem configurar o canal com a geometria desejada e controlar a velocidade do fluxo, evitando também vazamento do mesmo. A vedação pode ser realizada por fitas funcionais ou por polímeros como o polidimetilsiloxano (PDMS). Diferente das fitas adesivas, o PDMS possibilita a construção de diferentes formas tridimensionais, levando ao desenvolvimento de dispositivos customizados. Além disso, este tipo de vedação permite

a reutilização do dispositivo, uma vez que o encaixe pode ser realizado por meio de parafusos. Senel *et al.* [81] desenvolveram um sensor eletroquímico microfluídico para detecção de líquido cefalorraquidiano e dopamina no sangue que são biomarcadores da doença de Parkinson. A vedação da microcâmara por PDMS permitiu um baixo volume de amostra (2,4 μ l), o que é extremamente importante na análise de fluídos biológicos com baixo volume de amostra.

1.6 Tecnologia de Impressão 3D para Produção de Dispositivos Eletroquímicos

Nos últimos anos a acessibilidade da tecnologia de impressão em 3D teve um aumento significativo para o público em geral, tendo sua aplicação nas mais diversas áreas, como a indústria eletrônica, alimentícia, médica e aeroespacial. Mais recentemente teve sua aplicação na química analítica, em especial a eletroquímica, com o desenvolvimento de novos materiais e dispositivos eletroquímicos portáteis para aplicações *point-of-care*. Além disso, o uso da tecnologia permite a produção de dispositivos para aplicações na eletroquímica em larga escala, design desejado, geração mínima de resíduos e com melhor desempenho [82].

O processo de impressão 3D tem início com a criação do projeto e sua finalidade. Esta primeira etapa consiste na concepção de uma imagem virtual do objeto que se deseja, que é geralmente obtido por meio de um software de desenho instalado em um computador (Inkscape e CAD). Em seguida, o projeto é convertido em um arquivo STL compatível com o software da impressora 3D, que converte a imagem 3D em camadas 2D sequenciais do objeto inicial, resultando em um arquivo de código G. Após isso, a impressora 3D começa a realizar o desenvolvimento do projeto através da deposição de material camada por camada. Quanto aos métodos de impressão estes podem ser realizados por fotopolimerização, extrusão, laminação e a base de pó [83].

A impressão 3D pode ser realizada a partir de polímeros termoplásticos, sendo os filamentos à base de ácido polilático (PLA) e acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) os mais conhecidos. O PLA é composto por (bio)poliésteres e é biodegradável, sendo assim considerado um material seguro e ecologicamente correto. O ABS pode ser encontrado na área industrial graças as suas excelentes propriedades mecânicas e facilidade de processamento. Em termos de temperatura de extrusão o PLA se encontra em torno de 230 °C e o ABS na faixa de 200 a 300 °C [84, 85]. Em relação a parâmetros, como orientação de camada, o PLA demonstra melhor variabilidade que o ABS e as peças

confeccionadas se comportam de maneira mais rígida. Outro grande benefício da tecnologia de impressão 3D é a capacidade do desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos miniaturizados e portáteis. Katseli *et al.* [86] explorou a tecnologia de impressão 3D para a construção de um dispositivo *lab-on-a-chip*, em que a célula eletroquímica foi impressa em filamento PLA. Outro exemplo foi realizado por Richter *et al.* [87] que realizou a fabricação de diferentes peças de uma célula eletroquímica impressa em 3D, gerando um sistema eletroanalítico portátil.

1.7 Eletrodos Quimicamente Modificados

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem se revelado uma forte e importante ferramenta para o ramo da química, em especial a química analítica. Suas vantagens estão na detecção altamente sensível de analitos de interesse de matrizes ambientais, clínicas, alimentícias e industrial, apresentando fácil operação e capacidade de miniaturização. Estes dispositivos permitem a coleta de dados através de um transdutor que promove a troca de elétrons na interface eletrodo solução a partir da interação com espécies eletroativas. Isto ocorre quando potenciais definidos são aplicados, resultando em um sinal mensurável, como correntes de oxidação ou redução, que são proporcionais a concentração das espécies eletroativas [88]. Entretanto, a resposta da corrente de oxidação e redução para concentrações de espécies eletroativas depende da distinção entre as correntes capacitiva e faradaica, o que acarreta problemas de limites de detecção.

Assim, uma forma de resolver esta problemática é realizar a modificação da superfície eletródica, tornando os sensores seletivos para o analito de interesse em matrizes complexas. Dessa forma, a utilização de mediadores eletroquímicos tem sido uma saída para a melhora dos sensores eletroquímicos no que tange ao limite de detecção e seletividade. São compostos que apresentam baixo peso molecular e melhor versatilidade, visto que o potencial de trabalho utilizado passa a ser em função do mediador e não mais dos substratos anteriormente utilizados ou dos reagentes gerados no meio reacional [89]. Na literatura diversos mediadores são descritos, como o tetracianoquinodimetano (TCNQ) [90], azul de metileno [91], ftalocianinas [92, 93], sal de Reinecke [94], nanopartículas de ouro (AuNPs) [95, 96] e nanopartículas de platina (PtNPs) [97, 98].

Nesse sentido, sugerimos nesta etapa do trabalho a modificação com azul da Prússia (“*Prussian blue*”, PB) para o sensor eletroquímico composto de tinta de grafite e

esmalte. Este mediador é amplamente conhecido pela sua estabilidade, excelentes propriedades óticas e baixa toxicidade, sendo esta última característica extremamente interessante no desenvolvimento de biossensores. Em termos de curiosidade o PB foi descoberto no início do século XVIII, na cidade de Berlim, pelo cientista chamado Diesbach, que por acidente de contaminação do carbonato de potássio por hexacianoferrato descobriu-se o novo material. Após isso, aproximadamente 20 anos depois o PB foi utilizado no recobrimento de superfície de eletrodos [99].

De acordo com os padrões de difração de raios X (DRX), o PB possui uma estrutura cristalina cúbica de face centrada constituída por íons férricos (Fe^{3+}) e ferrosos (Fe^{2+}), que são intercalados na rede cristalina por meio de ligantes ($\text{C}\equiv\text{N}$) em ponte. Desse modo, cada centro atômico (Fe^{2+}) se encontra coordenado de forma octaédrica por seis unidades de $-\text{CN}$ e cada centro atômico de (Fe^{3+}) a seis unidades de $-\text{NC}$. Sua estrutura ideal pode ser demonstrada pela fórmula $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x=14-16$), onde sua configuração eletrônica mais disseminada apresenta multiplicidade de spin igual a 21, com os átomos de (Fe^{3+}) com spin alto e $S=5/2$, e os átomos de (Fe^{2+}) com spin baixo e $S=0$, conforme Figura 4 [100].

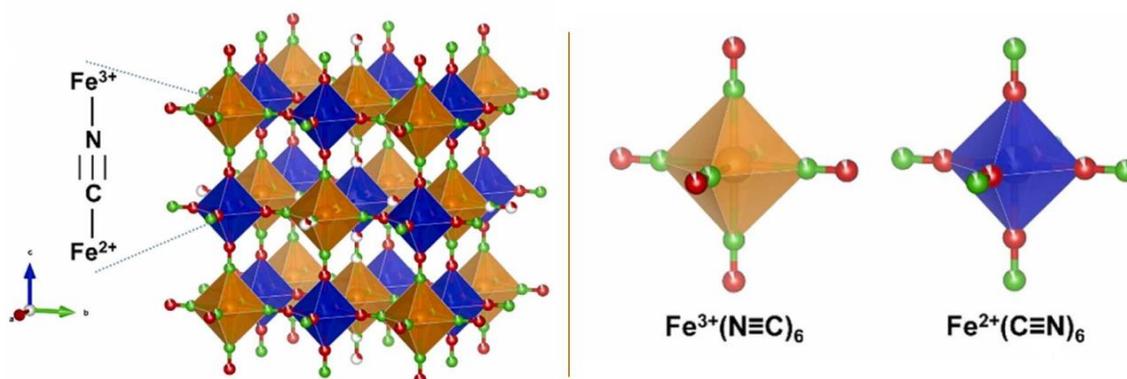


Figura 4. Representação esquemática da célula unitária ideal do azul da Prússia com octaédrico de Fe^{2+} de spin baixo $(\text{CN})_6$ e Fe^{3+} de spin alto $(\text{NC})_6$. Fonte: Thi *et al.* [101].

Entre os métodos de síntese do PB, o eletroquímico destaca-se por ser mais simples e com menor gasto de reagentes. Neste método, é utilizado o ferricianeto de

potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e sal de ferro ($FeCl_3$), ambos em meio ácido. Dentre os métodos eletroquímicos mais utilizados para eletrodeposição do filme de PB, destaca-se o potenciostático e potenciodinâmico. No método amperométrico é medida a corrente resultante a partir da aplicação de um potencial fixo, enquanto na voltametria cíclica há a variação de potencial em função do tempo com a velocidade de varredura definida. No processo de eletrodeposição deve ser levado em consideração fatores, como o pH do eletrólito de suporte, controle de potencial e tipo de substrato utilizado. Além disso, o mecanismo de deposição pode ser determinado por difusão, convecção e migração de acordo com o método eletroquímico utilizado. Por difusão há o movimento entre as espécies em solução e a superfície do eletrodo de trabalho a partir do gradiente de concentração estabelecido. Na convecção o movimento das espécies ocorre devido a agitação do eletrólito por meio de agitação magnética. No último mecanismo, a migração, a movimentação dos íons ocorrem devido ao gradiente de potencial aplicado, sendo responsável pela condução elétrica no eletrólito de suporte.

1.8 Biossensores Eletroquímicos

Dentro do desenvolvimento de dispositivos eletroanalíticos, os biossensores ganharam espaço como uma nova ferramenta para detecção e quantificação de (bio)moléculas. Dentre as vantagens em usar biossensores destacam-se a facilidade de operação, tempo rápido de resposta, especificidade e aplicações em análises POCDs. Suas aplicações encontram-se desde a área médica, na detecção precoce e monitoramento de doenças, a exemplo a Diabetes *mellitus*; na área ambiental, em controle e monitoramento de defensivos agrícolas e metais pesados; na área forense, na identificação de toxinas; na indústria alimentícia para determinação do teor de agentes patogênicos e nutrientes.

O funcionamento dos biossensores eletroquímicos tem como premissa a modificação da superfície do eletrodo de trabalho (transdutor) com um receptor biológico sensível (enzimas, anticorpos, antígenos, microrganismos, sequências de DNA e RNA), gerando um sinal analítico mensurável [102]. Este sinal é convertido pelo transdutor, amplificado e armazenado para posterior análise. No caso dos biossensores eletroquímicos este sinal é gerado a partir da oxidação ou redução de espécies redox, gerando uma corrente proporcional a concentração do analito.

Os biossensores também podem ser divididos, de acordo com o processo de transferência de carga na superfície eletrodo solução, em biossensores de primeira,

segunda e terceira geração [103]. Biossensores de primeira geração são baseados na obtenção de sinais mensuráveis a partir na oxidação ou redução de substratos naturais ou de um produto de uma reação enzimática. Além disso, a biomolécula encontra-se diretamente imobilizada na superfície do transdutor. Neste tipo de biossensor há algumas desvantagens, como aplicação de potenciais elevados em medições amperométricas, o que pode levar a interferência de outras espécies indesejáveis presentes em matrizes mais complexas (sangue, urina e suor). Os biossensores de segunda geração utilizam um mediador para facilitar a transferência de elétrons entre o centro ativo da biomolécula e o transdutor. Estes mediadores também são responsáveis por diminuir o potencial de trabalho aplicado, o que diminui a interferência de outras reações paralelas. Por último, os biossensores de terceira geração atuam na transferência de elétrons diretamente com o centro ativo da biomolécula, eliminando o uso de mediadores e diminuindo também o potencial de trabalho aplicado. A Figura 5 mostra um esquema genérico de um biossensor.

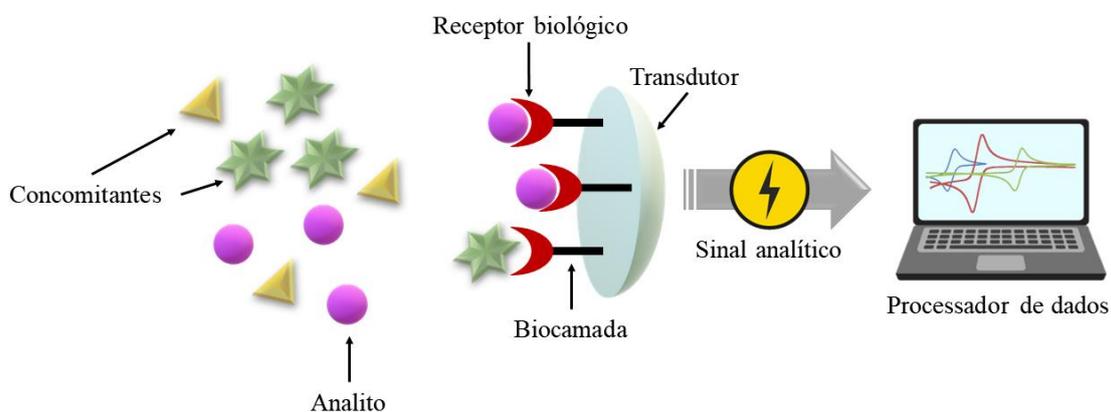


Figura 5. Representação esquemática de um biossensor. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.8.1 Biossensores Enzimáticos

Os biossensores enzimáticos estão entre os primeiros biossensores conhecidos na área da eletroanalítica. As enzimas utilizadas nesses dispositivos são conhecidas por apresentar uma excelente atividade catalítica e alta seletividade, além de serem responsáveis por acelerar as reações bioquímicas. Além disso, a excelente especificidade das enzimas acarreta a melhora da capacidade de detectar analitos com concentrações

mais baixas. A atividade catalítica da enzima também pode ser influenciada pela temperatura, concentração do substrato e pH [104].

Enzimas são cadeias poliméricas constituídas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. Estas ligações são geralmente formadas por um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) de um aminoácido que se liga a um grupo amina ($-\text{NH}_2$) de outro aminoácido, se intercalando ao longo de uma cadeia polipeptídica, sendo responsável pela conformação da enzima [105]. Diversos tipos de enzimas têm sido relatados na literatura no desenvolvimento de biossensores enzimáticos, como a peroxidase de rábano [106], lacase [107], urease [108], polifenol oxidase [109], (AChE) [110] e glicose oxidase (GOx) [111].

A GOx é uma flavoproteína da classe das oxidoredutases responsável por catalisar reações de troca de cargas ou de oxidação, como da β -D-glicose, utilizando o oxigênio molecular em glucono- δ -lactona e H_2O_2 . A GOx pode ser obtida a partir de fungos, como o *Penicillium notatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium amagasakiense* e *Penicillium purpurogenum*, mas sendo obtida principalmente da cultura de fungos *Aspergillus niger*, que possui uma melhor especificidade com o substrato glicose [112]. A *Aspergillus niger* apresenta uma massa molecular que varia entre 130 a 175 kDa, possuindo ponto isoelétrico de 4,2 em pH fisiológico 7,4 e apresentando aproximadamente 13% de carboidratos [113]. Na Figura 6 está ilustrado a estrutura na forma cristalina da GOx a 2,3 Å de resolução. O monitoramento da glicose pode ser realizado através da medição indireta do peróxido de hidrogênio durante a reação enzimática ou diretamente a partir da detecção de elétrons gerados na oxidação da glicose, por eletroquímica, onde a flavina adenina dicuclotídeo (FAD) atua como cofator no processo eletroquímico.

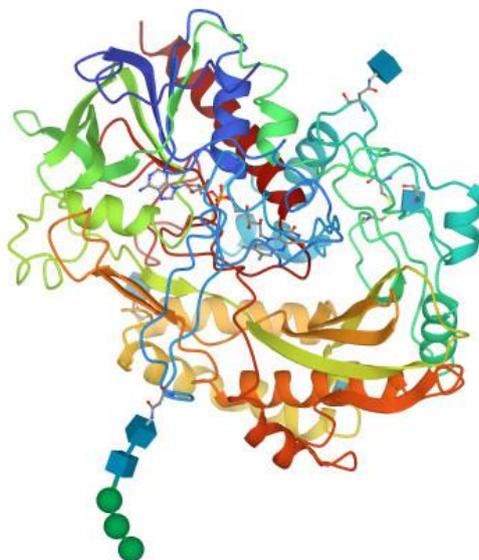


Figura 6. Ilustração da estrutura cristalina da GOx obtida do fungo *Aspergillus niger* a 2,3 Å de resolução.
Fonte: Hecht *et al.* [114].

1.9 Imobilização Enzimática

A imobilização de enzimas na superfície do transdutor é uma etapa necessária e crítica no desenvolvimento de biossensores, pois influenciam na estabilidade operacional, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade, custo e tempo de resposta destes dispositivos. Além disso, as enzimas imobilizadas quando comparadas com as enzimas solúveis são mais resistentes a mudanças de temperaturas, pH e solventes orgânicos. Entretanto, de acordo com o substrato de suporte e a estabilidade do derivado imobilizado e a natureza da enzima, há a necessidade de verificar o custo de cada processo de imobilização. Além do mais, o tipo de imobilização realizado pode distorcer a enzima ou qualquer espécie biológica caso haja interações múltiplas com o substrato. O sítio ativo pode ser bloqueado e ainda podem ocorrer mudanças conformacionais da estrutura da enzima levando na perda da atividade catalítica. Dessa forma, tais procedimentos podem ser divididos em quatro grupos: ligação covalente, adsorção física, aprisionamento e reticulação. A Figura 7 ilustra os procedimentos de imobilização.

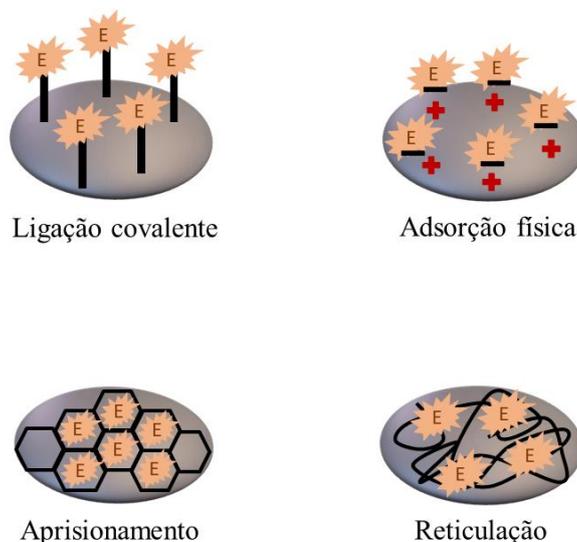


Figura 7. Esquema ilustrativo dos tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: ligação covalente, adsorção física, aprisionamento e reticulação. Fonte: Elaborado pelo autor

1.9.1 Imobilização por Ligação Covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na retenção da enzima na superfície do eletrodo por meio de ligações entre os grupos funcionais da enzima e superfície do eletrodo. A grande vantagem deste método é o fato de a atividade enzimática ser mantida próxima da atividade natural da enzima, além de demonstrar uma maior robustez do sistema. Esta robustez permite minimização da lixiviação, maior interação da enzima com o suporte e estabilidade frente as variações de pH e força iônica. Neste método os protocolos tem início com a ativação da superfície do suporte a ser utilizado através de reações de ativação para produção de intermediários reativos [115]. A ativação geralmente é feita com o glutaraldeído devido a sua simplicidade. Neste processo, um grupo aldeído da molécula de glutaraldeído (GLA) reage com um grupo amino da molécula de enzima, e o outro aldeído reage com um grupo amino da matriz de suporte.

1.9.2 Imobilização por Adsorção Física

A imobilização por adsorção se baseia na imobilização da enzima no suporte por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de van de Waals. Este tipo de imobilização permite a atividade enzimática observada ser mais próxima da

atividade natural da enzima. Além disso, a imobilização das enzimas apresenta um baixo custo e necessitam apenas de um determinado tempo de incubação. No entanto, este método apresenta interações fracas entre a enzima e suporte, levando a um aumento da lixiviação, o que ocasiona na contaminação da solução de substrato, e ainda são mais suscetíveis a mudanças de pH, temperatura e força iônica.

1.9.3 Imobilização por Aprisionamento

O método por aprisionamento apresenta a vantagem de melhorar as atividades catalíticas da enzima através do uso de redes poliméricas de baixo custo. Neste método, as enzimas são imobilizadas em uma membrana inerte, geralmente gel ou fibras, sobre a superfície do eletrodo de trabalho. As enzimas são retidas nas redes, o que diminui a lixiviação das enzimas enquanto há passagem dos substratos, levando ao aumento da estabilidade dos biossensores. Entretanto, este método leva a um aumento das barreiras de difusão que impedem que os substratos passem pelas redes, o que ocasiona numa diminuição da sensibilidade dos biossensores. Alguns materiais podem ser utilizados para o aprisionamento, como a quitosana (QT), gelatina, ágar, colágeno, alginato de cálcio, álcool polivinílico, poliuretano e entre outros [116].

1.9.4 Imobilização por Reticulação

A reticulação consiste em um método de imobilização que envolve a formação de ligações covalentes quando se usa um agente bifuncional, como o GLA, e observa-se a formação de cristais de enzimas insolúveis com elevada atividade catalítica [117]. Este método oferece algumas vantagens, como alta estabilidade e baixos custos de produção. Além disso, a imobilização é livre de suporte, e as enzimas estão ligadas umas às outras, formando uma estrutura tridimensional de agregados enzimáticos. Após a agregação, os sítios ativos da enzima são protegidos, preservando assim as atividades catalíticas. O agente de reticulação apresenta uma das extremidades reativas que são responsáveis por se ligar a grupos de aminoácidos na superfície da enzima. Estes agentes podem ser classificados em homobifuncional e heterobifuncional de acordo com a especificidade de seus grupos reativos, solubilidade, reatividade e comprimento de braço espaçador [118].

1.10 Imunossensores Eletroquímicos

Os imunossensores são um exemplo de biossensores amplamente utilizados para detecção rápida e simples de uma diversidade de analitos. O seu funcionamento se baseia na formação do complexo antígeno-anticorpo, princípio base da especificidade do sistema imunológico. Além disso, os imunossensores durante o diagnóstico clínico se distingue frente a outros biossensores por não requerer amostras purificadas. De forma geral, a confecção destes dispositivos começa a partir da imobilização do anticorpo ou antígenos sobre a superfície do eletrodo que irá reagir com o seu complementar, levando a alterações de corrente e potencial. Estas alterações são convertidas em um sinal analítico mensurável e detectadas com auxílio de um transdutor.

De acordo com o uso dos marcadores conjugados aos imunorreagentes, os imunossensores podem ser classificados como diretos (*label-free*) ou indiretos. Os imunossensores *label-free* optam pelo reconhecimento direto do analito alvo sem a presença de marcadores, utilizando-se uma sonda eletroquímica a fim de captar as mudanças obtidas sobre a superfície do transdutor. Além disso, representam avanços na velocidade das análises e simplificação das etapas envolvidas na montagem do sistema e processamento da amostra [119]. Já os imunossensores indiretos necessitam de uma marcação a fim de direcionar o fator gerador de sinal, podendo ser nanopartículas metálicas, magnéticas e/ou materiais biológicos (enzimas). Dentre estes, os marcadores mais utilizados são os enzimáticos, com a utilização de enzimas – como peroxidase de rábano-silvestre (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*), beta galactosidase, glicose oxidase e a fosfatase alcalina, que apresentam elevada pureza e alta atividade específica. Dentre os imunossensores indiretos, os do tipo sanduíche e do tipo competitivo são mais utilizados quando aplicados para a detecção de biomoléculas de baixa a alta massa molecular [120]. Imunossensores do tipo sanduíche baseiam-se na imobilização do antígeno ou do anticorpo primário sobre a superfície do transdutor, que por sua vez liga-se ao seu complementar marcado (anticorpo secundário), responsável por gerar o sinal a ser detectado. Já os imunossensores competitivos o antígeno marcado compete com o antígeno livre 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. Apesar desta técnica apresentar maior afinidade do anticorpo livre quando comparado ao anticorpo marcado, implica num aumento das etapas de processamento da amostra, o que eleva os custos operacionais. A Figura 8

ilustra as principais características das configurações de imunossensores acima mencionados.

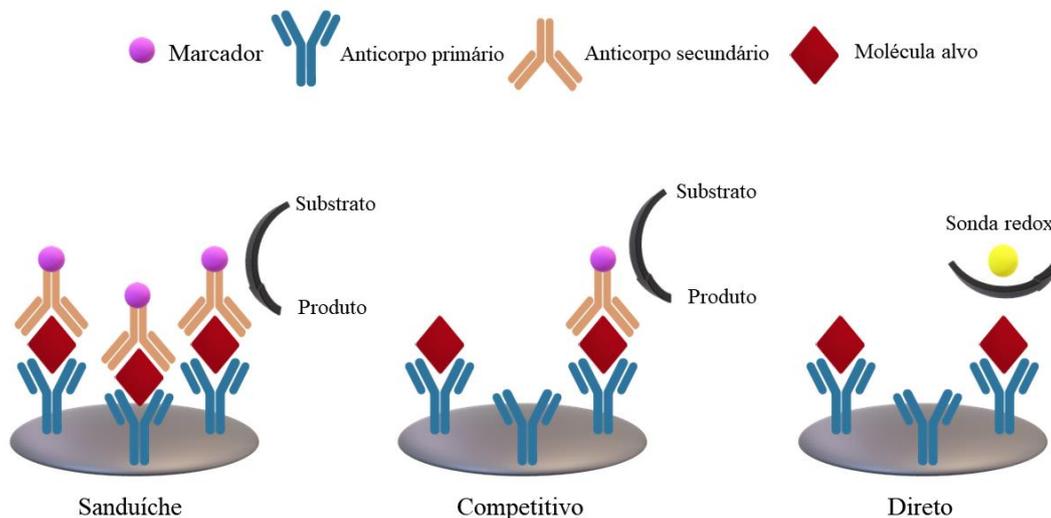


Figura 8. Imagem ilustrativa dos três principais tipos de configurações de imunossensores: sanduíche, competitivo e direto. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.10.1 Anticorpos e Proteínas Receptoras

Anticorpos (Ab), também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são moléculas proteicas produzidas pelos linfócitos B amadurecidos (células plasmáticas), que atuam na neutralização de agentes estranhos ao organismo, agindo como mecanismo de defesa do corpo. Um Ab tem diferentes isotipos com um terminal amina (NH_2) nas regiões de ligação com antígeno e o terminal carboxila (COOH) na haste. Sua estrutura é constituída por pares de cadeias leves e pesadas, formadas por sequências de aminoácidos. As cadeias pesadas há a presença de regiões constantes, capazes de fornecer flexibilidade à molécula. Nas cadeias leves há a presença de regiões constantes (CL) e variáveis (VL), sendo as últimas de grande contribuição para a ligação com o antígeno. Além disso, cada cadeia leve encontra-se diretamente ligada a uma cadeia pesada por pontes de dissulfeto. Já as cadeias pesadas encontram-se ligadas entre si por meio também de pontes de dissulfeto.

Os anticorpos são classificados em 5 tipos de imunoglobulinas de acordo com a suas cadeias pesadas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. As imunoglobulinas IgG são as mais comuns e estão relacionadas à cronicidade de doenças, estando em maior quantidade no

corpo humano e a mais usada em aplicações de imunossensores [121]. A classe IgM atua no reconhecimento do antígeno e são formados durante a resposta primária, estando relacionados a fases agudas da patogenia. A IgA está diretamente relacionada a imunidade de mucosas com a função de neutralização e aglutinação, presentes em secreções, como saliva, trato respiratório, gastrointestinal, urinário e genital. A IgE é está relacionada com processos alérgicos, sendo encontrada em menores concentrações no soro. E por último, a IgD está relacionada com a diferenciação dos linfócitos B induzida pelo antígeno, não apresentando uma função específica [122]. A Figura 9 mostra a representação de um anticorpo com diferentes regiões exibidas.

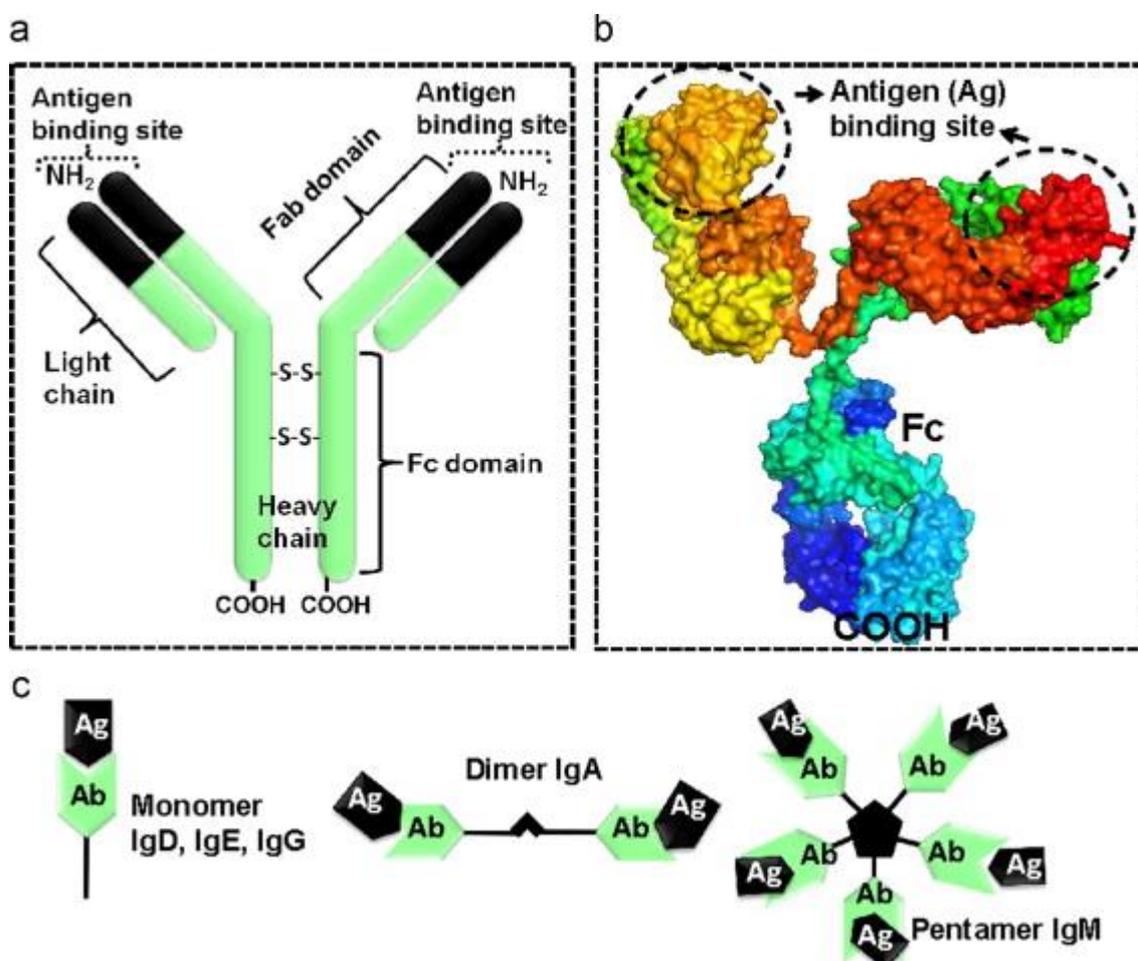


Figura 9. Estrutura de um anticorpo: (a) representação diagramática de um Ab com diferentes regiões exibidas; (b) vista tridimensional de um Ab (código PDB: 1IGT); (c) isotipos de um Ab. Monômeros (IgD, IgE e IgG), um dímero (IgA) e um pentâmero (IgM) são mostrados. Os círculos indicam a região de interação entre o anticorpo e o antígeno. Fonte: Gopinath *et al.* [122].

Uma grande vantagem de se utilizar anticorpos como elemento de bioreconhecimento é devido a sua alta sensibilidade e especificidade nas interações do

complexo antígeno-anticorpo. Outras vantagens podem ser relacionadas, como alta afinidade de captura em amostras impuras; orientação controlada para melhor interação com o analito alvo; grande maioria dos anticorpos monoclonais são facilmente regenerados; disponibilidade comercial e pequeno volume de amostra, dado que pequenas concentrações tanto do antígeno quanto do anticorpo são suficientes para uma análise efetiva. A grande desvantagem se encontra no custo, sendo considerado bem elevado devido à dificuldade de processamento na produção e purificação.

As proteínas receptoras estão localizadas no ambiente bidimensional da membrana celular, induzindo uma resposta celular e promovendo interações funcionais essenciais entre os receptores, com proteínas sinalizadoras associadas à membrana. Os receptores comumente respondem à hormônios, neurotransmissores, medicamentos e fatores de crescimento, por exemplo. Além disso, os receptores podem agir com a ação de retransmissão de sinal, amplificação ou integração. A retransmissão envia o sinal adiante, a amplificação aumenta o efeito de um único ligante, e a integração permite que o sinal seja incorporado em outra via bioquímica. Seu uso em imunossensores é de extrema importância graças a sua alta especificidade e afinidade com seus respectivos ligantes, além de serem biomarcadores naturais para grande variedade de drogas, toxinas e agentes patogênicos. Em relação aos anticorpos, estão menos disponíveis comercialmente e apresentam um alto custo, devido à dificuldade de extração e isolamento [123].

1.11 Biomarcadores de interesse clínico

Os biomarcadores são variáveis genéticas, bioquímicas e imunológicas passíveis de serem avaliados, sendo utilizadas como parâmetros de respostas patogênicas e farmacológicas do organismo. Sua aplicação em (bio)sensores com finalidades clínicas é extremamente interessante, tendo em vista que são substâncias presentes em uma diversidade de patologias, de forma direta ou indireta [124]. Podem ser classificados com base em sua aplicação, como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de doenças – como o câncer – e monitoramento a resposta clínica a intervenção médica [125]. Dentre os potenciais biomarcadores de maior relevância encontram-se os anticorpos, proteínas, mutações genéticas e disfunções enzimáticas [126]. Além disso, os biomarcadores apresentam, muitas vezes, elevada especificidade e seletividade para determinadas doenças, os tornando elementos-chave para o desenvolvimento de (bio)sensores. Para que

os biomarcadores possam ser utilizados na área eletroquímica, estes necessitam apresentar propriedades eletroativas, para que possam interagir com o eletrodo de trabalho. Estas características os tornam eficazes no auxílio e atendimento de alguns processos biológicos. Neste trabalho foram estudados biomarcadores para doenças Cardiovasculares (ácido úrico), Diabetes (glicose e peróxido de hidrogênio), SARS-CoV-2 (L-Cisteína e proteína *Spike*) e Mal de Parkinson (L-Dopa e dopamina).

1.11.1 Ácido Úrico

O AU conhecido por sua fórmula estrutural como (2, 6, 8-trihidroxipurina) (Figura 10) é conhecido como o produto do metabolismo das purinas (guanina e adenina) nos seres humanos. Está presente, em grande parte, na urina e no sangue e é produzido nos rins, intestino, fígado e endotélio vascular. O ácido úrico encontra-se diretamente associado a proteção das células neurais e facilitando o desenvolvimento do cérebro gerando respostas inflamatórias [127]. Também possui excelentes propriedades antioxidantes, sendo responsável pela eliminação de radicais livres no sangue humano em aproximadamente 60%. Esta eliminação ocorre a partir da ligação do AU com o ferro, inibindo o ascorbato de ferro-oxidação que impede a produção aumentada de radicais livres [128]. Em níveis normais e anormais o ácido úrico ocasiona esta correlacionado com doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose, fibrilação atrial (FA) e insuficiência cardíaca (IC) [129, 130]. Suas propriedades eletroquímicas como marcador eletroativo são determinadas pelos grupos funcionais C=O e C=N como sítios ativos redox efetivos.

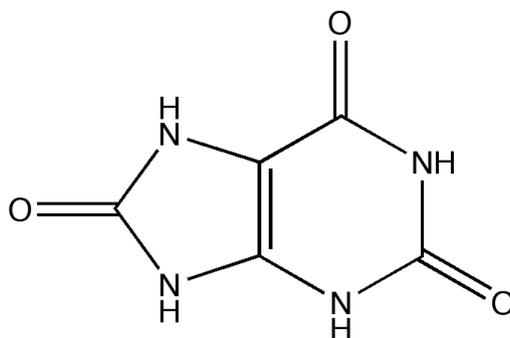


Figura 10. Fórmula estrutural do ácido úrico. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.11.2 Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio de fórmula química (H_2O_2) é um composto simples que atua como agente oxidante, desempenhando um importante papel em aplicações clínicas e farmacêuticas. Representa também um importante papel no metabolismo celular, pois como molécula mensageira, participa de uma diversidade de efeitos celulares. Pode interagir também com macromoléculas biológicas e levar a peroxidação de lipídios da membrana celular, desnaturação de enzimas e proteínas, além de danos ao DNA [131]. Além disso, o H_2O_2 é um membro da família de espécies reativas de oxigênio, atuando na toxicidade celular. As espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo celular normal, sendo associadas ao câncer de mama [132], câncer colorretal [133], câncer de ovário [134] e câncer de próstata [132]. Isto ocorre, pois em estágios iniciais do câncer os níveis de ROS são mais elevados em comparação com as células normais não transformadas. A Figura 11 mostra que espécies reativas de oxigênio envolvidos na progressão e desenvolvimento de câncer.

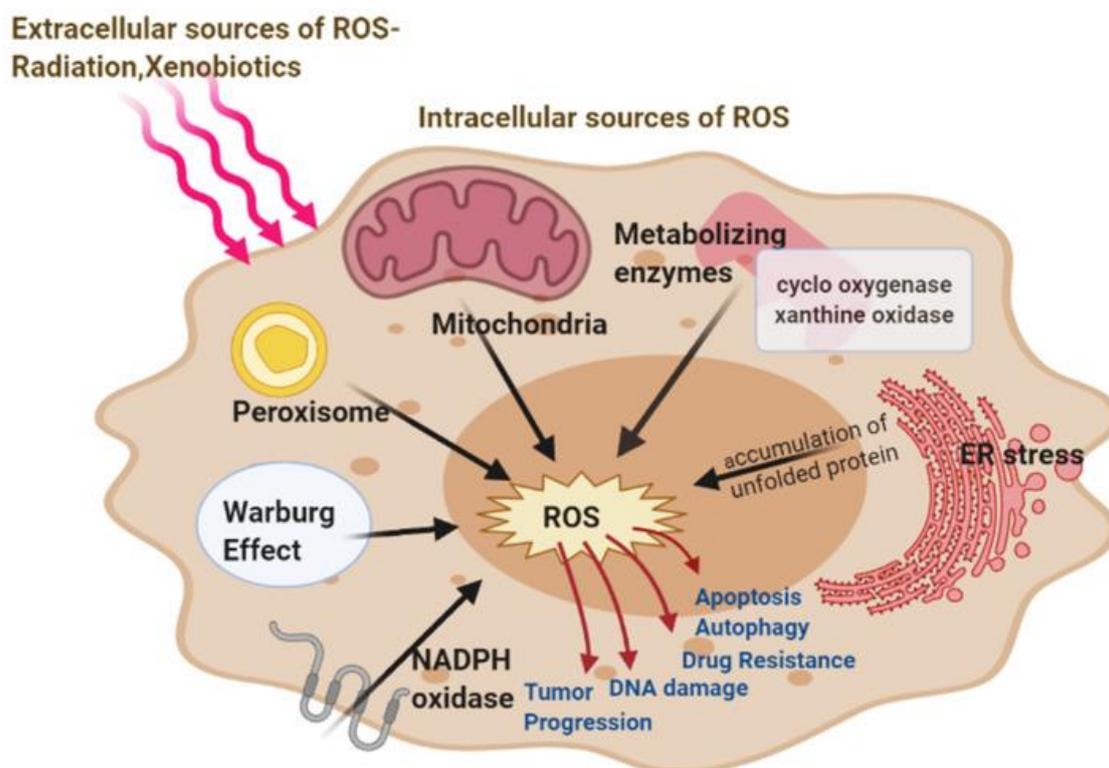


Figura 11. Principais fontes intracelulares e extracelulares de ROS envolvidos na progressão e desenvolvimento de câncer. Fonte: Arfin *et al.* [135].

O estresse oxidativo é um fator de avaliação para vários distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica [136]. A razão disso é que cérebro humano é altamente vulnerável ao dano oxidativo ao seu alto consumo de oxigênio, concentrações elevadas de lipídios insaturados e defesa antioxidante modesta em comparação com outros tecidos [137]. Além disso, alterações no H₂O₂ peroxissomal contribuem para a homeostase do cérebro. Dessa forma, a detecção de H₂O₂ é de grande interesse, pois permite uma grande variedade de aplicações, seja para a detecção indireta de biomarcadores como glicose colesterol ou ácido láctico.

1.11.3 Glicose

A glicose, também denominada de dextrose, é um monossacarídeo responsável pela principal fonte de suprimento energético ao corpo humano. Em sua fórmula molecular (Figura 12), sua cadeia é formada por seis carbonos e um grupo aldeído, sendo encontrada na forma de cadeia acíclica e cíclica. Sendo encontrado em maior quantidade no sangue, a glicose é um importante biomarcador para a doença de diabetes *mellitus*, fator de risco para acidente vascular cerebral isquêmico [138], anemia ferropriva [139], disfunção renal [140] e mais recentemente como um novo biomarcador para gravidade da SARS-CoV-2 [141].

Entre estas doenças a diabetes *mellitus* merece atenção por ser uma doença crônica, considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma epidemia mundial [142]. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, em 2019 a diabetes foi estimada em aproximadamente 9,3% da população adulta global com idade entre 20 e 79 anos, o que representa em torno de 43 milhões de pessoas. Até 2030 este número deve chegar ao patamar de 578 milhões de pessoas e 700 milhões até 2045, representando em média 11% da população mundial [143].

Caracterizada por uma desordem metabólica, o nível de diabetes no sangue pode ser classificado em hiperglicemia e hipoglicemia. Em índices hipoglicêmicos, pode levar a episódios de desmaio, palidez, taquicardia, náuseas sonolência e tremores no corpo, enquanto em índices hiperglicêmicos – resultante de deficiências na secreção ou ação da insulina nos tecidos alvos – pode ocasionar sintomas de cansaço extremo, visão turva, dificuldade de cicatrização, degeneração do nervo ótico, e entre outros [144]. Além disso, a hiperglicemia leva a fatores de comportamento cognitivos, incluindo fatores

inflamatórios, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, danos as células endoteliais e aumento da permeabilidade da barreiras hematoencefálicas [145]. A exposição a longo prazo à hiperglicemia pode danificar a barreira hematoencefálica e induzir a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios no cérebro que danificam as células circundantes, levando à disfunção cognitiva [146].

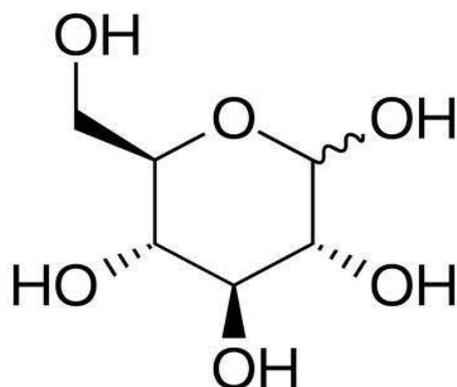


Figura 12. Fórmula estrutural cíclica da glicose. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.11.4 L-Cisteína

A L-Cisteína (L-Cys) (Figura 13) é um importante aminoácido de baixo peso molecular metabolicamente relacionado, responsável na defesa antioxidante, homeostase, sinalização redox e no controle de processos celulares e extracelulares [147]. A L-Cys também fornece sítios ativos em diversas funções catalíticas de enzimas, proteínas e proteases [148]. No corpo humano, a L-Cys é sintetizada pelo fígado a partir da homocisteína pela transmetilação da metionina. A homocisteína é primeiramente condensada em serina pela cistationina β -sintase e então há sua clivagem produzindo assim a L-Cys.

É um importante biomarcador para diferentes doenças, como doenças cardíacas, distúrbios neurológicos, colorretal, insuficiência hepática, fraqueza e um forte biomarcador associado a progressão da SARS-CoV-2 [149]. Sua avaliação como biomarcador na progressão da SARS-CoV-2 se dá a partir da correlação com doenças cardiovasculares, sendo a L-Cys um importante biomarcador deste. Isso demonstra que SARS-CoV-2 tem um risco aumentado de doenças cardiovasculares incidentes em várias categorias, incluindo distúrbios cerebrovasculares, arritmias, doenças cardíacas

isquêmica e não isquêmica, miocardite e tromboembólica. Além disso, desempenha um importante papel na proteção dos axônios do estresse oxidativo, prevenindo distúrbio neurodegenerativos, como Alzheimer e Parkinson [150]. No soro humano, a concentração de L-Cys é encontrada na faixa de 240 a 360 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [151]. Em níveis mais elevados é responsável pela síndrome do crescimento lento em crianças e em níveis intracelulares é reconhecida como um importante indicador de câncer e agente radioprotetor [152]. A L-Cys também apresenta ação antioxidante graças ao processo redox do grupo tiol (R-SH). Este grupo é amplamente encontrado em outras biomoléculas bioativas de elevada importância clínica como a glutatona, N-acetil-cisteína e o ácido lipoico. Suas propriedades eletroquímicas como biomarcador são determinadas em função do grupo funcional R-SH que é facilmente oxidável.

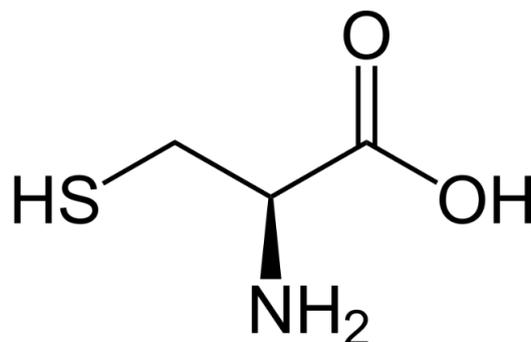


Figura 13. Fórmula estrutural da L-Cys. Fonte: Elaborado pelo autor.

1.11.5 Proteína Spike

No final do ano de 2019 foi dado o alerta de uma nova espécie de vírus na cidade de Wuhan. Os primeiros sintomas eram característicos de uma pneumonia viral comum, como tosse seca, febre e falta de ar, entretanto em alguns pacientes os sintomas eram mais severos levando ao óbito. Após alguns testes laboratoriais de amostras coletadas destes pacientes foi constatado que se tratava de um novo coronavírus que foi denominado SARS-CoV-2 [153]. O coronavírus são vírus zoonóticos já conhecidos, da ordem *Nidovirales*, da família *Coronaviridae*, sendo responsáveis por resfriados comuns e não letais em seres humanos [154]. Outras espécies de coronavírus associadas a sintomas leves no trato respiratório são conhecidas até o presente momento, como as espécies HKU1, NL63, OC43 e 229E [155].

A SARS-CoV-2 assim como os demais coronavírus possui uma organização estrutural primária. São vírus envelopados com os maiores genomas de RNA de fita simples de polaridade positiva ((+) ssRNA), já conhecidos até o presente momento. O RNA pode sofrer mutações e gerar novas variantes vírus com maior taxa de infecção e/ou letalidade, como já conhecidos pela OMS: B.1.1.7 linhagem (Alpha), B.1.135 (Beta), P.1 (Gamma), B.1.167.2 (Delta) e B.1.1.529 (Omicron) [156-160]. Apesar de suas variações, o SARS-CoV-2 possui estruturas proteicas em comum ideais para o diagnóstico de infecção. Entre estas estruturas podemos listar algumas proteínas inseridas na bicamada lipídica: as proteínas *spike*, de membrana (M), de nucleocapsídeo (N) e envelope (E) (Figura 14).

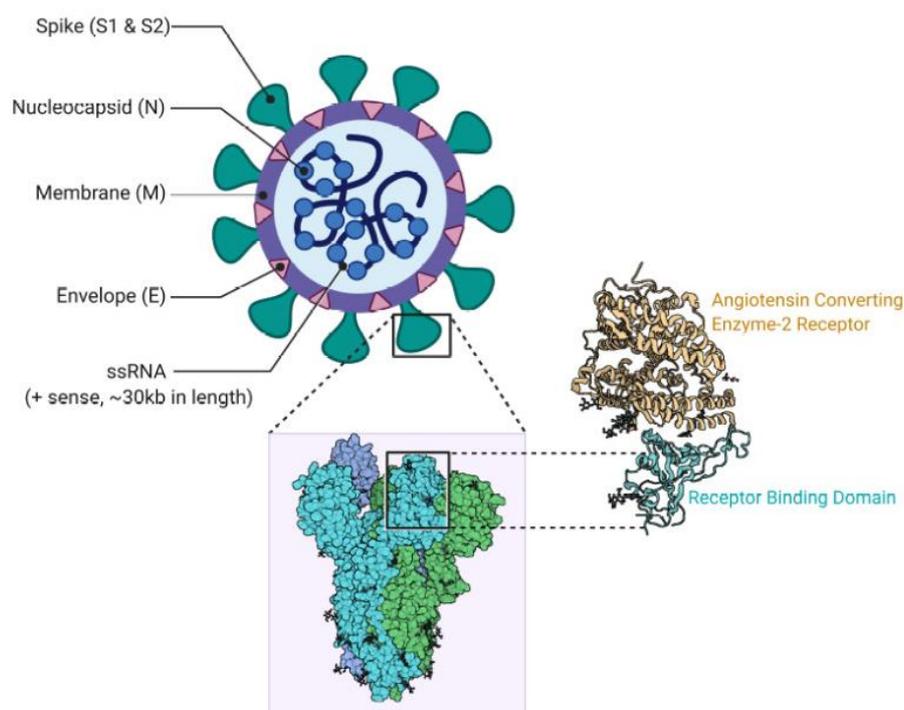


Figura 14. Estrutura viral do SARS-CoV-2. Imagem adaptada de Singh *et al.* [161].

A proteína de nucleocapsídeo está localizada entre as hélices do RNA e contém dois domínios de ligação ao RNA, sendo eles: RNA N-terminal (NTD) e o C-terminal (CTD). A principal função da proteína N é o empacotamento do ssRNA e montagem do vírus. A proteína M é responsável por dar forma ao vírus durante sua montagem, possuindo uma estrutura com um domínio N-terminal projetada para o exterior do vírus. A proteína de envelope E é uma proteína de membrana curta e integral de 76 a 109

aminoácidos, variando seu tamanho de 8,2 a 12 kDa [162]. Sua principal função é alterar a permeabilidade da membrana, facilitando e auxiliando a fusão destas.

Por fim, dentre estas, tem-se a proteína *spike* que merece atenção por ter um papel de conexão entre o vírus e a membrana da célula hospedeira. É uma grande glicoproteína transmembrana, que se organiza em 3 unidades idênticas de polipeptídios para formar as extremidades de picos na superfície do vírus. Cada monômero da proteína *spike* trimérica abrange duas subunidades: S1 e S2, que permanecem covalentemente ligadas antes de ocorrer a fusão [163]. As subunidades S1 e S2 apresentam funções distintas durante o processo de fusão. A S1 é responsável por realizar a ligação com o receptor da célula hospedeira, sendo identificada como (ACE2). Já a S2 é formada pela associação de duas regiões heptadas de repetição HR1 e HR2, que após a ligação com o receptor da célula hospedeira, podem se associar, alterando a conformação da proteína *spike*, ocasionando à fusão entre as membranas virais e celulares [164]. A ACE2 apresenta uma elevada afinidade com a proteína *spike* do vírus e é responsável por realizar a ligação com a mesma, levando a formação do complexo molecular, dando início ao processo de replicação viral. A ACE2 é uma proteinase transmembrana amplamente distribuídos no corpo humano, incluindo os tratos respiratório e gastrointestinal, coração, rins, cérebro.

1.11.6 Dopamina

A dopamina (DA) nomeada quimicamente por 3,4-dihidroxifeniletilamina é um importante neurotransmissor da família das catecolaminas, de elevada importância na saúde humana. É produzida nas glândulas adrenais e em diversas áreas do cérebro, sendo precursora metabólica de neurotransmissores – adrenalina e noradrenalina, que atuam como receptores específicos no organismo e estão presentes no sistema nervoso central (SNC), sistema renal e nos vasos renais e nas coronárias . A dopamina é responsável por diversas funções corporais, como movimento, cognição, apetite, sono, controle das respostas de estresse e organização. Quando presente em níveis reduzidos e elevados no SNC são implicadas como uma das principais causas de doenças neurodegenerativas como a Parkinson, epilepsia e esquizofrenia, sendo responsável pelo processo de entrega de mensagens extrassinápticas [165]. Pode ser encontrada em diferentes fluídos corporais - na urina e no plasma sanguíneo, por exemplo- e essa presença muitas vezes pode ser utilizada como um possível marcador de doenças. É produzida por neurônios dopaminérgicos, e essa produção acontece a partir do aminoácido tirosina, como visto na

Figura 15. A tirosina é então convertida em L-DOPA, e a partir da descarboxilação é formada a DA.

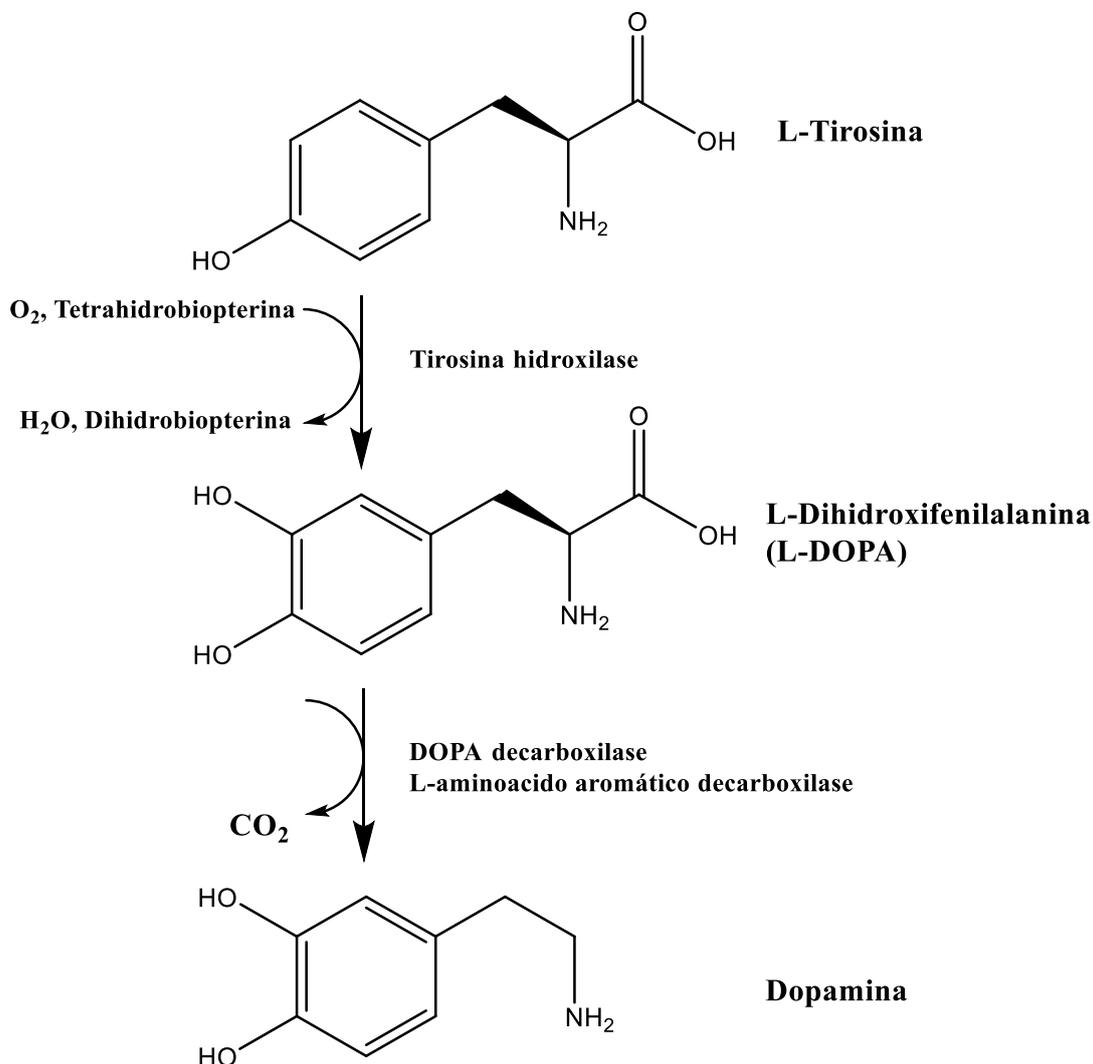


Figura 15. Mecanismo demonstrando as etapas para a produção de dopamina. Fonte: Elaborado pelo autor.

A doença de Parkinson é um distúrbio neurodegenerativo progressivo que afeta pelo menos quatro milhões de pessoas no mundo. Caracteriza por apresentar sintomas motores graves, incluindo desequilíbrio postural, tremores incontroláveis, lentidão de movimentos e rigidez nos membros. É uma doença que acomete principalmente os idosos. A principal característica patológica desse distúrbio é uma perda pronunciada de neurônios produtores de dopamina na substância negra, o que resulta em uma depleção drástica de dopamina no corpo estriado, para o qual esses neurônios se projetam. O resultado é o acúmulo da substância negra, promovendo a inibição do tálamo e por

consequência a inibição cortical, ou seja, perda ou descontrole dos movimentos, afetando a qualidade de vida do paciente e podendo levar ao óbito [166]. Outra importante característica da doença é a identificação, por coloração, da presença dos corpos de Lewi, que identificam os neurônios afetados em todo o sistema nervoso [167]. Nesse sentido, a identificação precoce é requerida constantemente para uma melhora na qualidade de vida dos pacientes. Entre as estratégias, a eletroquímica apresenta grandes vantagens, uma vez que a dopamina possui um caráter eletroativo e seu processo redox é bem conhecido. Isso facilita o desenvolvimento de novas plataformas eletroquímicas.

1.11.7 L-Dopa

A L-Dopa [(*-*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina], também conhecida popularmente como Levodopa, é um aminoácido aromático precursor biológico de diversos neurotransmissores – dopamina, epinefrina e noradrenalina. É amplamente descrita como um fármaco para o tratamento sintomático da DP. Embora seja utilizada no tratamento da DP, após um longo período de seu uso há estudos que demonstram diversas complicações médicas [168, 169]. Dessa forma, a L-Dopa também está relacionada como um marcador para a progressão da doença de Parkinson, pois é responsável pela síntese da dopamina a partir da descarboxilação pela enzima L-Aminoácido Aromático Descarboxilase. Sua principal função é restaurar os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos nos gânglios basais [170]. Mesmo sendo utilizada no tratamento, pouco se sabe como exatamente ela afeta o SNC. Desse modo, acompanhar os níveis de L-Dopa ajuda a melhorar e entender o diagnóstico destas doenças, bem como sua ação fisiológica. Além disso, a auto oxidação deste analito causa metabólitos tóxicos como radicais livres, quinonas e semi-quinonas [171], sendo extremamente importante sua detecção em amostras farmacêuticas e em fluídos biológicos.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A presente tese teve como objetivo geral o desenvolvimento de novas plataformas de sensores e biossensores eletroquímicos de relativo baixo custo - descartáveis e/ou reutilizáveis - tendo em vista sua aplicação *point-of-care* na detecção de biomarcadores de interesse clínico.

2.2 Objetivos Específicos

- A. Produzir eletrodos modificados com mediador PB empregando substrato de garrafa PET reciclável, ecologicamente correto, e uma tinta condutora simples a base de grafite e esmalte de unha através da técnica *screen-printing*;
- B. Aplicar os eletrodos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos enzimáticos e não enzimáticos para a detecção dos biomarcadores - ácido úrico, peróxido de hidrogênio e glicose;
- C. Avaliar o sensor modificado como sensor vestível utilizando uma pulseira confeccionada em impressão 3D para medição eletroquímica de ácido úrico;
- D. Aplicar eletrodos de platina para a detecção do biomarcador L-Cisteína, relacionado a SARS-CoV-2;
- E. Desenvolver um imunossensor eletroquímico sobre a superfície dos eletrodos de platina para a detecção da proteína *spike* do vírus SARS-CoV-2;
- F. Produzir eletrodos confeccionados com substrato de folhas caídas de árvores por pirólise a laser de CO₂ e aplicar na detecção de dopamina;
- G. Desenvolver uma nova plataforma eletroquímica composta por material reutilizável para confecção de eletrodos a base de grafite;
- H. Aplicar a nova plataforma eletroquímica na detecção de diferentes analitos e sistemas de maneira portátil.

CAPÍTULO I

SENSOR ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL MODIFICADO COM AZUL DA PRÚSSIA PARA DETECÇÃO DE MÚLTIPLOS BIOMARCADORES DE INTERESSE CLÍNICO

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

O grafite da Fisher Chemical® (Nova Jersey, EUA) e NP incolor (Base brilho cuidados, Cora®, São Paulo, Brasil) foram utilizados para a preparação da tinta condutora. AU, ferrocenometanol (FcMeOH), (H_2O_2), glicose, cloridrato de dopamina e a enzima GOx foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, EUA. Ácido ascórbico foi adquirido da Dinamica® (Brasil); frutose da Synth®, Brasil e sacarose da Vetec®, Brasil. Soluções de amostras sintéticas de suor sintético foram preparados seguindo a literatura com adaptações [172, 173] e era composto por uma mistura de NaCl $1,55 \text{ g L}^{-1}$, KCl $1,0 \text{ g L}^{-1}$, ureia $0,6 \text{ g L}^{-1}$, ácido acético $5,0 \text{ g L}^{-1}$, ácido láctico $1,26 \text{ g L}^{-1}$ e cloreto de amônio $17,5 \text{ g L}^{-1}$ - Dinamica® (Brasil), ácido úrico $9,92 \text{ g L}^{-1}$, ácido ascórbico $1,76 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ e glicose $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$, solubilizados em PBS e obtidos da Sigma-Aldrich®, EUA. Tampão fosfato salino (PBS) foi preparado utilizando fosfato de sódio dibásico (Dinamica®, Brasil), cloreto de potássio e fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich®, EUA). O filamento flexível e não condutor de acrilonitrila butadieno estireno (ABS), utilizado na construção de uma pulseira vestível, foi adquirido da 3DLAB (Minas Gerais, Brasil). A pulseira vestível impressa em 3D foi projetada no *software* livre Blender versão 2.91.2 e fabricado com uma impressora 3D Sethi3D S3. Todos os reagentes eram de grau analítico. Água ultrapura (Milli Q, EUA), com resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi utilizada para preparar todas as soluções aquosas.

3.2 Fabricação dos Sensores Descartáveis por Serigrafia

Uma configuração de sistema de três eletrodos, baseada no projeto de um eletrodo comercial serigrafado, foi usada para a construção dos eletrodos descartáveis. O eletrodo de trabalho proposto consistiu em um círculo de $4,95 \text{ mm}$ de diâmetro (área geométrica

de $0,19 \text{ cm}^2$). Primeiramente, os substratos das garrafas PET foram lixados com lixa convencional (n^o 220 da 3M®) para facilitar a deposição da tinta sobre os substratos. O substrato foi então limpo com etanol (70% v/v) para remover resíduos/impurezas orgânicas que pudessem interferir na análise eletroquímica, conforme exemplificado na etapa 1 (Figura 16). Máscaras recortadas em papel adesivo (Colacril, Office CC185) foram utilizadas para delimitar os eletrodos e dar forma aos mesmos. Para isso, foi utilizada uma impressora de corte, sendo os desenhos criados com o software Silhouette Studio versão 4.4. A parte interna das estruturas foi removida e as máscaras foram coladas na superfície de uma folha de PET obtida de uma garrafa de refrigerante descartada. A tinta condutora foi preparada misturando NP e grafite (48:52% (m/m)) (Figura 16, etapa 2), uma composição previamente otimizada por Araujo Andreotti e colaboradores [174]. Com o auxílio de um centrifugador assimétrico duplo (SpeedMixer® Dac 150.1 FVZ-K, FlackTec Inc) os reagentes foram misturados em 3 ciclos de 1min e 30s (3500 rpm). Por fim, a tinta preparada foi depositada e espalhada uniformemente nas máscaras, conforme mostrado na etapa 3 (Figura 16). O eletrodo à base de esmalte e grafite produzido foi denominado GNP.

3.3 Modificação dos Sensores com Azul da Prússia

A modificação dos eletrodos foi realizada por eletrodeposição do PB (etapa 4, Figura 16), fornecendo os eletrodos GNP/PB. Esta foi baseada em métodos descritos na literatura [175] e envolveu ciclagem consecutiva ($n=15$) empregando a técnica de CV em potenciais variando de $-0,3$ a $0,8 \text{ V}$ a 50 mV s^{-1} em uma solução aquosa de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo FeCl_3 $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) acidificado com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.4 Confeção do Biossensor

Para a fabricação do biossensor (etapa 5, Figura 16), $50 \mu\text{L}$ de uma dispersão de biopolímero quitosana a 0,2% (QT) foi misturado com $50 \mu\text{L}$ de solução de glutaraldeído a 2%. A mistura foi deixada em repouso por 30 min para que os dois grupos aldeídos do glutaraldeído interagissem completamente com os grupos NH_2 da QT. Assim, forma-se uma matriz reticulada com a enzima GOx aprisionada entre os interstícios [176]. Em seguida, $50 \mu\text{L}$ de uma solução de GOx 30 mg mL^{-1} foi adicionado à mistura. Este

método de ligação por aprisionamento proporcionou melhor biocompatibilidade e estabilidade para a enzima. Finalmente, 7 μL da mistura final foi adicionado à superfície do eletrodo de trabalho e deixou-se secar durante a noite a 10°C. O biossensor foi denominado GNP/PB/GOx.

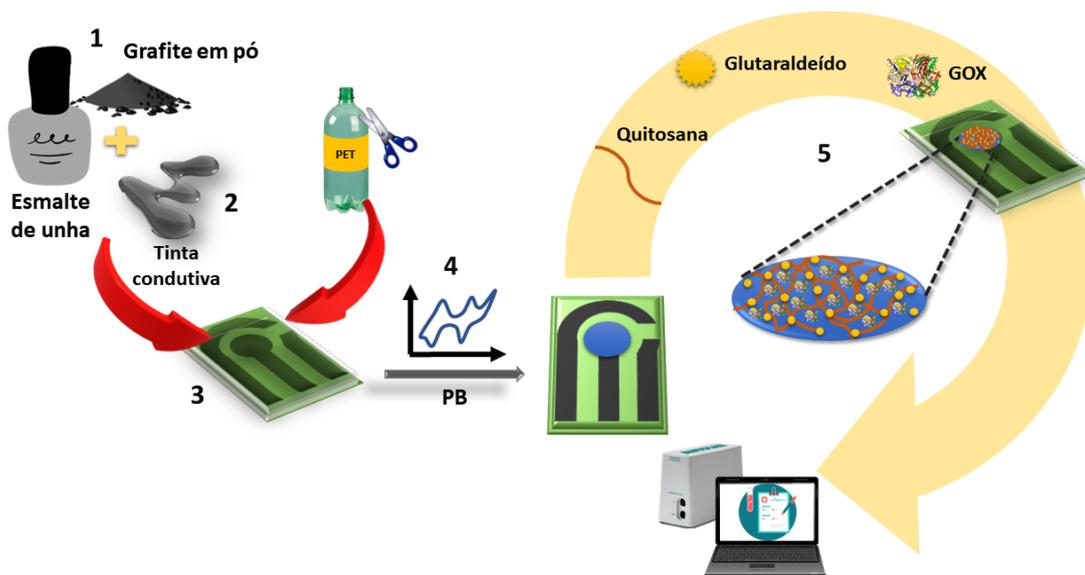


Figura 16. Preparação do sensor GNP e GNP/PB: (1 e 2) Preparação da tinta condutora. (3) Aplicação de tinta condutora e sensor GNP. (4) Eletrodeposição de filme PB e sensor GNP/PB. (5) Preparação do biossensor GNP/PB/GOx. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Caracterização Morfológica e Química dos Sensores

As caracterizações da superfície dos sensores foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da Thermo Fisher Scientific modelo Prisma E com tecnologia ColorSEM e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva integrada (EDS) para a aquisição de imagens por mapeamento de coloração dos elementos por superfície. As análises de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) foram realizadas com o espectrofotômetro Tensor II (Bruker) com resolução de 4,0 cm^{-1} no modo de absorbância na faixa de 400 a 4,000 cm^{-1} . Os espectros das amostras secas foram obtidos em pastilhas de KBr (Sigma-Aldrich).

3.6 Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT204 (Metrohm), gerenciado pelo *software* NOVA 2.1.4. Foram empregadas as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e cronoamperometria. Para caracterização dos sensores antes e após modificação com PB foi utilizada uma solução (FcMeOH) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, preparado em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

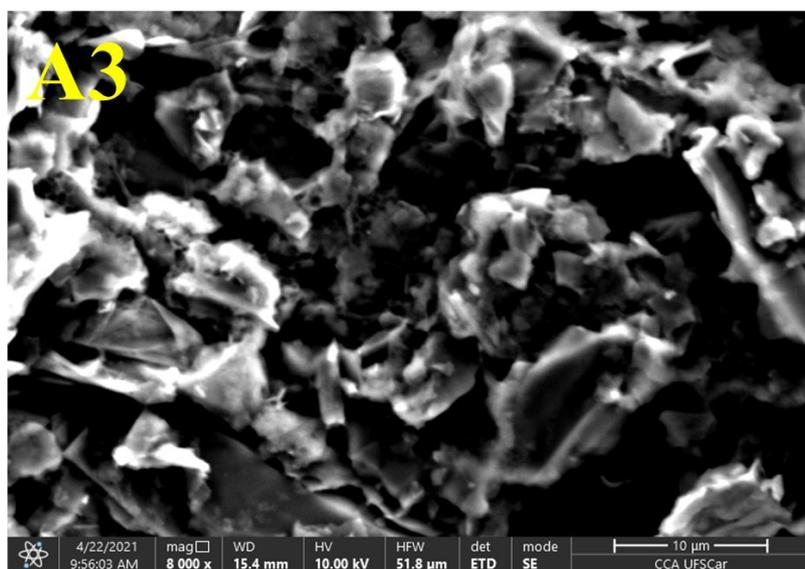
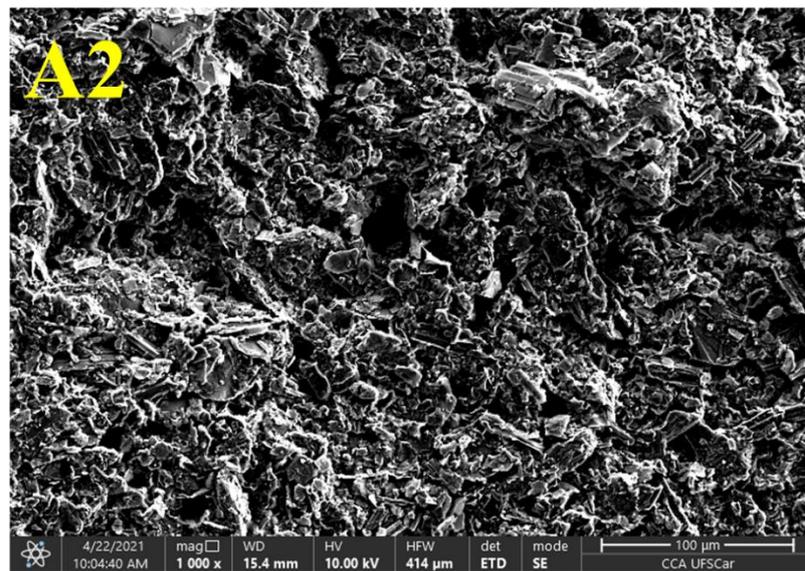
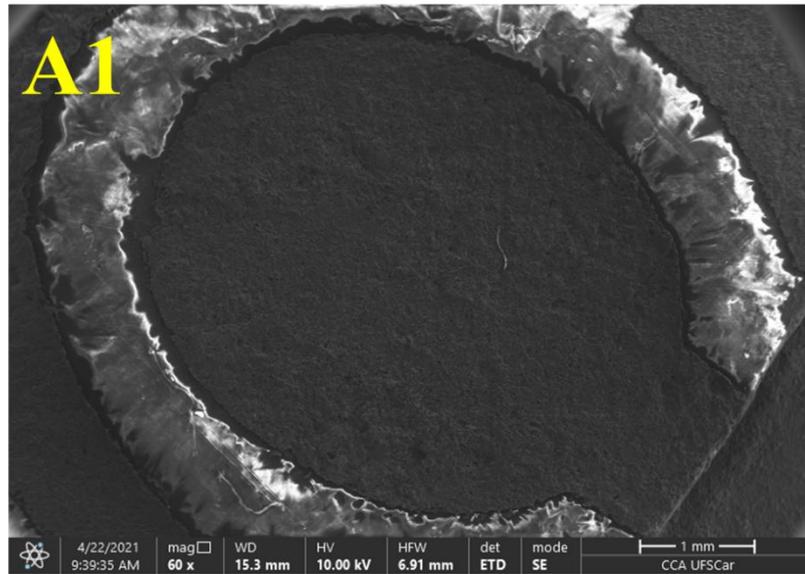
Experimentos de CV foram realizados para caracterizar eletroquimicamente o sensor obtido e avaliar o comportamento eletroquímico das moléculas. Para a escolha da técnica de detecção – dentre DPV e SWV – para AU, foi considerado a manutenção da velocidade de varredura em 10 mV s^{-1} . Para a detecção de H_2O_2 e glicose foi utilizada a técnica de cronoamperometria. Inicialmente, um estudo de potencial avaliou o melhor potencial de trabalho a ser aplicado.

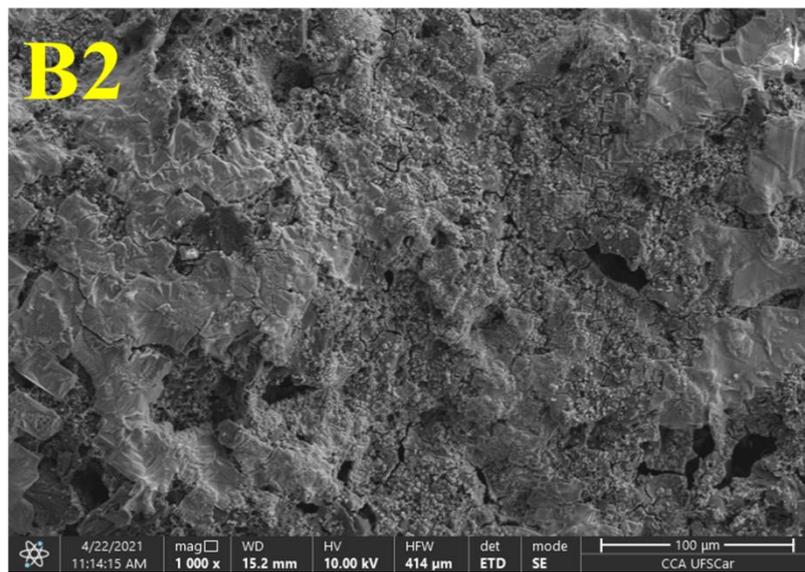
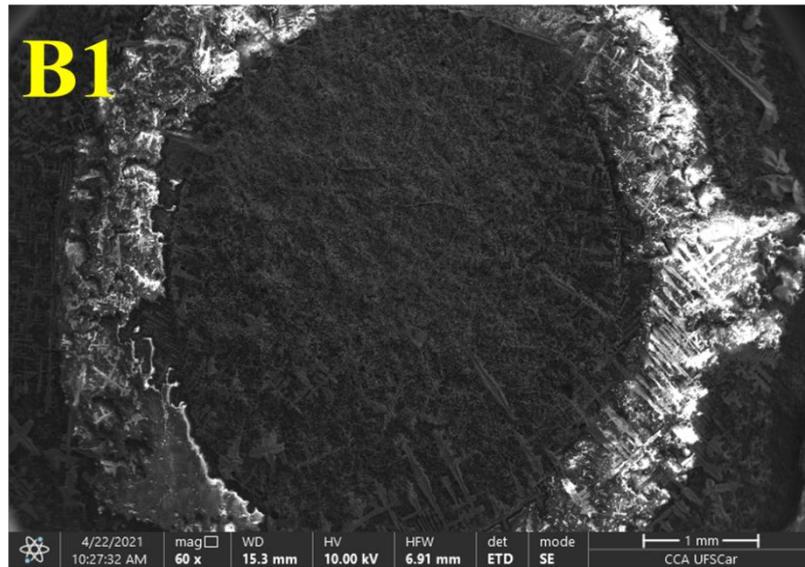
Amostras de suor sintético foram preparadas de acordo com a formulação química sugerida proposta na literatura [173] e posteriormente enriquecidas com AU ou glicose em diferentes concentrações. Para análise de AU, o suor sintético foi enriquecido com 4 concentrações diferentes de AU ($5,0$, $20,0$, $40,0$ e $59,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e para detecção de glicose, a fortificação envolveu 3 concentrações diferentes ($50,0$, $150,0$ e $400,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Estas soluções foram preparadas diretamente na amostra, anteriormente solubilizada em PBS. Todas as fortificações foram realizadas sem a diluição da amostra e em concentrações dentro da faixa de trabalho linear. Por fim, ensaios de reprodutibilidade, repetibilidade e interferentes foram realizados para o sensor e biossensor sob condições anteriormente otimizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Morfológica e Química

As morfologias dos eletrodos à base de tinta condutora grafite antes e após a modificação com PB, e do eletrodo modificado contendo GOx foram caracterizadas por MEV, e as imagens obtidas são mostradas nas Figuras 17-A, 17-B e 17-C, respectivamente. Através das imagens MEV apresentadas nas Figuras 17-A2 e A3 é possível observar folhas de grafite distribuídas homogeneamente por toda a superfície do eletrodo de trabalho. Além disso, observa-se uma topografia rugosa com presença de cavidades. Tais cavidades são interessantes para eletroanálise, pois podem fornecer sítios ativos capazes de realizar a interação e imobilização de espécies, como alguns mediadores eletroquímicos, aumentando assim a condutividade do dispositivo. Após modificação com PB (Figura 17-B), a superfície do eletrodo foi coberta homogeneamente pelo filme de PB. Este fato é evidenciado pela presença de ferro confirmada pela espectroscopia dispersiva de energia que fornece a porcentagem dos elementos presente na amostra (Figura 17-B3) e o respectivo espectro, mostrado na Figura 18. A coloração vermelha da Figura 17-2B indica a presença de Fe, enquanto a coloração azul indica a presença de C, confirmando o sucesso da síntese de PB, e a porcentagem correspondente a cada elemento encontrado é apresentado na tabela inserida na Figura 18. Além disso, pequenas trincas podem ser observadas, o que mostra que o processo de nucleação para o crescimento e formação do PB [177]. Finalmente, as imagens MEV do biossensor contendo GOx (Figura 17-C) mostram uma superfície mais lisa com a presença de pequenos aglomerados relacionados ao filme GNP/PB/GOx.





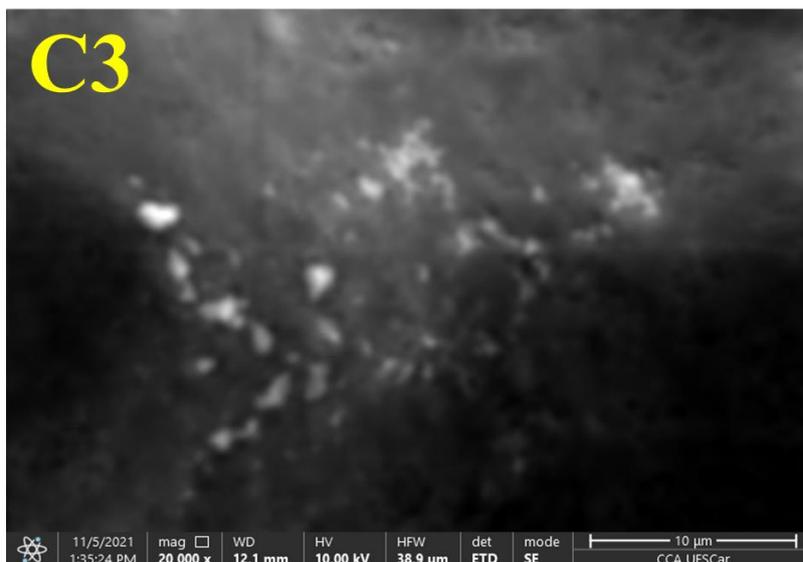
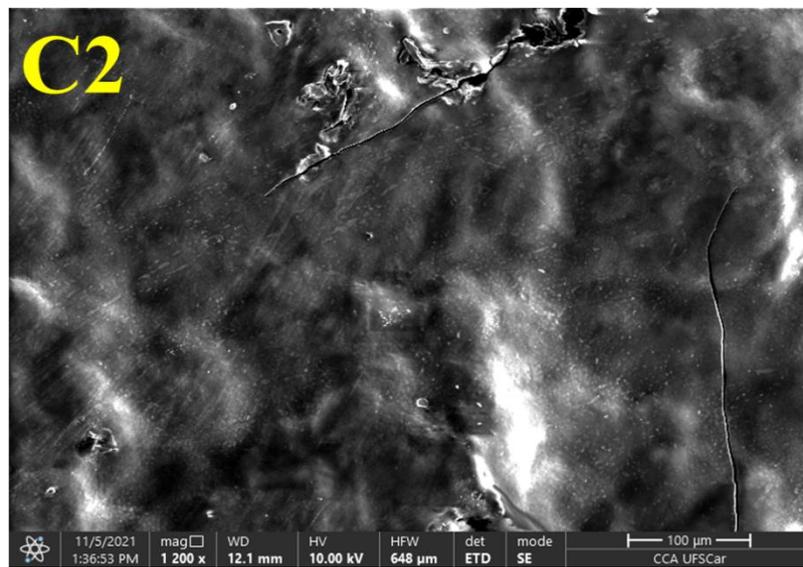
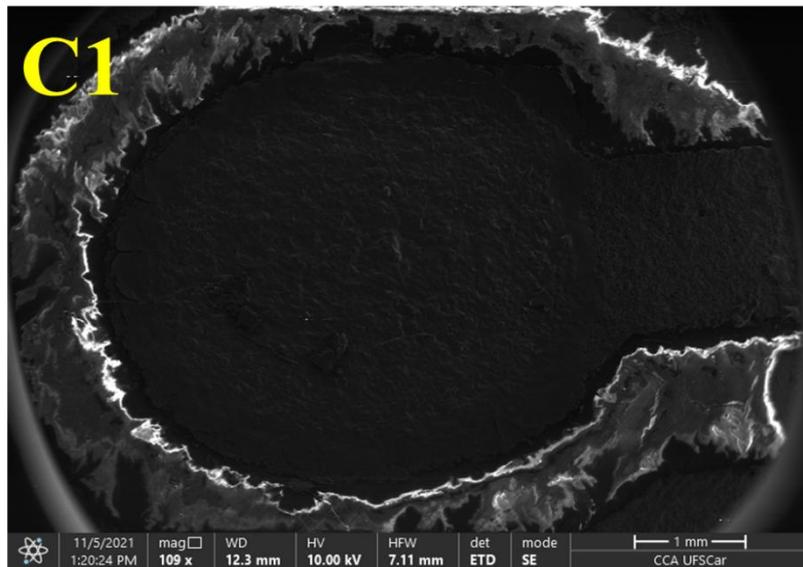


Figura 17. Imagens de MEV de (A) GNP em (1) 60 (2) 1000 (3) e 8000x fatores de ampliação , (B) GNP/PB (1) 60 (2) 1000 (3) e 8000x fatores de ampliação e (C) GNP/PB/GOx (1) 109 (2) 1200 (3) e 20000x fatores de ampliação. Color SEM com a distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo (B3) GNP/PB. Fonte: Elaborado pelo autor.

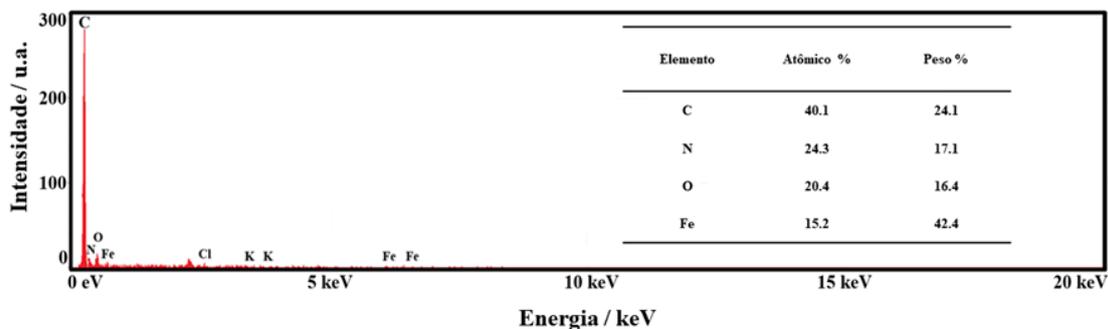


Figura 18. Espectros EDS e composição elementar em GNP/PB. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de FTIR foram obtidos para eletrodos GNP e GNP/PB para observar sua composição superficial e possíveis alterações após a modificação da superfície. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 19. É possível observar que para o GNP existem bandas predominantes na região entre 1800 e 800 cm^{-1} , nas quais são atribuídos grupos oxigenados, como carboxila e/ou carbonila (1717 e 1445 cm^{-1}) [178]. Nesse sentido, as bandas em 1222 e 1113 cm^{-1} , podem estar relacionadas à vibração de estiramento do C–O–C [178]. Essas bandas podem ser atribuídas a compostos presentes no NP, como tolueno, álcool isopropílico, acetato de butila e resina de formaldeído, entre outros, utilizados na fabricação de tintas condutoras. Por outro lado, nos espectros GNP/PB, uma banda de alta intensidade em 2070 cm^{-1} pode ser observado, o qual pode estar relacionado a grupos funcionais $\text{C}\equiv\text{N}$ e originado do PB [179]. Esses resultados corroboram que a modificação do sensor descartável com PB foi bem-sucedida.

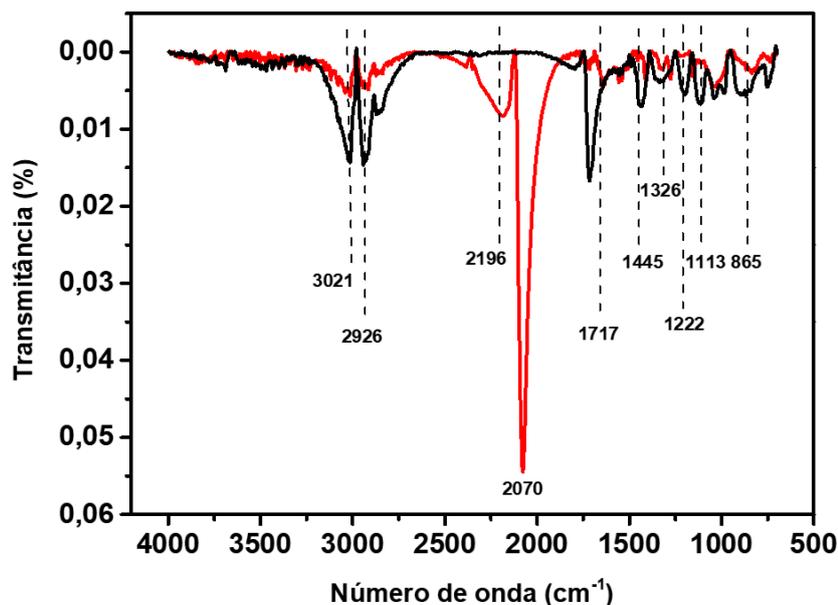
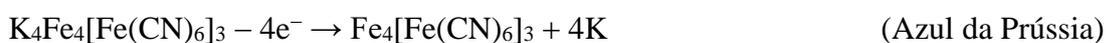


Figura 19. Espectros FTIR para GNP (—) e GNP/PB (—). Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos GNP e GNP/PB

Após a caracterização físico-química da superfície, foram realizadas caracterizações eletroquímicas utilizando a voltametria cíclica para estudar o comportamento eletroquímico dos eletrodos GNP e GNP/PB (Figura 20). Primeiramente, foram avaliados em PBS 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,0). Pode ser observado a partir dos voltamogramas cíclicos que nenhum processo redox esteve envolvido no eletrólito de suporte empregando o eletrodo GNP. Após a eletrodeposição do filme de PB (linha vermelha), os processos redox típicos que indicam a presença de PB estão presentes, compostos por dois picos de oxidação e dois picos de redução. O primeiro sinal redox (I) é um pico de oxidação em torno de +0,04 V atribuído ao PB. A oxidação do PB fornece um pico em torno de +0,76 V, relacionado ao verde de Berlim (III), e forma oxidada do PB. A redução subsequente do verde de Berlim fornece PB em torno de +0,52 V, e um segundo processo de redução gera branco da Prússia (IV) em -0,25 V. A formação dos compostos é relatada pela literatura [180, 181] e pode ser representada pelas reações químicas abaixo:



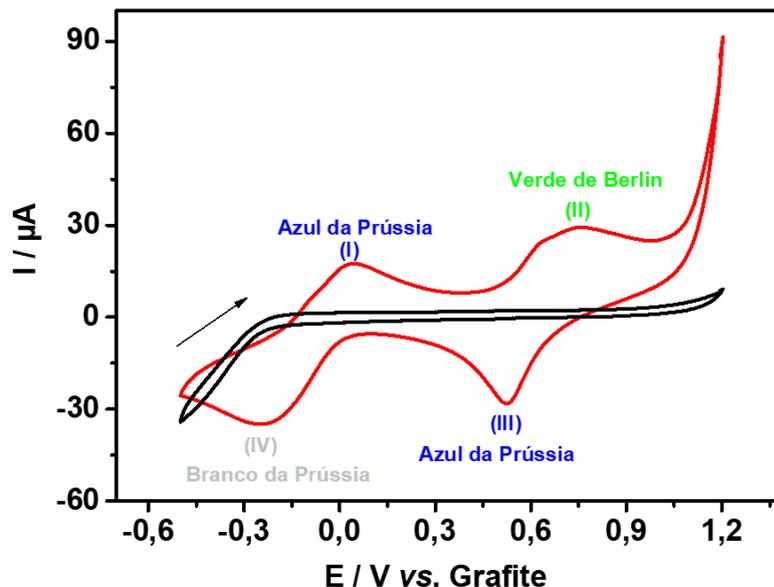


Figura 20. Voltamogramas cíclicos em ausência (—) e presença (—) de azul da Prússia em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

A área eletroativa do GNP e GNP/PB também foi calculada. Para isso, estudos de voltametria cíclica foram realizados em diferentes velocidades de varredura entre 30 a 250 mV s^{-1} em ambos os eletrodos (Figura 21). A área eletroativa foi calculada com base na equação de Randles-Sevcik (Equação 1), usando uma solução de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$:

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

onde, I_p é a corrente de pico (A), A a área eletroativa (cm^2), C a concentração da sonda redox (mol L^{-1}), D o coeficiente de difusão da sonda redox ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), n o número de elétrons envolvidos na reação, e ν a taxa de varredura (mV s^{-1}). O coeficiente de difusão utilizado para FcMeOH foi de $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [182, 183].

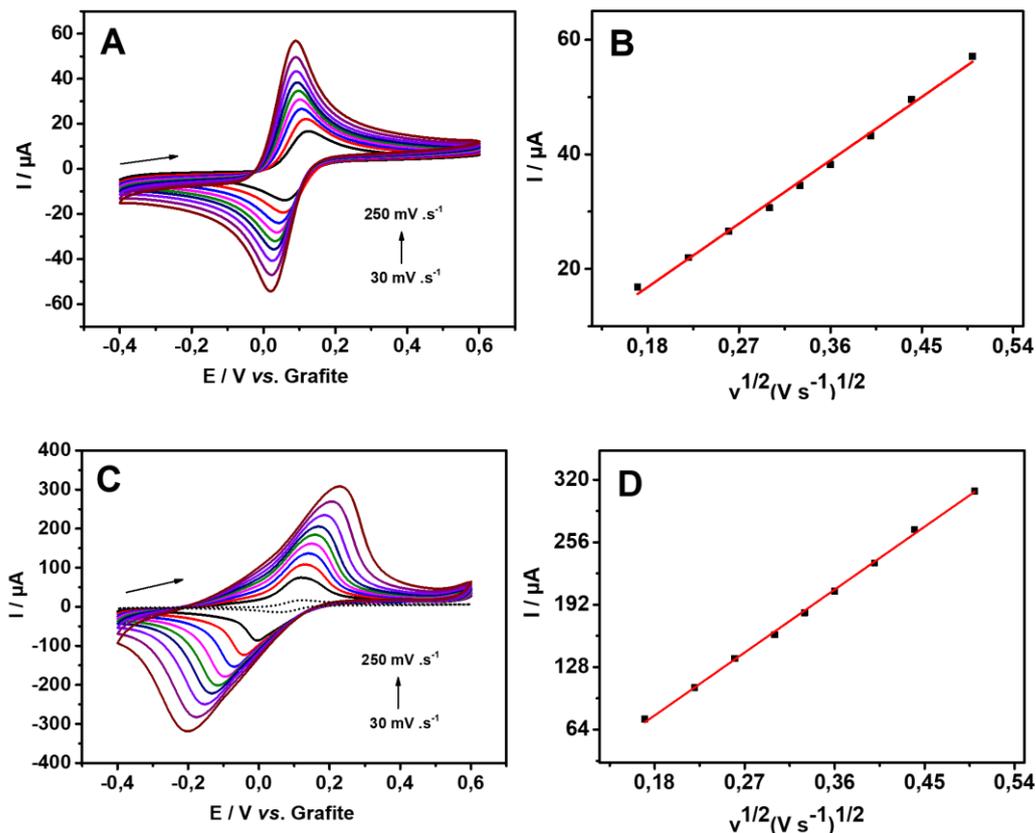


Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo (A) GNP e (B) GNP/PB em ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ variando a velocidade de varredura em 30, 50, 70, 90, 110, 130, 160, 200 e 250 mV s⁻¹. (B) e (D) Gráfico de pontos I vs. v^{1/2}. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores obtidos de I_{pa} foram 0,16 e 0,77 cm² para GNP e GNP/PB, respectivamente. Primeiramente, vale ressaltar que a área geométrica do eletrodo é ligeiramente maior (0,19 cm²) do que a área superficial eletroativa do GNP não modificado. Isso ocorre devido à composição do eletrodo (tinta condutora), que apresenta NP não condutor em sua composição, assim, apenas partes da superfície do eletrodo são eletroativas e responsáveis pelo processo de transferência de elétrons. Ao comparar a área eletroativa dos eletrodos não modificados e modificados com PB, pode-se observar que há um aumento de aproximadamente 5 vezes na área eletroativa após a modificação do PB. Tal aumento provavelmente ocorreu devido ao aumento da rugosidade da superfície do material após a deposição de PB, onde foram observadas rachaduras na superfície através de imagens de MEV. Esse aumento da área eletroativa é benéfico para a adsorção de analitos e a imobilização de enzimas, aumentando a resposta eletroquímica e diminuindo a detectabilidade [184].

As curvas da Figura 21 B e D, relacionadas ao gráfico de corrente de pico *versus* raiz quadrada de varredura ($v^{1/2}$), mostram um comportamento linear para ambas as superfícies com valores de coeficiente de determinação de linearidade de $R^2 = 0,9955$ (GNP) e $R^2 = 0,9986$ (GNP/PB), seguindo as equações: $I_p (\mu A) = -5,25 (\pm 1,008) + 122,8 (\pm 2,914) v^{1/2} (V s^{-1})^{1/2}$ e $I_p = -65,61 (\pm 3,191) + 711,7 (\pm 9,226) v^{1/2} (V s^{-1})^{1/2}$, respectivamente, o que indica que em ambos os eletrodos os processos de transporte de massa são controlados por difusão [185].

4.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Ácido Úrico

Após a caracterização dos eletrodos, estes foram avaliados quanto à detecção de AU. O desempenho eletroquímico do sensor na detecção de AU foi inicialmente avaliado por CV em uma solução de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) na presença de AU 800,0 μmol L⁻¹ a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A Figura 22 apresenta os voltamogramas obtidos para GNP na presença de AU (linha azul), e GNP/PB na presença (linha vermelha) e ausência (linha preta) de AU. É possível observar que o AU apresenta um comportamento irreversível com um pico de oxidação bem definido em torno de +225 mV no GNP/PB. Na presença de PB (linha vermelha), embora os picos típicos relacionados aos processos redox do PB sejam diminuídos, pode-se observar que o processo de oxidação do AU é melhorado, apresentando um valor de corrente de pico maior correspondendo a um aumento de 43%. Este resultado está de acordo com os valores de área eletroativa calculados, onde se observa um aumento de área para o GNP/PB. Assim, esta superfície fornece mais sítios eletroativos para a oxidação do AU e maiores correntes de pico são observadas. A oxidação do AU para o eletrodo GNP ocorreu na região de potencial de +290 mV. Para o eletrodo GNP/PB, a oxidação ocorreu em potencial de trabalho diminuído (+250 mV), o que pode indicar que o PB catalisou a reação, o que aumenta o desempenho eletroquímico do dispositivo. Pode-se inferir também que os dois átomos de oxigênio de AU têm uma melhor correspondência com os dois átomos de Fe^{II} localizados na diagonal da estrutura cristalina do PB em comparação com os átomos de oxigênio com Fe^{III}. Portanto, há uma forte adsorção entre os átomos de oxigênio do AU e os dois átomos de Fe^{II} do PB permitindo boas interações para a transferência seletiva de elétrons [186].

Além disso, não estão ocorrendo interferências dos processos redox do PB, indicando que o GNP/PB tem um grande potencial no sensoriamento de AU, sendo um material interessante a ser empregado.

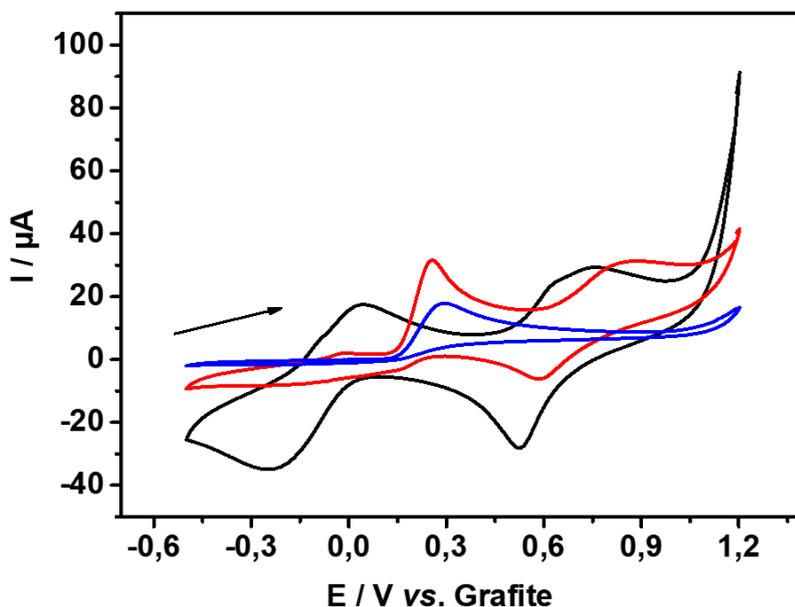


Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos para GNP (—) na presença de $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ AU, e para GNP/PB na ausência (—) e presença (—) de $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ AU, em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 23 demonstra o mecanismo de oxidação do ácido úrico que ocorre na superfície do sensor GNP e GNP/PB. O ácido úrico eletroativo pode ser oxidado irreversivelmente em uma solução aquosa para produzir alantoína como o produto principal. A alantoína é um produto da degradação da purina e é formada em humanos acima de um nível limiar, devido à oxidação do ácido úrico [187]. Além disso, é possível observar que durante o processo é gerado $2e^-$ e $2H^+$ em uma etapa única.

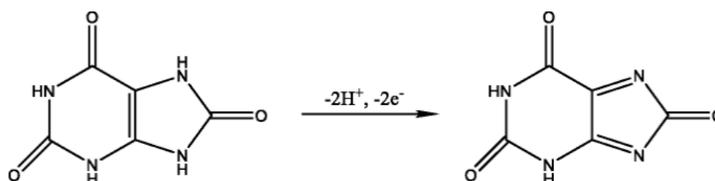


Figura 23. Mecanismo de oxidação do ácido úrico. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, determinou-se a melhor técnica voltamétrica para a detecção do analito. Foram testadas as técnicas voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). As medidas foram realizadas em tampão fosfato salino (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) em presença de AU $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, considerando a manutenção da velocidade de varredura (10 mV s^{-1}) em ambas as técnicas para uma melhor comparação. A Figura 24 mostra os voltamogramas obtidos para SWV e DPV. Um valor de corrente de pico maior foi obtido por DPV (14 vezes maior), indicando que DPV é mais adequada para a detecção de AU. Assim, esta técnica foi empregada para outros testes envolvendo o AU.

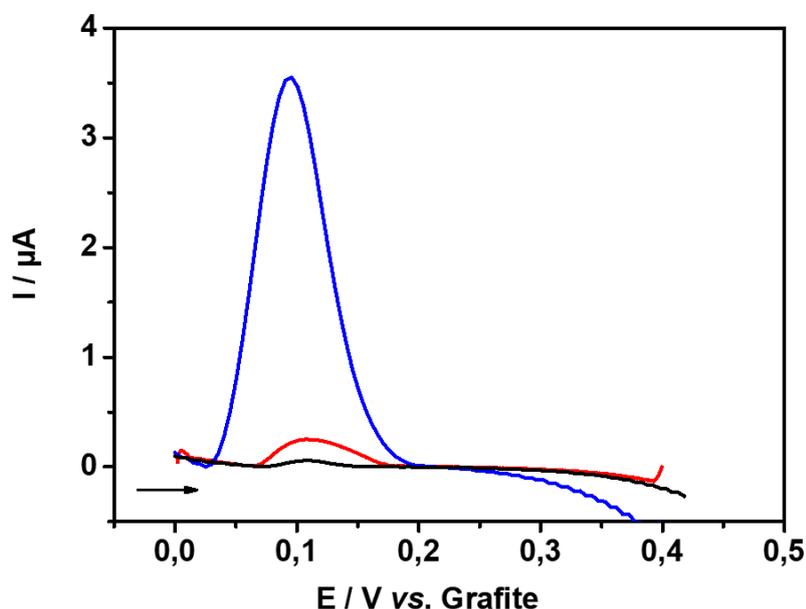


Figura 24. Comparação entre técnicas DPV (—) e SWV (—), em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (—) e na presença de AU $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS (pH 7,0). Parâmetros SWV: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, step 1 mV ; DPV: $a = 50 \text{ mV}$, modulation time = 25 ms , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a seleção da técnica, foi realizada a otimização dos parâmetros operacionais de DPV (amplitude de modulação, tempo de modulação e potencial de passo) para garantir a melhor resposta eletroquímica. Para isso, foi realizado um estudo univariado em uma solução contendo UA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ mantendo dois parâmetros fixos enquanto o terceiro foi variado. Para este estudo, os parâmetros do DPV foram fixados da seguinte forma: tempo de modulação (mt): 25 ms ; amplitude (a): 50 mV ; e incremento de potencial (ΔE): 5 mV . Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 25, bem

como os gráficos correspondentes da resposta de corrente. Observa-se que o aumento dos valores do potencial de passo levou a um aumento na resposta da corrente, e um potencial de passo de 7 mV foi escolhido para novos experimentos, pois, para valores maiores, observou-se um aumento na largura do pico, assim como o aumento na magnitude do ruído de linha de base (Figura 25-A). O mesmo aumento na resposta da corrente foi observado para a variação da amplitude, onde um máximo na resposta da corrente é atingido em 80 mV de amplitude (Figura 25-B). Portanto, este valor foi selecionado como ótimo. Também pode ser visto que aumentos no tempo de modulação reduzem a corrente de pico do AU (Figura 25-C) e, uma vez que respostas eletroquímicas mais altas são direcionadas.

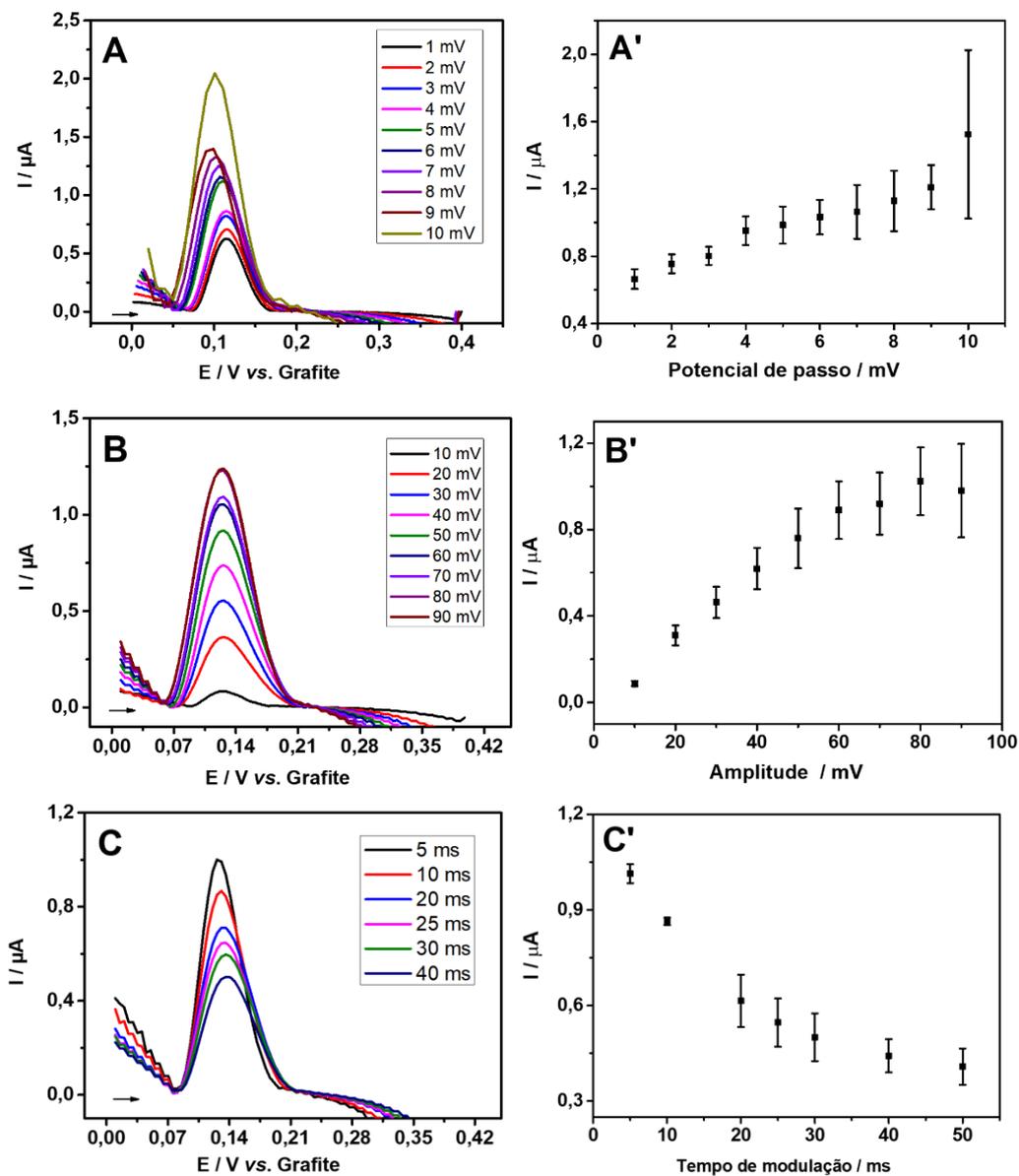


Figura 25. Resposta voltamétrica DPV para UA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) obtida em diferentes (A) incremento de potencial (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV). (B) amplitude de modulação (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 mV) e (C) tempo de modulação (5, 10, 20, 25, 30, 40 e 50 ms), e respectivos gráficos de corrente de pico *versus* parâmetros variados (A'-C'). Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os parâmetros, faixas estudadas e valores escolhidos durante a otimização estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Otimização de parâmetros para técnica de voltametria de pulso diferencial. Fonte: Elaborado pelo autor.

Parâmetro estudado	Faixa estudada	Valor selecionado
Incremento de potencial	1 a 10 mV	7 mV
Tempo de modulação de pulso	5 a 50 ms	5 ms
Amplitude	10 a 90 mV	80 mV

Após a otimização dos parâmetros experimentais para o sensor GNP/PB utilizando a voltametria de pulso diferencial, construiu-se uma curva analítica para diferentes concentrações crescentes de AU. Foram realizadas medidas sucessivas de AU em diferentes concentrações no intervalo de 5,0 a 150,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo voltamogramas para cada concentração (Figura 26-A). É possível observar um aumento linear na corrente de pico com a adição sucessiva e crescente de AU (Figura 26-B). As medidas para cada concentração foram realizadas com o mesmo eletrodo, sendo possível observar uma boa estabilidade do sensor. A curva apresentou um coeficiente de determinação de linearidade ($R^2=0,990$), e a regressão mostra que os dados seguem a equação $I_{pa} (\mu\text{A}) = -0,2981 (\pm 0,0202) + 0,0807 (\pm 0,0023) C_{AU} (\mu\text{mol L}^{-1})$.

O limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) foram calculados de acordo com 3 e 10 vezes o desvio padrão do intercepto linear sobre a sensibilidade analítica da curva de calibração [188]. O valor de desvio padrão relativo (RSD) (calculado de acordo com SKOOG *et al.* [189]) a seguir: $RSD = (s / x) * 100\%$, onde s é o desvio padrão e x o valor médio calculado). Obteve-se um LOD e LOQ de 0,70 e 2,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, demonstrando que o GNP/PB apresenta potencial para a detecção de AU.

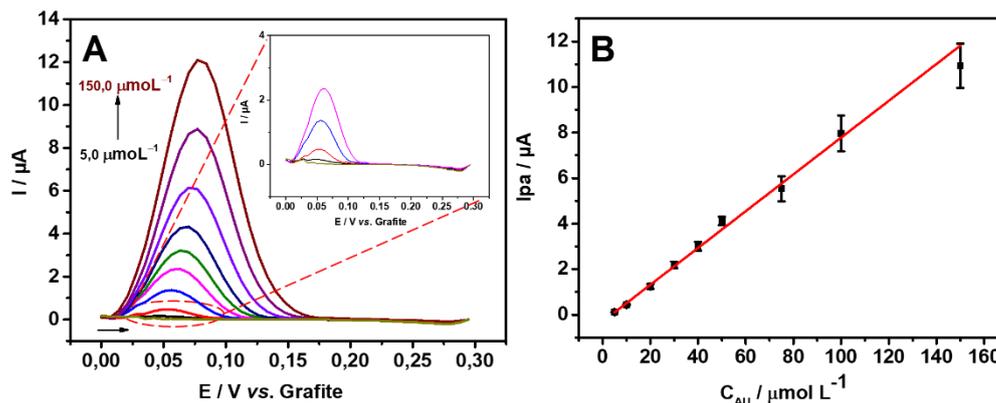


Figura 26. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtido em solução de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) em diferentes concentrações de AU (5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 150,0 μmol L⁻¹); (B) Gráfico da corrente de pico *versus* concentração de ácido úrico, obtido a partir de A. Condições experimentais DPV: amplitude: 80 mV; tempo de modulação ± 5 ms; incremento de potencial: 7 mV s⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ensaio para o estudo de repetibilidade e reprodutibilidade para o dispositivo descartável GNP/PB foram realizados sob as condições anteriormente otimizadas. Para avaliar a precisão do sensor, foi realizado um estudo de repetibilidade realizando 20 medições consecutivas de DPV no mesmo sensor. A Figura 27-A mostra os voltamogramas e o respectivo gráfico de corrente de pico em função do número de repetições. Como pode ser visto, e de acordo com o RSD obtido (4,72%), o sensor proposto apresentou precisão satisfatória e pode ser aplicado para medições consecutivas sem perda de desempenho. Além disso, foram realizados testes intereletrodos para avaliar a reprodutibilidade dos sensores obtidos. Para isso, cinco sensores diferentes foram avaliados realizando medições de DPV em uma solução contendo AU 25,0 μmol L⁻¹, e os voltamogramas são apresentados na Figura 27-B. Foi obtido um baixo valor de RSD (3,59%), indicando que a construção dos sensores é reprodutível.

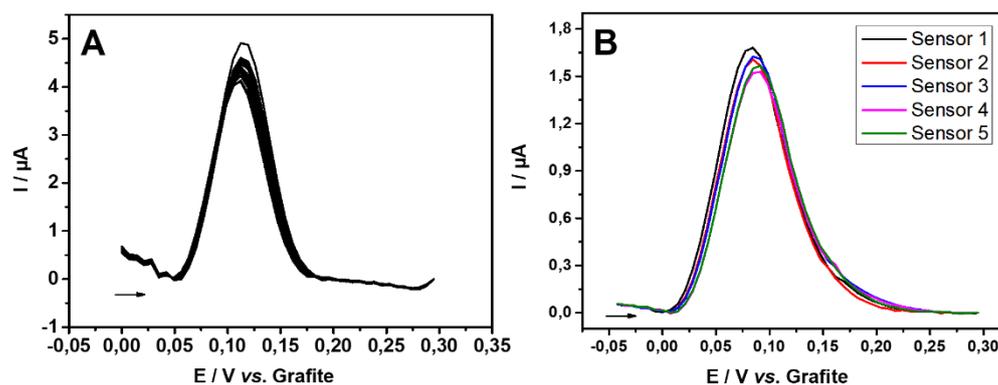


Figura 27. (A) Dados de repetibilidade obtidos de voltamogramas de pulso diferencial sucessivos ($n=20$) usando uma solução de AU $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (B) Dados de reprodutibilidade obtidos de voltamogramas de pulso diferencial sucessivos ($n=5$) usando uma solução de AU $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Condições experimentais DPV: amplitude: 80 mV ; tempo de modulação: 5 ms ; incremento de potencial: 7 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

Tem sido relatado que o AU pode ser encontrado no suor humano em concentrações que variam de $24,5$ a $35,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ [189]. Dessa forma, buscando validar e demonstrar a aplicabilidade do sensor GNP/PB, foram preparadas amostras de suor sintético a fim de serem utilizadas em medidas de adição e recuperação de padrão. Para isso, foram realizados testes de recuperação após a fortificação da amostra com quatro diferentes concentrações de AU ($5,0$, $20,0$, $40,0$ e $59,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3. A partir da tabela, pode-se observar que foram obtidos valores de recuperação que variam de $102\% \pm 3,4$ a $113\% \pm 1,8$, indicando que não houve interferências significativas da matriz amostral presente. Assim, o GNP/PB pode ser aplicado com sucesso na detecção de AU, sendo uma alternativa interessante aos eletrodos convencionais.

Tabela 3. Valores de recuperação (n=3) para adições de ácido úrico em amostras de suor sintético. Fonte: Elaborado pelo autor.

Amostra	Fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
A	5,0	$5,51 \pm 0,37$	$110,54 \pm 5,18$
B	20,0	$20,46 \pm 0,94$	$102,31 \pm 3,44$
C	40,0	$44,67 \pm 3,26$	$111,67 \pm 5,85$
D	59,0	$66,68 \pm 1,35$	$113,02 \pm 1,77$

Em busca de avaliar o desempenho do sensor GNP/PB, este foi avaliado com outros trabalhos já desenvolvidos, por meio de busca e comparação com outros sensores utilizados para a detecção de AU (Tabela 4). Guan *et al.* [190] apresentaram um sensor para determinação de AU usando nanotubos de carbono aminofuncionalizados e AuNPs. Os autores obtiveram um LOD de $0,29 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um intervalo linear de 0,3 a $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Apesar do sensor proposto pelos autores apresentar um LOD um pouco menor, a síntese de materiais e montagem do sensor requer mais de 3 dias. Como comparação, nosso sensor proposto leva aproximadamente 1,5 dias entre as etapas de preparação do substrato PET, tinta condutora e modificação com PB. Yang *et al.* [191], por outro lado, determinaram simultaneamente AU, dopamina (DA) e ácido ascórbico (AA) usando um eletrodo modificado com grafeno reduzido. A determinação foi realizada pela modificação de superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com grafeno, e obteve-se uma resposta linear na faixa de 0,5 a $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LOD de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. Xu *et al.* [192], também propuseram um GCE modificado, para a determinação simultânea de DA e UA na presença de AA. Neste trabalho, os autores empregaram nanopartículas reduzidas de Pt e óxido de grafeno como modificadores. Uma faixa linear de 10,0 a $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi alcançada, com um LOD de $0,45 \mu\text{mol L}^{-1}$. Embora os autores tenham relatado um baixo LOD, foram necessários procedimentos demorados para produzir os sensores e, além disso, o uso do GCE restringe a aplicação do dispositivo como sensor vestível.

Tabela 4. Desempenho analítico do GNP/PB para determinação de AU comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
ITO-rGO-AuNPs	LSV	10,0 a 500	3,6	[193]
MCPE	CV	10,0 a 70	5,1	[194]
COF-NH ₂ - MWCNT/Au/GCE	DPV	0,3 a 200	0,29	[195]
GCE/rGO/PtNPs	DPV	10,0 a 100	0,45	[196]
ERGO/GCE	DPV	0,5 a 60	0,5	[197]
Eletrodo de diamante dopado com boro	SWV	8,0 a 1000	7,7	[198]
GNP/PB	DPV	5,0 a 150	0,70	Este trabalho

Notas: ITO-rGO-AuNPs: eletrodos à base de óxido de índio-estanho modificados com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de ouro; MCPE: eletrodo de pasta de carbono modificado com 2-hidroxibenzimidazol; COF-NH₂-MWCNT/Au/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com estruturas orgânicas covalentes, nanotubos de carbono aminofuncionalizados e nanopartículas de ouro; GCE/rGO/PtNPs: eletrodo de carbono vítreo modificado com Pt/óxido de grafeno reduzido; GCE/rGO: eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido.

4.4 Aplicação de GNP/PB como Sensor Vestível

Sensores vestíveis têm recebido grande atenção na área da saúde para monitorar marcadores clínicos em fluidos biológicos, como suor, saliva e lágrimas [199]. Tais plataformas são dispositivos que podem ser usados durante atividades físicas para rastrear a saúde e a aptidão de um indivíduo, visando o monitoramento em tempo real e contínuo de biomarcadores relevantes. Além disso, essas plataformas permitem a substituição do diagnóstico clínico convencional que demanda instrumentação cara e grandes volumes de amostras [71 , 72]. Nesse sentido, a impressão 3D surge como uma ótima alternativa para a construção de dispositivos vestíveis com características interessantes como baixo custo e possibilidade de construção de objetos com grande variedade de composição e desenhos, possibilitando a obtenção de dispositivos não invasivos para serem utilizados no monitoramento de biomarcadores em humanos [73 , 74]. A tecnologia de impressão

3D pode ser uma ferramenta poderosa para a obtenção de objetos sob demanda. A possibilidade de empregar diferentes materiais e a moldagem de estruturas simples ou mais complexas tornam esta técnica uma ótima opção na construção de sensores vestíveis [75]. Dado que o AU é um fator de risco para doenças como doença cardiovascular, doença renal, [76] e gota, o desenvolvimento de um sensor vestível para detecção de AU após a prática de atividades físicas é muito atraente [76]. Assim, propomos a determinação de UA empregando o sensor GNP/PB proposto em uma pulseira vestível, obtida usando a tecnologia de impressão 3D. O sensor vestível impresso em 3D foi desenvolvido empregando filamento ABS flexível não condutor flexível, e três conectores condutores foram fabricados a partir de filamentos condutores caseiros de grafite e ácido polilático [77]. A Figura 28 mostra o sensor vestível proposto. Como prova de conceito, as medições empregando o sensor vestível produzido foram realizadas pelo DPV para UA.

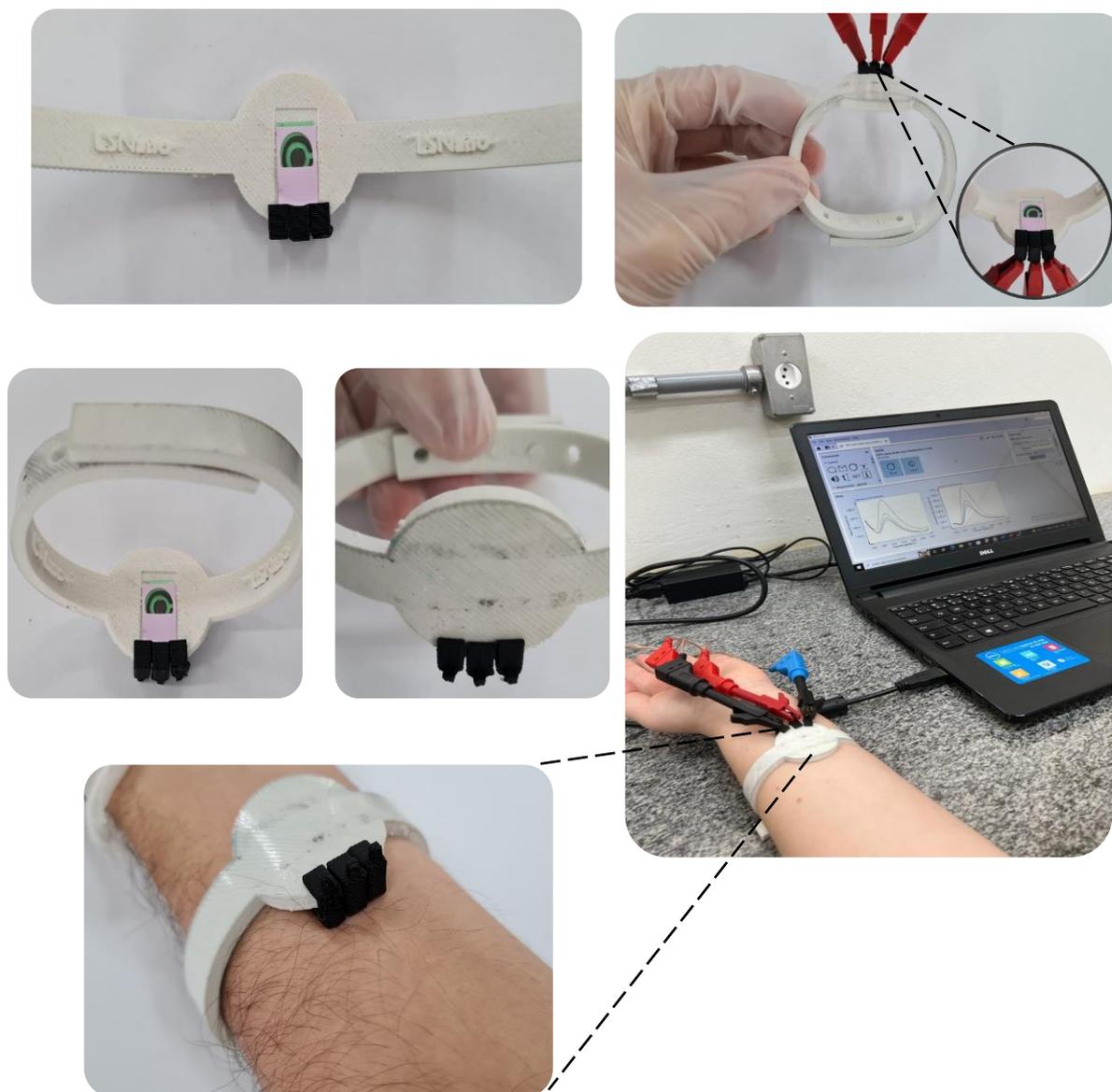


Figura 28. Montagem da pulseira vestível com o eletrodo e conectores e um exemplo de análise do suor na pele humana. Os conectores foram responsáveis por fornecer o contato elétrico e a conexão do sensor ao potenciostato, fechando o sistema eletroquímico. Parâmetros de impressão: extrusão e temperatura da mesa de 200°C e 65°C, respectivamente, com enchimento total. Fonte: Elaborado pelo autor.

A pulseira permitiu a medição eletroquímica do AU no suor sintético diretamente em contato com a pele. A medida eletroquímica foi realizada pela adição de 5 μL de uma solução de AU $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, preparada em suor sintético, diretamente no braço de uma pessoa. Para isso, a pulseira foi colocada com o eletrodo voltado diretamente para a amostra, sendo então realizada a medida do DPV (Figura 29). O voltamograma obtido foi comparado ao com o sensor não acoplado à plataforma vestível. Com base nas medições, pode-se observar que ocorreu uma pequena diminuição na resposta de corrente, porém,

essa diminuição corresponde a apenas 3%, indicando que a detecção de AU pode ser realizada diretamente na pele, sem prejuízo da resposta eletroanalítica.

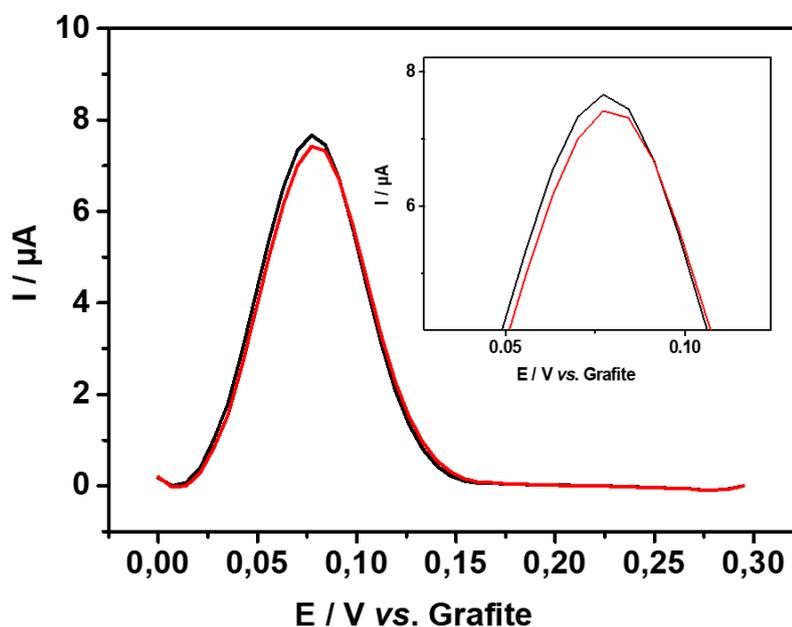


Figura 29. Voltamogramas de pulso diferencial com conector de eletrodos serigrafados (linha preta) e pulseira de relógio de pulso (linha vermelha) na presença de AU $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Condições experimentais DPV: amplitude: 80 mV ; tempo de modulação: 5 ms ; incremento de potencial: 7 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando que a quantidade de suor excretada por uma pessoa em toda a região do corpo durante as atividades físicas é de $0,45$ a $3,80 \text{ mL}$ [78], o sensor vestível proposto é adequado para a análise do suor de um indivíduo. Ressalta-se também que, caso seja empregado um potenciostato portátil, a análise pode ser realizada *in loco* logo após a prática do exercício, ou durante as atividades físicas, por meio de um potenciostato miniaturizado e um smartphone por *software* via *wireless*, permitindo análise em tempo real. A possibilidade de ser empregado como um sensor vestível torna o sensor proposto uma plataforma muito interessante, e a possibilidade de monitorar os níveis de AU durante ou logo após a atividade física desempenha um papel importante no monitoramento de condições físicas estritamente relacionadas a diversos problemas crônicos de saúde, desde de doenças cardíacas, diabetes tipo 2 e câncer [79]. Assim, o dispositivo vestível pode atuar no monitoramento da saúde de forma dinâmica e não invasiva.

4.5 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Peróxido de Hidrogênio

Além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um importante agente oxidante e biomarcador de doenças é também um produto obtido durante a reação enzimática entre glicose e a enzima glicose oxidase (GOx). Dessa forma, a avaliação do sensor GNP/PB para detecção deste analito foi testada. Inicialmente, um estudo de potencial por meio de medidas cronoamperométricas foi realizado com o intuito de determinar o melhor potencial ideal para aplicar no eletrodo para a detecção de H_2O_2 . Registros cronoamperométricos triplicados (120s) para H_2O_2 $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foram obtidos para cada potencial estudado (de $-0,5 \text{ V}$ a $0,0 \text{ V}$) usando eletrodos GNP/PB. A Figura 30-A mostra a resposta para cada potencial estudado, onde ΔI corresponde à resposta atual de H_2O_2 subtraído da corrente de fundo (eletrólito de suporte) no respectivo potencial aplicado. É possível observar que em potenciais mais negativos, superiores a $-0,1 \text{ V}$, obtém-se um aumento significativo na resposta da corrente, atingindo um valor máximo no potencial de $-0,3 \text{ V}$, sem alterações significativas a partir daí. Considerando que $-0,3 \text{ V}$ forneceu a melhor resposta de corrente e que, em altos potenciais, a interferência de outros compostos é mais presente, este valor foi empregado para experimentos posteriores. Além disso, esse potencial de trabalho é próximo ao utilizado na literatura [200].

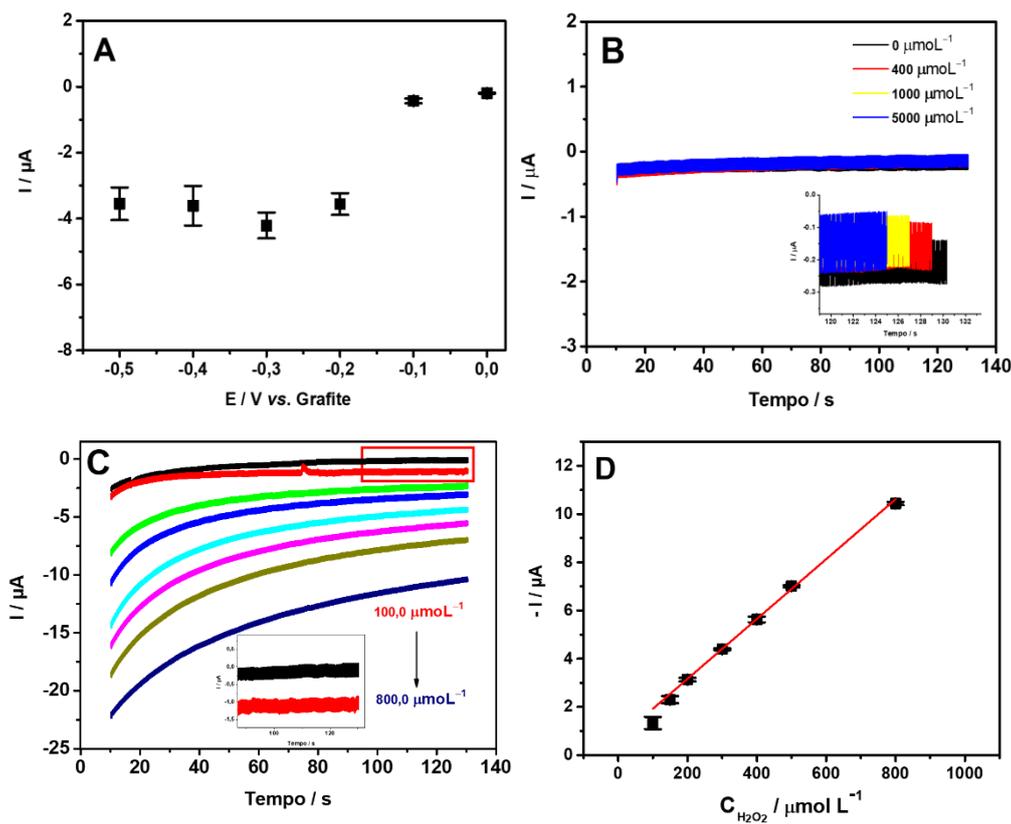


Figura 30. (A) Estudo de potencial para peróxido de hidrogênio $400,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando eletrodo GNP/PB obtido após medidas cronoamperométricos (duração de 120s; $n = 3$) em variados potenciais de trabalho; (B) Registros cronoamperométricos para concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio ($0,0$; $400,0$; $1000,0$ e $5000,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) no GNP, potencial de trabalho: $-0,3 \text{ V}$ (120 ms); (C) Registros cronoamperométricos para concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio ($100,0$ a $800,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em GNP/PB, potencial de trabalho: $-0,3 \text{ V}$ (120 ms); (D) Gráfico de corrente de pico *versus* concentração de peróxido de hidrogênio, obtido a partir de C. Fonte: Elaborado pelo autor.

Como prova de conceito, construiu-se uma curva analítica para determinação de H₂O₂ utilizando o eletrodo GNP/PB. Nesse sentido, foram obtidos registros cronoamperométricos para concentrações crescentes de H₂O₂ ($n = 3$) nos eletrodos GNP (Figura 30-B) e GNP/PB (Figura 30-C). Como pode ser visto, na ausência de PB (Figura 30-B), nenhuma resposta eletroquímica é observada para o peróxido de hidrogênio, mesmo em altas concentrações ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Esse comportamento é esperado, pois essa reação precisa ser catalisada para ocorrer. Como pode ser visto na Figura 30-C, a presença de PB é de grande importância, pois permite a detecção de peróxido de hidrogênio. Para concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio, um

comportamento linear foi obtido em concentrações variando de 100,0 a 800,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 30-D). A respectiva curva analítica segue a equação $I_p (\mu\text{A}) = 0,6823 (\pm 0,1305) + 0,0124 (\pm 2,864 \times 10^{-4}) C_{\text{H}_2\text{O}_2} (\mu\text{mol L}^{-1})$, com R^2 de 0,996. Os valores de LOD e LOQ foram calculados usando a mesma equação proposta anteriormente e os valores obtidos foram 31,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Dada a importância do H_2O_2 como uma molécula de sinalização inter e intracelular [201, 202] e em níveis acima de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ excretados pela urina [203], pode ser um indicador de complicações de saúde. Nesse sentido, a detecção de H_2O_2 pode ser realizada empregando o sensor proposto modificado com PB, permitindo uma análise rápida e simples deste composto. Além disso, a detecção de H_2O_2 é de grande interesse, pois permite uma grande variedade de aplicações, seja para a detecção indireta de biomarcadores como glicose, colesterol ou ácido láctico. Como esse composto é um subproduto de reações enzimáticas, ele está envolvido nesses processos biológicos [204] e permite o desenvolvimento de sensores alternativos para análise clínica. Portanto, sua facilidade de confecção e excelentes características analíticas são comparáveis ou superiores às observadas, conforme apresentado na Tabela 5, atestando que o sensor proposto pode ser empregado com sucesso para análises clínicas.

Tabela 5. Desempenho analítico do GNP/PB para determinação de H₂O₂ comparado com a literatura.

Fonte: Elaborado pelo autor

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
Fe ₃ O ₄ -Fe ₂ O ₃	Cronoamperometria	200,0 a 1800,0	200,0	[205]
Poli (GMA-co-VFc)	Cronoamperometria	2000,0 a 3,0×10 ⁴	2,6	[206]
PAn/MWCNTCOOH	Cronoamperometria	86,0 a 1,0×10 ⁴	86,0	[207]
Nafion/HRP-GNSs- TiO ₂ /GCE	Cronoamperometria	41,0 a 630,0	5,9	[208]
CuO/g-C ₃ N ₄	CV	0,5 a 50,0	0,31	[209]
GNP/PB	Cronoamperometria	100,0 a 800,0	31,6	Este trabalho

Notas: **Fe₃O₄-Fe₂O₃**: magnetita – hematita, **Poli (GMA-co-VFc)**: poli (glicidil metacrilato-co-vinilferroceno), **PAn/MWCNTCOOH**: nanotubo de carbono multiparede polianilina/carboxi-funcionalizado, **COOH**: Oxihidróxido de cobalto, **Nafion/HRP –GNSs-TiO₂/GCE**: peroxidase de rábano – nano-sementes de ouro – óxido de titânio/eletrodo de carbono vítreo, **CuO/g-C₃N₄**: óxido de cobre/nitreto de carbono grafitico.

4.6 Construção e Avaliação do Biossensor de Glicose

Após mostrar que o GNP/PB fornece uma resposta satisfatória para o peróxido de hidrogênio, um biossensor enzimático de glicose foi desenvolvido na superfície do GNP/PB. Nesse contexto, foi realizada a imobilização de GOx por ligação covalente, que tem a vantagem de contornar o fenômeno de dessorção e, assim, afetar o desempenho do biossensor. Para a construção do biossensor, avaliou-se a concentração de (QT) em 0,2%, 0,4% e 0,6% p/v para a imobilização de GOx na superfície do eletrodo com uma quantidade fixa de solução de glutaraldeído a 2%. Concentrações inferiores a 0,2% de QT não favorecem a imobilização da GOx levando a lixiviação da mesma. Observou-se que com concentrações de QT superiores a 0,2%, obteve-se uma queda de corrente, demonstrando uma maior resistividade do filme (Figura 31). Isso está diretamente relacionado à baixa condutividade da QT, que pode afetar o desempenho dos biossensores [210]. A concentração de glutaraldeído utilizada neste trabalho foi fixada em 2%, com

base em estudos anteriores da literatura [211] e que abordam a desnaturação de enzimas em concentrações superiores a 2%.

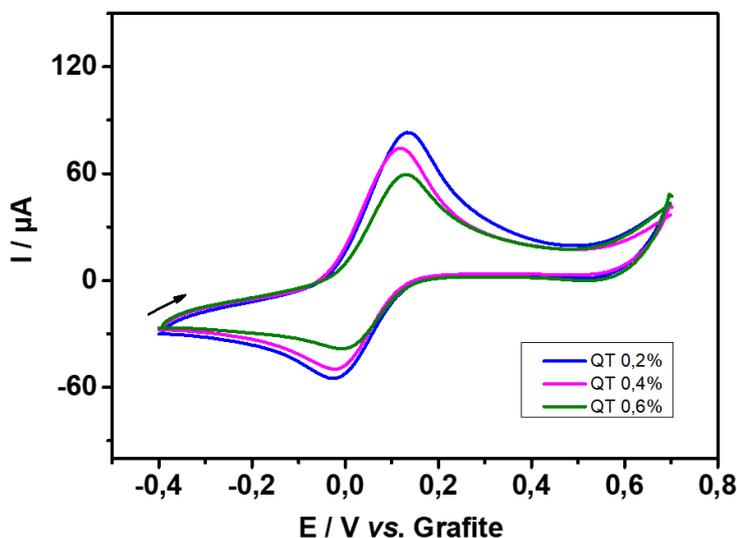


Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos para QT nas concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6% na presença de solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo 30 mg mL^{-1} GOx; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

Após estabelecidas as concentrações de QT, o comportamento eletroquímico da glicose foi avaliado utilizando o biossensor proposto. Todas as análises foram realizadas em pH 7,0, uma vez que soluções ácidas podem afetar a atividade enzimática, e em meios alcalinos causam diminuição da estabilidade do filme de PB, além de prejudicar a atividade da GOx [212]. Portanto, os CVs foram registrados usando uma solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). A Figura 32 mostra os voltamogramas obtidos em GNP/PB/GOx na presença e ausência de glicose. Pode-se observar que após a adição da solução de glicose há um aumento da corrente redox (linha vermelha). Este aumento da densidade de corrente dos picos de oxidação e redução do biossensor pode ser atribuído a oxidação da glicose para ácido glúconico, que se reoxida novamente com a redução do mediador PB, o qual é reoxidado pelo potencial aplicado, gerando um aumento na magnitude de corrente.

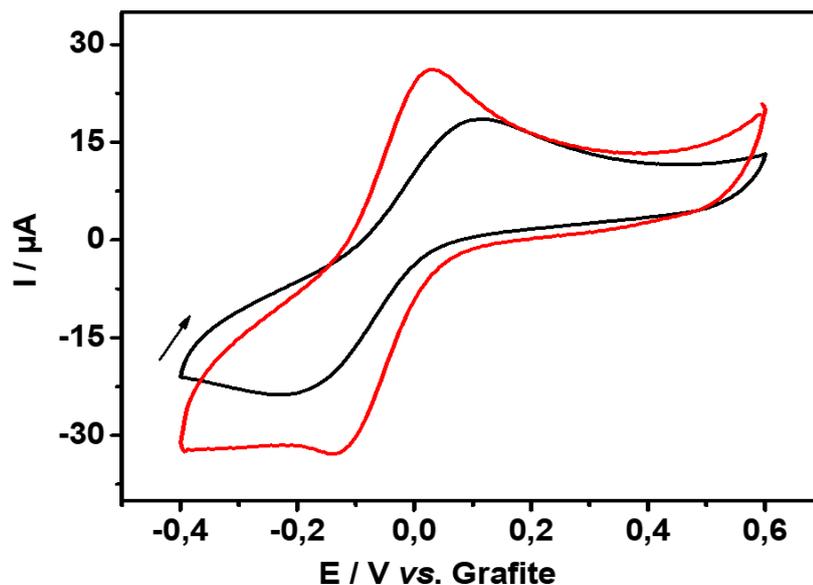


Figura 32. Voltamogramas cíclicos na ausência (—) e na presença (—) de glicose $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando o GNP/PB/GOx; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

O mecanismo para a oxidação enzimática da glicose é demonstrado na Figura 33. Neste processo, a glicose é convertida em ácido glucônico, catalisada pela enzima glicose oxidase (GOx) imobilizada na superfície do sensor. Secundaria a esta reação é a produção de peróxido de hidrogênio que pode ser reduzido cronoamperotricamente em sobrepotenciais baixo aplicados, eletrocatalisados pelo branco da Prússia (PW, do inglês “*Prussian White*”). Além disso, há uma ligeira abertura da enzima quando é depositada sobre o eletrodo GNP/PB, que tem uma superfície mais rugosa e irregular, conforme demonstrado pelo MEV, diminuindo a influência que a barreira proteica tem na transferência de carga, sendo mais fácil a transferência de elétrons entre o GNP/PB e a enzima.

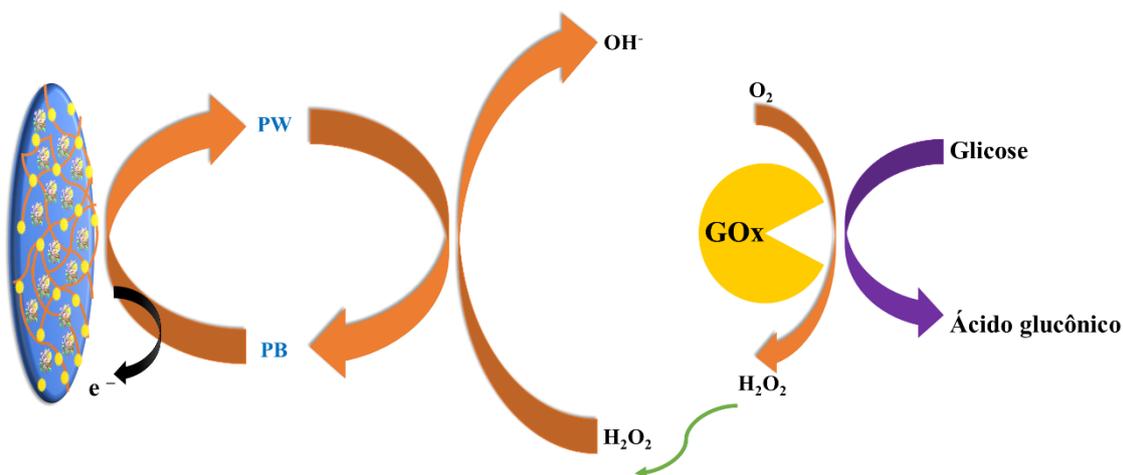


Figura 33. Mecanismo de funcionamento do biossensor GNP/PB/GOx. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o desenvolvimento do método de detecção por cronoamperometria, também foi realizado um estudo de potencial para glicose, assim como para a detecção de H_2O_2 . A Figura 34 apresenta as respostas de corrente obtidas para diferentes potenciais aplicados (variando de 0,0 a $-0,4$ V). Uma resposta de corrente mais alta foi obtida em $-0,3$ V. Este resultado está de acordo com o sensor proposto para peróxido de hidrogênio (Figura 34-A) uma vez que a detecção enzimática da glicose realizada através do peróxido de hidrogênio (gerado na reação enzimática), que é detectado indiretamente pelo biossensor, o qual foi selecionado para estudos posteriores.

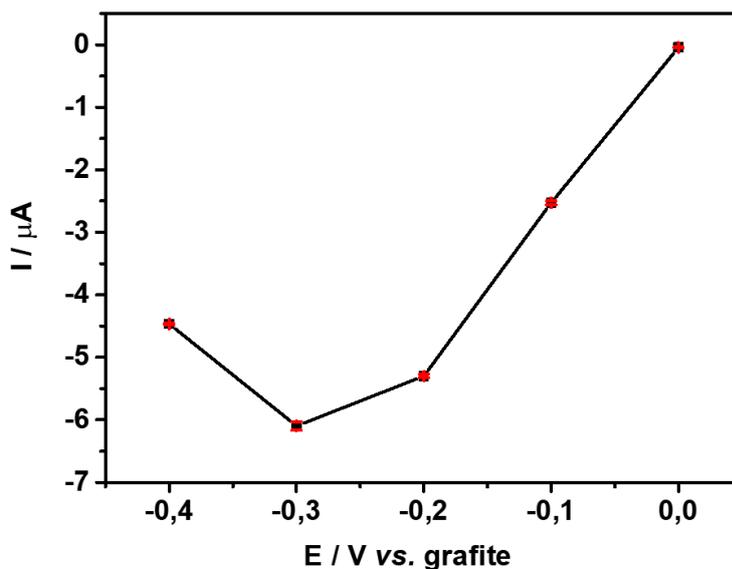


Figura 34. Estudo de potencial para glicose $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) utilizando eletrodo modificado com azul da Prússia obtido após medidas amperométricas ($n=3$) em potenciais de trabalho variados (-0,4, -0,3, -0,2, -0,1 e 0,0 V) durante 120 s. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a otimização do potencial de trabalho, foi obtida uma curva de calibração para concentrações crescentes de glicose empregando o biossensor proposto (Figura 35-A). Um comportamento linear foi observado com concentrações de glicose variando de $50,0$ a $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 35-B), seguindo a equação $I (\mu\text{A}) = 0,3554 (\pm 0,0223) + 2,393 \times 10^{-3} (\pm 8,785 \times 10^{-5}) C_{\text{glicose}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, com o valor de R^2 de 0,999. Os valores de LOD e LOQ foram calculados conforme descrito para o ácido úrico e peróxido de hidrogênio, e os valores foram $9,2$ e $30,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O desempenho analítico do biossensor foi comparado a outros biossensores para detecção de glicose apresentados na literatura e apresentados na Tabela 6. Além disso, a concentração de glicose em amostras de suor é relatada na literatura como variando de $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $600,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ [213]. Assim, o biossensor proposto é adequado para análise de glicose no suor na maioria das concentrações típicas.

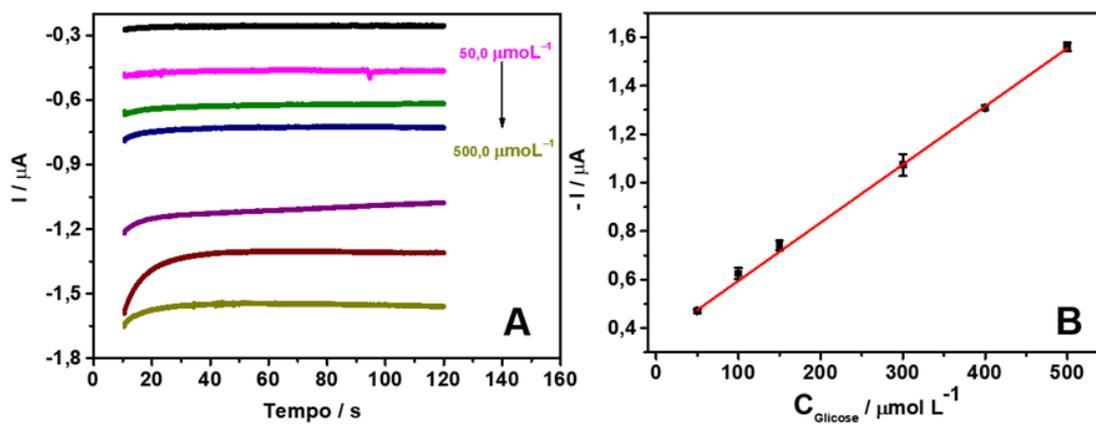


Figura 35. (A) Registros cronoamperometricos na ausência (—) e presença de concentrações crescentes de glicose (50,0;100,0; 150,0; 300,0; 400,0 e 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) contendo solução de KCl 0,1 mol L^{-1} em GNP/PB/GOx, potencial de trabalho: $-0,3 \text{ V}$ (120 s). (B) Gráfico de corrente *versus* concentração de glicose, obtido a partir de A. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6. Desempenho analítico do biossensor GNP/PB/GOx para determinação de glicose comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref
GOx/Chit/IL/PB/Pt	Cronoamperometria	10,0 a 4200,0	5,0	[214]
GOx/PB nanocubos	CV	10,0 a 1300,0	10,0	[215]
GOx/PPy/Al ₂ O ₃ /Pt	Cronoamperometria	500,0 a 1×10^4	30,0	[216]
rGO-GOx/PGE	Cronoamperometria	10,0 a 1000,0	5,8	[217]
GOx-DHP/Gr-AV	CV	1,0 a 10,0	0,21	[218]
Fe ₃ O ₄ @PNE-GOx	CV	200,0 a $2,4 \times 10^4$	6,1	[219]
GCE/Chi- Py/Au/GOx	Cronoamperometria	1000 a $2,0 \times 10^4$	68,0	[220]
CPE/GOx- SiO ₂ /Lig/Fc	Cronoamperometria	500,0 a 9000,0	145,0	[221]
GNP/PB/GOx	Cronoamperometria	50,0 a 500,0	9,2	Este trabalho

Notas: GOx/Chit/IL/PB/Pt: Eletrodo de Pt modificado com PB, líquido iônico ([bmim]BF₄), quitosana e GOx; **GOx/PB nanocubos:** eletrodo serigrafado modificado com cristais nanocúbicos de azul da prússia e glicose oxidase; **GOx/PPy/Al₂O₃/Pt:** biossensor baseado em arranjo de nanotubos de polipirrol (PPy) depositado em substrato de alumina nanoporosa banhado a Pt, modificado com glicose oxidase; **rGO-GOx/PGE:** eletrodo lápis de grafite modificado com biocompósito óxido de grafeno-glicose oxidase eletroquimicamente reduzido; **GOx-DHP/Gr-AV:** tinta condutora à base de grafite e verniz automotivo, modificada com dihexadecil fosfato e glicose oxidase; **Fe₃O₄@PNE-GOx:** nanoplateforma baseada em polinorepinefrina enxertada em nanopartículas de magnetita com glicose oxidase; **GCE/Chi-Py/Au/GOx:** biossensor baseado em filme bionanocompósito reticulado de polipirrol *in-situ* de quitosana/glicose oxidase/ouro; **CPE/GOx-SiO₂/Lig/Fc:** eletrodo de pasta de carbono baseado no sistema funcional glicose oxidase/sflica-lignina com mediador redox ferroceno.

Para demonstrar a aplicabilidade do biossensor proposto, testes de recuperação foram realizados fortificando amostras de suor sintético com três diferentes concentrações de glicose (50,0, 150,0 e 400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7, e foram obtidos valores de recuperação que variam de $91,56\% \pm 3,91$ a $100,5\% \pm 0,46$, mostrando que GNP/PB/GOx pode ser aplicado com sucesso para a detecção de glicose no suor.

Tabela 7. Valores de recuperação (n=3) para adições de glicose em amostras de suor sintético. Fonte: Elaborado pelo autor.

Amostra	Fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
A	50,0	47,28 \pm 2,92	94,56 \pm 3,91
B	150,0	137,38 \pm 3,02	91,59 \pm 1,55
D	400,0	402,37 \pm 2,41	100,59 \pm 0,46

Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade também foram realizados para avaliar o desempenho do biossensor proposto. Para o estudo de repetibilidade, dez cronoamperogramas sucessivos foram registrados (Figura 36-A), sob condições otimizadas (potencial de trabalho: $-0,3$ V, durante 120 s), usando uma solução de glicose $150,0 \mu\text{mol}^{-1}$. Obteve-se um resultado adequado, com um RSD de 5,2%, indicando que para análises sucessivas, o biossensor forneceu respostas semelhantes. Os dados das correntes para análise RSD foram retirados após 120s (tempo final da medição). Este resultado também pode indicar a estabilidade do biossensor, mostrando que após dez medições, o biossensor ainda forneceu respostas estáveis. Para o teste de reprodutibilidade, três biossensores diferentes foram avaliados pela técnica cronoamperometrica, utilizando uma solução de glicose $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em condições otimizadas (Figura 36-B). O estudo intereletrodos mostrou a reprodutibilidade na fabricação do biossensor uma vez que, a partir de três biossensores diferentes, a resposta cronoamperometrica proporcionou um baixo RSD (1,37%).

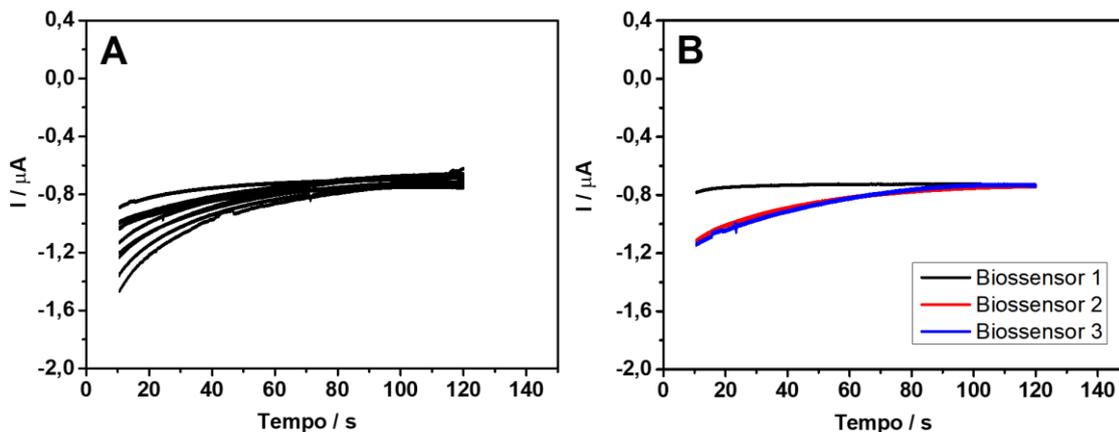


Figura 36. (A) Dados de repetibilidade obtidos de cronoamperogramas sucessivos ($n = 10$) usando uma solução de glicose $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, no GNP/PB/GOx. (B) Dados de reprodutibilidade obtidos de cronoamperogramas sucessivos usando uma solução de glicose $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em três biossensores GNP/PB/GOx diferentes; Eletrólito de suporte: solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Potencial de trabalho: $-0,3 \text{ V}$ (120s). Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, também foi realizado um estudo de seletividade. Para isso, diferentes moléculas, possivelmente encontradas em conjunto com a glicose no corpo humano, como frutose, sacarose, ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina, foram avaliados na presença de glicose em duas proporções diferentes: 1:1 e 1:2 (glicose: interferente). A resposta da glicose individualmente (controle) foi avaliada. A resposta atual da glicose na presença dos interferentes foi dada em porcentagem, em que os valores positivos são atribuídos a um aumento e os valores negativos correspondem a uma diminuição na resposta cronoamperométrica da glicose. Pode-se observar que para uma proporção de 1:1, a maioria das espécies avaliadas não está interferindo. Observou-se considerável interferência da dopamina, em aproximadamente 53%, enquanto o ácido ascórbico proporcionou uma leve interferência na resposta da glicose, correspondendo a 11,4%.

Quando a proporção 1:2 (glicose: interferente) é avaliado, esse comportamento é acentuado para o ácido ascórbico, que proporcionou um aumento na resposta de corrente em torno de 3,65 vezes, enquanto a dopamina aumentou a resposta em 1,48 vezes. Nesse contexto, foi demonstrado que essas moléculas, principalmente em altas concentrações quando comparadas à glicose, estão interferindo na análise da glicose quando se emprega GNP/PB/GOx. Além disso, o ácido úrico torna-se um interferente em concentrações mais altas, com aumento da resposta de corrente de 272,7%. Esses analitos foram relatados anteriormente na literatura como espécies interferentes na detecção de glicose [222, 223].

Embora a seletividade tenha sido um problema em concentrações mais altas, algumas medidas podem ser empregadas para contornar esse problema. O uso de modificadores de superfície, que podem aumentar a seletividade dos sensores, pode ser uma opção interessante. Nesse sentido, a literatura relata o uso de óxido de rutênio sobre carbono [224], complexos metálicos (ftalocianina de cobalto [225], porfirina metálica [226] e complexo de rutênio [227]), filmes baseados na repulsão eletrostática dos interferentes como o Nafion, que é um ionômero perfluorado com carga negativa que pode efetivamente restringir a adesão dos interferentes aniônicos em sua superfície [228].

Tabela 8. Estudo de seletividade no sinal cronoamperométrico de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de glicose. Fonte: Elaborado pelo autor.

Razão de interferente (Glicose: interferente)	Interferentes	Variação do sinal (%)
1:1	Frutose	-2,27
	Sacarose	-4,55
	Ácido ascórbico	+11,36
	Ácido úrico	+3,35
	Dopamina	+52,81
1:2	Frutose	+4,54
	Sacarose	+5,51
	Ácido ascórbico	+365,90
	Ácido úrico	+272,72
	Dopamina	+147,87

CONCLUSÕES

Neste trabalho relatamos o desenvolvimento de um (bio)sensor descartável feito de substrato de garrafa PET e tinta condutora de baixo custo modificada com filme PB para detecção de AU, H₂O₂ e glicose. O GNP/PB apresentou excelente desempenho analítico para determinação de AU e peróxido de hidrogênio apresentando respostas lineares na faixa de 5,0 a 150,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100,0 a 800,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Valores de LOD de 0,70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (AU) e 31,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (H₂O₂) foram obtidos. A estrutura do GNP/PB foi modificada com GOx tornando o biossensor denominado GNP/PB/GOx, que foi empregado para a detecção de glicose em amostras de suor sintético. O biossensor apresentou uma faixa linear de trabalho de 30,0 a 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 9,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O biossensor apresentou ótimos resultados, e suas vantagens, como miniaturização, baixo custo e fácil preparo, tornam este biossensor bastante atrativo em comparação aos demais apresentados na literatura. Além disso, o biossensor apresentou um desempenho eficiente, com potencial para ser aplicado em amostras biológicas, apresentando recuperações entre 91,56% \pm 3,91 e 100,5% \pm 0,46 para a detecção de glicose em suor artificial. Para mostrar a versatilidade do sensor proposto, seu desempenho como sensor vestível também foi avaliado em relação à resposta do AU, como prova de conceito. A resposta obtida com a pulseira vestível, em contato direto com a pele, apresentou resposta semelhante à obtida convencionalmente, com diminuição do pico de corrente de apenas 3%. Portanto, GNP/PB e GNP/PB/GOx são sistemas simples que apresentam características relevantes, versatilidade e eficiência na determinação de AU, H₂O₂ e glicose. Além disso, o custo estimado por unidade de sensor foi de R\$ 4,71 e para o biossensor foi de R\$ 6,89, o que torna essas plataformas atrativas diante dos testes laboratoriais.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DE PLATINA FLEXÍVEIS SOBRE A SUPERFÍCIE DE FOLHAS DE ECOPET APLICADO COMO SENSOR PARA DETECÇÃO DE L-CISTEÍNA E UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR LABEL-FREE PARA DETECÇÃO DA PROTEÍNA SPIKE.

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho eram de grau analítico. Água ultrapura (Milli Q, EUA), com resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi utilizada para preparar todas as soluções aquosas. Hexaferrocianeto de potássio (II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), L-cisteína (Alfa Aesar), metionina (Fisher Bio Reagentes), ácido cítrico (Dinamica®, Brasil), ureia (Vetec®, Brasil), tirosina, cafeína, frutose, glicose, cisteamina (CYS), albumina sérica bovina (BSA) e glutaraldeído (GLA) foram obtidos da Sigma-Aldrich®, EUA. A proteína de pico SARS-CoV-2 recombinante foi usada como antígeno e o anticorpo de pico SARS-CoV-2 (Ab) foi obtido da Sino Biological (Wayne, EUA). Para a detecção de L-Cisteína, foi utilizado $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (pH 6,0) como solução de eletrólito de suporte, preparada por fosfato de sódio dibásico (Dinamica®, Brasil), cloreto de potássio e fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich®, EUA). A solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x, pH 7,4) foi preparada usando cloreto de potássio (Sigma-Aldrich®, EUA), cloreto de sódio (Vetec®, Brasil), fosfato de sódio dibásico (Dinamica®, Brasil) e fosfato de potássio monobásico da Cinética (Jandira, Brasil). A saliva sintética foi produzida com cloreto de sódio (Vetec®, Brasil), fosfato de sódio dibásico (Dinamica®, Brasil), bicarbonato de sódio, cloreto de potássio e uréia da Sigma-Aldrich®, EUA. O filamento flexível e não condutor de acrilonitrila butadieno estireno (ABS) utilizado na construção de uma plataforma para medições eletroquímicas, foi adquirido da 3DLAB (Minas Gerais, Brasil).

5.2 Fabricação dos Eletrodos de Platina

Para a fabricação 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 (*Hexamethyldisilazane*, 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 isso, 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 sujeiras. 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 x 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. Por fim, os eletrodos foram cortados individualmente e utilizados para caracterizações morfológicas e eletroquímicas. A Figura 37 ilustra o processo de obtenção dos eletrodos de platina e a Figura 38 mostra o eletrodo finalizado.

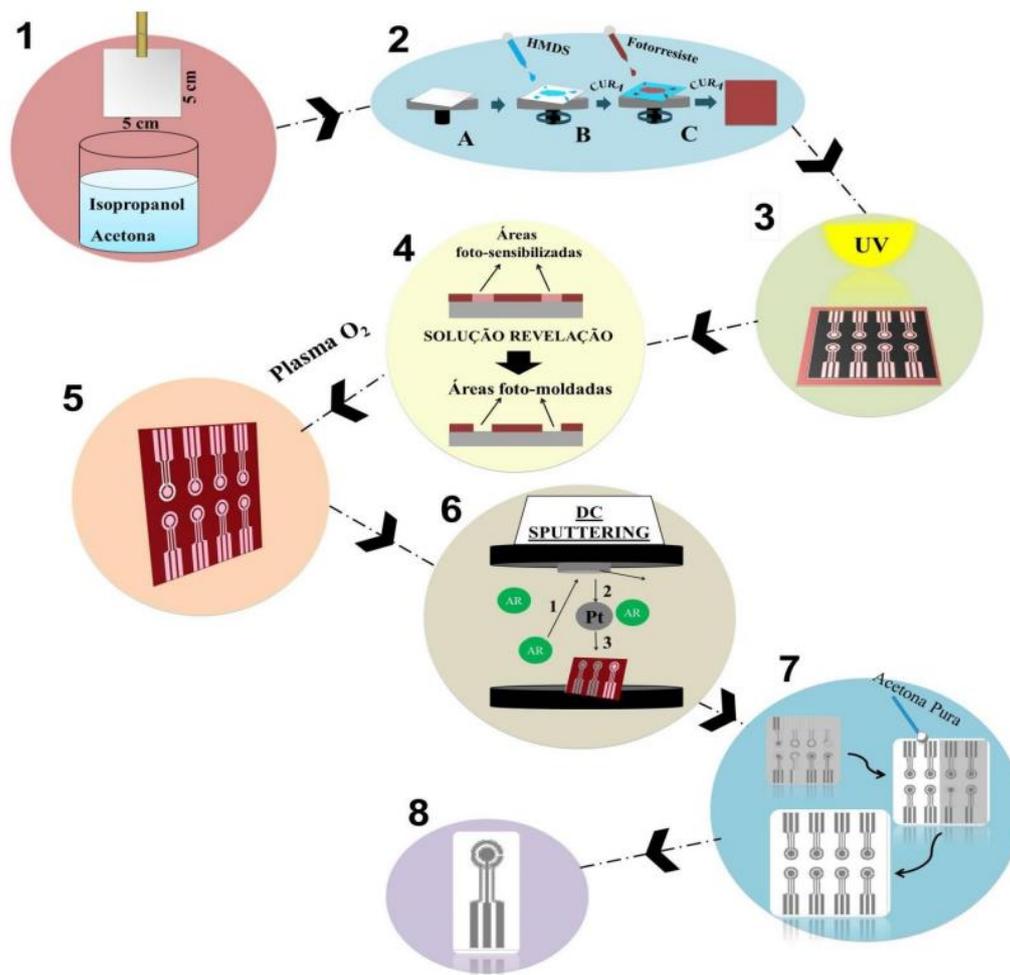


Figura 37. Processo de obtenção dos eletrodos de platina onde: (1) Limpeza do BioPET com solução de isopropanol e acetona; (2A) Utilização de spin coater de bancada para (2B) Espalhamento do HMDS sobre o substrato e; (2C) Espalhamento do fotorresiste sobre o substrato;(3) Exposição do substrato + máscara de campo escuro à luz UV para sensibilização. 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 fotorresiste sobre o substrato;(3) Exposição do substrato + máscara de campo escuro à luz UV para sensibilização. Fonte: Figura de Oliveira *et al.* [229].

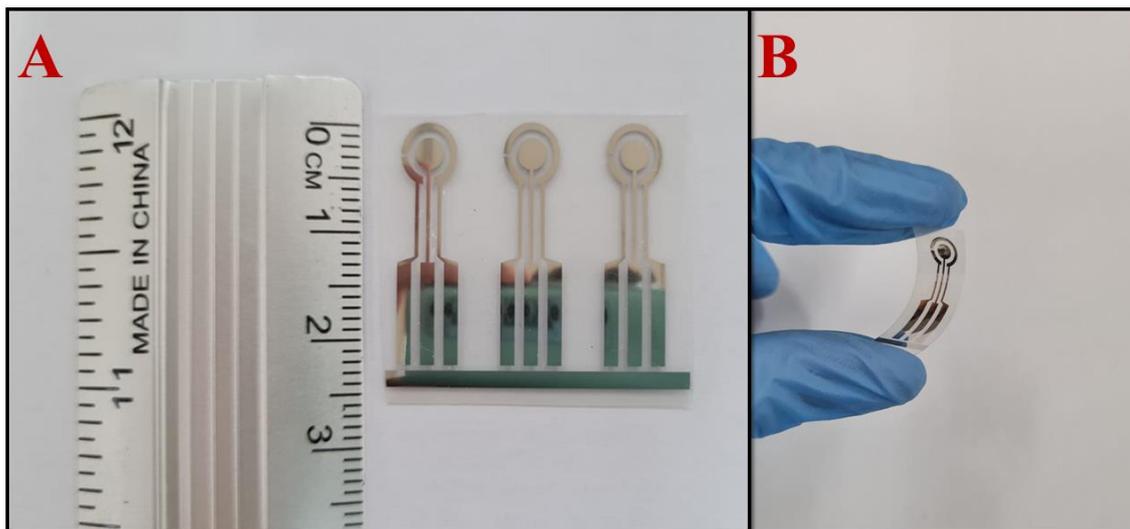


Figura 38. (A) Eletrodos flexíveis de platina fabricados por fotolitografia em substratos Bio-PET; (B) Processo de estresse mecânico aplicado ao eletrodo. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Caracterização Morfológica e Química dos Sensores

As caracterizações da superfície dos sensores foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da Thermo Fisher Scientific modelo Prisma E com tecnologia ColorSEM e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva integrada (EDS) para a aquisição de imagens por mapeamento de coloração dos elementos por superfície. Os experimentos de ângulo de contato antes e após a modificação da superfície do imunossensor foram realizados visando a avaliação do seu caráter hidrofóbico ou hidrofílico. O equipamento utilizado foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa e consta na literatura [230]. Para o registro das imagens o equipamento foi projetado para acoplar um *smartphone* para fotografar a gota na superfície analisada. O tratamento das imagens foi feito com auxílio do *software* CorelDRAW Graphics Suite 2019 (Corel Corporation, Canadá).

5.4 Medidas Eletroquímicas

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em 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 onda quadrada, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Para caracterização dos sensores foi utilizado uma solução equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L⁻¹, preparado em KCl 0,1 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 das técnicas de voltametria de onda quadrada e espectroscopia de impedância eletroquímica.

A voltametria cíclica (CV) e a cronoamperometria foram utilizadas para o monitoramento da L-Cys. Por outro lado, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e a voltametria de onda quadrada (SWV) foram aplicadas para a detecção da proteína *Spike* (SARS-CoV-2). Para essas análises, KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) foi usado como eletrólito de suporte e uma mistura equimolar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ como sonda redox. As medições SWV foram calibradas por logaritmo da concentração da proteína *Spike* e as medições EIS foram calibradas por mudança de impedância normalizada (NIC%) [231] em relação ao controle. O valor NIC% foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{NIC}\% = \frac{Z_{\text{amostra}} - Z_{\text{controle}}}{Z_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde Z_{controle} é a magnitude da resistência à transferência de carga (R_{ct}) para uma amostra de controle sem a proteína, e Z_{amostra} é a magnitude de R_{ct} para cada ponto adicionado de concentração da proteína *Spike*. O dispositivo de análise clínica impresso em 3D foi projetado no software livre Blender versão 2.91.2 e fabricado com uma impressora 3D Sethi3D S3 utilizando filamento ABS.

Amostras de saliva sintética foram preparadas de acordo com a literatura [232] e enriquecido com 7 concentrações diferentes de proteína *Spike* SARS-CoV-2 (0,7, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 e 30,0 pmol L⁻¹), que estavam dentro da faixa de trabalho linear do imunossensor.

5.5 Fabricação da Plataforma 3D para Medições Eletroquímicas

Um dispositivo de análise clínica impresso em 3D foi desenvolvido empregando filamento, conforme ilustrado na Figura 39 (etapa A). Os parâmetros de impressão utilizados foram: extrusão e temperatura da mesa de 200°C e 65°C, respectivamente, com enchimento total. O dispositivo permite o acoplamento de sensores com controle de volume de amostra (10 µL) e sem vazamento, tendo seu fechamento por meio de ímãs, o que garante maior praticidade em seu uso.

5.6 Confeção do Imunossensor

Para o imunossensor, inicialmente, 8,0 µL de uma solução aquosa de CYS (10,0 mmol L⁻¹) foram depositados na superfície do eletrodo de trabalho em temperatura ambiente por 12 h. Um maior tempo de imobilização também já foi relatado na literatura [233]. Isso favorece maior interação dos grupos tióis do CYS na superfície da platina, aumentando assim os sítios disponíveis para imobilização de outros grupos de interesse. Os eletrodos foram então lavados com água deionizada para remover o excesso de CYS não imobilizado. Em seguida, 8,0 µL de uma solução de GLA (5,0 mmol L⁻¹) preparada em tampão fosfato (PB) 0,2 mol L⁻¹, pH 8,0 foi depositado na superfície modificada com CYS por 1 h, seguido de uma etapa de lavagem com PB. Oito microlitros de SARS-CoV-2 anticorpo *Spike* 1,0 µmol L⁻¹ (PBS 1x, pH 7,4) foram adicionados ao eletrodo por 2 h, seguidos por uma etapa de lavagem com PBS 1x. Os eletrodos foram então lavados com PBS 1x para remover o excesso de material e depois incubados com 8,0 µL de solução de BSA (1% p/v) em PBS 1x (pH 7,4) por 30 min para bloquear os sítios de ligação restantes, seguido de lavagem com PBS 1x. Depois disso, o imunossensor foi lavado com PBS 1x antes de ser usado em experimentos de detecção da proteínas *Spike*. A Figura 39 (etapa B) demonstra um esquema representativo das etapas envolvidas na montagem do imunossensor. Os ensaios imunossensores foram realizados medindo-se EIS e SWV antes e após a adição de 8,0 µL de solução de proteína *Spike* em diferentes concentrações (0,70 a 30,0 pmol L⁻¹), imobilizada na superfície do eletrodo de trabalho por 1 h. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C).

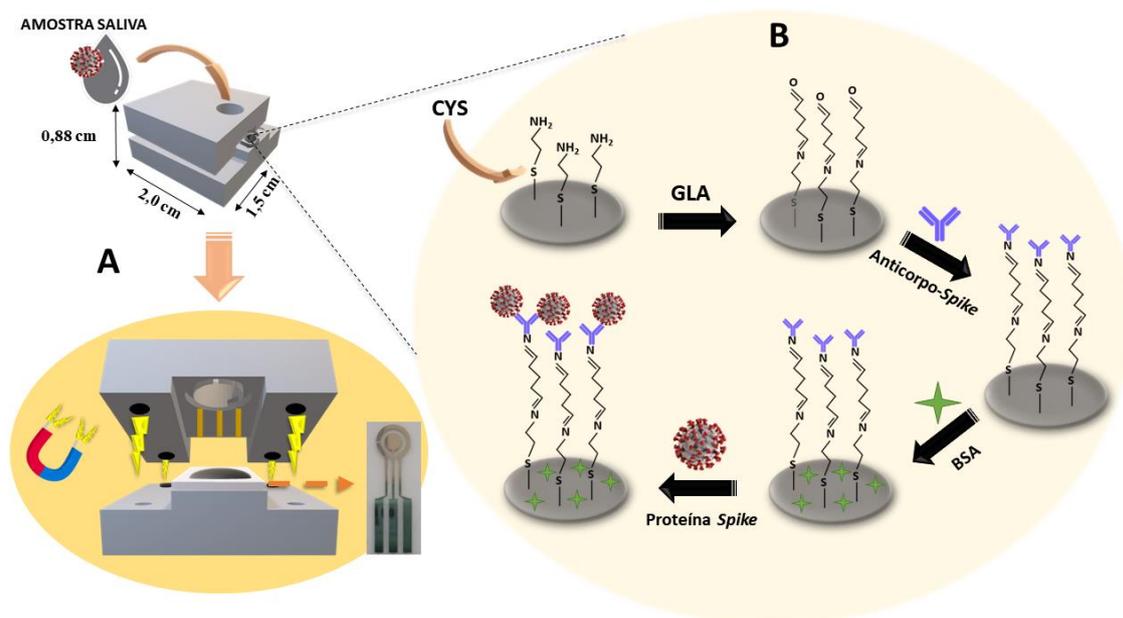


Figura 39. Esquema representativo da plataforma de análise clínica impresso em 3D em (A) e as etapas envolvidas na fabricação do imunossensor em (B). Fonte: Elaborado pelo autor.

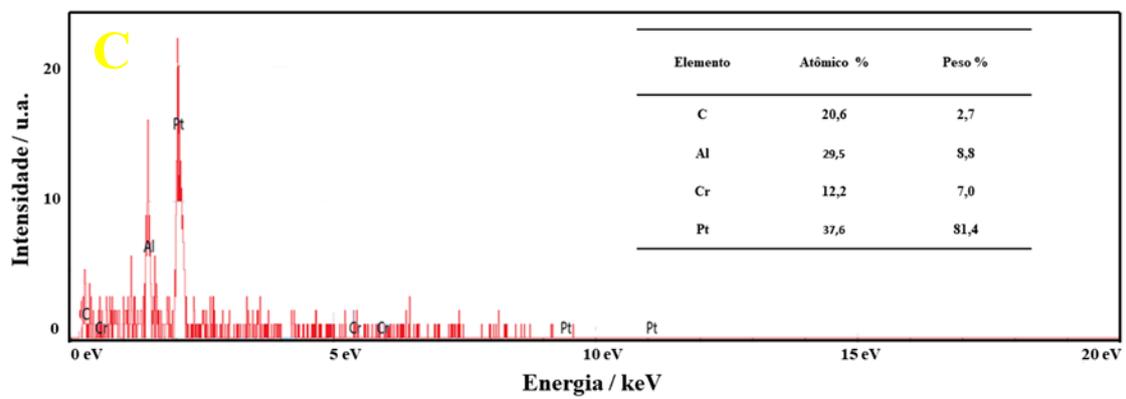
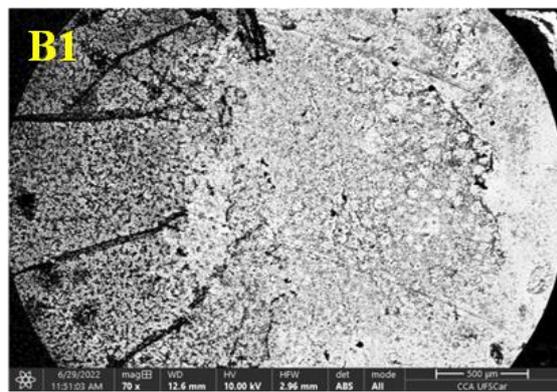
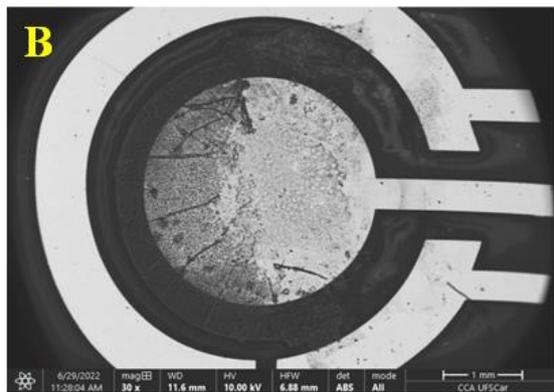
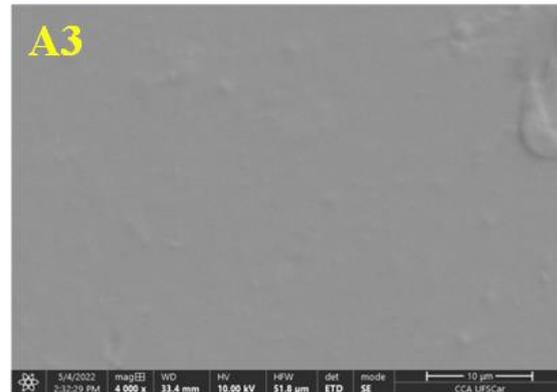
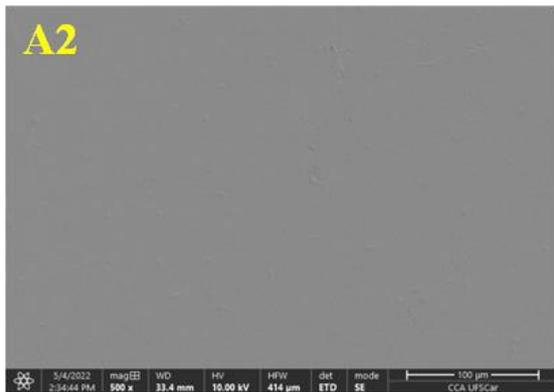
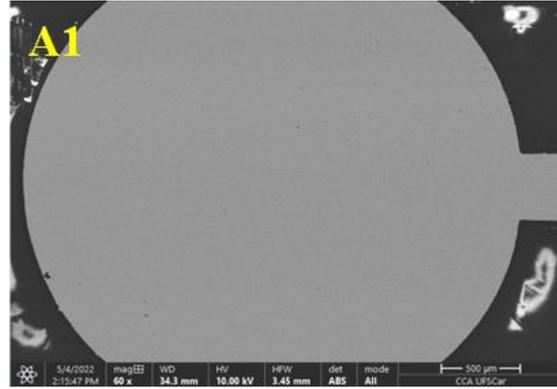
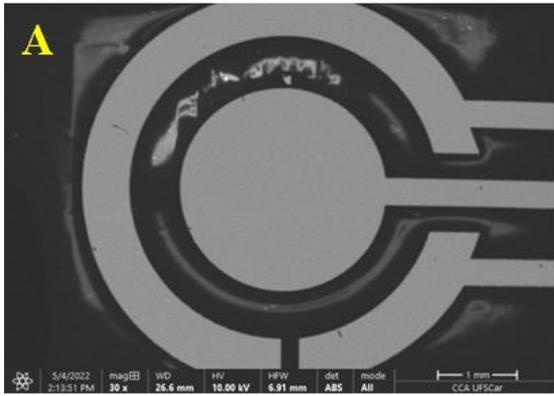
RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização Morfológica e Química

As características superficiais do Pt/Bio-PET foram avaliadas por MEV-EDS em duas estratégias diferentes, utilizando os porta amostras de alumínio de 180° e 90° para realizar as análises. Para possíveis diferenças entre as superfícies de Pt/Bio-PET e do imunossensor (SARS-CoV-2-Ab/Pt/Bio-PET), antes e após a modificação, os eletrodos foram colocados no suporte de alumínio de 180°. As imagens MEV são mostradas na Figura 40A, B e C, bem como os espectros EDS na Figura 40-D.

É possível observar excelente homogeneidade do filme de Pt sobre o Bio-PET, sobre a superfície de trabalho, mesmo em maiores ampliações (Figura 40-A1, A2 e A3). A alta homogeneidade pode garantir uma melhor reprodutibilidade dos eletrodos na etapa de imobilização dos anticorpos ou outros materiais biológicos, além de garantir um melhor processo de transferência de carga em medições eletroquímicas. Analisando as imagens MEV do eletrodo após a modificação com o complexo antígeno-anticorpo (Figura 40-B1 e B2), é possível observar a formação de um filme sobre a superfície do Bio-PET do eletrodo de trabalho, indicando o sucesso da etapa de modificação. O mapeamento químico EDS mostra os elementos predominantes para o eletrodo, como carbono, platina e cromo, o que pode ser confirmado pelos espectros EDS (Figura 40-C).

Para a avaliação da espessura do filme de Pt, o Pt/Bio-PET foi cortado na região do eletrodo de trabalho para expor a parte condutora, e foi colocado no porta amostra de alumínio 90°. A Figura 40-D mostra a espessura do filme de Pt com um valor médio para a área do eletrodo de trabalho de aproximadamente $212,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Esta característica é interessante porque os filmes finos geralmente exibem propriedades diferentes dos materiais a granel, uma vez que a relação superfície-volume é muito maior para filmes finos. Isso permite que filmes finos tenham alta flexibilidade, característica necessária para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos flexíveis. Isso também demonstra que as técnicas de fotolitografia e *sputtering* são atrativas para a produção em larga escala de eletrodos em substratos Bio-PET.



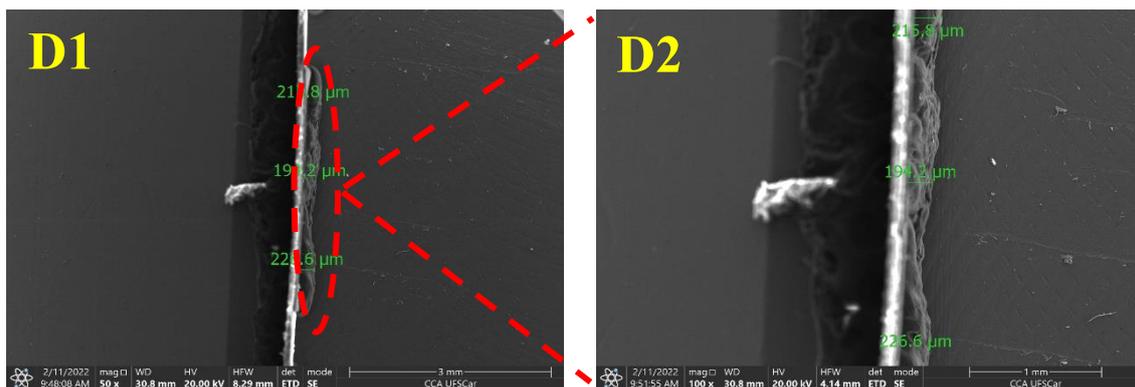


Figura 40. (A) Imagens MEV do eletrodo de trabalho de platina em diferentes ampliações: 30× (A), 60× (A1), 500× (A2) e 4000× (A3), respectivamente. (B) Imagens MEV do eletrodo de trabalho de platina modificado em diferentes ampliações: 30× (B) e 70× (B1), respectivamente. (C) Espectros EDS com a distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo. (D) Imagens MEV da espessura do filme de Pt. Fonte: Elaborado pelo autor.

O ângulo de contato foi medido para a superfície do eletrodo antes (Figura 41-A) e após a modificação (Figura 41-B), para fornecer informações sobre a presença de moléculas biológicas após a etapa de modificação. Para isso, foram utilizados 6,0 μL de água deionizada para avaliação do caráter hidrofóbico ou hidrofílico da superfície do eletrodo de trabalho. Dependendo do ângulo de contato verificado (θ) com a água, a superfície pode ser classificada como super-hidrofílica ($\theta < 10^\circ$), hidrofílica ($\theta < 90^\circ$), hidrofóbica ($90^\circ < \theta < 150^\circ$) ou superhidrofóbica ($\theta > 150^\circ$) [234]. Portanto, as superfícies do eletrodo antes e após as modificações apresentaram um caráter hidrofílico apresentando um ângulo de contato de $80 \pm 1^\circ$ e $66 \pm 1^\circ$, respectivamente. Essa diminuição do ângulo de contato é resultado da imobilização da cisteamina, pois mais da superfície do eletrodo é coberta com tiol aquoso, tornando o filme mais hidrofílico em contato com a água, o que é crucial para o sucesso da imobilização de biomoléculas.

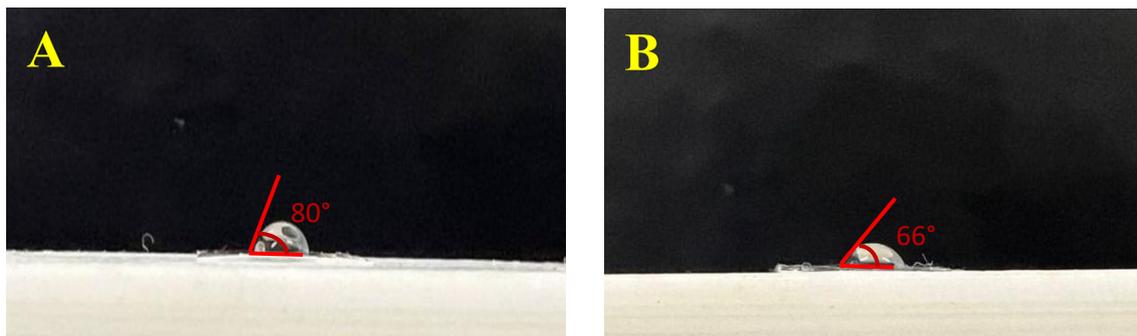


Figura 41. Imagens de ângulo de contato (A) antes e (B) após a modificação do sensor. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Caracterização Eletroquímica do Eletrodo de Platina

Os eletrodos de platina foram avaliados por voltametria cíclica na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 42 mostra o voltamograma cíclico obtido a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Pode-se observar pelo voltamograma obtido, pico anódico e catódico bem definidos. A relação I_{pa}/I_{pc} foi de 1,03 e um ΔE de 0,12 V, indicando a reversibilidade da sonda redox sob a superfície do eletrodo. Além disso, uma boa magnitude de corrente pode ser observada para o eletrodo de Pt, uma característica decorrente de materiais metálicos. Os valores aqui encontrados são comparados com o trabalho de Oliveira *et al.* [50] onde os pesquisadores utilizando as técnicas de fotolitografia e pulverização catódica, desenvolveram um imunossensor para análises clínica da doença de Parkinson. Entretanto, este trabalho relata pela primeira vez o uso desse tipo de sistema para aplicação da detecção da proteína *spike* da SARS-CoV-2.

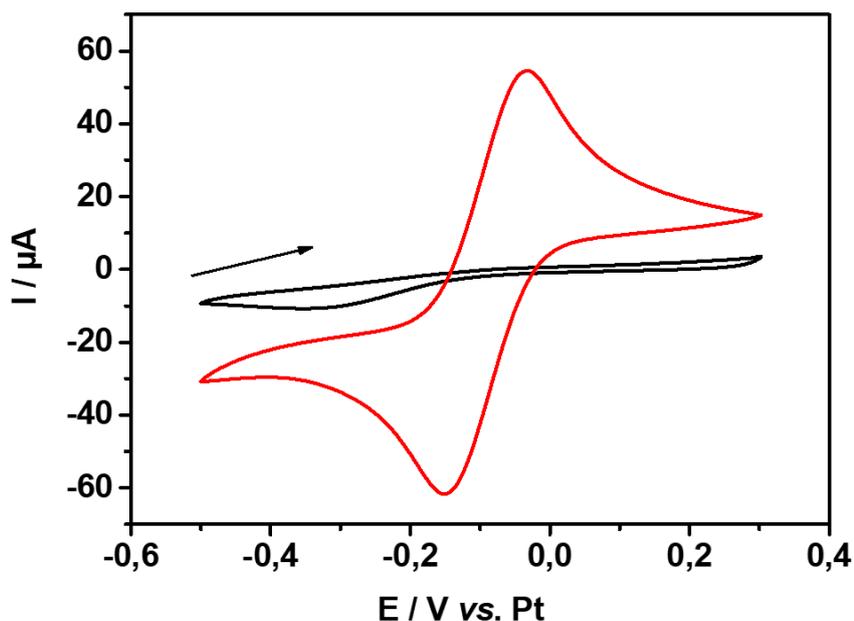


Figura 42. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de platina flexível em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na presença (linha vermelha) e na ausência (linha preta) de uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

A área eletroativa do eletrodo de platina foi estimada. Para isso, estudos voltamétricos cíclicos foram realizados em diferentes velocidades de varredura entre 10 a 250 mV s^{-1} (Figura 43-A). A área eletroativa foi calculada com base na equação de Randles-Sevcik (Equação 1), usando uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A área eletroativa estimada foi de $0,31 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ a partir da área geométrica de $0,03 \pm 0,01 \text{ cm}^2$. O aumento no valor da área eletroativa quando comparado a área geométrica do eletrodo, pode estar relacionado ao filme de Pt, resultante da deposição por *sputtering*. Também está relacionada aos defeitos observados na superfície do eletrodo (Figura 40-A3), o que poderia aumentar a área e rugosidade. Além disso, filmes finos de Pt apresentam alta função de trabalho e excelentes propriedades elétricas e eletrocatalíticas [235], que o tornam atraentes para aplicações em sensores e biossensores. A curva da Figura 43-B, relacionada ao gráfico de corrente de pico *versus* raiz quadrada de varredura ($v^{1/2}$), mostra um comportamento linear para ambas as superfícies com resposta linear de $R^2 = 0,9970$, seguindo a equação: $I_{pa} (\mu\text{A}) = 1,146 (\pm 1,526) + 235,5 (\pm 4,813) v^{1/2} (\text{V s}^{-1})^{1/2}$, o que indica que para o eletrodo de Pt o processo de transporte de massa é controlado por difusão.

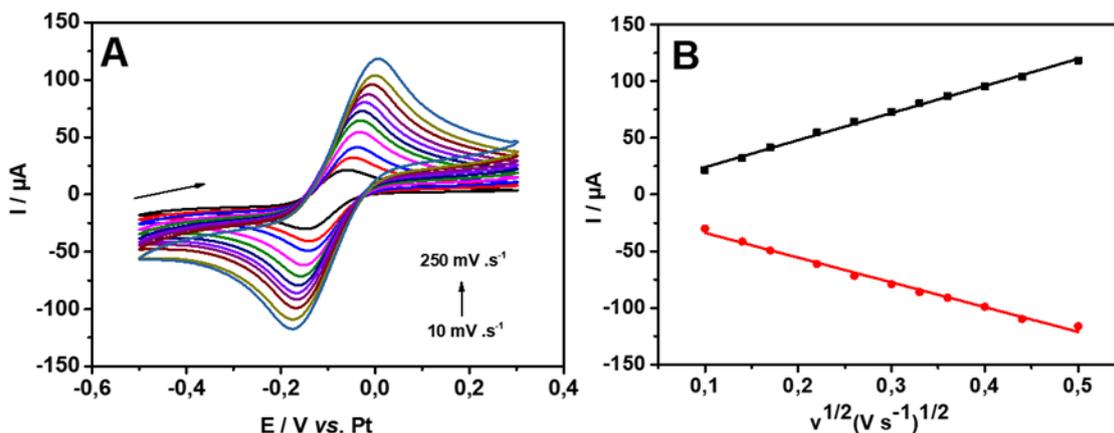


Figura 43. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de platina em mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ variando a velocidade de varredura em 10, 20, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 160, 200 e 250 mV s^{-1} . (B) Gráfico de pontos I versus $v^{1/2}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para demonstrar o perfil característico da platina foi investigado o comportamento do eletrodo em meio contendo H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ dentro da janela de potenciais entre 0,0 e 1,2 V (Figura 44). É possível observar um pico bem definido em 1,0 V proveniente da formação de óxidos, resultado da reação semi-reversível de formação do $\text{PtO} (\text{H}_2\text{O})$ [236]. Na região de 0,0 a 0,2 V há um pico discreto proveniente da adsorção do hidrogênio. 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. O pico característico da primeira etapa de oxidação da platina não pôde ser observado o que pode ser justificado pela descamação 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. Medidas foram realizadas em velocidades mais altas e menores concentrações de H_2SO_4 , porém nenhum pico característico foi obtido devido à danificação do eletrodo ser mais rápida e severa.

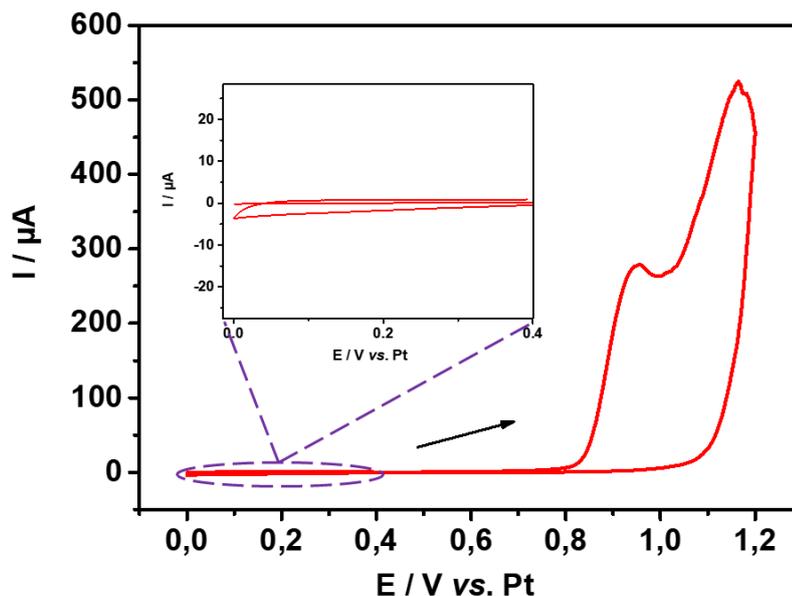


Figura 44. Voltamograma cíclico utilizando eletrodo de platina flexível em meio contendo H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de L-Cisteína

A L-Cys tem alto potencial como biomarcador associado à progressão da doença Sars-CoV-2 [237], e sua detecção é uma importante ferramenta para análise clínica do Sars-CoV-2. Dessa forma, foi avaliado sua eletroatividade na detecção da L-Cys avaliado por CV e uma solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) a presença de $500,0 \text{ μmol L}^{-1}$ do analito a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} (Figura 45). É possível notar que (L-Cys) apresenta um comportamento reversível com dois picos de oxidação bem definidos em $0,50$ e $0,90 \text{ V}$, e um pico de redução em $0,15 \text{ V}$, o que demonstra a eletroatividade da L-Cys sobre do eletrodo de Pt.

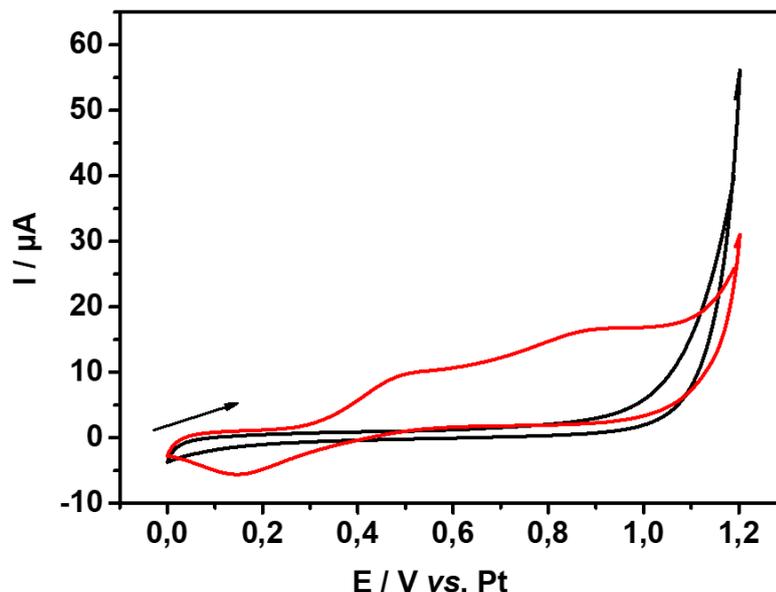


Figura 45. Voltamogramas cíclicos na presença (linha vermelha) e ausência (linha preta) de L-Cys 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (PBS pH 6,0); velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 46 demonstra o mecanismo de adsorção de L-Cys que ocorre na superfície do eletrodo de Pt e é relatada pela literatura [238, 239]. O primeiro pico de oxidação na região de 0,50 V (P1) está relacionado a geração de PtOH, enquanto o segundo pico na região de 0,90 V (P2) refere-se à formação de PtO. Isso sugere que o primeiro pico está relacionado a oxidação de L-Cys por PtOH enquanto o segundo pico está relacionado a oxidação por PtO. As mudanças observadas se encontram relacionadas a dependência da oxidação na etapa de adsorção, demonstrando que os processos observados em P2 são facilitados com o aumento da adsorção de L-Cys, ao passo que P1 é restringido pela adsorção de L-Cys. Estas observações sugerem que as espécies geradas em P1 ainda estão adsorvidas e as geradas em P2 são dessorvidas.

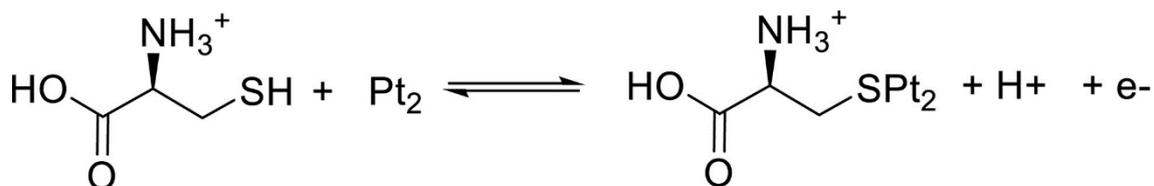


Figura 46. Mecanismo de adsorção de L-Cys na superfície do eletrodo de Pt. Fonte: Elaborado pelo autor.

Para obter uma melhor resposta catalítica do eletrodo de Pt à oxidação da L-Cys, foram investigados estudos sobre a influência do pH da solução na resposta eletroquímica do analito. Assim, CVs de soluções de PBS contendo L-Cys $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram obtidos em faixas de pH de 5,0 a 9,0 (Figura 47). Uma diminuição nas correntes de pico anódico (I_{pa}) para oxidação da L-Cys pode ser observada com o aumento do pH, o que implica um processo altamente dependente deste. Isso pode estar relacionado com a ionização de CySH dependendo do pH em soluções aquosas, pois a CySH contém vários grupos funcionais de COOH, SH e NH_2 com pK_a de 1,92, 8,37 e 10,70, respectivamente. Além disso, a mudança dos picos anódicos e catódico junto ao aumento do pH é consequência da desprotonação envolvida no processo de oxidação, que é facilitada em valores de pH mais baixos. Outro ponto a ser mencionado é que o ponto isoelétrico de CySH é 5,02; portanto, em meios ácidos fortes, a molécula de L-Cys é carregada positivamente (CySH_2^+ (H_3A^+)), e o aumento do pH a altera para carga neutra ou negativa [240]. Embora a resposta de corrente e I_{pa} sejam maiores em pH 5,0, optou-se por trabalhar em pH 6,0 para estudos posteriores, pois está dentro da faixa de pH fisiológico (6,0 a 8,0), e por apresentar também uma maior corrente (I_{pa}).

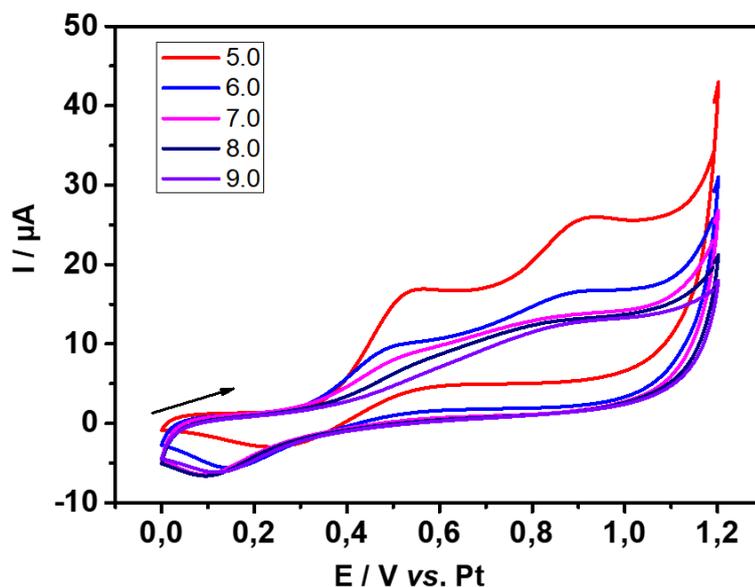


Figura 47. Efeito do pH nas características voltamétricas de L-Cys $500 \mu\text{mol L}^{-1}$; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos do efeito da velocidade de varredura na eletrooxidação da L-Cys foram investigados usando leituras de CV. A Figura 48-A mostra o CV da L-Cys $1000,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 6,0 na faixa de velocidade de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} . É possível observar o aumento da corrente de pico (I_{pa} e I_{pc}) com o aumento da velocidade de varredura. A Figura 48-B mostra que I_{pa} e I_{pc} aumenta com a velocidade de varredura (v) e é linearmente proporcional a $v^{1/2}$, com a equação de regressão $I_{pa(II)} (\mu\text{A}) = -1,188 (\pm 0,943) + 99,14 (\pm 2,755) v^{1/2} (\text{V s}^{-1})^{1/2}$ com $R^2 = 0,990$, indicando que o processo de oxidação da L-Cys é controlado por difusão [241].

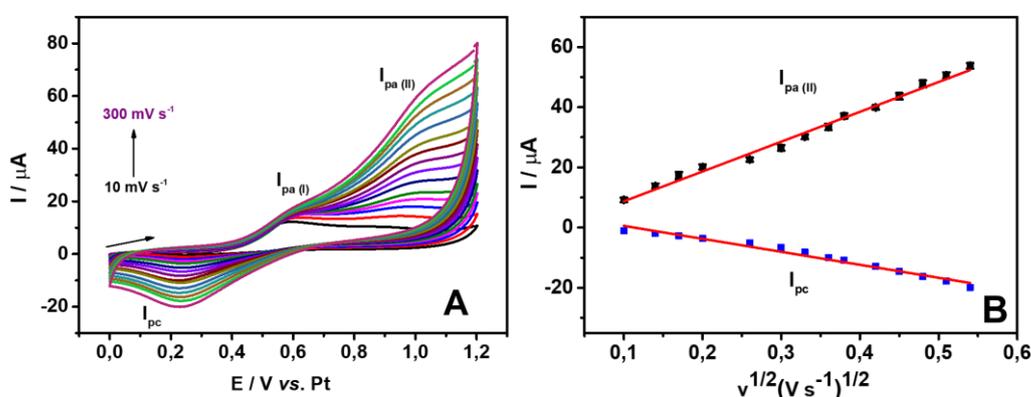


Figura 48. (A) Voltamogramas cíclico Pt/Bio-PET em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) contendo L-Cys $1000,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura de 10 a 300 mV s^{-1} . (B) Gráfico linear da corrente de oxidação da L-Cys *versus* velocidade de varredura $(\text{V s}^{-1})^{1/2}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a otimização do valor de pH ideal para o sensor, construiu-se uma curva analítica para diferentes concentrações crescentes de L-Cys. Para isso foi utilizado a técnica de cronoamperometria sob condição de agitação. A Figura 49-A mostra os cronoamperogramas em sistema sob agitação para o sensor com injeções sucessivas de L-Cys a um potencial de $0,55 \text{ V}$, que foi suficiente para promover a oxidação da molécula com base no voltamograma cíclico. Além disso, a seleção do menor potencial (primeiro pico de oxidação) resulta em uma diminuição na oxidação de espécies interferentes quando valores de potencial mais altos são usados. Sob sucessivas adições em um intervalo de tempo de 100s, uma curva de calibração foi obtida para concentrações crescentes de L-Cys. É possível observar duas faixas lineares entre as correntes de resposta e as concentrações de L-Cys em $3,98$ a $39,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $39,0$ a $145,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, conforme observado na curva analítica (Figura 49-B), $I_p (\mu\text{A}) = 6,297 \times 10^{-8} (\pm 8,846$

$\times 10^{-9}$) + 0,0147 ($\pm 2,973 \times 10^{-4}$) C_{L-Cys} ($\mu\text{mol L}^{-1}$), com R^2 de 0,996 para o primeiro intervalo linear e I_p (μA) = $4,538 \times 10^{-7}$ ($\pm 1,043 \times 10^{-8}$) + 0,0047 ($\pm 1,749 \times 10^{-4}$) C_{L-Cys} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) com R^2 de 0,990 para a segunda faixa linear. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com 3 e 10 vezes o desvio padrão do intercepto sobre a sensibilidade analítica da curva de calibração. Os valores de LOD e LOQ obtidos foram 0,70 e 2,36 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

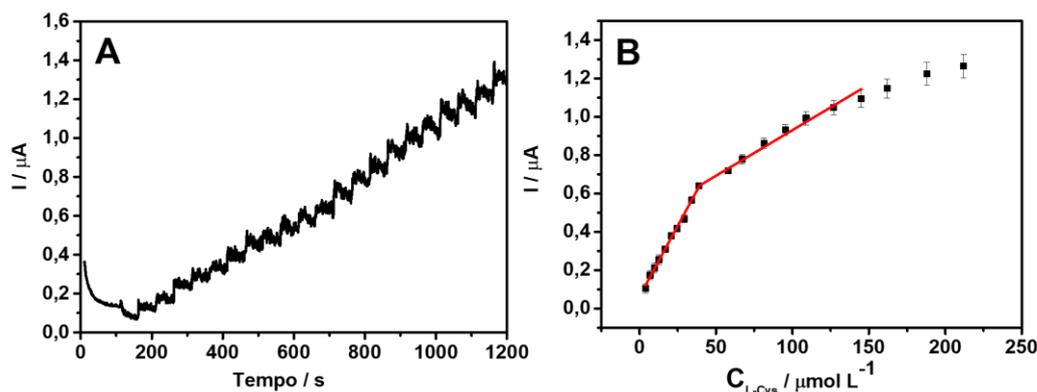


Figura 49. (A) Registros de cronoamperometria para concentrações crescentes de L-Cys 3,98, 6,96, 9,93, 12,8, 16,8, 20,7, 24,5, 29,4, 34,2 e 39,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 39,0, 58,0, 67,3, 81,5, 95,5, 100,9, 127,0 e 145,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o Pt/Bio-PET, potencial de trabalho: 0,55 V; A solução foi agitada a uma taxa de 1000 rpm (B) Gráfico da corrente de pico *versus* concentração de L-Cys em PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0), obtido a partir de A. Fonte: Elaborado pelo autor.

A seletividade do Pt/Bio-PET para determinação de L-Cys ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi avaliada na presença de possíveis concomitantes em fluidos biológicos ou produtos farmacêuticos ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), como metionina (MET), tirosina (Tyr), cafeína (CAFF), ácido cítrico (CA), ureia, glicose (GLU) e frutose (FRUC). No caso de aplicações médicas, a concentração média de metionina na corrente sanguínea está na faixa de 5 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ [242], a concentração de frutose pode ser encontrada na excreção de urina em indivíduos saudáveis na faixa de $23,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ [243] e após ingestão de alimentos não excedem $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ na corrente sanguínea [244]. Para a tirosina sua concentração plasmática normalmente se encontra na faixa de 30 a $120 \mu\text{mol L}^{-1}$ [245] e para glicose em níveis normais pode ser encontrada no soro humano na faixa de 4,0 a $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$ [246]. Os demais analitos podem estar presentes em formulações de produtos farmacêuticos e sua concentração pode variar de acordo com o produto.

Dessa forma, a concentração de 1:10 (L-Cisteína: interferente) foi estudada a fim de avaliar níveis máximos de interferência destes analitos. É possível observar na Figura 50 que após a adição dos interferentes a resposta de pico de corrente de L-Cys diminuiu ligeiramente em 4,65%. Isso demonstra que o sensor Pt/Bio-PET não teve sua seletividade afetada na presença das moléculas interferentes. A sensibilidade para o sensor Pt/Bio-PET foi calculada em $0,0047 \mu\text{A} \mu\text{mol L}^{-1}$.

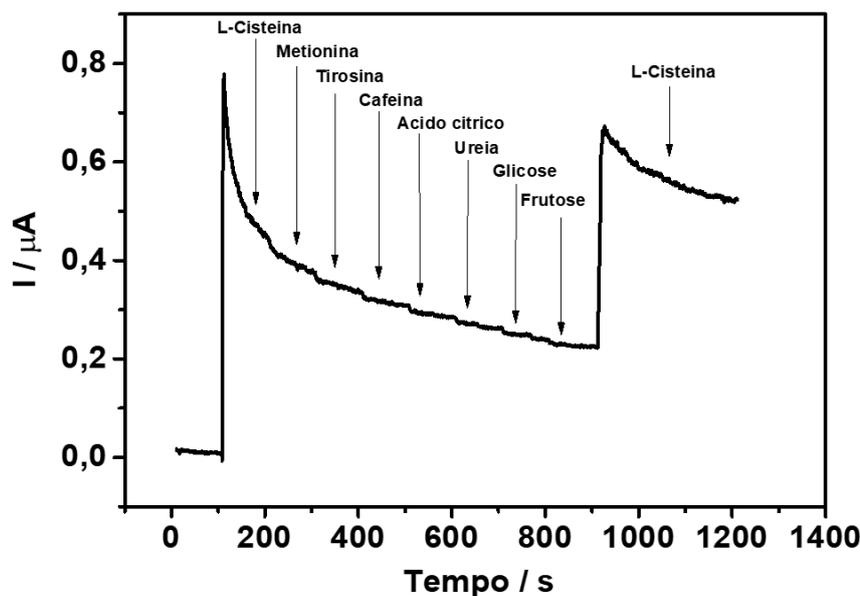


Figura 50. Respostas cronoamperométricas a adições sucessivas de L-Cys $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e várias espécies interferentes (indicadas por setas), incluindo metionina, tirosina, cafeína, ácido cítrico, uréia, glicose e frutose em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), potencial aplicado: $0,55 \text{ V}$; Sistema sob agitação. Fonte: Elaborado pelo autor.

O sensor Pt/Bio-PET proposto foi comparado a outros dispositivos eletroquímicos já relatados para a detecção de L-Cys, conforme apresentado na Tabela 9. Singh *et al.* [247] desenvolveram um sensor modificado com nanocompósito de óxido de grafeno-ciclodextrina-platina reduzido. Os autores obtiveram um LOD de $0,12 \mu\text{mol L}^{-1}$ com uma faixa linear de $0,5$ a $170 \mu\text{mol L}^{-1}$. Embora o baixo LOD seja encontrado para o sensor proposto, a preparação, montagem e confecção do material requer muitas etapas, o que torna o sensor mais caro. Atacan *et al.* [248] também trabalham com grafeno para a detecção de L-Cys. O sensor de óxido de grafeno reduzido (rGO) decorado com ferrita de cobre e AuNPs obteve um LOD de $0,383 \mu\text{mol L}^{-1}$ com uma faixa linear de $50,0$ a

400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As etapas de fabricação do sensor proposto pelos autores também exigem várias etapas de preparação do material, mas o uso de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) como substrato restringe o sensor para análise no local de atendimento. Depois disso, Abbas *et al.* [242] desenvolveram um sensor de pasta de grafite modificado com nanopartículas de ferro e ftalocianina. O sensor mostrou uma faixa linear de 50,0 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em um LOD de 0,27 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Embora a ftalocianina com nanopartículas de ferro melhore o efeito catalítico para detecção de L-Cys, o uso de eletrodos de pasta de grafite preparados com adição de óleo de parafina nem sempre garantem a uniformidade do material, que pode sofrer sedimentação e, assim, variar a espessura da membrana formada.

Tabela 9. Desempenho analítico Pt/Bio-PET para determinação de L-Cys comparado com a literatura.

Fonte: Elaborado pelo autor

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
AuNP/MnP/FTO	Cronoamperometria	12,0 to 34,0	2,40	[249]
SPE/PB-ammine	Cronoamperometria	100,0 to 500,0	72,0	[250]
GR/CD/Pt/SPE	DPV	0,5 to 40,0 40,0 to 170,0	0,12	[247]
Poli (ácido <i>p</i> - cumárico) / MWNT/GCE	DPV	7,5 to 1000	1,1	[251]
CuFe ₂ O ₄ /rGO- Au	CV	50,0 to 400,0	0,383	[248]
PLA-G _{DMF} - EC+PB	Cronoamperometria	3,0 to 230	0,858	[252]
FePc- AuNP/GPE	DPV	50,0 to 1000	0,27	[242]
GC/RGO/cobalto (II) porphyrzine	Cronoamperometria	1000 to 6,6×10 ⁵	0,79	[253]
Pt	Cronoamperometria	3,98 to 39,0 39,0 to 145,1	0,70 2,36	Este trabalho

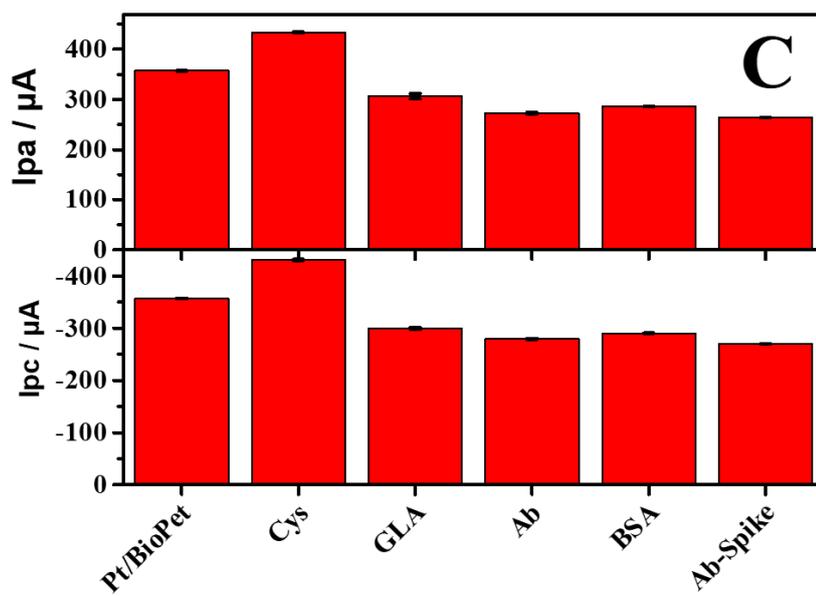
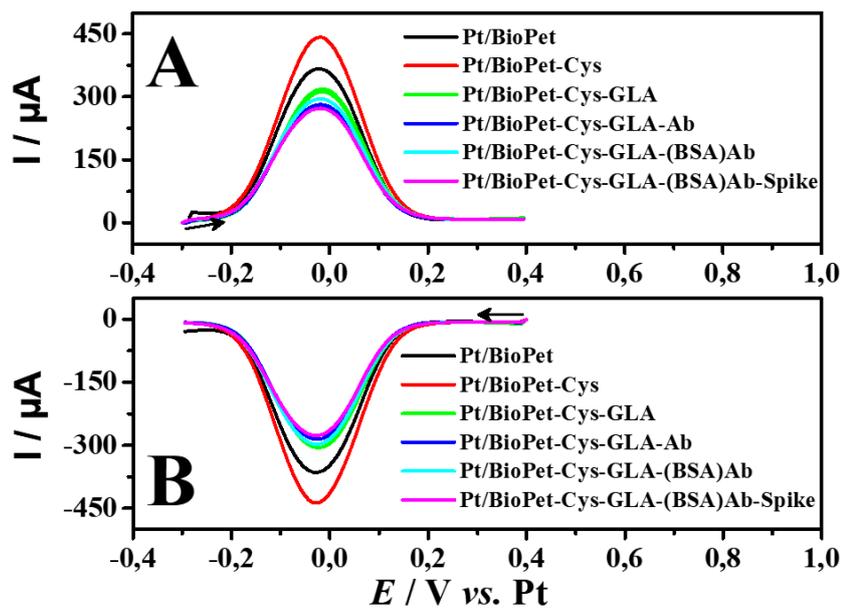
Notas: AuNP: nanopartículas de ouro; MnP: porfirina metalada; FTO: vidro revestido com óxido de estanho e flúor; SPE: eletrodos serigrafados; PB: Azul da Prússia; GR: grafeno reduzido; CD: óxido- β -ciclodextrina; Pt: platina; MWNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; GCE: eletrodo de carbono vítreo; CuFe₂O₄: ferrita de cobre; rGO: óxido de grafeno reduzido.

6.4 Construção e Avaliação do Desempenho Eletroquímico do SARS-CoV-2-AB/Pt/Bio-PET como um imunossensor *label-free*.

Para avaliar a eficiência da montagem do imunossensor, foram realizadas medidas de SWV (direta e reversa) e EIS após cada etapa de imobilização, bem como para o imunossensor na presença da proteína *spike* SARS-CoV-2, usando [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ como uma sonda eletroquímica.

Primeiramente, a Cys foi adsorvida pela superfície do eletrodo de trabalho da platina através de seus grupos tiol. Essa interação é bem difundida para superfícies de Au, mas pode ser justificada da mesma forma para superfícies de platina [254]. Para a superfície de Au, há a formação da interação do grupo tiol-metal que ocorre através da formação de ligações coordenadas entre $-SH$ e Au, ocorrendo também para o eletrodo de platina como $-SH$ e Pt. Posteriormente, ocorre dissociação dessa ligação, resultando em um radical tiila e consequente formação da ligação covalente platina-tiolato.

A Figura 51 mostra os voltamogramas (A e B) e diagramas de Nyquist (D) obtidos para o Pt/Bio-PET antes e após as etapas de modificação. Os valores de corrente de pico e impedância após cada etapa de modificação podem ser observados na Figura 51-C e E. 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 circuito 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 que funciona como um capacitor, parâmetro este que simula a interação da interface do eletrodo com a solução (C_{dc}) além da impedância de Warburg (W) – referente ao comportamento difusional das espécies eletroativas. O circuito equivalente de formação do imunocomplexo sobre a superfície do eletrodo de platina encontra-se na inserção da Figura 51-D.



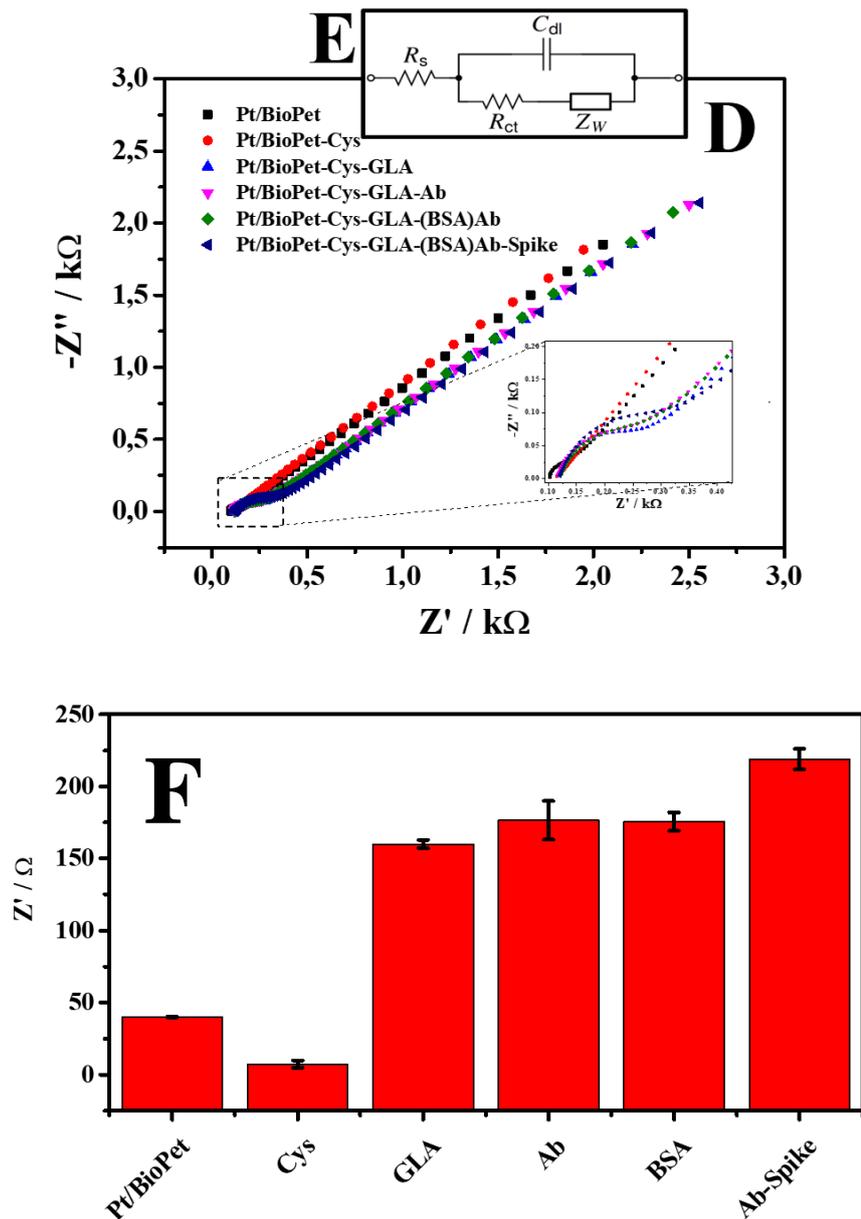


Figura 51. Voltamogramas de onda quadrada (A) direto e (B) reverso. (C) Gráfico de corrente de pico após cada etapa de modificação, obtido de A e B. (D) Diagrama de Nyquist. (E) Circuito equivalente utilizado para simulação dos dados experimentais, na presença de pares redox: R_{ct} , resistência à transferência de elétrons; R_s , a resistência da solução eletrolítica; C_{dl} , é a capacitância de dupla camada e; W , impedância de Warburg; (F) Gráfico de impedância após cada etapa de modificação, obtido de D. Eletrodo impresso em platina (**Pt/BioPET**), Pt/BioPET-cisteamina (Pt/BioPET-Cys), Pt/BioPET-Cys-glutaraldeído (Pt/BioPET-Cys-GLA), Pt/BioPET-Cys-GLA-anticorpo (Pt/BioPET-Cys-GLA-Ab), Pt/BioPET-Cys-GLA-(BSA)-Ab and Pt/BioPET-Cys-GLA-(BSA) Ab-SARS-CoV-2 Spike Protein (Pt/BioPET-Cys-GLA-(BSA)Ab-Spike). Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, na presença de apenas Cys na superfície Pt/Bio-PET, observou-se um aumento na intensidade do pico do par redox para SWV em $\Delta I_{pa} = 72,89 \mu A$ e $\Delta I_{pc} = 74,28 \mu A$. Para EIS a houve uma diminuição em $\Delta R_{ct} = -32,76 \Omega$. Este comportamento resulta da atração eletrostática entre $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ e os grupos amina protonados de Cys, levando ao aumento da resposta de corrente (SWV) e diminuição de R_{ct} (EIS). Esse comportamento é bem relatado na literatura para confecção de imunossensores e foi relatado por Figueira *et al.* [33], que detectaram a proteína NS1 do vírus da dengue, e mais recentemente por Liv *et al.* [63], para o diagnóstico de SARS-CoV-2, entre outros [64, 65].

Em seguida, o GLA foi usado como ligante para ligar covalentemente o anticorpo à superfície do eletrodo de trabalho do sensor. Antes que isso possa acontecer, o GLA com suas extremidades de carbonila liga-se aos grupos amino primários livres da Cys. Já na outra extremidade de GLA um grupo aldeído fica livre para realizar a ligação com o grupo amina presente na molécula do anticorpo. Dessa forma, após sua adição, foi possível observar uma redução significativa da corrente redox (SWV) e o crescimento dos valores de R_{ct} (EIS) com o aumento do ΔR_{ct} para $121,0 \Omega$ (PEPt-Cys-GLA), devido ao bloqueio de transferência de carga na superfície do eletrodo e da sonda redox, demonstrando assim a interferência do solvente na construção do imunossensor. Essa interferência foi relatada no trabalho de Mauruto *et al.* [25] em que a faixa de pH é responsável pela reação reversível do GLA com os grupos amino. Para faixas de pH superiores a 7,0, há melhor repetibilidade no comportamento do imunossensor, além de impossibilitar a quebra de ligações superficiais, tornando o imunossensor mais estável para as etapas seguintes das modificações. Em seguida, o anticorpo da proteína Spike, rico em grupos carboxílicos, foi imobilizado na superfície do PEPt-Cys-GLA-Ab, levando a uma diminuição da corrente redox, corroborando com o aumento de R_{ct} para $176,5 \Omega$.

A imobilização de BSA não afetou significativamente os valores de corrente redox (SWV) e nem uma mudança nos valores de R_{ct} (EIS). Embora não tenha demonstrado alteração na corrente e R_{ct} , o BSA foi utilizado para bloquear ácidos carboxílicos ativos e estabilizar biomoléculas já imobilizadas na superfície do eletrodo (PEPt-Cys-GLA-(BSA)Ab). Isso reduz as ligações não específicas e, assim, evita resultados falso-positivos no sinal analítico, levando ao aumento da robustez do sensor. Finalmente, a incubação do antígeno (proteína Spike) levou a uma redução adicional da corrente redox de $264 \mu A$ para I_{pa} e de $-270 \mu A$ para I_{pc} e um aumento de R_{ct} em $219,0 \Omega$ (PEPt-Cys-GLA-

(BSA)Ab-Spike) devido ao confinamento da transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e a sonda redox, causada pela formação do complexo antígeno-anticorpo. Portanto, a diminuição do valor e da corrente redox final (SWV) e o aumento do R_{ct} (EIS) comprovaram que a formação do imunocomplexo foi realizada com sucesso, atestando o funcionamento do imunossensor. Para a técnica EIS, foi realizada uma simulação do ajuste do circuito equivalente para a primeira e última etapa de modificação do imunossensor (Figura 52). A partir dos resultados observados na montagem do imunossensor, pode-se concluir que os estudos por SWV e EIS apresentam uma excelente correlação dos resultados obtidos após cada etapa de modificação, indicando que ambas as técnicas podem ser utilizadas para estudos posteriores.

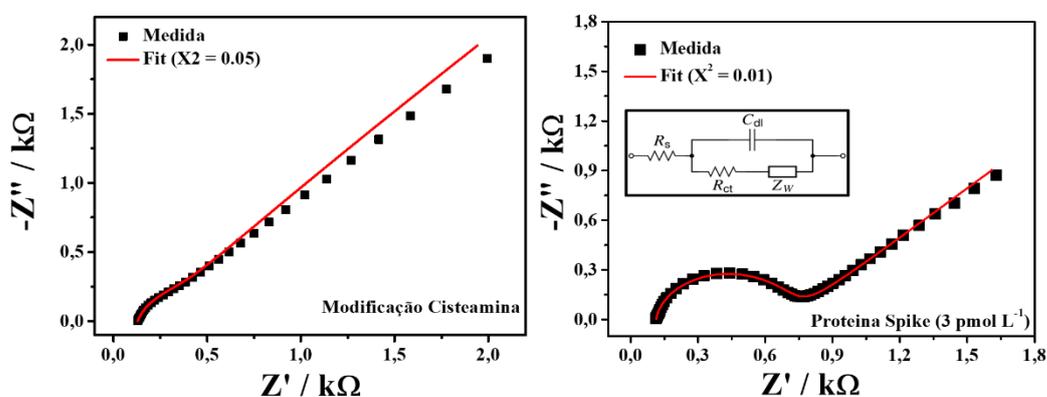
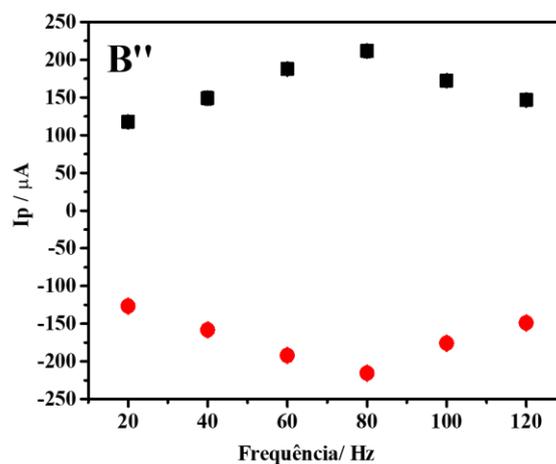
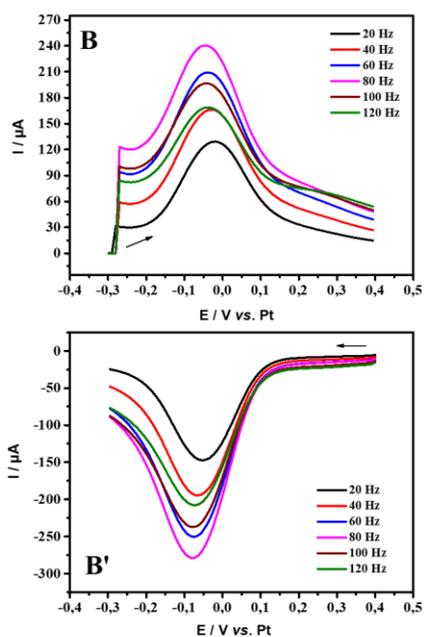
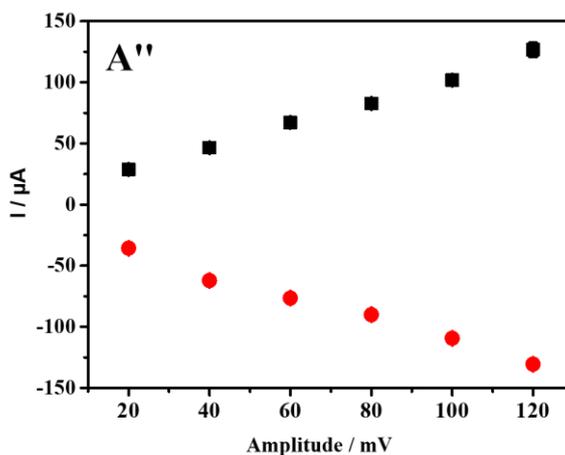
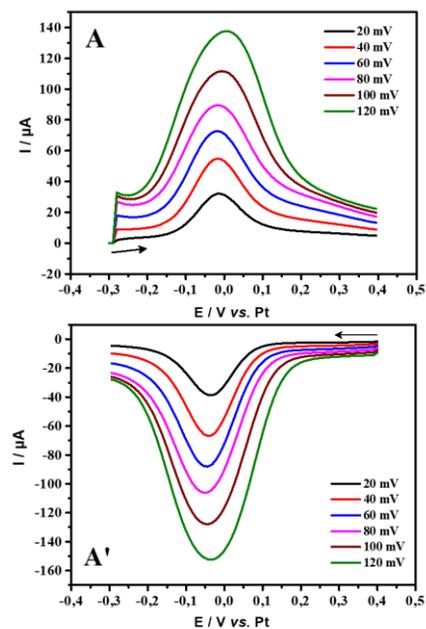


Figura 52. Simulação de ajuste do circuito equivalente para a primeira e última etapa de modificação do imunossensor. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.5 Determinação Eletroquímica da Proteína Spike

Com o objetivo de verificar o desempenho analítico do imunossensor proposto, as concentrações da proteína *Spike* foram avaliadas por meio de SWV e EIS, e analisadas em termos de I_{pa} , I_{pc} e $NIC\%$. A influência dos parâmetros operacionais (amplitude frequência e incremento de potencial) na resposta eletroquímica foi realizada usando SWV. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 53, bem como os gráficos correspondentes da resposta da corrente. O aumento nos valores de amplitude de pulso leva a um aumento na corrente (Figura 53-A"). Embora a amplitude de 120 mV apresente o maior valor na resposta da corrente, o valor de 80 mV foi selecionado por apresentar uma melhor definição de pico. O mesmo também foi observado para a variação do

incremento de potencial, onde a resposta de corrente máxima foi alcançada no potencial de 10 mV (Figura 53-C''). Portanto, este valor foi selecionado como ótimo.



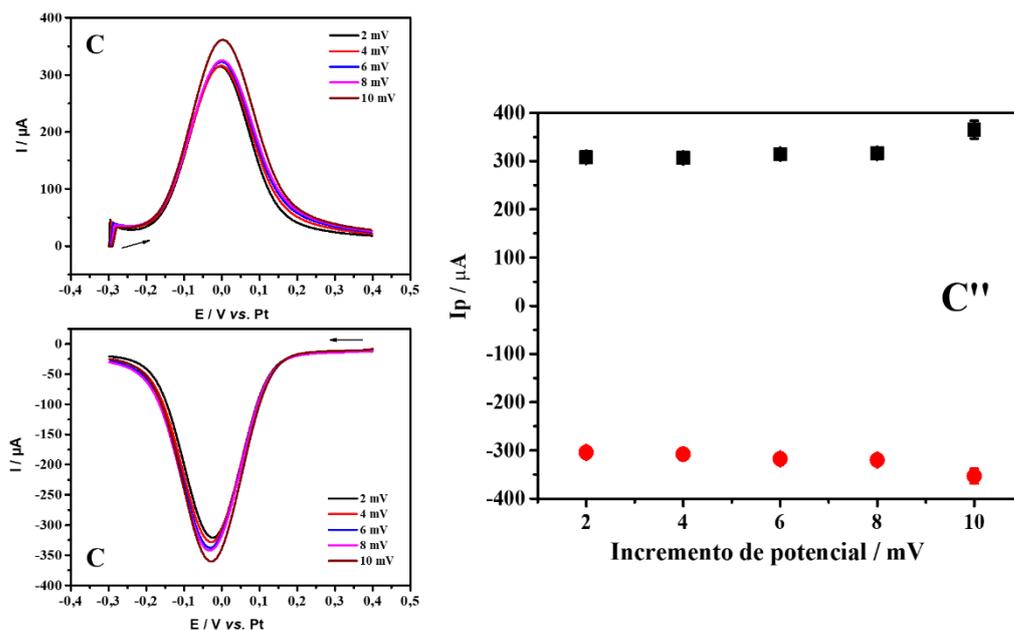


Figura 53. Voltamogramas de onda quadrada direto (A-C) e reverso (A'-C'), e respectivos gráficos de corrente de pico em função dos parâmetros variados (A''-C'') para $3,0 \text{ pmol L}^{-1}$ de proteína Spike em PBS 1x na presença de mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); amplitude de 20 a 120 mV (A''), frequência de 20 a 120 Hz (B'') e incremento de potencial de 2 a 10 mV (C''). Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os parâmetros, faixas estudadas e valores escolhidos durante a otimização estão demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10. Otimização de parâmetros para técnica de voltametria de onda quadrada. Fonte: Elaborado pelo autor.

Parâmetro estudado	Faixa estudada	Valor selecionado
Amplitude	20 a 120 mV	80 mV
Frequência	20 a 120 Hz	80 Hz
Incremento de potencial	2 a 10 mV	10 mV

Sob parâmetros otimizados, uma curva de calibração em função de log da concentração [255] foi construído em concentrações crescentes da proteína Spike SARS-CoV-2 (Figura 54 A-C). Um comportamento linear foi obtido em uma faixa de concentração de $0,7$ a $7,0 \text{ pmol L}^{-1}$, conforme observado na curva inserida (Figura 54 A-B), seguindo as equações e R^2 : In (anódico) = $9,016 (\pm 0,304) + 0,7253 (\pm 0,026) \times$

$\log C_{\text{spike}}$ (pmol L^{-1}), com $R^2 = 0,994$ e I_n (catódico) = $9,671 (\pm 0,359) + 0,7795 (\pm 0,031) \times \log C_{\text{spike}}$ (pmol L^{-1}), com $R^2 = 0,993$. O limite de detecção (LOD) foi escolhido para ser $0,7 \text{ pmol L}^{-1}$ (primeiro ponto detectável) para a proteína *Spike* (concentrações inferiores a $0,7 \text{ pmol L}^{-1}$ não causam alteração no pico da corrente redox), conforme já demonstrado em sistemas semelhantes na literatura [256, 257]. Com o aumento das concentrações da proteína, é possível observar um decaimento da corrente de pico e aumento da impedância, levando a supressão do sinal da sonda redox. Embora concentrações acima de $7,0 \text{ pmol L}^{-1}$ não apresentem linearidade com a sonda redox (I_{pa} e I_{pc}), o imunossensor ainda pode ser utilizado como sensor qualitativo, pois sua aplicação depende apenas da seletividade durante o processo de formação do imunocomplexo, independente da concentração.

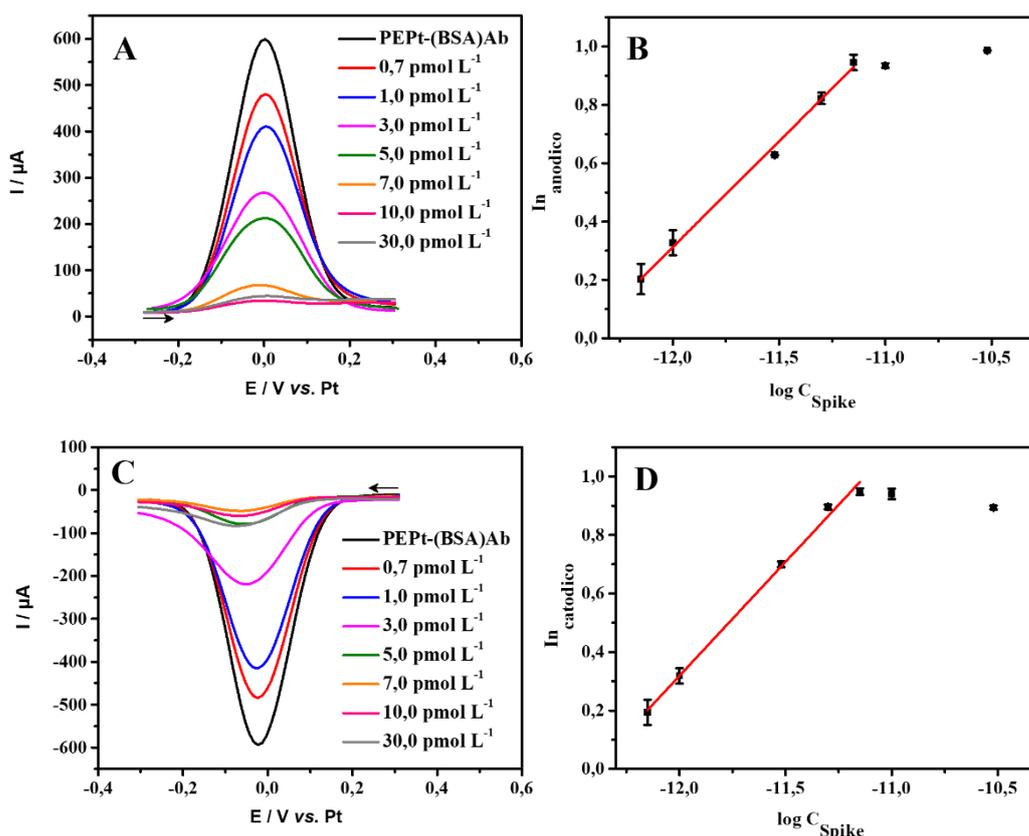


Figura 54. Voltamogramas de onda quadrada direto (A) e reverso (C) obtidos para diferentes concentrações de proteína *Spike* ($0,7, 1,0, 3,0, 5,0$ e $7,0 \text{ pmol L}^{-1}$), em presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 7,0$). (B) e (D) Gráficos de I_n de corrente *versus* \log de concentração de proteína *Spike*. Condições experimentais SWV: amplitude de pulso: 80 mV ; frequência: 80 Hz ; potencial de passo: 10 mV . Fonte: Elaborado pelo autor.

Para EIS, a detecção de pico foi realizada na faixa linear de 1,0 a 30,0 pmol L⁻¹ conforme observado na Figura 55. O diagrama de Nyquist foi ajustado ao circuito de Randles (inserido na Figura 51-D) e utilizado para o cálculo dos valores de resistência a partir da formação do imunocomplexo formado. O sinal analítico foi dado em termos de NIC%, que é dado em função da variação da impedância na superfície do eletrodo. Essa variação ocorre à medida que mais espécies não eletroativas e não eletricamente condutoras – como a adição crescente da proteína *Spike*, por exemplo – são adicionadas a superfície do sensor. Desta forma, o aumento da proteína *Spike* leva ao aumento da resistência ao sistema devido a formação do imunocomplexo formado pelo antígeno-anticorpo. A curva apresentou um coeficiente de linearidade ($R^2 = 0,999$), e a regressão mostra que os dados seguem a equação $NIC\% = -40,60 (\pm 1,288) + 1,11 \times 10^{13} (\pm 5,047 \times 10^{10}) C_{\text{spike}} \text{ (pmol L}^{-1}\text{)}$. O LOD foi escolhido para ser 1,0 pmol L⁻¹ (primeiro ponto detectável) para a proteína *Spike* (concentrações inferiores a 1,0 pmol L⁻¹ não causam alteração significativa no semicírculo).

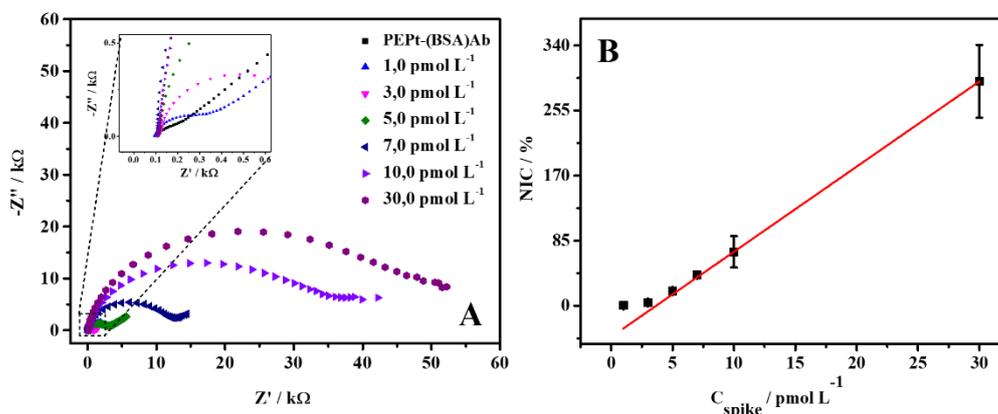


Figura 55. (A) Gráficos de Nyquist obtidos para diferentes concentrações da proteína *Spike* (1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 10,0 e 30,0 pmol L⁻¹), em presença de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,10 mol L⁻¹ (pH7,0); (B) Gráfico de concentrações de proteína *Spike* versus NIC%. Sonda redox: [Fe (CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.

O desempenho analítico do imunossensor foi comparado a outros imunossensores para detecção de SARS-CoV-2 apresentados na literatura. Pode-se observar que o imunossensor de platina apresenta desempenho eletroquímico comparável ou superior a outros imunossensores para detecção de SARS-CoV-2, conforme apresentado na Tabela 11. Mehmandoust *et al.* [35] propuseram um imunossensor para a determinação de

SARS-CoV-2 usando estruturas metal-orgânicas (UiO-66) com a incorporação de nanopartículas de SiO₂. Apesar da alta sensibilidade do imunossensor proposto, a síntese de SiO₂ @ UiO-66 leva a mais uma etapa de modificação e preparação do sensor, o que acarreta o custo do produto final obtido. Em contrapartida, nosso imunossensor proposto apresenta menos etapas de modificação, o que leva a um ganho no tempo de preparo e conseqüentemente a um melhor custo final do dispositivo obtido. Liv *et al.* [63] detectaram o SARS-CoV-2 usando um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com Au-clusters, obtendo uma resposta ultrasensível. No entanto, o uso do GCE restringe a aplicação do dispositivo como um sensor portátil para análise no local de atendimento. Em outro trabalho, Vásquez *et al.* [75] detectaram o SARS-CoV-2 usando esferas magnéticas carboxiladas funcionalizadas com anticorpos do SARS-CoV-2 ligados ao receptor do hospedeiro da enzima conversora de angiotensina (ACE2), adicionalmente marcado com a enzima repórter estreptavidina (poli) peroxidase de rábano (HRP). Apesar do uso do HRP como amplificador de sinal, um segundo marcador pode levar ao aumento dos custos de preparação do imunossensor, o que pode afetar a acessibilidade do teste para regiões subdesenvolvidas. Nesse sentido, nosso imunossensor utiliza a própria platina como amplificador de sinal, sendo confeccionado em poli (tereftalato de etileno) (Bio-PET), substrato utilizado para a produção de sensores flexíveis devido às suas excelentes propriedades mecânicas e térmicas, aliadas ao seu baixo - custo [9].

Tabela 11. Desempenho analítico do imunossensor de platina flexível sem rótulo para determinação de SARS-CoV-2 em comparação com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear	LOD	Aplicação	Refs.
SPCE	Cronoamperometria	0,5 a 10,0 ng mL ⁻¹	0,19 ng mL ⁻¹	Amostra de saliva artificial	[258]
Sensor impresso em tela modificado com <i>carbon black</i>	SWV	0,04 a 10,0 µg mL ⁻¹	19,0 ng mL ⁻¹	Amostra de saliva clínica	[259]
SPCE	EIS	10 ⁻¹¹ a 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	19,0 ng mL ⁻¹	Amostra de saliva humana	[260]
Gpt-PLA	CV	5,0 a 75,0 nmol L ⁻¹	1,36 nmol L ⁻¹	Amostra de saliva artificial	[261]
SiO ₂ @ UiO-66 / SPCE	EIS	100,0 fg mL ⁻¹ a 10,0 ng mL ⁻¹	100,0 fg mL ⁻¹	Amostra de fluido nasal	[256]
GCE	SWV	0,1 a 1000,0 ag mL ⁻¹	0,01 ag mL ⁻¹	Amostras clínicas de saliva e <i>swab</i> orofaríngeo	[262]

G/PLA	EIS	1,0 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Amostra de soro humano	[263]
SPAuE	Cronoamperometria	0 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$	22.55 ng mL^{-1}	Amostras clínicas de <i>swab</i> nasofaríngeo	[264]
Platinum immunosensor	SWV	0,7 a 7,0 pmol L^{-1}	0,7 pmol L^{-1}	Amostra de saliva artificial	Este trabalho
	EIS	1,0 a 30,0 pmol L^{-1}	1,0 pmol L^{-1}		

Notas: SPCE: eletrodos de carbono serigrafados; Gpt-PLA: grafite-ácido polilático; @ UiO-66: universidade em Oslo-66; GCE: eletrodo de carbono vítreo; G/PLA: grafeno/ácido polilático; SPAuE: eletrodo de ouro serigrafado.

6.6 Determinação da Proteína Spike da SARS-CoV-2 em amostra de saliva artificial

A saliva como meio comum de transmissão de SARS-CoV-2 e outras doenças infecciosas, e como método não invasivo de análise foi usada para este trabalho. Assim, o desempenho analítico do imunossensor foi realizado em saliva sintética em concentrações conhecidas da proteína *Spike*. A Figura 56 e 57 mostra as medições de SWV e EIS registradas na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em concentrações de $0,7$ a $7,0 \text{ pmol L}^{-1}$ e $1,0$ a $10,0 \text{ pmol L}^{-1}$ da proteína *Spike* após incubação, respectivamente. Pode-se observar que as curvas analíticas (Figura 56 B-D) e Figura 57-B apresentam comportamento semelhante àquelas onde o PBS foi usado, com uma diminuição da corrente redox para SWV mostrando R^2 (anódico) e (catódico) de $0,983$ e um aumento linear na impedância com um R^2 de $0,967$ com a adição do analito. No entanto, uma maior diminuição da corrente redox para SWV e um aumento da R_{ct} podem ser observados a partir da primeira adição do analito, demonstrando a interação com outros componentes inespecíficos da saliva em relação à solução tampão.

Assim, foi comprovada a aplicabilidade do imunossensor na detecção da proteína *Spike* em meio de saliva artificial, demonstrando assim sua eficiência em relação à técnica padrão-ouro de RT-PCR. Nesse sentido, como comparação, o estudo de Basso *et al.* [265] detectaram o antígeno SARS-CoV-2 em amostras de saliva usando RT-PCR com um LOD de $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$. Isso mostra que o imunossensor proposto apresenta alta sensibilidade para detectar a presença do vírus SARS-CoV-2 no estágio inicial, onde a carga viral é extremamente baixa, e a repetição do teste não é necessária para a detecção precisa.

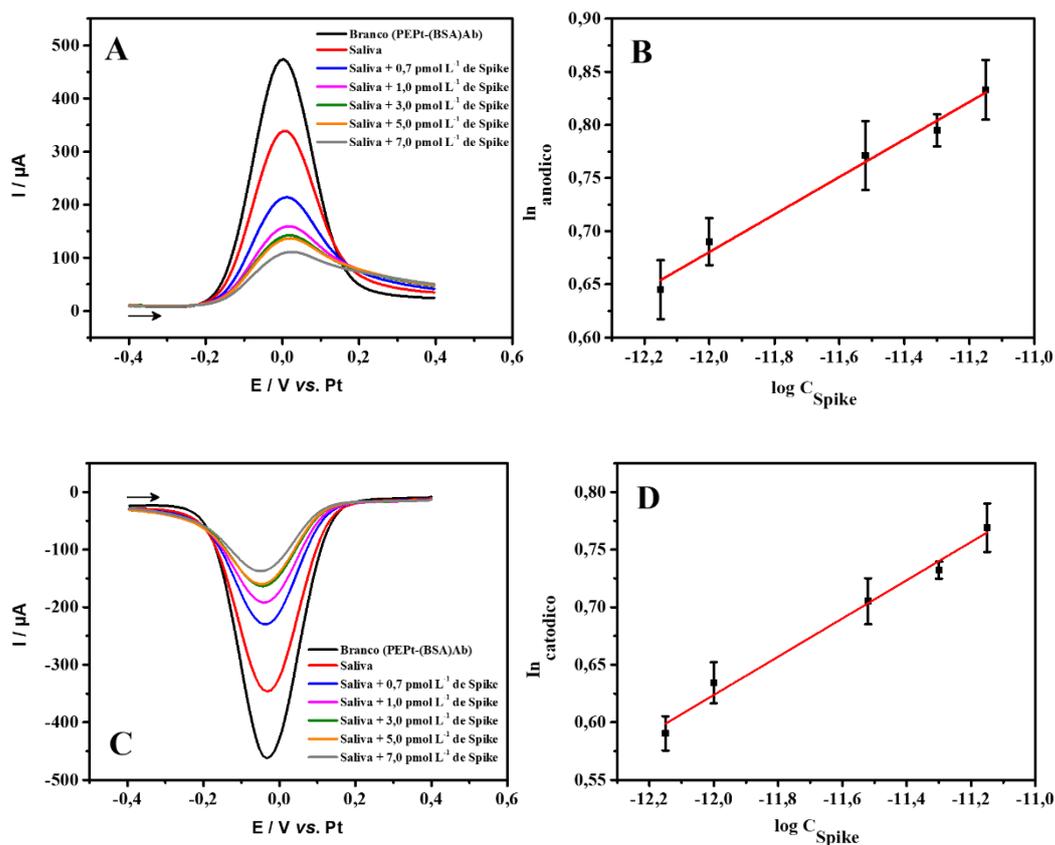


Figura 56. Voltamogramas de onda quadrada direto (A) e reverso (C) obtidos para diferentes concentrações de proteína *Spike* (0,7, 1,0, 3,0, 5,0 e 7,0 pmol L⁻¹) em amostras de saliva sintética, com [Fe (CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). (B) e (D) Gráficos de ln de corrente *versus* log de concentração de proteína *Spike*. Condições experimentais SWV: amplitude de pulso: 80 mV; frequência: 80 Hz; potencial de passo: 10 mV. Fonte: Elaborado pelo autor.

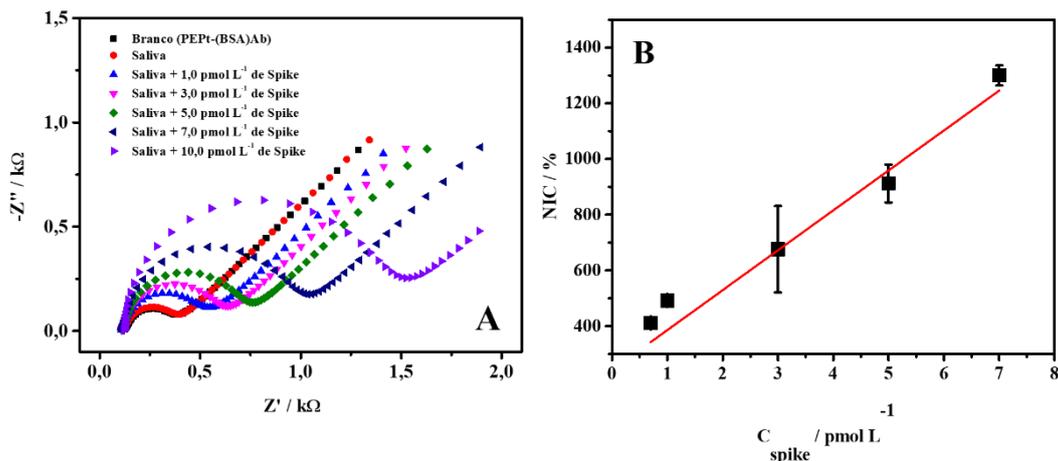


Figura 57. (A) Gráficos de Nyquist obtidos para diferentes concentrações da proteína *Spike* (1,0, 3,0, 5,0 7,0 e 30,0 pmol L⁻¹) em amostras de saliva, com [Fe (CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,10 mol L⁻¹ (pH7,0); (B) Gráfico das concentrações de proteína *Spike* versus NIC%, obtido de A. Fonte: Elaborado pelo autor.

6.7 Aplicação do dispositivo proposto em impressão 3D para análises clínicas

A tecnologia de impressão 3D permite um controle preciso sobre dispositivos eletroquímicos personalizados, com *design* e dimensão (miniaturizados) para atender a análises *point of care*. Além disso, o uso da impressão 3D na confecção de novos dispositivos permite a substituição de células eletroquímicas convencionais que demandam maiores volumes de amostras. Um exemplo de dois sistemas eletroquímicos completos desenvolvidos pelo uso da tecnologia de impressão 3D foi realizado pelo grupo de pesquisa. Richter *et al.* [87] desenvolveram uma plataforma de detecção eletroquímica confeccionada totalmente em impressão 3D com capacidade para 5mL de solução. A célula foi projetada como um cilindro, fixado a uma base com parafusos. A possibilidade de retirar a base da célula possibilitou o encaixe do eletrodo de trabalho, também impresso em 3D em forma de placa retangular. Como mencionado anteriormente, a tecnologia de impressão 3D permite a fabricação de diferentes *designs* de células e, portanto, outra abordagem é apresentada por Silva *et al.* [266] que projetaram uma célula de formato cilíndrico projetada para trabalhar com eletrodos de formato cilíndrico foi construída sem a necessidade de parafusos para montar a base. A célula apresentou uma capacidade de 30 mL de solução. Apesar dos sistemas abordados apresentarem alta versatilidade, um baixo volume de amostra e miniaturização são requeridos. Isso garante um menor gasto com reagentes e melhor portabilidade do dispositivo. Assim, é proposto uma nova célula

eletroquímica para o eletrodo de Pt com capacidade de 10 μL de volume de amostra. Além do baixo volume de amostra o dispositivo permite delimitar a área do eletrodo de trabalho, melhorando a reprodutibilidade do sistema para o imunossensor. A Figura 58 apresenta a montagem do dispositivo proposto.

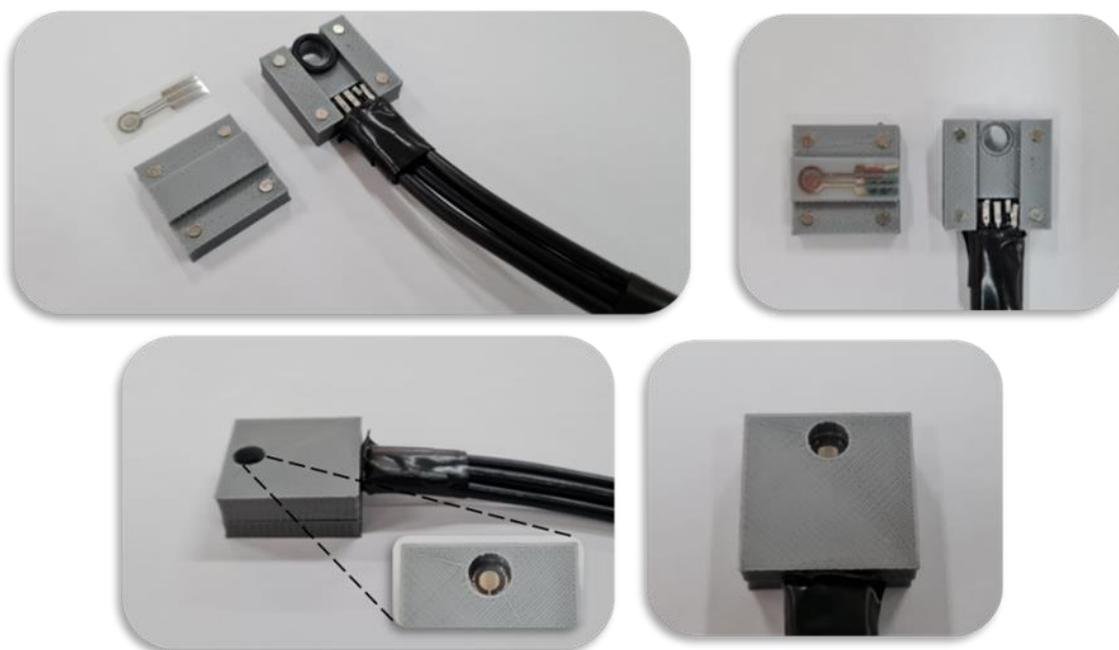


Figura 58. Montagem do dispositivo proposto em impressão 3D para análises clínicas. Fonte: Elaborado pelo autor.

CONCLUSÕES

Este trabalho relatou o desenvolvimento de um sensor e imunossensor feito de substratos flexíveis contendo platina em sua superfície e ecologicamente corretos (Bio-PET). É importante mencionar que o eletrodo produzido não necessita de nenhum tratamento físico ou químico para amplificação do sinal e conseqüentemente seu uso, levando a um menor custo e tempo na produção do imunossensor. Além disso, o uso da plataforma 3D para conexão de eletrodos e análise eletroquímica permite um baixo volume de amostra (10 µl) e alta robustez, o que garante seu uso na análise point-of-care. O dispositivo também permitiu a detecção satisfatória de L-Cys e proteína *Spike* da SARS-CoV-2, demonstrando baixo LOD (0,7 µmol L⁻¹) e (0,7 e 1,0) pmol L⁻¹, respectivamente. Esses recursos tornam o dispositivo uma alternativa no diagnóstico de biomarcadores relacionados ao SARS-CoV-2, permitindo respostas rápidas e precisas.

CAPÍTULO III

FABRICAÇÃO VERDE DE ELETRODOS DE CARBONO DESCARTÁVEIS FEITOS DE FOLHAS DE ÁRVORES CAÍDAS DA ESPÉCIE *Persea americana* MILL USANDO UM LASER DE CO₂ E SUA APLICAÇÃO ANALÍTICA PARA DETECÇÃO DE DOPAMINA.

MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho eram de grau analítico. Água ultrapura (Milli Q, EUA), com resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi usada para preparar todas as soluções aquosas. A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada utilizando uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, preparado em $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo de carbono serigrafado da marca DropSens® foi utilizado para comparação com o eletrodo proposto neste capítulo. Para a detecção de dopamina foi utilizado PBS (pH 7,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como diluição e eletrólito de suporte. A urina sintética foi preparada seguindo a literatura com adaptações [267], e era composta por uma mistura de ureia $170,0 \text{ mmol L}^{-1}$, de cloreto de cálcio dihidratado $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, sulfato de sódio anidro $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, ácido úrico $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e creatinina $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Sigma-Aldrich®, EUA); ácido cítrico $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, cloreto de amônio $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (Dinamica®, Brasil) e cloreto de sódio $90,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da Synth (Diadema, Brasil). O soro AB humano filtrado estéril (código H6914) foi adquirido da Sigma-Aldrich®, EUA.

7.2 Fabricação dos Sensores Sustentáveis

Os eletrodos foram produzidos com um cortador a laser de CO₂ (Work Special Laser com comprimento de onda de $10,6 \mu\text{m}$ e duração de pulso de $\sim 14 \mu\text{s}$). O software RDWorks 8.0 foi usado para projetar a geometria do eletrodo, consistindo em uma configuração integrada de três eletrodos. A Figura 59 mostra uma imagem representativa do processo de fabricação. As folhas foram obtidas da espécie de árvore *Persea americana* Mill, que foram coletadas do solo a uma distância máxima de 2m da árvore. As folhas coletadas não foram tratadas por meio de lavagem. O laser de CO₂ foi utilizado

para carbonizar seletivamente, em atmosfera aberta, a geometria do eletrodo sobre as folhas secas. A potência do laser otimizada foi definida em 6,6% (0,9 W), velocidade de varredura de gravação $80,0 \text{ mm s}^{-1}$, intervalo de varredura de $0,03 \text{ mm}$ e distância focal de 7 mm . Após a carbonização, a área da célula eletroquímica foi delimitada com esmalte transparente. As folhas foram conectadas por meio de conectores do tipo jacaré.

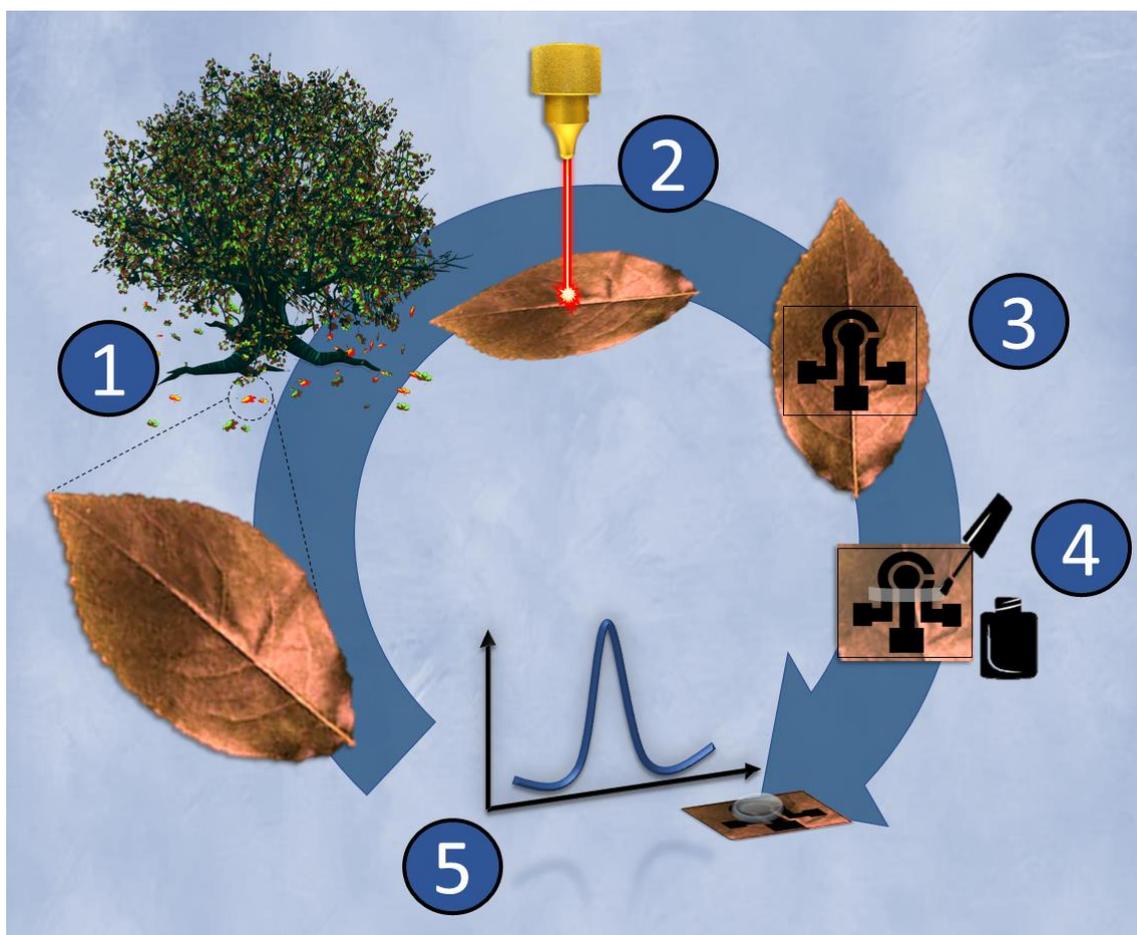


Figura 59. Representação do processo de fabricação e geometria dos eletrodos de folha. As folhas foram coletadas do solo a uma distância máxima de 2m da árvore (Etapa 1). Utilizando o software RDWorks 8.0 foi feito o dimensionamento e os eletrodos foram pirólisados com laser de CO₂ (etapa 2). O eletrodo foi cortado com laser (etapa 3) e após a pirólise, a área da célula eletroquímica foi delimitada com esmalte de unha transparente (etapa 4). Após 10 minutos, o esmalte estava completamente seco e os eletrodos estavam prontos para uso (etapa 5). Fonte: Elaborado pelo autor.

7.3 Caracterização Morfológica e Química dos Sensores

A avaliação da superfície do sensor foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando um microscópio Thermo Fisher Scientific Prisma E com tecnologia Color SEM e integrado a um espectrômetro de raios-X de dispersão de energia (EDS) para o mapeamento químico da superfície do eletrodo. A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com um espectrofotômetro Tensor II (Bruker). Os espectros Raman foram adquiridos usando um Renishaw inVia microRaman, com um laser de 785 nm. Para adquirir espectros sobre folhas não carbonizadas, a potência do laser foi ajustada para 1% e 50 medições, com duração de 1 segundo cada, foram integradas. Para folha carbonizada, a potência do laser foi ajustada para 10% e 10 medições, com duração de 10 segundos cada, foram integradas. A diferença nas configurações foi realizada para evitar danos pelo laser sobre pontos não carbonizados.

7.4 Medidas Eletroquímicas

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT128N, equipado com um módulo de impedância (FRA32M) e controlado pelo software NOVA 2.1.4 (Metrohm, Holanda). Para caracterização dos sensores foi utilizado uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L^{-1} , preparado em KCl 1,0 mol L^{-1} .

Experimentos de CV e LSV foram realizados para caracterizar eletroquimicamente o sensor obtido e avaliar o comportamento eletroquímico da DA. Os parâmetros LSV foram avaliados por (DoE, do inglês “*design of experiment*”) usando Statistica 64 da Statsoft (Dell, Tulsa, EUA). O objetivo do DoE é identificar os principais fatores que afetam a medição eletroquímica e determinar os níveis ideais desses fatores que produzirão a saída desejada sob os parâmetros estudados.

A possibilidade de usar os eletrodos à base de folhas como um sensor para DA foi avaliado usando urina sintética e amostras de soro humano. As amostras de urina sintética foram preparadas de acordo com a formulação sugerida na literatura [267]. Para o soro humano foi realizada uma diluição em 1:10 em PBS para posterior análise. Um teste de recuperação foi realizado após a fortificação das amostras com quatro concentrações diferentes de DA (300,0, 700,0 e 1000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Todas as fortificações foram

realizadas em concentrações dentro da faixa de trabalho linear. Por fim, ensaios de reprodutibilidade, repetibilidade e interferentes foram realizados para o sensor e sob condições anteriormente otimizadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Caracterização Morfológica e Química

As morfologias da folha antes e após o processo de carbonização foram caracterizadas por MEV. As micrografias apresentadas na Figura 60-A1 a A3, são da folha antes da carbonização, onde se observa a estrutura celular [268-270]. Após a carbonização (Figura 60-B1 a B4) as morfologias das estruturas superficiais sofrem alterações significativas, possivelmente decorrentes do depósito de carbono, gerado a partir da queima do substrato celulósico. A interseção entre as áreas carbonizadas e não carbonizadas (Figura 60-C1), mostra um claro contraste entre as duas regiões, com a parte tratada revestida com folhas de carbono, conforme comprovado pela tecnologia ColorSEM na Figura 60-C2. Atribui-se a condutividade elétrica do eletrodo às folhas de carbono formadas na superfície. O espectro EDS mostrando a composição média da superfície do eletrodo é apresentada na Figura 61. Os elementos mais abundantes encontrados na superfície do material foram C (50,6%) e O (26,6%), elementos originários da queima da celulose. Observa-se também uma quantidade significativa de Si (16,7%), que pode ser proveniente do solo, pois se trata de folhas caídas, coletadas do solo, e não houve tratamento, nem mesmo lavagem, das folhas antes da confecção dos eletrodos.

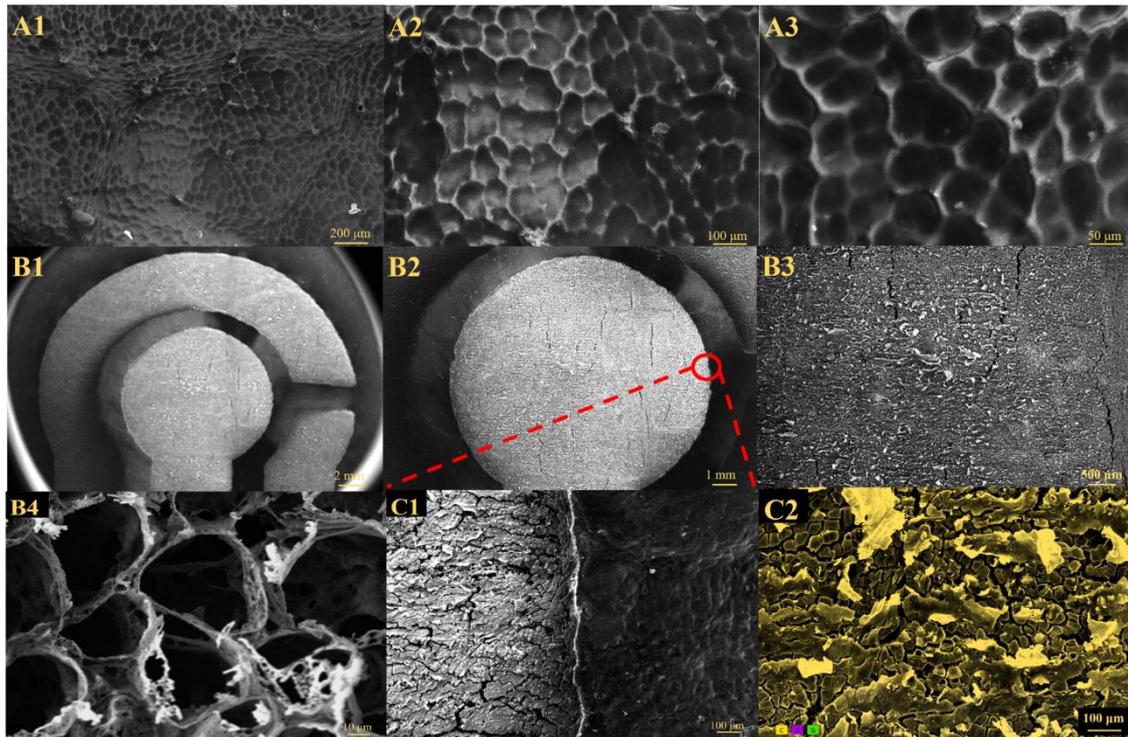


Figura 60. Imagens MEV da (A) Folha não carbonizada com uma ampliação de (A1) 200x, (A2) 500x e (A3) 1000x; (B) Folha carbonizada com uma ampliação de (B1) 22x, (B2) 30x, (B3) 70x, (B4) 3000x. (C1) Interseção entre folha carbonizada e não carbonizada com ampliação de 100x, (C2) Tecnologia ColorSEM mostra carbono, oxigênio e silício na superfície do eletrodo, ampliação de 500x. Fonte: Elaborado pelo autor.

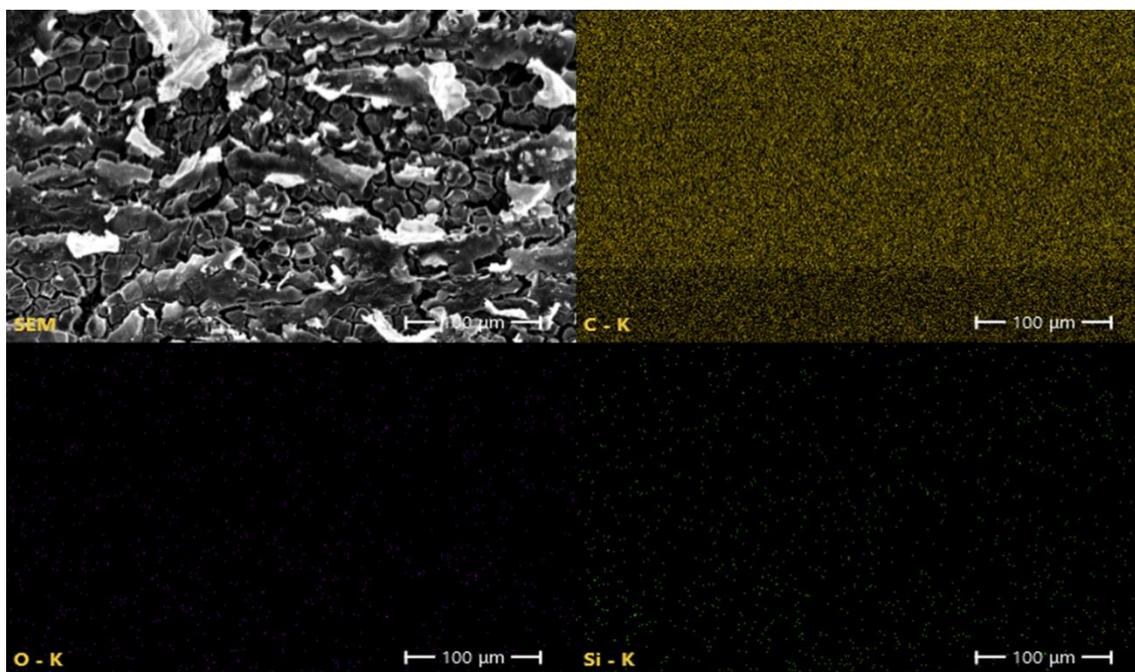
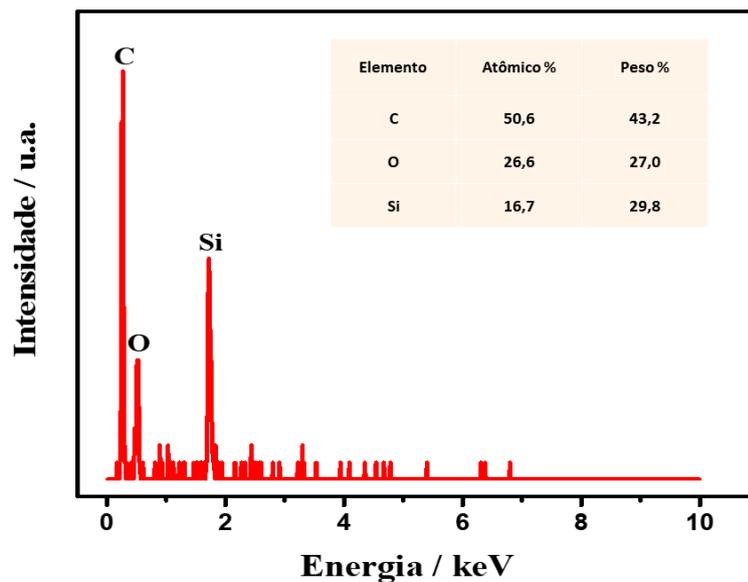


Figura 61. EDS com mapeamento da tecnologia Color SEM da distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo. Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro Raman obtido em folha não carbonizada mostra um grande fundo fluorescente (Figura 62-A), característico de matrizes orgânicas [271]. Isso é altamente contrastante com os espectros Raman obtidos em regiões carbonizadas (Figura-62-B), que mostram uma superfície mais ordenada, com menos fluorescência. O espectro registrado no local carbonizado sobre a folha mostra bandas claras D e G em 1340 e 1570 cm^{-1} , respectivamente. Os espectros corretos de fundo registrados em vários ($n = 60$)

locais carbonizados sobre a folha foram usados para calcular a razão média da intensidade das bandas D e G, encontrada como $0,85 \pm 0,13$. Este valor demonstra que o filme formado na superfície da folha é composto por carbonos sp^2 . A distribuição das razões D/G para o espectro é retratada na Figura 62-C. O histograma mostra que a superfície de carbonos formada sobre a folha é heterogênea, com algumas áreas mais ordenadas (grafíticas - maiores valores de D/G), do que outras (menores valores de D/G). A heterogeneidade resulta da falta de uma atmosfera controlada durante a carbonização, pois foi demonstrado que o controle da atmosfera local pode influenciar a formação de material grafítico [272].

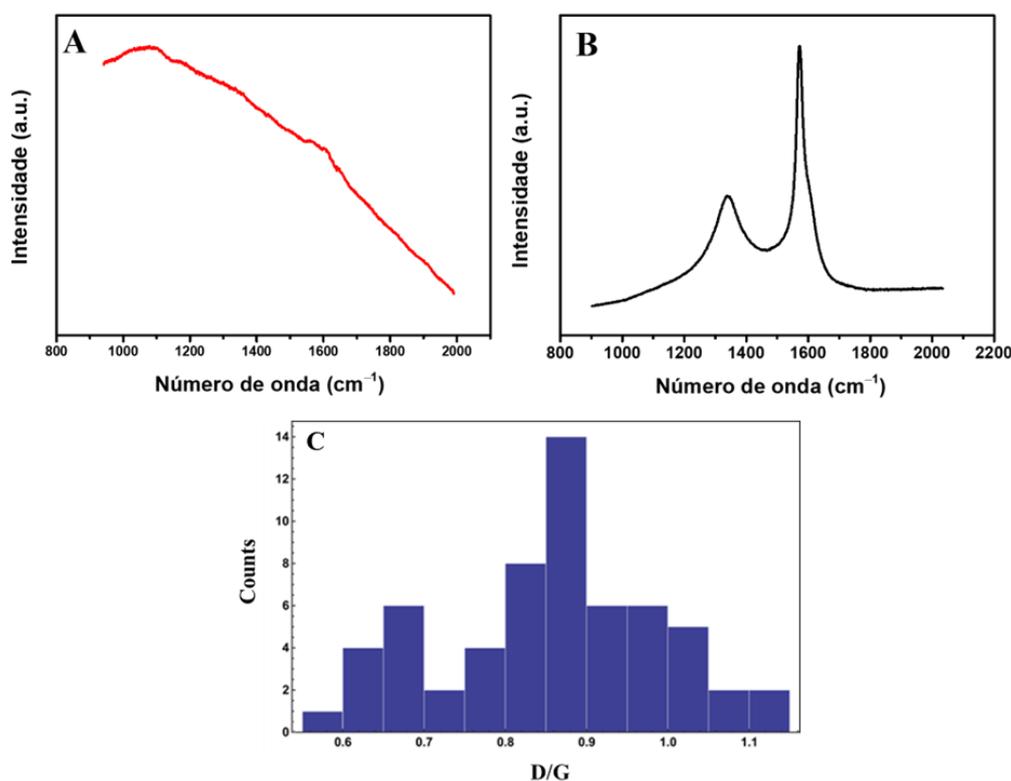


Figura 62. Espectros Raman (A) folha não carbonizada, (B) folha carbonizada e (C) DG Histograma. Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) da folha não carbonizada (Figura 63, traço vermelho) mostra bandas de absorção em 3340 cm^{-1} (estiramento O-H), 2919 e 2848 cm^{-1} (estiramento C-H), 1739 cm^{-1} (alongamento C=O), 1602 cm^{-1} (alongamento C=C), 1367 e 1247 cm^{-1} (alongamento C-O) e 1033 cm^{-1}

(alongamento C–O–C). Muitas dessas bandas de absorção enfraqueceram significativamente ou até desapareceram no espectro FTIR da folha após a carbonização (Figura 63, traço preto), indicando que os heteroátomos foram removidos durante a pirólise a laser [273], suportando a formação de uma camada de carbono condutora.

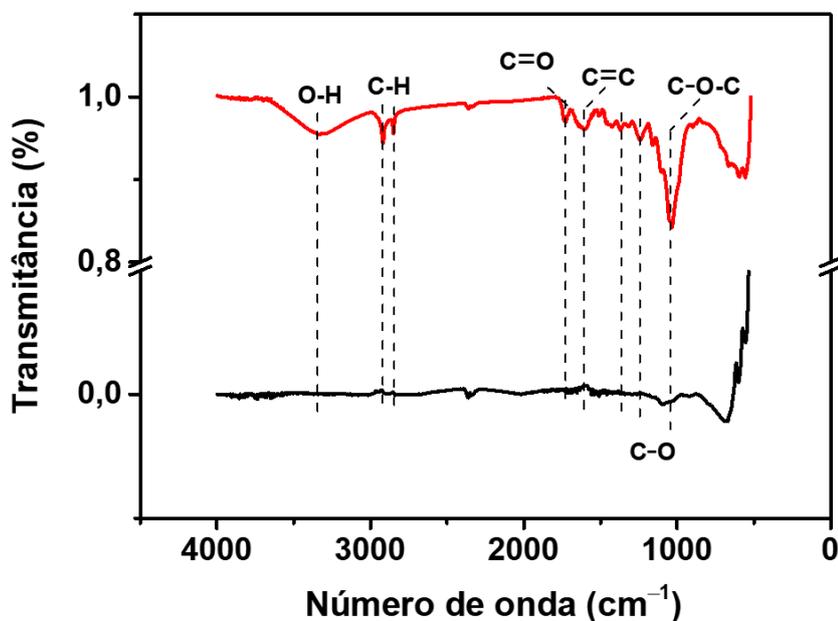


Figura 63. Espectros FTIR de materiais (—) folha ativada por laser e (—) folha não ativada por laser. Fonte: Elaborado pelo autor.

8.2 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos

A otimização dos parâmetros do laser, como potência, velocidade de varredura de gravação e espaçamento de varredura do laser, foi realizada avaliando a resposta voltamétrica usando o par redox Ferri/Ferrocianeto. O desempenho do eletrodo foi avaliado pela separação de potencial de pico catódico e anódico (ΔE_p). Esses experimentos foram realizados com o projeto integrado de três eletrodos. Foi avaliado o possível impacto da utilização de um eletrodo de pseudo-referência de carbono em vez de um eletrodo de referência verdadeiro, no perfil voltamétrico (Figura 64), e nenhuma distorção na onda voltamétrica, além de uma mudança de potencial esperada, é observada.

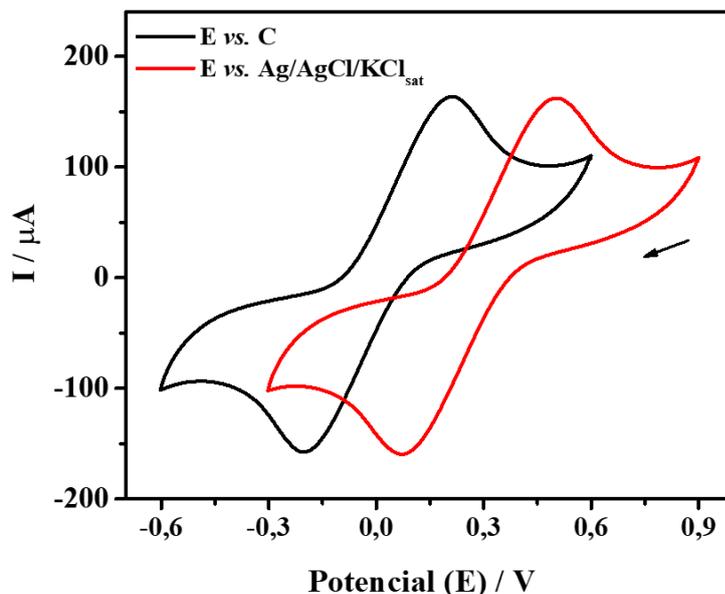


Figura 64. Voltamogramas cíclicos de eletrodos de folhas obtidos na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução de $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ usando carbono (—) e um $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ (—) eletrodo de referência. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 65 mostra os voltamogramas cíclicos para os eletrodos de folha a uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . Primeiro, a potência do laser variando de 5,8 a 6,6% foi avaliada (Figura 65-A). Nenhuma carbonização apreciável ocorreu na superfície da folha em 5,8 e 6,0% de potência, com os eletrodos resultantes apresentando um comportamento resistivo (Figura 65-A). Por outro lado, acima de 6,6%, o laser queimou a folha, destruindo completamente a superfície do eletrodo. Uma tendência clara de diminuição de ΔE_p com o aumento da potência do laser é observada para valores de 6,2, 6,4 e 6,6 % (Figura 65-A) e os maiores valores de potência foram escolhidos para a fabricação dos eletrodos. As velocidades de varredura de gravação do laser foram avaliadas de 70 a 90 mm s^{-1} , e pouco impacto é visto nos valores de ΔE_p (Figura 65-B). Foi selecionado 80 mm s^{-1} , pois foi relatado que velocidades de varredura mais altas resultam em eletrodos resistivos e velocidades de varredura mais lentas podem danificar o substrato [274]. Por fim, foi investigado o efeito do espaçamento do laser na resposta voltamétrica dos eletrodos, explorando valores de *line gap* entre 0,03 e 0,09 mm. O menor valor de lacuna resultou no menor ΔE_p (Figura 65-C) e, portanto, um espaçamento de varredura de 0,03 mm foi selecionado para fabricar os eletrodos à base de folha.

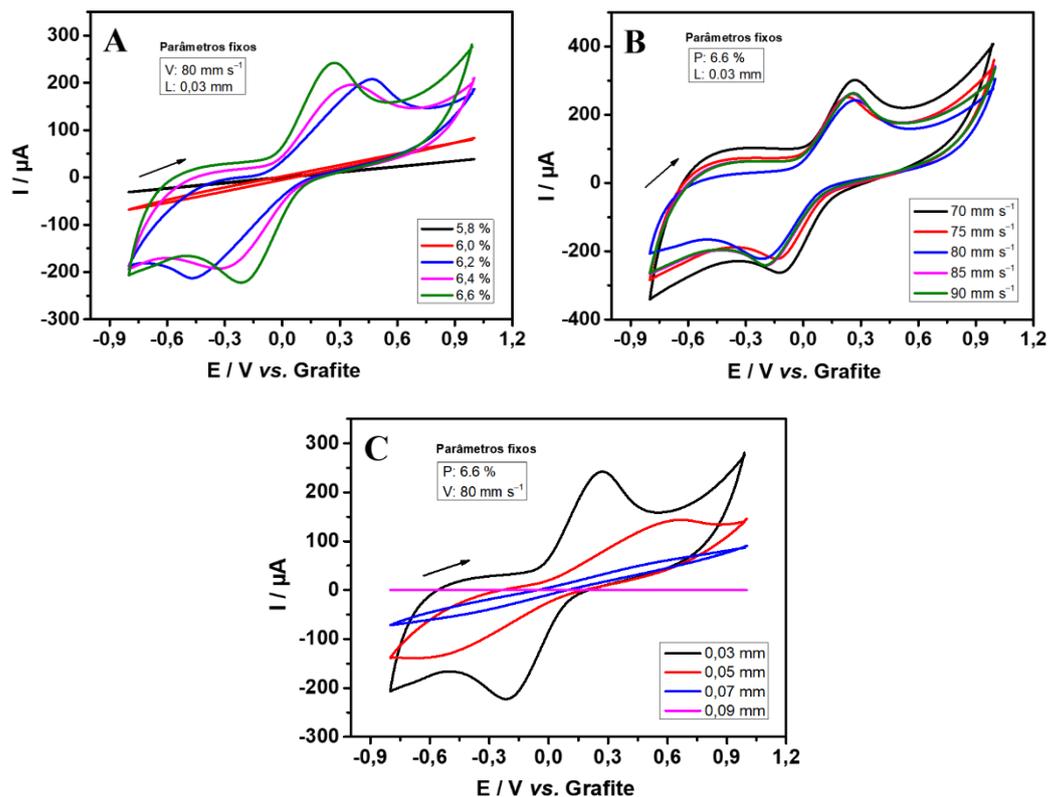


Figura 65. Voltamogramas cíclicos de eletrodos de folhas produzidos em diferentes condições de carbonização. Os parâmetros incluem (A) potência do laser (B) velocidade de varredura e (C) lacuna de varredura. As medidas eletroquímicas foram registradas em mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L^{-1} , em solução de KCl 1 mol L^{-1} . Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

O desempenho eletroquímico de eletrodos fabricados com os parâmetros de laser selecionados foi medido por CV e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) usando o par redox Ferri/Ferrocianeto. Voltamogramas de fundo registrados em solução de KCl (Figura 65-B, traço preto) mostram uma grande contribuição capacitiva, resultante da superfície porosa do eletrodo (ver Figura 60). Os CVs registrados na presença do par redox (Figura 65-B, traço vermelho) mostram um pico anódico e catódico bem definido. A razão das correntes de pico catódicas e anódicas foi de 0,97, e ΔE_p 0,68 V, indicando um comportamento irreversível. Essa grande separação de pico, pelo menos em parte, surge da resistência de contato. A camada de carbono sobre a folha tem uma resistência de folha média de 101 $\Omega \text{ mm}^{-1}$, medida a partir de curvas de polarização de seções das trilhas de carbono (Figura 66-A). Como o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo (caminho da corrente) são feitos da mesma camada de carbono (Figura 66-B), a

resistência de contato geral pode chegar a 3000Ω , o que representaria a maior parte da separação de potencial de pico nas correntes registradas.

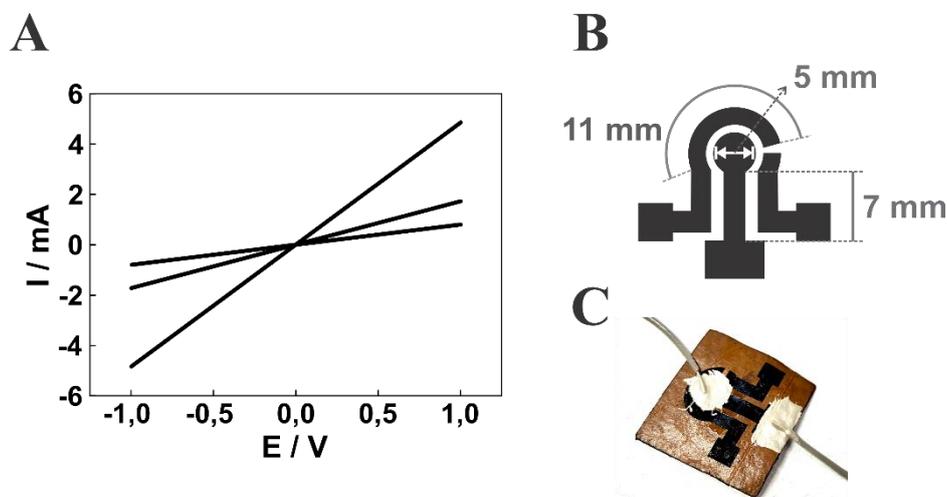


Figura 66. (A) Curva de polarização de uma seção de carbono de 3 eletrodos de folha a partir da qual a resistência de folha pode ser derivada. (B) Desenho do projeto do eletrodo mostrando o comprimento aproximado do caminho do fluxo de corrente nos eletrodos, usado para calcular a resistência de contato aproximada. (C) Imagem da configuração usada para registrar as curvas de polarização no painel A. O comprimento de cada seção foi medido com paquímetro para calcular a resistência da folha. O valor médio entre os 3 aparelhos foi de $101 \Omega \text{ mm}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

A EIS (Figura 67-C) mostra uma resposta com dois semicírculos e uma linha reta com ângulo de 45° , característica de sistemas bifásicos. Olhando a literatura sobre este comportamento, existem alguns artigos que auxiliam no processo de adequação do sistema [275-277]. Neste contexto, os dados de impedância foram analisados ajustando-se um circuito elétrico equivalente $[R(RQ)([RW]Q)]$, que é mostrado inserido na Figura 67-C. Este consiste nos componentes R_s , R e R_{ct} , correspondendo à resistência do eletrólito (R_s), à resistência de superfície (R) e à resistência de transferência de carga (R_{ct}), respectivamente. Além disso, o circuito contém a impedância de Warburg (W). Em particular, o circuito inclui um elemento de fase constante (CPE) para explicar a heterogeneidade da superfície de carbonização do laser de CO_2 .

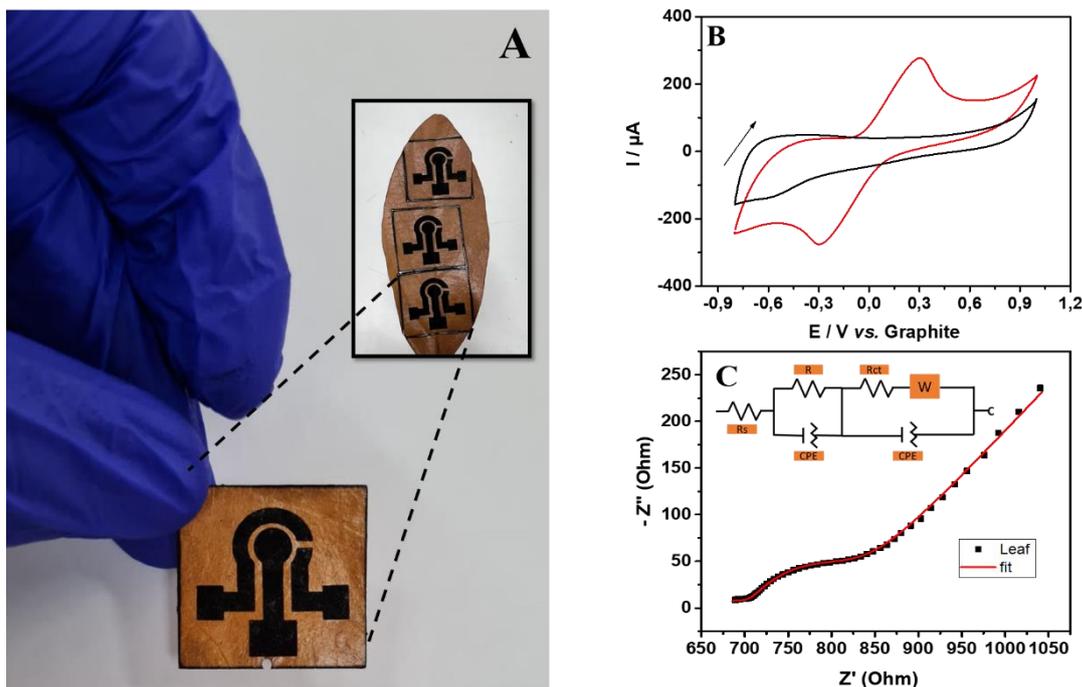


Figura 67. (A) Imagem de eletrodo ativado por laser produzido a partir de folha de árvore caída. (B) Voltamogramas cíclicos do eletrodo na presença (—) e ausência (—) de uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$; Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} . (C) Diagramas de Nyquist de folha de árvore caída na presença de equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. A inserção apresenta o circuito de Randles correspondente. Fonte: Elaborado pelo autor.

O cálculo da área eletroativa foi utilizado para verificar a pirólise a laser, pois, em alguns casos, dependendo dos parâmetros do laser, a superfície resultante não é totalmente carbonizada. Como a área eletroativa reflete a geométrica, podemos assumir que toda a área é pirolisada ou pelo menos há uma sobreposição difusional completa entre todos os caminhos condutores. Dessa forma, a área eletroativa do eletrodo foi determinada por cronoamperometria (Figura 68), com um passo de potencial de circuito aberto de $0,3 \text{ V}$. Este estudo foi realizado usando a equação de Cottrell. Os parâmetros utilizados no cálculo foram a constante de Faraday: $96,485 \text{ C mol}^{-1} (\text{e}^-)$; concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$: $5 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$; o número de elétrons transferidos: 1; o coeficiente médio de difusão de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$: $6,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [278]. O eletrodo apresentou uma área eletroativa de $0,17 \text{ cm}^2$. A área geométrica do eletrodo é ligeiramente maior ($0,23 \text{ cm}^2$) do que a área da superfície eletroativa do eletrodo carbonizado. O limite superior para o método usado [279] sugere que os parâmetros do laser, particularmente o

line gap, foram suficientes para cobrir a maior parte do área do eletrodo de trabalho com material condutor.

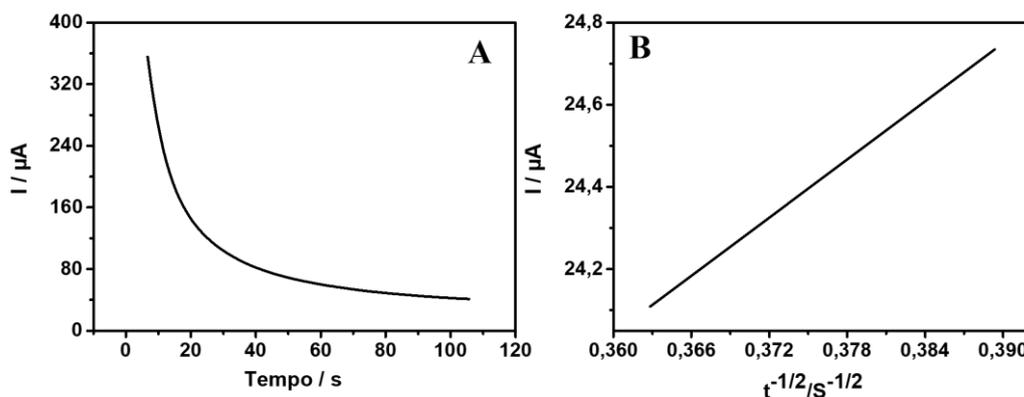


Figura 68. (A) Cronoamperograma usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução de $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ (curvas de decaimento de corrente, $I \times t$). (B) Dependência de I versus $t^{-1/2}$ a partir da equação de Cottrell para o eletrodo (intervalo de tempo utilizado: 10s). Fonte: Elaborado pelo autor.

O impacto da resistência de contato no perfil voltamétrico é evidente quando os experimentos são realizados em velocidades de varredura mais altas (Figura 69), como esperado.

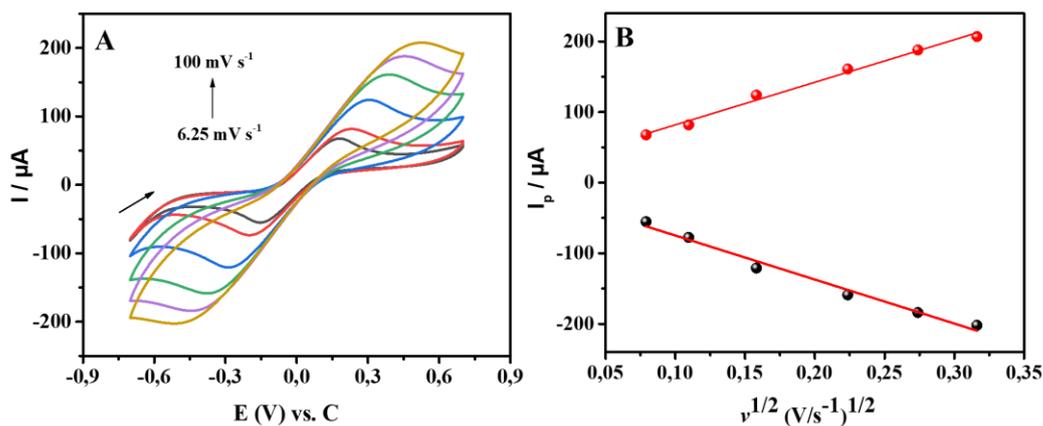


Figura 69. (A) Medições voltamétricas cíclicas do sensor baseado em folha na presença $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução de $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura ($6,25 - 100 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Relação das correntes de pico anódicas e catódicas versus a raiz quadrada da taxa de varredura ($v^{1/2}$). Fonte: Elaborado pelo autor.

A grande superfície porosa vista na Figura 60 pode impactar a resposta eletroquímica de processos que não são reversíveis (difusão limitada) [280]. O eletrodo proposto também é comparado com um eletrodo de grafite comercial (Figura 70). É possível notar um maior deslocamento de potencial para o eletrodo folha, o que está de acordo com as características do material utilizado discutidas na análise morfológica e eletroquímica. No entanto, quando comparado ao eletrodo comercial, observa-se um aumento na magnitude corrente de pico, o que o torna interessante para aplicações eletroanalíticas.

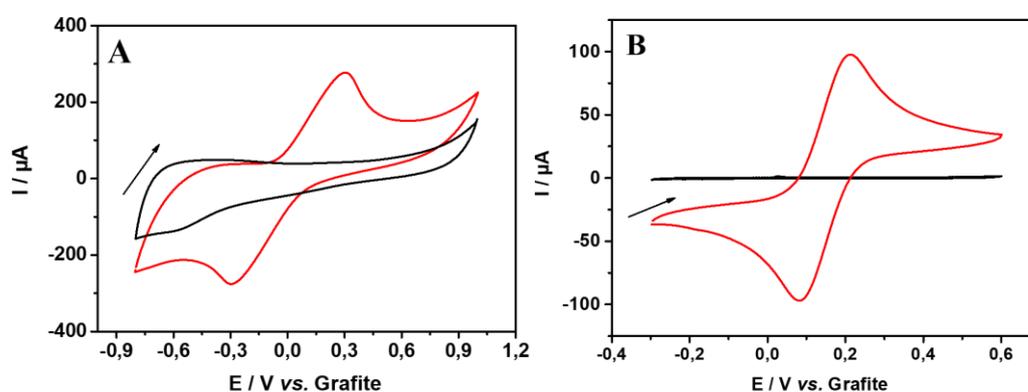


Figura 70. Voltamogramas cíclicos de (A) eletrodo de folha e (B) eletrodo de grafite comercial na presença (—) e ausência (—) de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução de $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$; Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, a reprodutibilidade do processo de fabricação foi avaliada com cinco sensores diferentes (Figura 71). O estudo foi realizado com a mesma leva de folhas secas coletadas a uma distância máxima de 2m da árvore. A distância de 2m indica que as folhas caídas são mais recentes e não se encontram em processo avançado de degradação. demonstrando consistência na resposta analítica (desvio padrão relativo, $\text{RSD} = 2,29 \%$ para valores de I_p para $n = 3$). O baixo valor de RSD demonstra que o sensor pode ser utilizado em análises *point of care*, com respostas consistentes para tomada de decisão em análises clínicas.

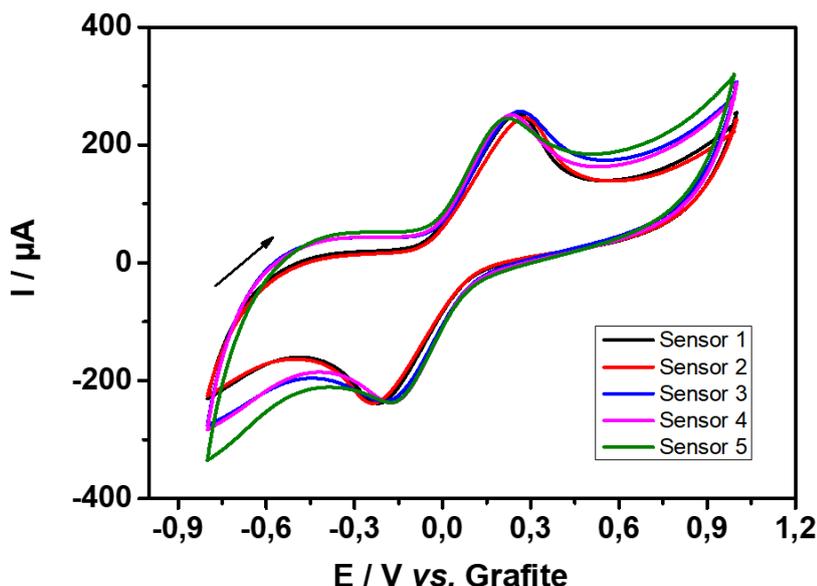


Figura 71. Dados de reprodutibilidade ($n = 5$) obtidos de voltamogramas cíclicos sucessivos usando uma mistura equimolar de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução de $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$; Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

8.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Dopamina

O desempenho eletroquímico dos eletrodos na detecção de DA foi inicialmente avaliado por CV em uma solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) na presença de DA $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . A Figura 72-A apresenta os voltamogramas obtidos para o sensor na presença (linha vermelha) e ausência (linha preta) de DA. Um pico de oxidação em $0,46 \text{ V}$, atribuído à oxidação da dopamina em Dopaminaquinona, e um pico de redução em $-0,08 \text{ V}$ correspondente à reação de redução da Dopaminaquinona são vistos, mostrando a capacidade do eletrodo à base de folha em detectar DA. Sabe-se que a resposta eletroquímica da DA é limitada à superfície em algumas superfícies de carbono [281], o que pode ser o caso aqui, apesar da separação de pico observada na Figura 72-A, que é atribuída à resistência de contato. A reação da dopamina à Dopaminaquinona é mostrada na Figura 72-B.

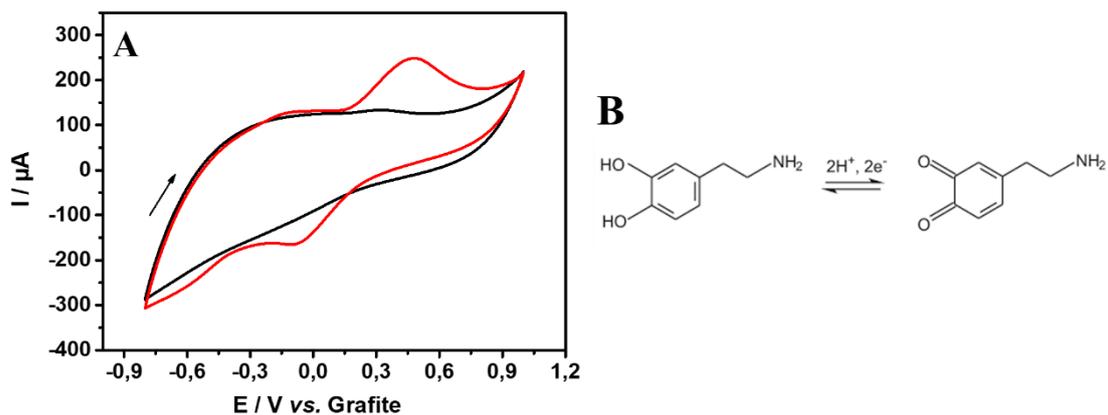


Figura 72. (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo na ausência (—) e presença (—) de DA $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . (B) Possível reação de eletrooxidação de DA. Fonte: Elaborado pelo autor.

A otimização dos parâmetros do LSV (velocidade de varredura e potencial) foi realizada para garantir a melhor resposta eletroquímica. Para isso, uma curva de resposta foi traçada para determinar os níveis ótimos dos fatores testados. Este estudo foi realizado em uma solução contendo DA $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 73). Maiores valores de corrente são observados na área roxa, maior velocidade de varredura e valores de passo, o maior valor de corrente sob os valores avaliados realizados foi obtido em 100 mV s^{-1} e 10 mV , respectivamente, velocidade de varredura e valores de passo. Com base nisso, os valores foram escolhidos como condições otimizadas para as etapas seguintes.

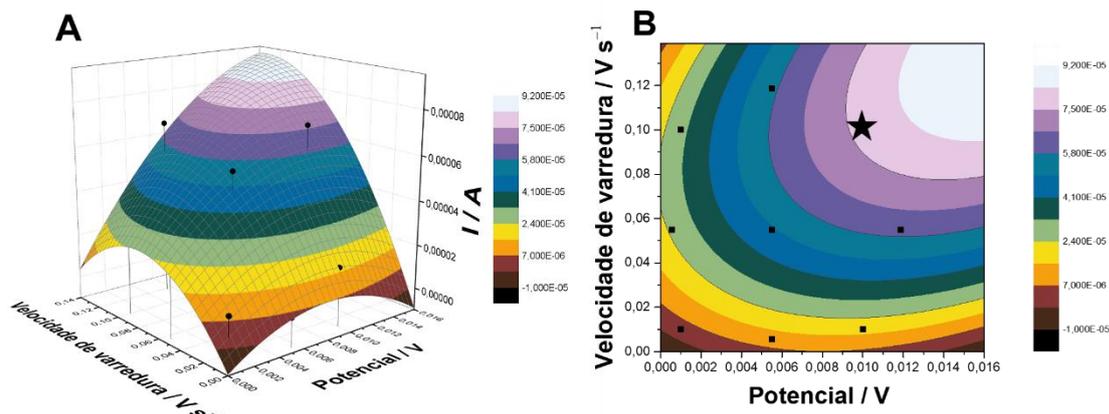


Figura 73. Otimização dos parâmetros do LSV através do mapeamento dos experimentos realizados no software STATSTICA® (A) Gráfico 3D referente ao valor atual obtido no LSV. (B) Gráfico 2D referente ao valor da corrente, estrela vermelha posicionada sobre os maiores valores da corrente dentro do intervalo de confiança. Fonte: Elaborado pelo autor.

Sob condições otimizadas, um gráfico de calibração foi obtido para diferentes concentrações de DA (Figura 74-A). Uma relação linear entre a concentração e a corrente de pico foi obtida em uma faixa de concentração variando de 10 a 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 74-B), seguindo a equação: $I_p (\mu\text{A}) = 2,286 \times 10^{-5} (\pm 1,597 \times 10^{-6}) + 0,076 (\pm 0,004) C_{\text{DA}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, com R^2 de 0,993. O limite de detecção (LOD) foi calculado como 3 vezes o desvio padrão do intercepto linear sobre a inclinação do gráfico de calibração [282].

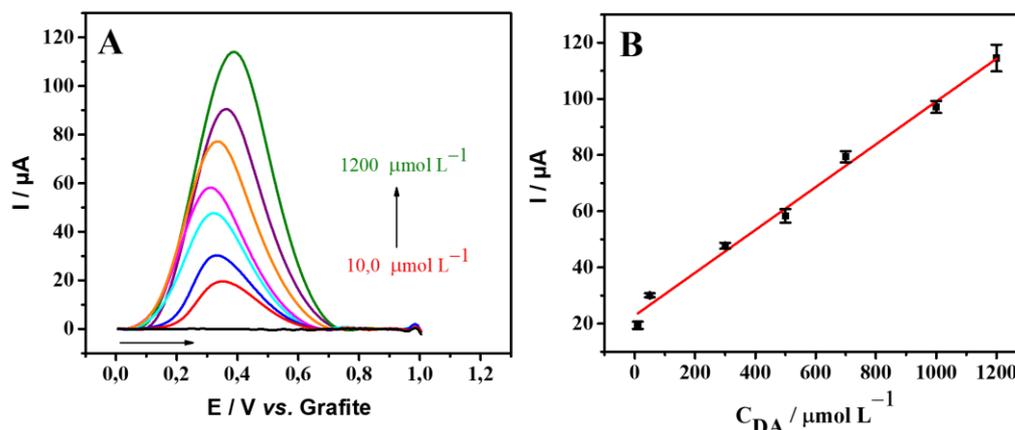


Figura 74. (A) Voltamogramas de varredura linear registrados em diferentes concentrações de DA (10,0; 50,0; 300,0; 500,0; 700,0; 1000,0 e 1200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); Velocidade de varredura: 100 mV s⁻¹, passo: 10 mV (B) Gráfico de calibração para DA (I_p versus C_{DA}). Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor de LOD foi de 1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, indicando que o sensor apresenta potencial para a detecção de DA em uma ampla faixa linear de trabalho. Além disso, para demonstrar a precisão dos testes de repetibilidade ($n=10$) e reprodutibilidade ($n=5$) do sensor foram realizados (Figura 75), com valores de RSD de 1,46% e 6,47%, respectivamente.

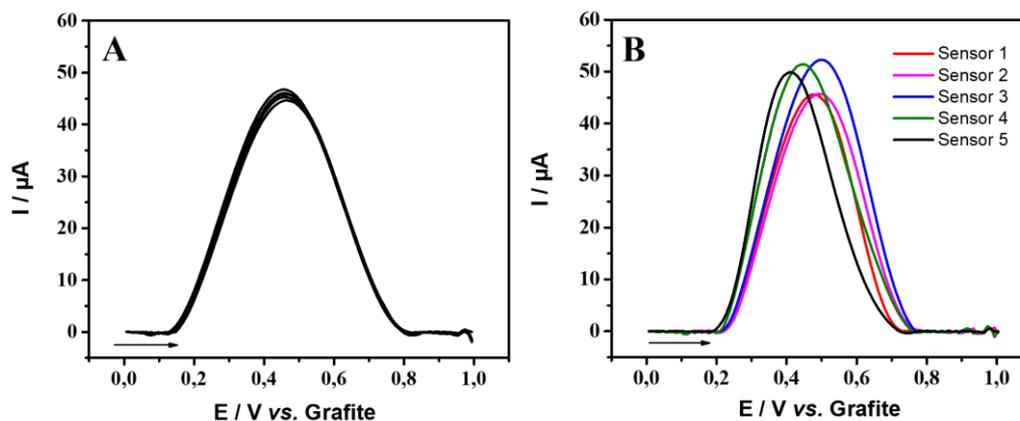


Figura 75. (A) Dados de repetibilidade obtidos a partir de voltamogramas de varredura linear sucessivos ($n=10$) usando uma solução de DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). (B) Os dados de reprodutibilidade foram obtidos a partir de voltamogramas de varredura linear sucessivos ($n=5$) usando uma solução de DA 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito de suporte: PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.

A possibilidade de usar os eletrodos à base de folhas como um sensor de DA foi avaliada usando urina sintética e amostras de soro humano. Um teste de recuperação foi realizado após a fortificação das amostras com quatro concentrações diferentes de DA (300,0, 700,0 e 1000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de recuperação ($n = 3$) para adições de dopamina em soro humano e amostra de urina. Elaborado pelo autor.

Amostra	Fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Soro humano	300,0	$334,0 \pm 2,8$	$111,3 \pm 1,0$
	700,0	$732,0 \pm 5,5$	$104,6 \pm 1,0$
	1000,0	$925,0 \pm 3,4$	$92,5 \pm 1,0$
Urina sintética	300,0	$344,0 \pm 3,8$	$114,6 \pm 6,0$
	700,0	$716,0 \pm 4,6$	$102,2 \pm 5,0$
	1000,0	$984,0 \pm 2,2$	$98,43 \pm 4,0$

Valores de recuperação variando de $92,5 \% \pm 1,0$ a $114,6 \% \pm 6,0$ foram obtidos, indicando que não há interferências da matriz da amostra. A seletividade do sensor para determinação de DA ($300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi avaliada na presença de possíveis espécies concomitantes encontradas em fluidos biológicos [92, 283] como ácido ascórbico, ácido úrico, uréia, creatinina e glicose, na proporção de 1:1 (dopamina: interferente). A Tabela 13 mostra os resultados de interferência obtidos para determinação de DA na presença de cada espécie. Um desvio de corrente de pico inferior a 10% é observado em todos os casos, o que foi considerado satisfatório para a determinação de DA nessas amostras. Os dados LSV obtidos para o estudo de interferência podem ser vistos na Figura 76.

Tabela 13. Estudo de possíveis interferentes para quantificação de DA, na proporção 1:1 (dopamina: interferente), presentes nas amostras testadas. Elaborado pelo autor.

Interferentes	Variação do sinal de corrente (%)
Ácido ascórbico	8,50±0,3
Ácido úrico	2,33±0,1
Ureia	8,32±0,7
Creatinina	7,44±0,5
Glicose	4,03±0,5

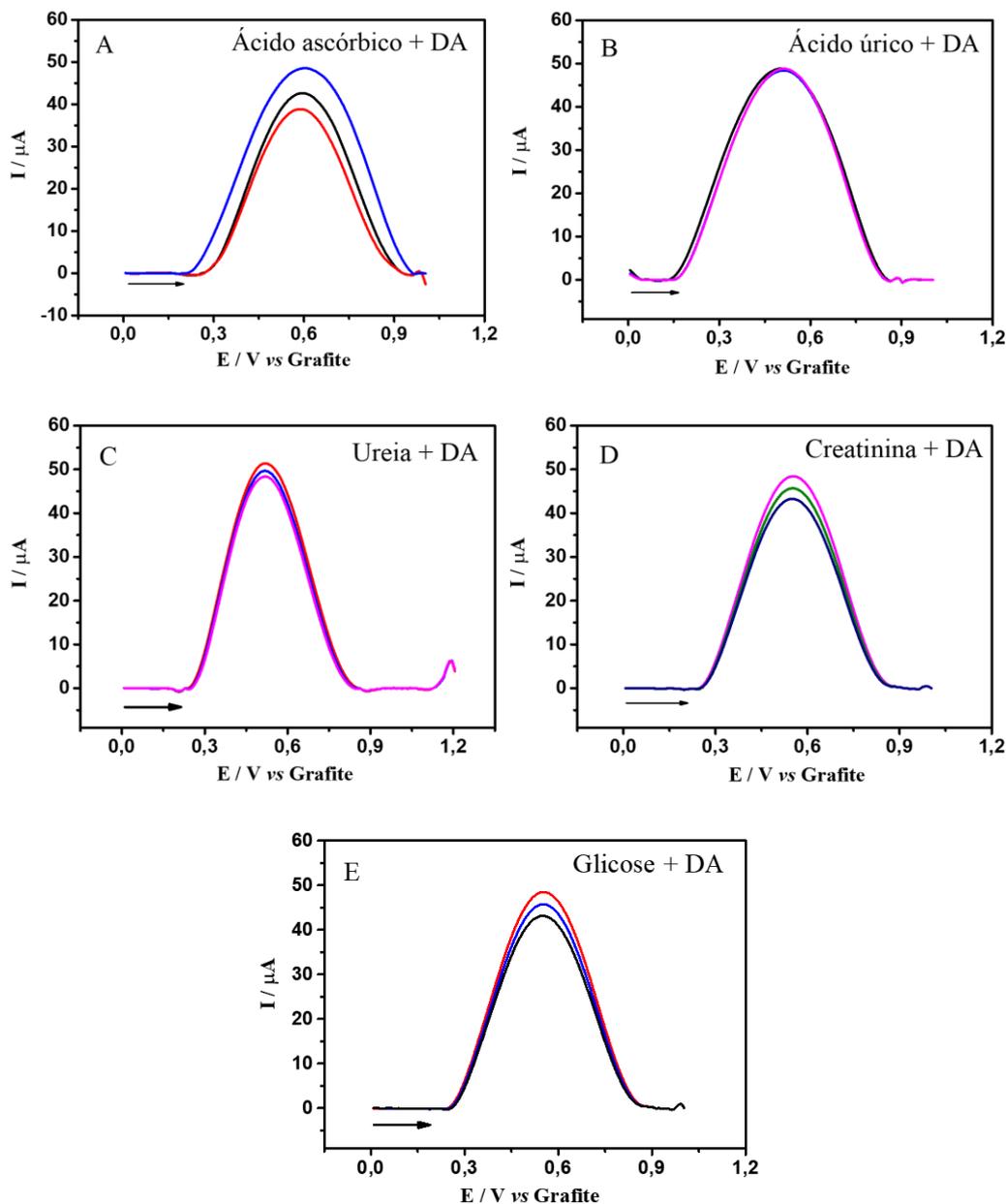


Figura 76. Dados de interferência obtidos a partir de voltamogramas de varredura linear ($n = 3$) usando uma proporção de 1:1 (dopamina: interferente); (A) solução de ácido ascórbico + DA $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (B) Solução de ácido úrico + DA $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (C) solução de Uréia + DA $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; (D) solução de Creatinina + DA $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (E) solução de Glucose + DA $300,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.

O desempenho analítico dos eletrodos baseados em folhas foi comparado a outros métodos eletroquímicos relatados para detecção de DA, conforme apresentado na Tabela 14. Por exemplo, Jia *et al.* [284] desenvolveram um sensor usando um filme híbrido de

nanopartículas de ouro-poli(luminol) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas com eletrodo de carbono vítreo modificado com β -ciclodextrina incorporado. Os autores obtiveram um LOD de $0,19 \mu\text{mol L}^{-1}$ com uma faixa linear de 1,00 a $56,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Embora o LOD relatado pelos autores seja um pouco melhor do que o relatado para este trabalho, a preparação e confecção do material requer muitas etapas. Essas etapas incluem polimento de GCE em pasta de alumina e ativação em H_2SO_4 , eletrodeposição de AuNPs e, finalmente, funcionalização de MWCNTS para posterior deposição na superfície do eletrodo. Isso torna o processo de fabricação do sensor mais demorado e mais caro. Em outro trabalho, Sharma *et al.* [285] propuseram um sensor baseado em nanofibras de carbono suportadas por níquel para detecção de DA, apresentando um LOD de $0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$. A fabricação do sensor modificado por Ni@CNF requer primeiramente sua síntese, que leva aproximadamente 20h, tornando o processo de fabricação do sensor mais demorado. Depois disso, Kalinke *et al.* [286] desenvolveram eletrodos de PLA-grafeno impressos em 3D. Embora o eletrodo seja simples de fabricar e apresente LODs próximos aos relatados neste trabalho, seu desempenho depende de tratamentos químicos e eletroquímicos para posterior aplicação. Assim, o sensor proposto feito de folhas caídas de árvores ativado por laser não requer tratamentos químicos ou várias etapas de modificação de superfície para aplicação. Isso torna os sensores propostos um sistema eletroquímico ecologicamente correto e altamente versátil.

Tabela 14. Desempenho analítico do sensor de folha de árvore para determinação de DA comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Eletrodo	Técnica	LDR ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Aplicação	Refs.
Au-Cu ₂ O/rGO	DPV	10 to 90	3,9	Soro humano e urina	[287]
β -CD-MWCNTs)/Plu-AuNPs/GCE	DPV	1 to 56	0,19	–	[284]
MWCNT-BPVCm-e/GCE	CV	5 to 1000	2,3	Farmacêutica	[288]
Ni@CNF/SPCE	CV	0,1 to 10	0,11	Urina e soro humano	[289]
WS ₂ QDs	Fluorescência	50 to 450	20	Soro sanguíneo	[290]
CoTMPyP/Sr ₂ Nb ₃ O ₁₀	DPV	20 to 1620	7,6	Urina humana	[291]
CPC/ α -ZrP	DPV	13 to 520	3,3	Urina humana	[292]
AuNPs@PANI core-shell	DPV	10 to 1700	5,0	Urina humana	[293]
	CV	10 to 500	3,49		
PLA-G NaOH-30-EC	DPV	7,0 to 100	2,17	Urina e soro humano	[286]
	SWV	5,0 to 100	1,67		
Sensor de folha de árvore	LSV	10 to 1200	1,1	Soro humano e urina sintética	Este trabalho

LDR: Faixa dinâmica linear; **Au-Cu₂O/rGO:** Ouro- Óxido cuproso/óxido de grafeno reduzido; **β -CD-MWCNTs)/Plu-AuNPs/GCE:** Filme híbrido de nanopartículas de ouro-poli(luminol) (Plu-AuNPs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas com eletrodo de carbono vítreo modificado com β -ciclodextrina incorporado; **BPVCm-e:** Polímero anfifílico ramificado fotossensível e eletroativo; **Ni@CNF:** Nanopartículas de níquel suportadas por nanofibra de carbono; **SPCE:** Eletrodos de carbono serigrafados; **WS₂QDs:** Pontos quânticos de tungstênio cetilpiridínio; **CoTMPyP/Sr₂Nb₃O₁₀:** Nanofolhas de Sr₂Nb₃O₁₀ carregadas negativamente foram montadas com 5,10,15,20-tetraquis (N-metilpiridínio-4-il) porfirinato cobalto (CoTMPyP) carregados positivamente; **CPC/ α -ZrP:** Cloreto de cetilpiridínio/fosfato de α -zircônio; **AuNPs:** Nanopartículas de ouro; **PANI:** Polianilina; **PLA-G NaOH-30-EC:** Ácido polilático-grafeno.

CONCLUSÕES

O uso de folhas de árvores caídas como substrato para sensores eletroquímicos, combinado com pirólise a laser de CO₂, representa uma abordagem inovadora e ecológica para a fabricação de sensores. Os sensores resultantes mostraram resultados promissores para a detecção de DA, um neurotransmissor com funções importantes no cérebro. O sensor de folha demonstrou uma resposta linear variando de 10,0 a 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, boa repetibilidade e reprodutibilidade, valores de 1,46% e 6,47%, respectivamente e um baixo LOD de 1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, indicando seu potencial para uso prático formulados. No geral, esta pesquisa destaca o potencial do uso de materiais sustentáveis e técnicas avançadas de fabricação para criar sensores eficazes e acessíveis para uma variedade de aplicações. Como perspectiva futura é interessante realizar estudos com a mesma espécie de árvore nas quatro estações do ano, folhas verdes e outras regiões de coleta a fim de ser avaliado a estabilidade do eletrodo e mudanças no perfil voltamétrico.

CAPÍTULO IV

NOVA PLATAFORMA REUTILIZÁVEL PARA CONFECÇÃO DE ELETRODOS À BASE DE GRAFITE E SUA APLICAÇÃO ANALÍTICA MULTIVARIADA

MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. Água ultrapura (Milli Q, EUA), com resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, foi usada para preparar todas as soluções aquosas. Grafite da Fisher Chemical™ (New Jersey, EUA) e NP incolor (Base brilho cuidados, Cora©, São Paulo, Brasil) foram utilizados para a preparação da tinta condutiva. Ácido úrico, metanol ferroceno, cloreto de potássio, glicose, creatinina, tirosina, epinefrina, L-Dopa e cloridrato de dopamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, EUA. Ácido ascórbico, ácido acético, ácido láctico, cloreto de amônio e uréia da Dinamica®, Brasil; Cloreto de sódio; Paracetamol; Parkidopa® (Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda).

A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada utilizando uma solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de FcMeOH em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. Para a detecção de L-Dopa, foi utilizado como solução eletrolítica suporte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão Britton-Robinson (BR) (pH 4,0), preparado com ácido acético, ácido bórico (Dinamica®, Brasil) e ácido fosfórico (Sigma-Aldrich®, EUA). Para a detecção de DA, foi utilizada como eletrólito de suporte solução salina de tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), o qual foi preparado com fosfato de sódio dibásico (Dinamica®, Brasil), cloreto de potássio, e fosfato de sódio monobásico (Sigma-Aldrich®, EUA). O filamento flexível e não condutor de acrilonitrila butadieno estireno (ABS), utilizado na construção de um dispositivo eletroquímico, foi adquirido da 3DLAB® (Minas Gerais, Brasil).

9.2 Construção da Plataforma Eletroquímica e Confecção dos Eletrodos

O layout desejado dos eletrodos foi desenhado com o auxílio do software AutoCAD (AutoDesk, EUA) e uma peça de PMMA de 2,8 mm de espessura foi gravada e cortada com o auxílio de uma cortadora a laser (Laser 6000, Combat Laser) (parâmetros

de gravação - velocidade 100 mm s^{-1} , espaçamento de varredura $0,1 \text{ mm}$, potência de 15 W ; velocidade de corte 10 mm s^{-1} , potência de 90 W ; 85 W) fornecendo o layout dos eletrodos para posterior deposição de tinta. Para medidas estacionárias, uma gota de solução foi inserida diretamente na superfície dos eletrodos. Para análise de fluxo, uma plataforma de polidimetilsiloxano (PDMS) foi usada. Para isso, uma fina camada de PDMS (espessura $0,8 \text{ mm}$) foi preparada a partir de uma mistura de Sylgard 184 (Dow, EUA) (relação 1:10 p/p) curado a 125°C por 10 min em uma placa de Petri de vidro. O PDMS foi então gravado com um caminho para as soluções fluírem usando um cortador a laser (velocidade 40 mm s^{-1} , força 90;90) e posicionado sobre os eletrodos para realizar as medições de fluxo. As estruturas finais foram acopladas formando uma plataforma sanduíche (PMMA, PDMS, PMMA), prensadas entre si por meio de parafusos metálicos para evitar vazamentos.

Para a confecção dos eletrodos à base de grafite sobre a plataforma acrílica foram utilizadas máscaras recortadas em papel adesivo (Colacril, Office CC185) para delimitar os eletrodos e evitar o espalhamento excessivo ultrapassando os trajetos gravados (Figura 72, etapa A). Para a confecção da máscara foi utilizada uma impressora de recorte, sendo os desenhos criados com o software Silhouette Studio versão 4.4. As máscaras foram então coladas na superfície da peça de PMMA gravada. A tinta condutora foi preparada misturando NP e grafite (48:52% (p/p), composição previamente otimizada por Andreotti *et al.* [174, 294]. Após a deposição da tinta na superfície do PMMA, a plataforma foi acoplada a um suporte impresso em 3D contendo conexão elétrica ligando os eletrodos ao potenciostato para aplicação em diferentes sistemas na detecção dos analitos (Figura 72, etapa B). Após análise, a plataforma pode ser reutilizada retirando a tinta com auxílio de uma pinça e acrescentando uma nova camada de tinta para uso posterior (Figura 77, etapa C). A Figura 78 mostra a montagem do dispositivo eletroquímico portátil proposto.

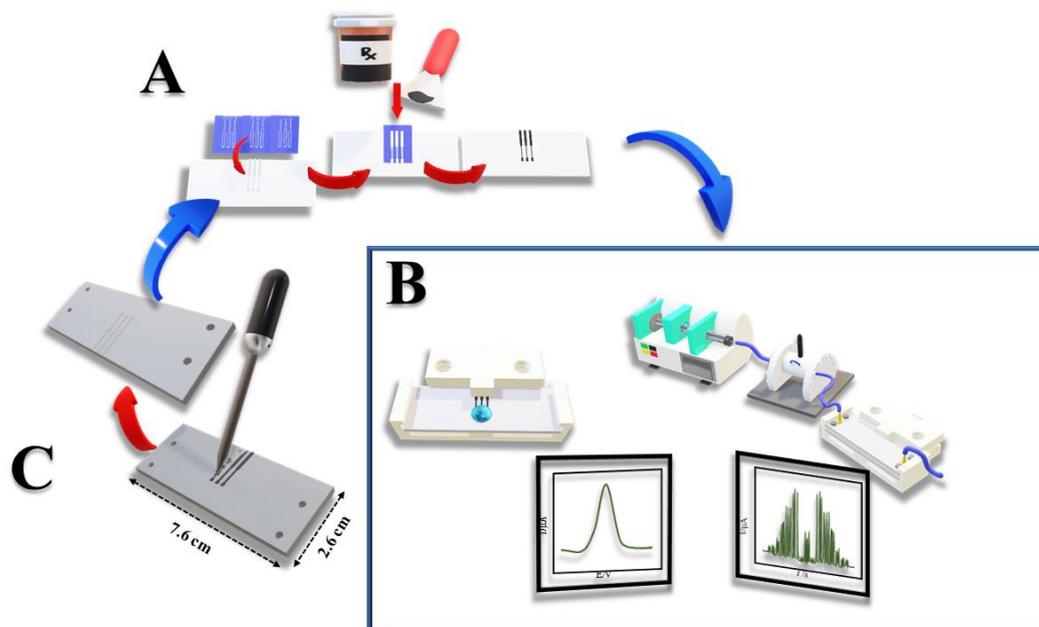


Figura 77. Representação do processo de fabricação do dispositivo para detecção eletroquímica portátil. (A) Preparação dos eletrodos com a tinta condutora composta de NP e grafite. (B) Diferentes sistemas de detecção de analitos. (C) Reutilização da plataforma removendo a tinta condutora. Fonte: Elaborado pelo autor.

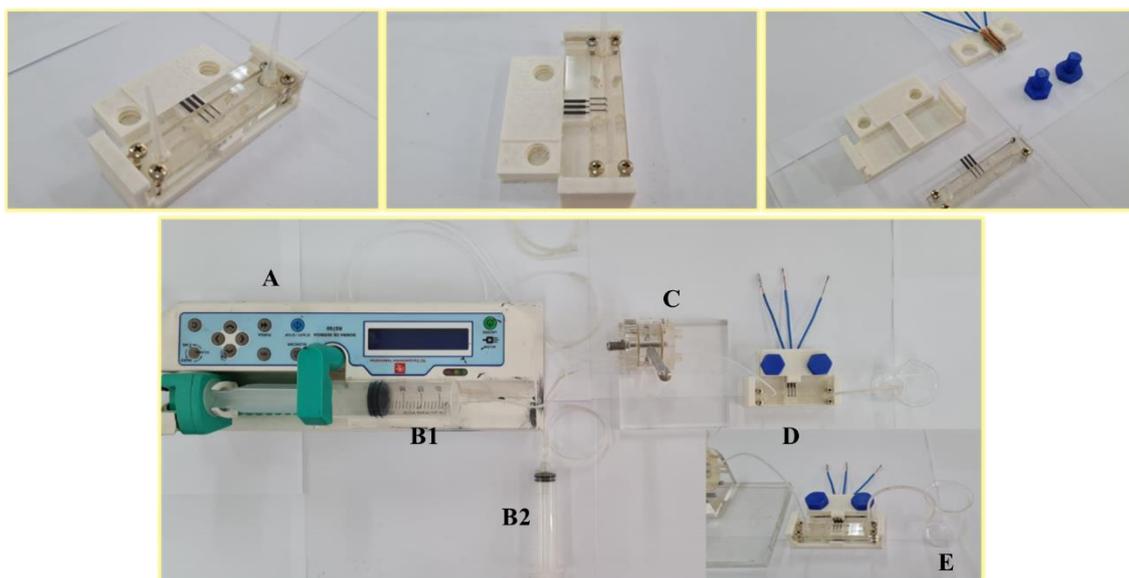


Figura 78. Montagem do dispositivo portátil proposto em impressão 3D para detecção eletroquímica portátil. (A) Bomba de seringa. (B1) Seringa com PBS. (B2) Seringa com amostra. (C) Válvula injetora comutadora. (D) Dispositivo eletroquímico. (E) Descarte de amostra. Fonte: Elaborado pelo autor.

9.3 Caracterização Morfológica e Eletroquímica dos Sensores

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT204 com módulo de impedância FRA32M gerenciado pelo software NOVA 2.1.4 (Metrohm, Holanda). A tinta condutora foi misturada e moída com uma centrífuga assimétrica dupla (DAC) SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K (FlackTec Inc) e os caminhos dos eletrodos foram fornecidos com uma impressora de corte (Silhouette, Cameo 3) [294]. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) do modelo Prisma E da Thermo Fisher Scientific com tecnologia ColorSEM e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva integrada (EDS) foi usada para a aquisição de imagens MEV.

Medições de voltametria cíclica (CV) foram realizadas de $-0,2$ a $+1,0$ V para L-Dopa a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , e medições de voltametria de pulso diferencial (DPV) foram realizadas com uma amplitude de modulação de 90 mV ; tempo de modulação de 40 ms e incremento de potencial de 8 mV para a determinação de L-Dopa. Para a determinação de DA, foram realizadas medidas de CV de $-0,2$ a $+1,0$ V a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e medidas FIA amperométricas com potencial aplicado de $+0,45 \text{ V}$; velocidade de fluxo de $150 \mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de $200 \mu\text{L}$.

9.4 Preparo de Amostras

Para avaliar a eficiência do sensor proposto na determinação de L-Dopa, uma formulação farmacêutica contendo o analito alvo foi analisada [295]. Para isso, o medicamento estudado foi o Parkidopa® (Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda) contendo cada comprimido de 250 mg de L-Dopa. Dois comprimidos de L-Dopa foram macerados com pilão e almofariz e diluídos em tampão Britton-Robinson (pH 4,0) para adquirir uma solução estoque de concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com base na descrição do medicamento e metodologia proposta pela literatura [295]. A solução estoque foi então homogeneizada com auxílio de banho de ultrassom por 5 minutos, seguido de agitação por 30 segundos. Para a determinação de L-Dopa, na amostra farmacêutica, foram realizados testes de recuperação. Nesse sentido, a partir dos valores rotulados, foi realizada a diluição da solução amostral em tampão Britton-Robinson (pH 4,0) para

atingir três concentrações diferentes (20,0, 25,0 e 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de L-Dopa, dentro da faixa linear de detecção da curva analítica.

Para avaliar a eficiência do sensor proposto na determinação de DA, foi preparada urina sintética seguindo a literatura com adaptações [267]. A amostra foi composta por uma mistura de ureia 170,0 mmol L^{-1} , cloreto de cálcio dihidratado 2,5 mmol L^{-1} , sulfato de sódio anidro 10,0 mmol L^{-1} , ácido úrico 0,4 mmol L^{-1} e creatinina 7,0 mmol L^{-1} , 2,0 mmol L^{-1} ácido cítrico, 25,0 mmol L^{-1} cloreto de amônio e 90,0 mmol L^{-1} cloreto de sódio. Para análise DA, a urina sintética foi adicionada com 3 concentrações diferentes de DA (5,0, 20,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), que estavam dentro da faixa de trabalho linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 Caracterização Morfológica e Eletroquímica

A morfologia dos eletrodos condutivos à base de tinta de grafite foi caracterizada por MEV e as imagens obtidas são mostradas na Figura 79A-D. As regiões em amarelo na Figura 79-A mostram os pseudoeletrodos de referência, de trabalho e contra eletrodo após a deposição da tinta condutiva. Conforme observado em diferentes magnitudes de amplificação (Figura 79-B e C), as imagens obtidas revelaram uma superfície com lâminas de grafite distribuídas homogeneamente. A presença de grafite pode ser comprovada pela tecnologia ColorSEM na Figura 79-D. Além disso, a camada de tinta apresentou uma topografia com presença de cavidades, características que contribuem para o aumento da área eletroativa e condutividade do sensor. O mapeamento químico EDS mostrou a estimativa semiquantitativa dos elementos no eletrodo, atestando a presença de carbono e oxigênio (Figura 80).

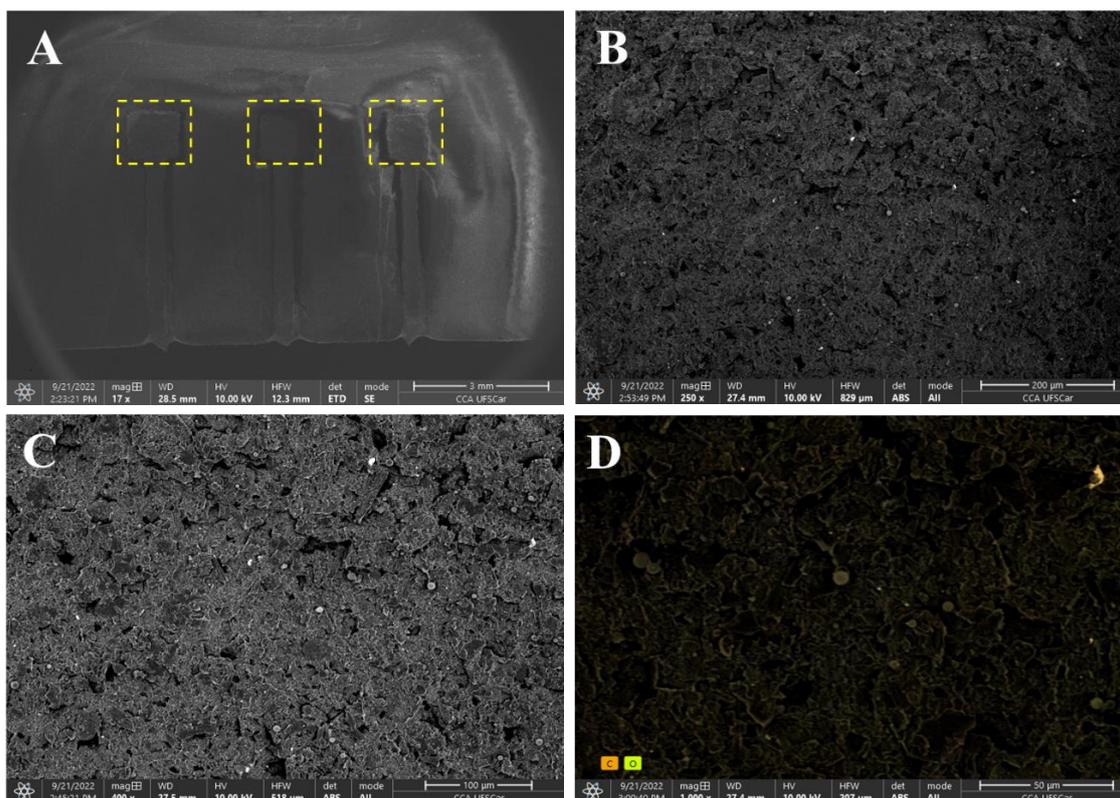


Figura 79. Imagens MEV do eletrodo com uma ampliação de (A) 17x, (B) 250x e (C) 400x. (D) Tecnologia ColorSEM mostra carbono e oxigênio na superfície do eletrodo, ampliação de 1000x. Fonte: Elaborado pelo autor.

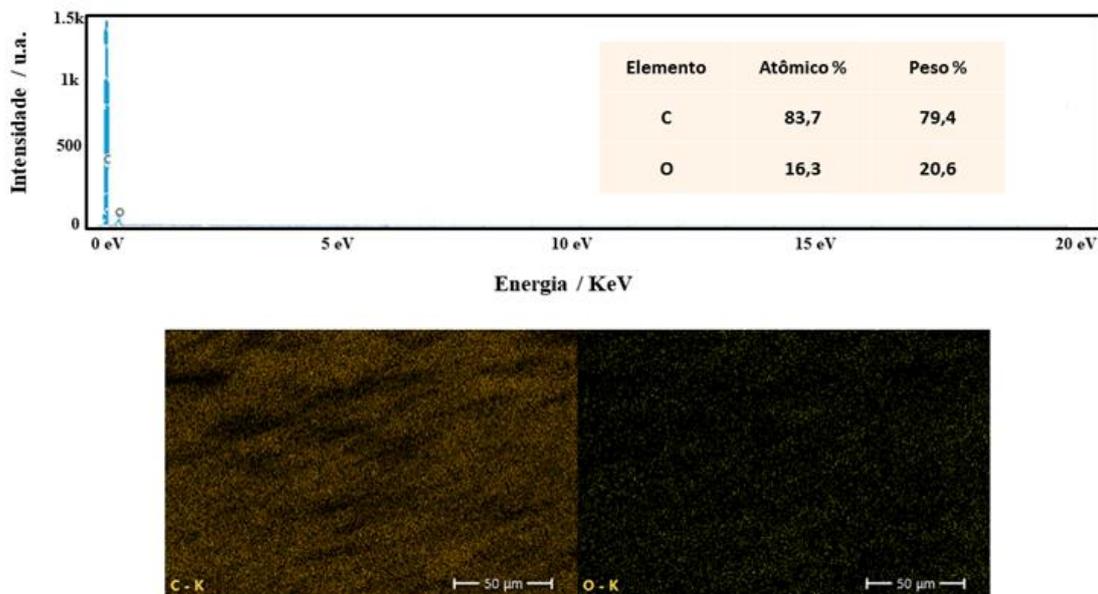


Figura 80. EDS com mapeamento da tecnologia ColorSEM da distribuição dos elementos químicos na superfície do eletrodo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a caracterização físico-química da superfície do eletrodo, foram realizadas caracterizações eletroquímicas usando CV para estudar os processos que ocorrem no eletrodo (Figura 81). É possível observar que com o aumento da velocidade de varredura, a relação das correntes de pico catódica e anódica permanece em $1,08 \pm 0,1$ e ΔE_p de $0,073 \pm 0,001$ V (Tabela 15), indicando comportamento semi-reversível.

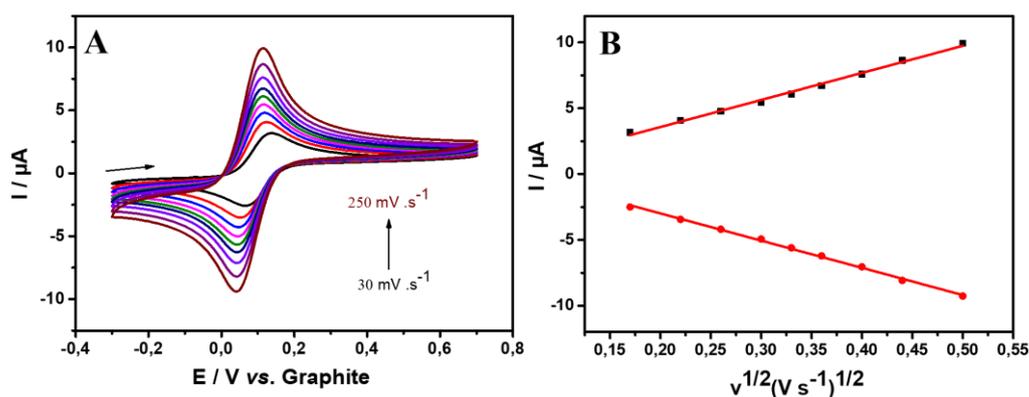


Figura 81. Voltamogramas cíclicos para ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ variando a velocidade de varredura em 30, 50, 70, 90, 110, 130, 160, 200 e 250 mV s^{-1} . (B) Gráfico de pontos I versus $v^{1/2}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 15. Parâmetros voltamétricos obtidos para FcMeOH em diferentes velocidades de varredura de potencial (mV s^{-1}). Fonte: Elaborado pelo autor.

V (mV s^{-1})	I_{pa}/I_{pc}	ΔE_p
30	$1,08 \pm 0,01$	$0,071 \pm 0,001$
50	$1,08 \pm 0,01$	$0,072 \pm 0,001$
70	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$
90	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$
110	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$
130	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$
160	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$
200	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$
250	$1,08 \pm 0,01$	$0,073 \pm 0,001$

A área eletroativa do eletrodo de trabalho foi estimada por voltametria cíclica com base na equação de Randles-Ševčíck em velocidades de varredura variando de 30 a 250 mV s^{-1} , usando uma solução de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Foi obtido um valor de $0,027 \text{ cm}^2$. A área geométrica do eletrodo é aproximadamente 2 vezes menor ($0,014 \text{ cm}^2$) que a área da superfície eletroativa do eletrodo. A maior área de superfície eletroativa do eletrodo em aproximadamente 2 vezes pode ser atribuída as cavidades observadas no eletrodo fabricado com tinta condutiva à base de carbono (Figura 79B-C), aumentando as propriedades eletroquímicas do eletrodo. A Figura 81, relacionando o gráfico da corrente de pico *versus* raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), apresenta um comportamento linear, indicando que a reação é característica de um processo típico de controle de difusão [296].

10.2 Caracterização e Detecção Eletroquímica de L-Dopa

Para demonstrar o potencial de aplicação do dispositivo eletroquímico proposto, diferentes analitos e sistemas foram investigados. Primeiro, a determinação de L-Dopa foi realizada por DPV usando a plataforma de três eletrodos. Para alcançar um melhor desempenho eletroquímico do sensor, o estudo de pH foi realizado para verificar o melhor sinal (corrente e deslocamento de potencial) para o analito usando soluções tampão Britton-Robinson (pH 3,0 a 7,0). Os voltamogramas cíclicos e os perfis redox são

mostrados na Figura 82. É possível observar que o pH influenciou o comportamento eletroquímico da L-Dopa, ocorrendo um deslocamento do potencial de pico de oxidação da L-Dopa para valores mais positivos com o aumento do pH.

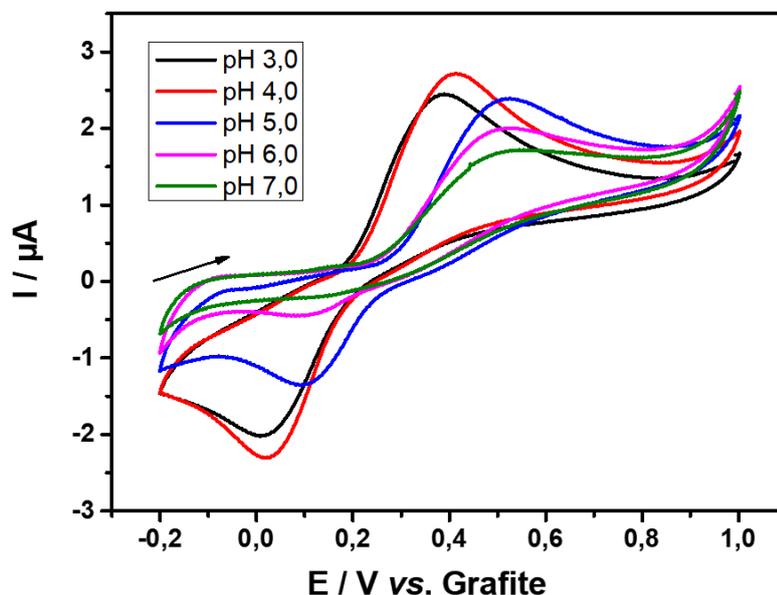


Figura 82. Efeito do pH nas características voltamétricas de L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} ; Eletrólito de suporte: solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Isso demonstra a participação direta dos prótons na etapa de oxidação do analito. A partir dos voltamogramas cíclicos, observa-se uma diminuição gradativa do I_{pc} com o aumento do pH da solução. Essa diminuição gradual do I_{pc} em valores de pH superiores a 4,0 pode estar ocorrendo devido ao grupo amina desprotonado na estrutura da quinina de cadeia aberta, que atua como um agente nucleofílico [297]. Assim, o valor de pH de 4,0 foi considerado a melhor condição para estudos posteriores, pois proporcionou melhor perfil redox e maior corrente I_{pa} . Após o estudo do pH, foi obtido um voltamograma para L-Dopa, mostrando picos de oxidação e redução bem definidos, demonstrando a reversibilidade do sistema (Figura 83-A). O eletrodo apresentou um pico de oxidação em $+0,40 \text{ V}$ e um pico de redução em $+0,04 \text{ V}$. A oxidação eletroquímica da L-Dopa envolve dois elétrons e dois prótons, conforme mostrado no mecanismo da Figura 83-B.

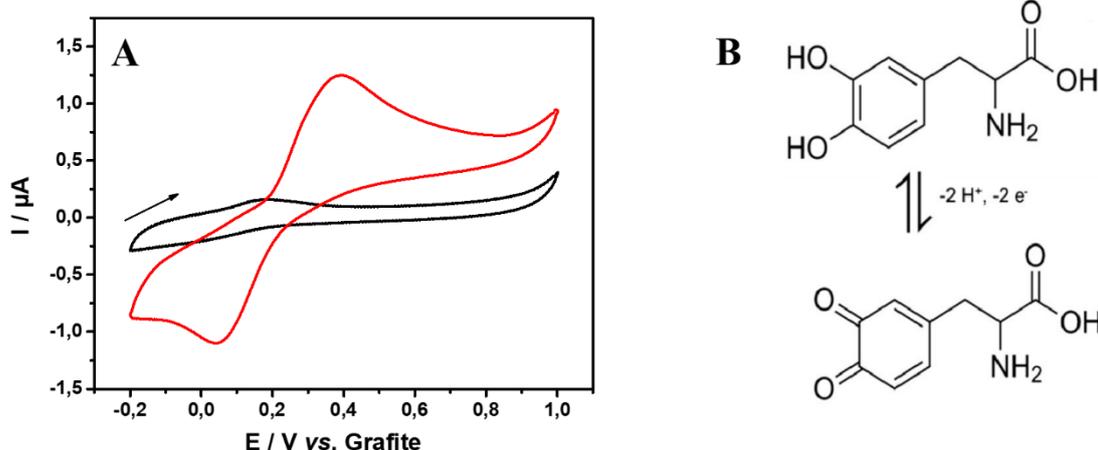


Figura 83. (A) Voltamogramas cíclicos na ausência (—) e presença (—) de L-Dopa $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) para o eletrodo proposto; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . (B) Mecanismo eletroquímico de oxirredução da L-Dopa. Fonte: Elaborado pelo autor.

Diferentes técnicas voltamétricas foram testadas para avaliar a resposta eletroquímica de L-Dopa. Para isso, foram realizadas medições para uma solução contendo L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando as técnicas SWV e DPV, e os respectivos voltamogramas são mostrados na Figura 84. Um valor de corrente de pico mais alto foi obtido por DPV ($0,064 \mu\text{A}$) em comparação com SWV ($0,024 \mu\text{A}$).

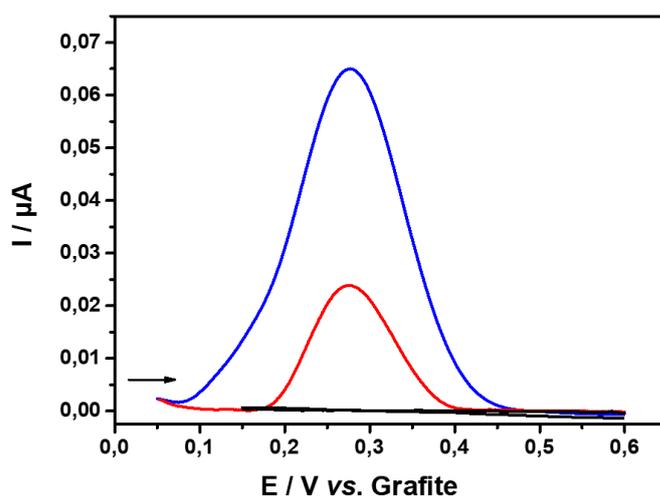


Figura 84. Comparação entre as técnicas SWV (—) e DPV (—) na presença de L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e na ausência de L-Dopa (—), usando uma solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) para o eletrodo proposto. Parâmetros SWV: $f = 10 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\text{step } 1 \text{ mV}$; Parâmetros DPV: $a = 50 \text{ mV}$, tempo de modulação = 25 ms , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Portanto, a técnica DPV foi selecionada para experimentos posteriores. Após a seleção da técnica, a otimização dos parâmetros operacionais de DPV (amplitude, tempo de modulação e incremento de potencial) foi realizada para garantir a melhor resposta eletroquímica (Figura 85). Observa-se que o aumento dos valores do incremento de potencial a um aumento da resposta de corrente, sendo escolhido um incremento de potencial de 8 mV para experimentos posteriores, pois para valores maiores foi observado um aumento na largura do pico, assim como um aumento do desvio padrão (Figura 85-A). O mesmo aumento na resposta de corrente foi observado para a variação de amplitude, onde um máximo na resposta de corrente é alcançado na amplitude de 100 mV (Figura 85-B). No entanto, o valor de 70 mV foi selecionado por ter o menor RSD. Portanto, esse valor foi selecionado para etapas seguintes. Também pode ser visto que o aumento no tempo de modulação aumenta a corrente de pico de L-Dopa (Figura 85-C) e, como são direcionadas respostas eletroquímicas mais altas, o tempo de modulação de 40 ms foi escolhido por apresentar um menor RSD.

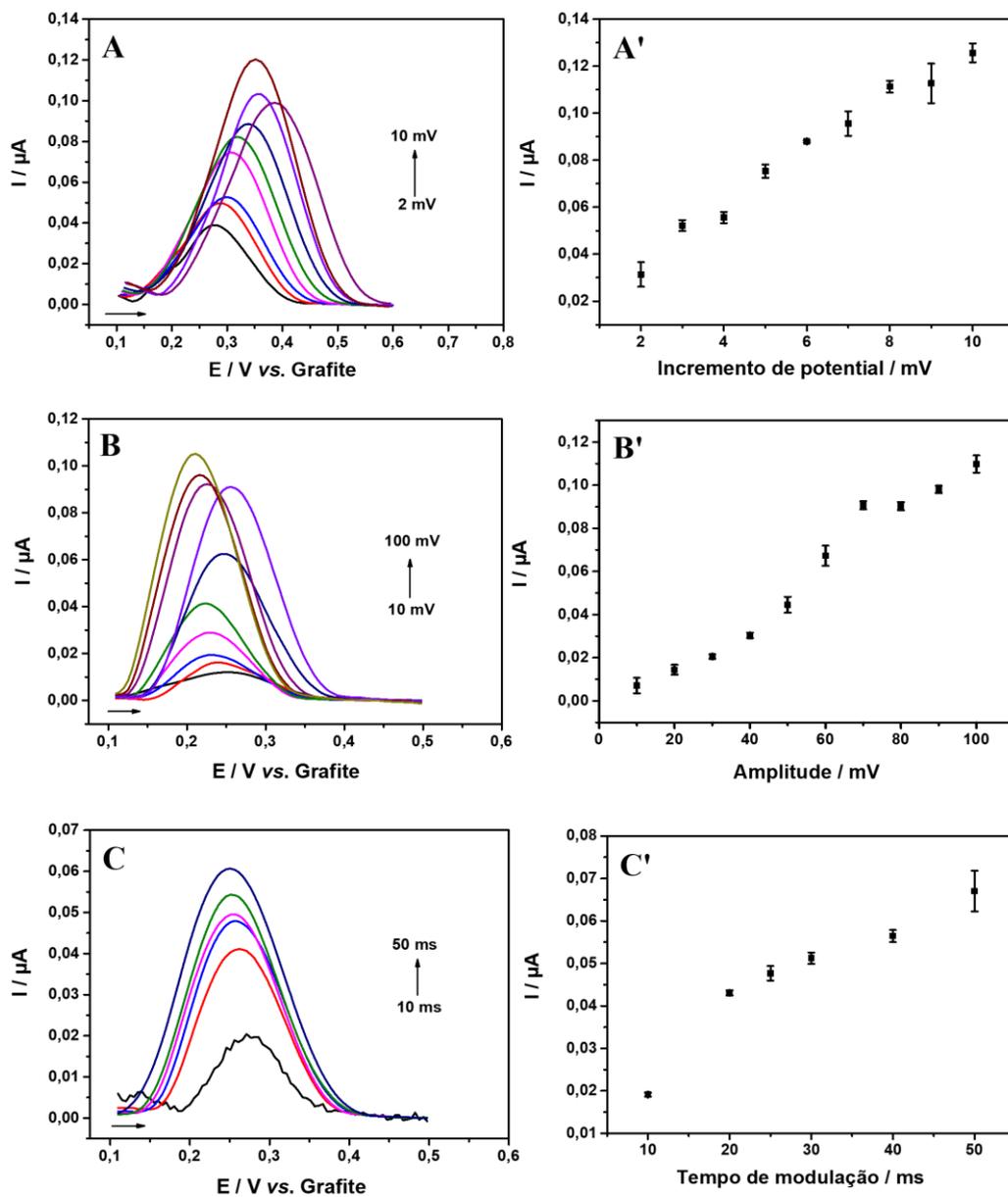


Figura 85. Resposta DPV para L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) obtida em diferentes (A) incremento de potencial (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mV), (B) amplitude (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV) e (C) tempo de modulação (10, 20, 25, 30, 40 e 50 ms), e respectivos gráficos de corrente de pico *versus* parâmetros variados (A'-C'). Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os parâmetros, faixas estudadas e valores escolhidos durante a otimização estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16. Otimização de parâmetros para técnica de voltametria de pulso diferencial. Fonte: Elaborado pelo autor.

Parâmetro estudado	Faixa estudada	Valor selecionado
Incremento de potencial	1 a 10 mV	8 mV
Tempo de modulação de pulso	10 a 50 ms	40 ms
Amplitude	10 a 100 mV	90 mV

Sob condições experimentais otimizadas, uma curva de calibração foi obtida para concentrações crescentes de L-Dopa. Foram realizadas medidas sucessivas de L-Dopa em diferentes concentrações no intervalo de 5,0 a 1000,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo voltamogramas para cada concentração (Figura 86-A). É possível observar um aumento linear na corrente de pico com a adição sucessiva e crescente de L-Dopa (Figura 86-B). As medidas para cada concentração foram realizadas com o mesmo eletrodo, sendo possível observar uma boa estabilidade do sensor. A curva apresentou um coeficiente de determinação de linearidade ($R^2=0,999$), e a regressão mostra que os dados seguem a equação $I_p (\mu\text{A}) = -0,0247 (\pm 0,0017) + 0,0046 (\pm 7,9993 \times 10^{-5}) C_{\text{L-Dopa}} (\mu\text{mol L}^{-1})$.

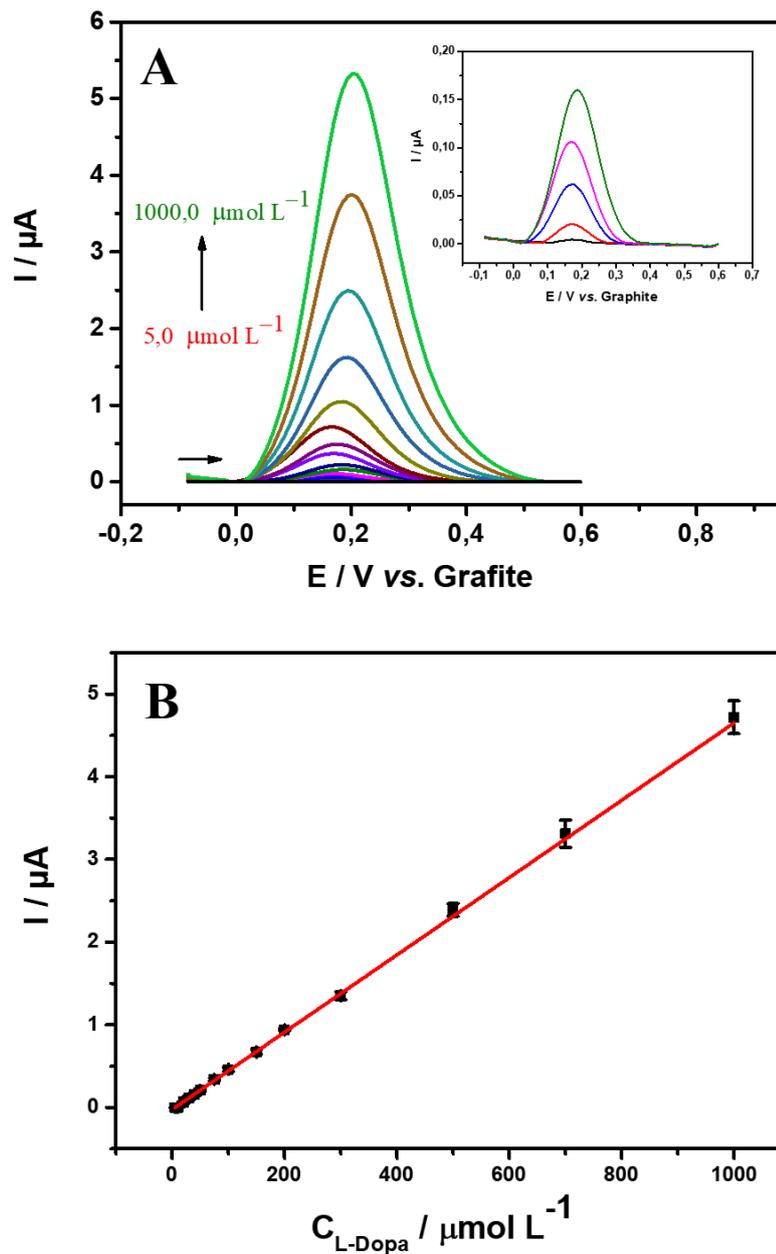


Figura 86. (A) Voltamograma de pulso diferencial obtido em solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) em diferentes concentrações de L-Dopa ($5,0$; $10,0$; $20,0$; $30,0$; $40,0$; $50,0$; $75,0$; $100,0$; $150,0$; $200,0$; $300,0$; $500,0$; $700,0$ e $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). (B) Gráfico da corrente de pico *versus* concentração de L-Dopa, obtido a partir de A. Condições experimentais DPV: amplitude: 90 mV ; tempo de modulação: 40 ms ; incremento de potencial: 8 mV s^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor.

O limite de detecção (LOD) foi calculado de acordo com 3 vezes o desvio padrão do intercepto linear sobre a sensibilidade analítica da curva de calibração [282], e forneceu um valor igual a $0,11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Para demonstrar a precisão do sensor (Figura 87), um teste de repetibilidade ($n = 10$) foi realizado após registros sucessivos de DPV e

mostrou um valor de desvio padrão relativo (RSD) de 1,44%, demonstrando que o sensor proposto apresenta desempenho satisfatório.

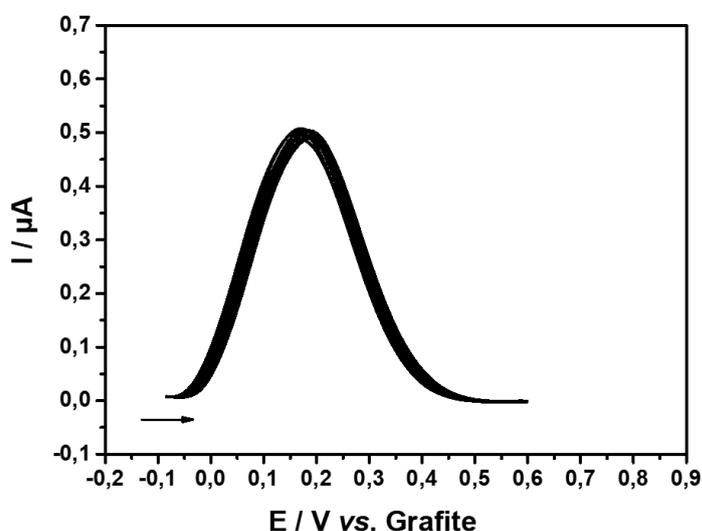


Figura 87. Dados de repetibilidade obtidos a partir de sucessivos voltamogramas de pulso diferencial ($n = 10$) usando uma solução de L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; Eletrólito de suporte: solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Fonte: Elaborado pelo autor.

O dispositivo proposto também foi aplicado para detecção de L-Dopa em uma amostra farmacêutica contendo o analito alvo. O valor de concentração encontrado e os valores de recuperação são apresentados na Tabela 17. Com este método, foi possível obter valores de recuperação entre $95,57 \pm 1,18\%$ e $100,41 \pm 3,09\%$ para a amostra do fármaco. Além disso, para demonstrar a reutilização da plataforma removendo e adicionando uma nova camada de tinta, cinco sensores diferentes foram testados realizando medições de DPV em uma solução contendo L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e os voltamogramas são mostrados na Figura 88. Um baixo valor de RSD (1,70%) foi obtido, indicando que a construção dos sensores é reprodutível.

Tabela 17. Quantificação de L-Dopa em amostra de fármaco com três níveis diferentes de concentração e a diferença entre a quantidade esperada rotulada. Fonte: Elaborado pelo autor.

Amostra	Fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Parkidopa	20,0	$20,08 \pm 0,85$	$100,41 \pm 3,09$
	25,0	$23,89 \pm 0,38$	$95,57 \pm 1,18$
	35,0	$33,94 \pm 2,59$	$96,97 \pm 5,16$

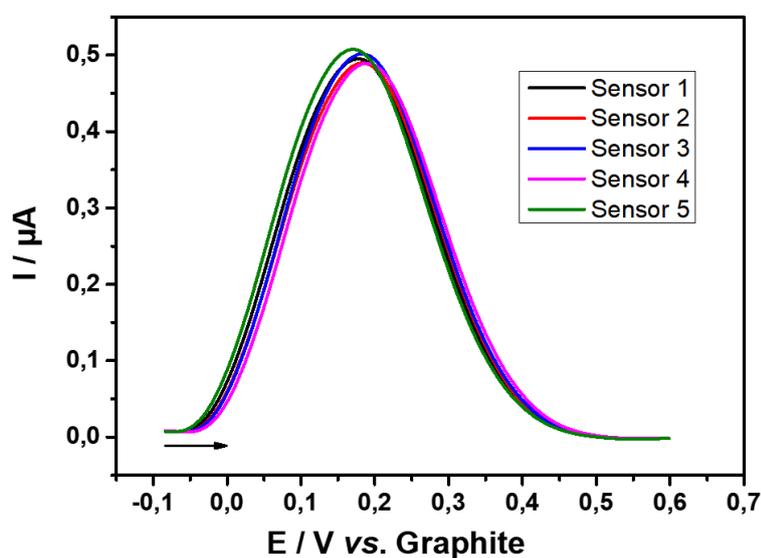


Figura 88. Dados de reprodutibilidade ($n = 5$) obtidos a partir de sucessivos voltamogramas de pulso diferencial ($n = 5$) usando uma solução de L-Dopa $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Sensor 1: (—), sensor 2: (—), sensor 3: (—), sensor 4: (—) e sensor 5: (—); Eletrólito de suporte: solução BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Fonte: Elaborado pelo autor.

Um estudo de interferência foi realizado para avaliar o comportamento de L-Dopa na presença de outras moléculas normalmente presentes em amostras farmacêuticas e biológicas [298] como paracetamol, ácido ascórbico, ácido úrico, glicose e dopamina. Para isso, os possíveis interferentes foram avaliados na proporção de 1:1 (L-Dopa: interferente), fixando a concentração de L-Dopa em $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Estudo de seletividade no sinal DPV de L-Dopa 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Interferentes	(L-Dopa: interferente)	Variação do sinal (%)
Paracetamol	(1:1)	+ 8,75
Ácido ascorbico	(1:1)	-9,45
Ácido úrico	(1:1)	- 7,93
Glicose	(1:1)	- 6,18
Dopamina	(1:1)	+ 94,36

Pode-se notar que na presença de dopamina, houve interferência significativa na resposta da L-Dopa, com aumento da resposta atual de 94,36%. Essa interferência já foi relatada na literatura na detecção de L-Dopa [299, 300], e provavelmente ocorre porque os analitos são da mesma família das catecolaminas e oxidam em potenciais de pico idênticos. Uma solução para melhorar a seletividade desse sistema é o uso de modificadores de superfície de eletrodos, que podem aumentar a seletividade dos sensores. Isso foi demonstrado por Stanković *et al.* [301] que, modificando o sensor com microesferas de MnO_2 semelhantes a dente-de-leão, demonstraram que a corrente de pico de oxidação DA era o dobro da L-Dopa, diferenciando assim as correntes destes analitos.

O desempenho analítico do sensor proposto foi comparado com outros dispositivos eletroquímicos já relatados na literatura para detecção de L-Dopa, conforme apresentado na Tabela 19. Por exemplo, Guo *et al.* [302] desenvolveram um sensor eletroquímico para detectar L-Dopa de In_2S_3 em um eletrodo de vidro ITO modificado com grafeno 3D. Embora o LOD ($0,087 \mu\text{mol L}^{-1}$) relatado para o trabalho seja relativamente menor do que o LOD observado em para o trabalho proposto, todo o processo para obtenção do sensor requer mais de 13h. Além disso, a utilização de um reator hidrotérmico para a síntese de In_2S_3 NSPs/3D Gr torna o produto final mais caro e inacessível em regiões com menor investimento tecnológico. Outro exemplo de trabalho que utiliza a síntese de materiais para a construção de sensores foi realizado por Afkhami

et al. [303]. Através da síntese de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) foi possível obter uma maior separação do pico de oxidação da L-Dopa na presença de ácido ascórbico. Ji *et al.* [304] usando eletrodos impressos em tela modificados com nanopartículas de ouro (AuNPs), nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e quitosana, mostraram alta sensibilidade para L-Dopa. Os nanotubos de carbono de parede simples e as nanopartículas de ouro, além de proporcionarem melhor desempenho do eletrodo, possuem excelente condutividade. Já a quitosana, devido a sua excelente capacidade de formação de filme, alta permeabilidade, boa adesão, atoxicidade e baixo custo, foi utilizada para melhorar a adesão de AuNPs e o SWCNT aumentou a estabilidade do sensor. Pode-se constatar que o sensor proposto apresenta desempenho analítico semelhante aos relatados na Tabela 19. Porém, como grande vantagem, não requer materiais e modificações e todo o processo de produção do sistema leva cerca de 5 horas. Além disso, a plataforma eletroquímica pode ser reaproveitada para confecção de novos eletrodos, o que torna a construção dos sensores simples, rápida e de baixo custo.

Tabela 19. Desempenho analítico do sensor proposto para determinação de L-Dopa comparado com a literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Eletrodo	Técnica	LDR ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Aplicação	Refs.
ZnO NFs-rGO NSs	DPV	1,0 a 60	1,0	Urina	[305]
In ₂ S ₃ NSPs/3D Gr	DPV	0 a 60	0,087	Soro	[302]
pCAF	SWV	1,0 a 50,0	0,14	Soro fetal bovino	[306]
Fe ₂ O ₃ NP-MWCNT	DPV	0,1 a 8,0	0,21	Comprimidos farmacêuticos	[307]
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ /MWCNT	DPV	10 a 600	2,0	Urina	[308]
PG/ZnO/CNTs/CPE	DPV	5,0 a 500,0	0,08	Preparações farmacêuticas e urina	[303]
SWCNT/AuNPs/chitosan	DPV	0,5 a 200	0,1	Soro	[304]
nPt-5ADMBCNPE	DPV	0,50 a 100,0	0,31	Amostras farmacêuticas e produtos lácteos	[309]
MoS ₂ -GR	DPV	5,0 a 60	0,30	Plasma humano	[310]
Eletrodo de grafite reutilizável	DPV	5,0 a 1000	0,11	Farmacêutica	Este trabalho

LDR: Faixa dinâmica linear; **ZnO NFs-rGO NSs:** nanofolhas de ZnO-óxido de grafeno; **In₂S₃ NSPs/3D Gr:** Nanosferas de sulfeto de índio/grafeno tridimensional; **pCAF:** poli (ácido cafeico); **Fe₂O₃NP-MWCNT:** nanopartículas de óxido de ferro (III) - nanotubos de carbono de paredes múltiplas; **PG/ZnO/CNTs/CPE:** poliglicina/nanopartículas

de ZnO/eletrodo de pasta de carbono modificada com nanotubos de carbono de paredes múltiplas; **nPt-5ADMBCNPE**: Eletrodo de Pasta de Nanotubos de Carbono-Pt Nanopartículas; **MoS₂-GR**: Nanoflakes de dissulfeto de molibdênio-grafeno.

10.3 Caracterização e Detecção Eletroquímica de Dopamina em Sistema de Injeção em Fluxo (FIA)

A aplicabilidade do sensor também foi avaliada na detecção FIA-amperométrica de DA. Para isso, o eletrodo de trabalho foi associado a um sistema analítico de fluxo (FIA) com o auxílio de uma plataforma portátil impressa em 3D. Inicialmente, a técnica CV foi usada para investigar o comportamento voltamétrico de DA no eletrodo proposto usando uma solução de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) na presença de DA $200,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . A Figura 89-A apresenta os voltamogramas obtidos para o sensor na presença (linha vermelha) e na ausência (linha preta) de DA. O par redox obtido na voltametria cíclica caracteriza o processo de oxidação inicial (+0,42 V) da molécula, onde é possível observar o processo inverso (+0,21 V), com a presença do pico de redução. O mecanismo de reação da dopamina à Dopaminaquinona é mostrado na Figura 89-B.

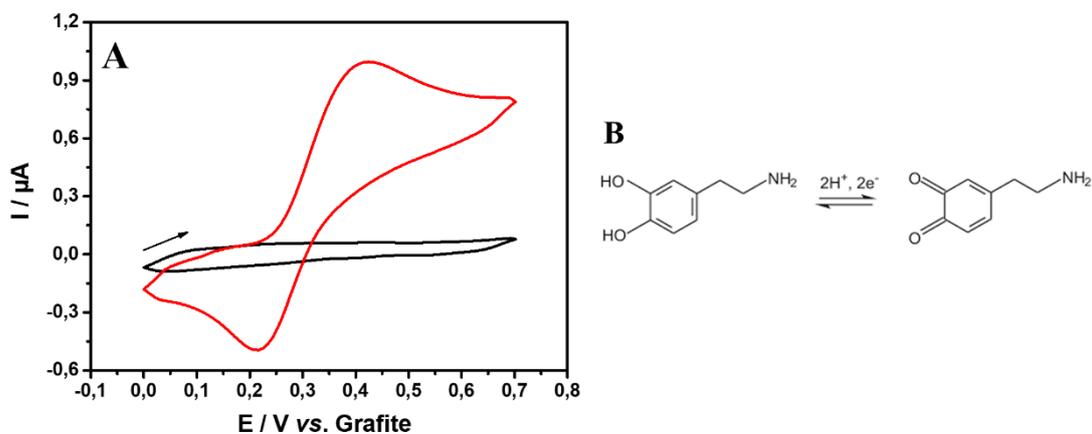


Figura 89. (A) Voltamogramas cíclicos na ausência (—) e presença (—) de DA $200,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) usando o eletrodo proposto; Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . (B) Mecanismo eletroquímico de oxirredução de DA. Fonte: Elaborado pelo autor.

O próximo passo foi investigar os efeitos do potencial de trabalho, vazão e volume de injeção, a fim de obter o maior sinal analítico para determinação de DA. A Figura 90 mostra a influência do potencial de trabalho (+0,30 a +0,60 V) no sinal de corrente de pico anódico da DA. O sinal analítico aumentou com o aumento do potencial de trabalho para valores mais positivos, até +0,50 V e seguindo uma diminuição em +0,60 V.

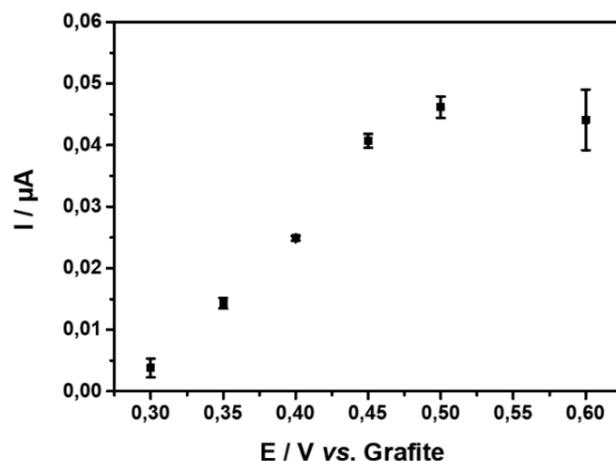


Figura 90. Gráfico de potencial aplicado *versus* altura da corrente de pico. Solução padrão de DA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Potencial aplicado: 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 e 0,60 V; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial de trabalho de $+0,45 \text{ V}$ foi escolhido por apresentar o menor desvio padrão. Além disso, potenciais acima de $+0,45 \text{ V}$ pode levar à oxidação de espécies interferentes. O estudo de vazão também foi realizado (50 a $250 \mu\text{L min}^{-1}$), e o resultado é mostrado na Figura 91.

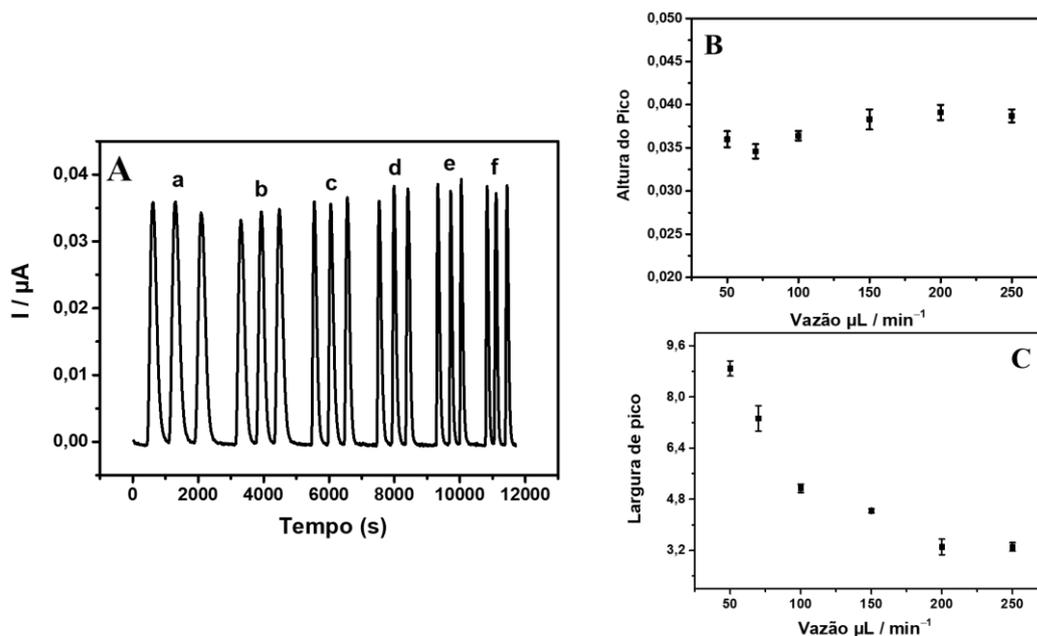


Figura 91. Estudo sobre o efeito da vazão no sistema FIA usando uma solução de DA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no eletrodo. Vazão: (a) 50, (b) 70, (c) 100, (d) 150, (e) 200 e (f) $250 \mu\text{L min}^{-1}$; Volume de injeção: $100 \mu\text{L}$; Potencial aplicado: $0,45 \text{ V}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

A vazão ótima selecionada para detecção de DA foi de $150 \mu\text{L min}^{-1}$, devido ao maior sinal de corrente ($0,037 \mu\text{A}$) em comparação com as menores vazões estudadas. Vazões inferiores fornecem menores valores de corrente e picos mais largos, ocasionado por uma maior dispersão da zona da amostra na tubulação [311]. Além disso, vazões mais baixas podem levar a contaminação da superfície do eletrodo. Embora a vazão de $250 \mu\text{L min}^{-1}$ apresente um sinal de corrente mais alto ($0,039 \mu\text{A}$) do que a vazão selecionada, ele não foi selecionado a fim de minimizar o consumo de reagentes. Além disso, a largura do pico para $150 \mu\text{L min}^{-1}$ apresentou um desvio padrão menor em comparação com $250 \mu\text{L min}^{-1}$.

Outro parâmetro estudado foi o volume de injeção (50 a $250 \mu\text{L}$) e o resultado é mostrado na Figura 92. Pode ser visto que o sinal de corrente aumenta ligeiramente com o aumento do volume de injeção. Este aumento ocorre devido a maior quantidade de moléculas do analito que entram em contato com a superfície do eletrodo. O volume de injeção selecionado foi de $200 \mu\text{L}$, que apresentou um valor de corrente de $0,053 \mu\text{A}$. Embora o sinal de corrente obtido a $250 \mu\text{L}$ ($0,061 \mu\text{A}$) tenha sido maior, optou-se também por utilizar um baixo volume de amostra para garantir um menor consumo de reagente.

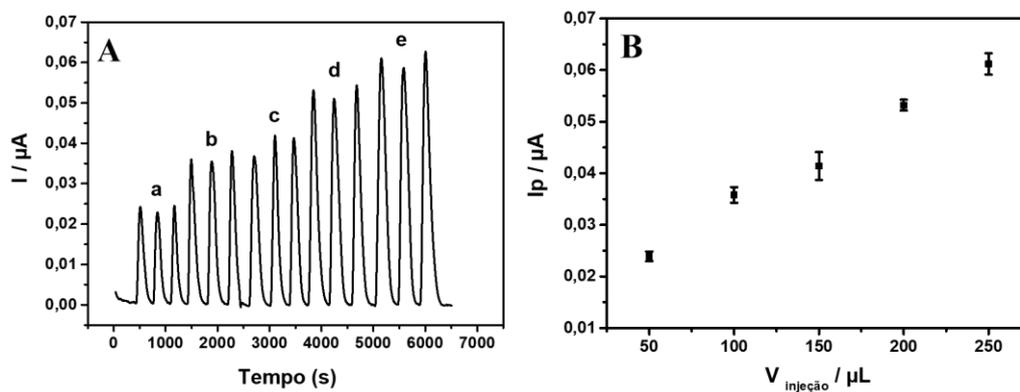


Figura 92. Otimização do volume de injeção no sistema FIA usando uma solução de DA $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no eletrodo; Volume de injeção: (a) 50, (b) 100, (c) 150, (d) 200 e (e) 250 μL ; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Potencial aplicado: $0,45 \text{ V}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os parâmetros, faixas estudadas e valores escolhidos durante a otimização estão demonstrados na Tabela 20.

Tabela 20. Otimização de parâmetros para sistema FIA. Fonte: Elaborado pelo autor.

Parâmetro estudado	Faixa estudada	Valor selecionado
Potencial	0,30 a 0,60 V	0,45 V
Vazão	50 a 250 $\mu\text{L min}^{-1}$	150 $\mu\text{L min}^{-1}$
Volume de injeção	50 a 250 μL	200 μL

Sob condições otimizadas, a aplicabilidade do eletrodo foi avaliada para a determinação de DA (Figura 93-A). Um comportamento linear foi obtido em uma faixa de concentração variando de 2,0 a 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme observado na curva analítica (Figura 93-B), seguindo a equação: $I (\mu\text{A}) = -8,7034 \times 10^{-4} (\pm 4,866 \times 10^{-4}) + 0,0018 (\pm 3,233 \times 10^{-5}) C_{\text{DA}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, com R^2 de 0,998. O LOD para DA foi calculado considerando 3 vezes o desvio padrão da corrente antes da primeira injeção (120s) sobre a sensibilidade analítica da curva de calibração, e o valor de 0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi obtido. A frequência analítica calculada foi de 9 injeções por hora.

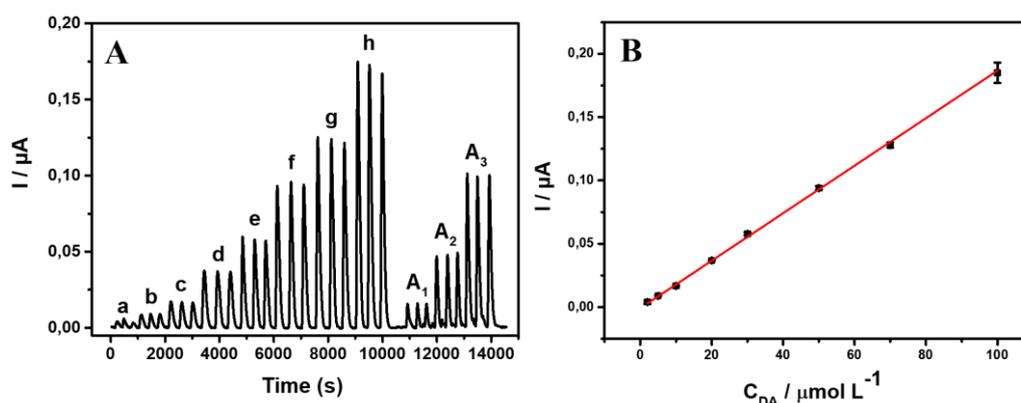


Figura 93. (A) Amperograma obtido pelo sistema FIA para a determinação de DA em amostras de urina sintética (A1, A2, A3). (B) Curva analítica para DA (I_p versus C_{DA}), obtido de A. Concentração das soluções de DA: (a) 2,0, (b) 5,0, (c) 10,0, (d) 20,0, (e) 30,0, (f) 50,0, (g) 70,0 e (h) 100,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Potencial aplicado: 0,45 V; Vazão: 150 $\mu\text{L min}^{-1}$; Volume de injeção: 200 μL . Solução de transporte: PBS 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Fonte: Elaborado pelo autor.

Para demonstrar a precisão do sensor, foi realizado um teste de repetibilidade ($n = 10$), mostrando um valor RSD de 4,91% (Figura 94). Nota-se no diagrama, que os sinais de corrente anódica da DA não decresce linearmente entre a primeira e última injeção do analito. Essa característica demonstra que não uma mudança significativa na superfície

eletroativa do eletrodo, indicando que não houve adsorção do analito, o que geralmente é um problema na aplicação deste método.

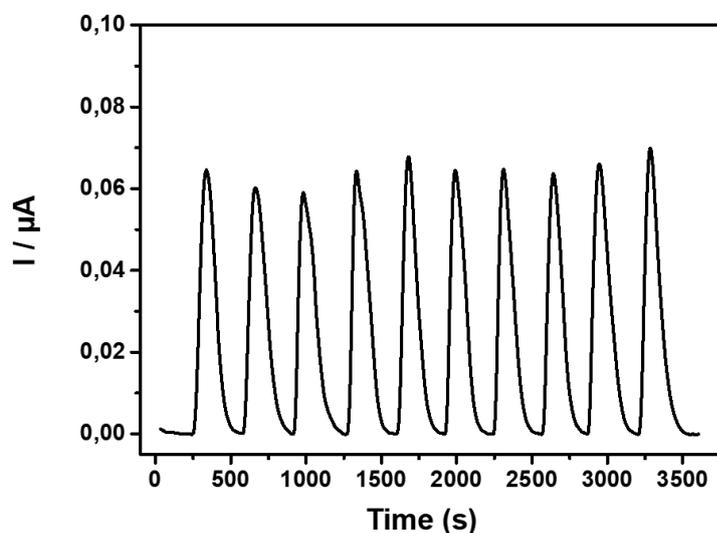


Figura 94. Injeções repetidas ($n = 10$) no sistema FIA usando uma solução padrão de DA $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) no eletrodo. Volume de injeção: $200 \mu\text{L}$; Vazão: $150 \mu\text{L min}^{-1}$; Potencial aplicado: $0,45 \text{ V}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

O eletrodo proposto foi aplicado na detecção de DA em amostra de urina sintética. Para isso, foi realizado um teste de recuperação após a fortificação da amostra com três concentrações diferentes de DA (A1, A2, A3) (Figura 93-A), e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de recuperação ($n = 3$) para adições de dopamina em amostras de urina sintética. Fonte: Elaborado pelo autor.

Amostra	Fortificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Urina sintética	5,0	$5,62 \pm 0,12$	$112,46 \pm 1,70$
	20,0	$22,86 \pm 0,41$	$114,28 \pm 1,58$
	50,0	$54,74 \pm 0,25$	$109,48 \pm 0,39$

Pela tabela, pode-se observar que foram obtidos valores de recuperação variando de $109,48\% \pm 0,39$ a $114,28\% \pm 1,58$, indicando que não há interferências de matriz da amostra. Além disso, foi realizado um estudo de possíveis interferentes presentes nas amostras a fim de avaliar a presença de diferentes compostos no sinal analítico de DA. Para isso, foi avaliada a seletividade do sensor na determinação de DA ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de possíveis espécies concomitantes encontradas em fluidos biológicos [92, 283] como ácido ascórbico, ácido úrico, ácido láctico, ácido acético ácido, glicose, creatinina, epinefrina e tirosina. Uma mistura de DA e interferente foi avaliada na proporção de 1:1 (dopamina: interferente). A Tabela 22 mostra os resultados de interferência obtidos para DA na presença de cada espécie. Pode-se notar que na presença de epinefrina, houve uma interferência significativa na resposta da dopamina, com aumento da resposta atual de 106,33%. Essa interferência já foi relatada na literatura para a detecção de dopamina [312-314]. Isso ocorre devido ambos analitos possuírem estrutura química semelhantes.

Tabela 22. Estudo de seletividade no sinal do diagrama de DA $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor.

Interferentes	(Dopamina: interferente)	Varição do sinal (%)
Ácido ascórbico	(1:1)	8,5
Ácido úrico	(1:1)	7,4
Ácido láctico	(1:1)	4,1
Ácido acético	(1:1)	4,9
Glicose	(1:1)	5,1
Creatinina	(1:1)	4,7
Epinefrina	(1:1)	106,33
Tirosina	(1:1)	2,79

O desempenho analítico do eletrodo proposto foi comparado com outros que empregaram o método FIA já relatado para detecção de DA, conforme apresentado na Tabela 23. Pode-se observar que vários tipos de eletrodos modificados foram relatados para detecção de DA. Por exemplo, del Pozo *et al.* [315] desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com o complexo Cucurbit[8]uril (CB[8]) e Nafion. Antes de cada modificação, o GCE foi polido com pasta de alumina seguido de enxágue com água ultrapura, sonificado três vezes alternadamente em etanol e água deionizada (30 s) e finalmente seco sob fluxo de nitrogênio. Outro exemplo de modificação do GCE foi realizado no trabalho de Chen *et al.* [316] onde os autores usaram nanotubos de carbono de paredes múltiplas, quercetina e nafion. Neste trabalho, o eletrodo compósito apresentou um potencial de pico anódico para dopamina de cerca de +0,37 V, comparado ao valor de +0,27 V com o eletrodo GCE não modificado. Esse deslocamento do potencial de oxidação ocorre devido à multicamada de modificadores na superfície do GCE, resultando também em uma maior resistência à corrente de difusão da DA. Quanto a outros trabalhos como o de Wong *et al.* [317] e Guimenes *et al.* [318], eletrodos convencionais como o eletrodo de diamante dopado com boro e eletrodos de carbono vítreo são usados, respectivamente. Embora esses eletrodos não precisem de modificações e tenham valores de LOD (0,011 e 0,05 $\mu\text{mol L}^{-1}$) melhores do que o observado neste trabalho, os autores observaram que o uso constante dos eletrodos pode levar a efeitos de memória, o que diminui seu desempenho eletroquímico. Assim, o eletrodo proposto neste capítulo para detecção de DA pode efetivamente competir com os eletrodos relatados anteriormente. Além disso, o eletrodo proposto não requer procedimentos de modificação e limpeza longos e tediosos, e a superfície do eletrodo pode ser renovada com uma nova camada de tinta de carbono de baixo custo, produzida em laboratório.

Tabela 23. Desempenho analítico do sensor para determinação de dopamina comparado com trabalhos da literatura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Eletrodo	LDR ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Frequência	Aplicação	Refs.
			Analítica (Injeções h^{-1})		
EVA-cobre (II)	1000 a 10000	870	25	Amostras farmacêuticas	[319]
Eletrodo de diamante dopado com boro	0,5 a 130	0,011	-	Amostras de soro e água do rio	[317]
Eletrodo de trabalho de carbono vítreo	1 a 100	0,05	40	-	[318]
SPCE/rGO/CBCC-Nafion	200 a 1000	27,8	-	-	[320]
Cucurbit[8]uril (CB[8])	0,07 a 10	0,026	55	Soro humano	[315]
Nafion/GCE	2000 a 10^7	1,5	-	-	[321]
Nafion/Q/MWCNTs/GCE	1,4 a 300	1,4	-	Soro humano	[316]
Carbono vítreo nu	0,4 to 20	0,05	-	Amostras farmacêuticas	[322]
Eletrodo de grafite reutilizável	2,0 to 100	0,26	9	Urina sintética	Este trabalho

LDR: Faixa dinâmica linear; **EVA:** poli(etileno-co-acetato de vinil); **SPCE:** Eletrodo impresso; **rGO:** Óxido de grafeno reduzido; **CBCC:** complexo de cloreto de bis(2,2'-bipiridil)cobre(II) ([Cu(bipy)₂Cl]Cl 5H₂O); **GCE:** Eletrodo de carbono vítreo; **P:** Quercetina; **MWCNTs:** Nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

CONCLUSÕES

Pela primeira vez que é apresentado um dispositivo de serigrafia com microfluídica totalmente integrado em uma única plataforma. O eletrodo apresentou excelente desempenho analítico para determinação de L-Dopa em uma ampla faixa linear de 5,0 a 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 0,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O eletrodo miniaturizado também permitiu a análise do analito em aproximadamente 50 μL de solução, o que o torna interessante na redução do custo dos reagentes. Além disso, o eletrodo foi avaliado em uma amostra farmacêutica, demonstrando eficiência em sua determinação. A associação do eletrodo a um sistema FIA em conjunto com o dispositivo impresso em 3D permitiu a determinação rápida e de baixo volume de amostra de DA. O desempenho analítico do sistema para determinação de DA apresentou LOD de 0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e apresentou potencial para determinação em amostra biológica apresentando recuperações entre 109,48 a 114,28% para detecção de DA em urina sintética. Portanto, o dispositivo eletroquímico proposto pode ser aplicado a diferentes analitos e sistemas, mostrando grande eficiência em todos os casos. Também permite que a superfície do substrato seja facilmente renovada com uma nova camada de tinta, diminuindo o custo de produção de novas plataformas eletroanalíticas.

CONCUSÃO GERAL

Esta tese descreve a utilização de diferentes substratos e meios de fabricação de eletrodos, visando a obtenção de novos dispositivos eletroquímicos completos para aplicações de interesse clínico. Estes novos dispositivos permitem possíveis aplicações em análises *point-of-care*, considerando que não possuem aparelhagem complexa e apresentam características interessantes como boa repetibilidade e reprodutibilidade, além de um baixo custo de produção. No primeiro capítulo, foi desenvolvido um novo sensor e biossensor eletroquímico a partir da modificação do eletrodo de trabalho com azul da Prússia. Como substrato, utilizou-se garrafas PET recicladas a custo zero e a tinta pode ser considerada atóxica, uma vez que nenhum solvente orgânico é utilizado, sendo considerada uma arquitetura ambientalmente amigável. Já o segundo capítulo, discutiu-se o desenvolvimento de um sensor e imunossensor para detecção de biomarcadores (L-Cisteína e proteína *Spike*) relacionados a SARS-CoV-2. A produção de eletrodos de finos filmes de platina sobre a superfície de folhas de BioPET ainda não havia sido abordada em literatura para estes biomarcadores, utilizando as técnicas de fotolitografia e pulverização catódica. O terceiro capítulo é apresentado uma abordagem inovadora e ecológica para a fabricação de eletrodos através de substratos de folhas de árvores caídas da espécie *Persea americana MILL*. O sensor de folha apresentou um desempenho satisfatório na detecção de dopamina, um importante biomarcador relacionado a doença de Parkinson. Para demonstrar a aplicação do sensor, o mesmo foi utilizado na detecção do analito em amostras de urina sintética e soro humano, apresentando um ótimo desempenho. Por fim, o quarto capítulo, discutiu-se uma nova plataforma reutilizável para o desenvolvimento de eletrodos de tintas condutoras. A capacidade de reutilização do sistema permitiu uma economia de reagentes e tempo de preparo de novas plataformas sensoriais. O dispositivo pode ser aplicado de maneira multivariada para sistemas de análises e analitos, demonstrando grande eficiência. Espera-se que estes dispositivos contribuam e auxiliem no diagnóstico de diversas doenças, permitindo análises não invasivas e de rápida resposta.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

13.1 Participação em eventos científicos

- Curso de Comunicação e Escrita Científica ministrado pelo Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior nos dias 07, 14 e 21 de outubro de 2020, por transmissão online. *The American Chemical Society (ACS)*.
- VIII Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais. Apresentação oral de trabalho: Application of low-cost conductive ink-based pet bottle electrochemical sensor for uric acid determination. (online) (Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, 2021).
Autores: Rodrigo Vieira Blasques, Jéssica Santos Stefano, Jéssica Camargo, Bruno Campos Janegitz.
- IX Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais. (Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, 2022).
- Participação em banca julgadora do XXVII Congresso de Iniciação Científica - UFSCar (Sessão DCNME), 2022.

13.2 Materiais encaminhados para publicação

- **Capítulo de livro publicado:** Luís M. C. Ferreira, Rodrigo Vieira Blasques, Fernando Campanhã Vicentini, Bruno Campos Janegitz. Nanomaterials for Biosensors. In: Azad, U.P., Chandra, P. (eds) Handbook of Nanobioelectrochemistry. Springer, 2023.
- **Capítulo de livro publicado:** Nirton Vieira, Bianca Ribeiro, Rodrigo Vieira Blasques, Bruno Campos Janegitz, Fabrício dos Santos, Valtencir Zucolloto. Solution-Gated Reduced Graphene Oxide FETs: Device Fabrication and Biosensors Applications. Graphene Field-Effect Transistors: Advanced Bioelectronic Devices for Sensing Applications. Springer, 2023.
Capítulo de livro publicado: Luiz Otávio Orzari, Jéssica Camargo, Rodrigo Vieira Blasques, Luiz Humberto Marcolino Junior, Marcio Bergamini, Bruno Campos Janegitz. Use of Metallic Nanostructures in Electrochemical Biosensing

- of SARS-CoV-2. In: Crespilho, F.N. (eds) Covid-19 Metabolomics and Diagnosis. Springer, 2023.
- **Artigo Publicado:** Giovani G. Daniele, Daniel C. de Souza, Paulo Roberto de Oliveira, Luiz Otavio Orzari, Rodrigo Vieira Blasques, Rafael Germscheidt, Emily C. da Silva, Leandro A. Pocrifka, Juliano Alves Bonacin, Bruno Campos Janegitz. Development of Disposable and Flexible Supercapacitor Based on Carbonaceous and Ecofriendly Materials. *C* 2022, 8, 32.
 - **Artigo Publicado:** Rodrigo Vieira Blasques, Jéssica Santos Stefano, Jéssica Rocha Camargo, Luiz Ricardo, Laís Canniatti Brazaca, Bruno Campos Janegitz. Disposable Prussian blue-anchored electrochemical sensor for enzymatic and non-enzymatic multi-analyte detection. *Sensors and Actuators Reports*, 4, 100118, 2022.
 - **Artigo Publicado:** Rodrigo Vieira Blasques, Wilson S. Fernandes-Junior, Ana Marcia Ribeiro Mendes, Andressa Rose Castro Costa, Thiago C. Canevari, Leliz T. Arena, Marcelo Barcellos da Rosa, Gilvanda Silva Nunes, Bruno Campos Janegitz, Maria Raimunda Chagas Silva, Maria Isabel Pividori, Paulo Cesar Mendes Villis. Electrochemical Glyphosate Sensor Based on Hybrid Material SiO₂/Sm₂O₃/Carbon Modified with Meldola Blue. *Electroanalysis*, 2022.
 - **Artigo Publicado:** Rodrigo Vieira Blasques, Paulo Roberto de Oliveira, Cristiane Kalinke, Laís Canniatti Brazaca, Robert D. Crapnell, Juliano Alves Bonacin, Craig E. Banks, Bruno Campos Janegitz. Flexible Label-Free Platinum and Bio-PET-Based Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2. *Biosensors*, 13, 190, 2023.
 - **Artigo em revisão:** Rodrigo Vieira Blasques, Jéssica Rocha Camargo, William Barros Veloso, Gabriel Negrão Meloni, Fernando Amaral Fernandes, Beatriz Fernandes Germinare, Luiz Ricardo Guterres e Silva, Thiago Regis Longo Cesar Paixão, Bruno Campos Janegitz. Green fabrication and analytical application of a disposable carbon electrodes made from fallen tree leaves using a CO₂ laser, 2023.
 - **Artigo em revisão:** Laís Canniatti Brazaca, Amanda H. Imamura, Rodrigo Vieira Blasques, Jéssica Rocha Camargo, Bruno Campos Janegitz, Emanuel Carrilho. Low-cost paper-based platforms for the diagnosis of important diseases: a critical review. *Biosensors and Bioelectronics*, 2023.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FERREIRA, P.C., ATAÍDE, V.N., SILVA, C.L.S., ANGNES, L., TOMAZELLI, W.K.C, PAIXÃO, T.R.L.C., et al. Wearable electrochemical sensors for forensic and clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 115622, 2019.
- [2] DOSSI, N., TONIOLO, R., PICCIN, E., SUSMEL, S., PIZZARIELLO, A. AND BONTEMPELLI, G. Pencil-Drawn Dual Electrode Detectors to Discriminate Between Analytes Comigrating on Paper-Based Fluidic Devices but Undergoing Electrochemical Processes with Different Reversibility. **Electroanalysis**, v. 25, p. 2515-2522, 2013.
- [3] CHAGAS, C.L.S., COSTA, L.D., LOBO-JÚNIOR, E.O., PICCIN, E., DOSSI, N. AND COLTRO, W.K.T. Hand drawing of pencil electrodes on paper platforms for contactless conductivity detection of inorganic cations in human tear samples using electrophoresis chips. **Electrophoresis**, v. 36, p. 1837-1844, 2015.
- [4] ATAIDE, V.N., AMEKU, W.A., BACIL, R.P., ANGNES, L., de ARAUJO, W.R., PAIXÃO, T.R.L.C. Enhanced performance of pencil-drawn paper-based electrodes by laser-scribing treatment. **RSC Advances**, v. 11, p. 644-653, 2021.
- [5] ORZARI, L.O., de ARAUJO ANDREOTTI, I.A., BERGAMINI, M.F., JUNIOR, L.H.M., JANEGITZ, B.C. Chemical, Disposable electrode obtained by pencil drawing on corrugated fiberboard substrate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 264, p. 20-26, 2018.
- [6] de OLIVEIRA, G.C.M., CAMARGO, J.R., VIEIRA, N.C.S., JANEGITZ, B.C. A new disposable electrochemical sensor on medical adhesive tape, Journal of Solid State Electrochemistry. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, p. 2271-2278, 2020.
- [7] WELLE, F., Twenty years of PET bottle to bottle recycling—An overview. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 55, p. 865-875, 2011.
- [8] NASCIMENTO, V.B., ANGNES, L. Eletrodos fabricados por" silk-screen". **Química Nova**, v. 21, p. 614-629, 1998.
- [9] WU, W. Inorganic nanomaterials for printed electronics: a review. **Nanoscale**, v. 9, p. 7342-7372, 2017.
- [10] GONG, X., HUANG, K., WU, Y.-H., ZHANG, X.-S. Recent progress on screen-printed flexible sensors for human health monitoring. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 345, p. 113821, 2022.
- [11] MOLDENHAUER D., NGUYEN D.C.Y., JESCHECK L., HACK F., FISCHER D., SCHNEEBERGER A. 3D screen printing – An innovative technology for large-scale

manufacturing of pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120096, 2021.

[12] TALEAT, Z., KHOSHROO, A. & MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013). **Microchimica Acta**, v. 181, p. 865-891, 2014.

[13] FLETCHER, S. Screen-Printed Carbon Electrodes. **Loughborough University**, v. 2015, p. 425-444, 2015.

[14] SURESH, R.R., LAKSHMANAKUMAR, M., AROCKIA JAYALATHA, J.B.B., et al. Fabrication of screen-printed electrodes: opportunities and challenges. **Journal of Materials Science**, v. 56, p. 8951-9006, 2021.

[15] BANDODKAR, A.J., NUÑEZ-FLORES, R., JIA, W. AND WANG, J. All-Printed Stretchable Electrochemical Devices. **Advanced Materials**, v. 27, p. 3060-3065, 2015.

[16] TONELLO, S., ABATE, G., BORGHETTI, M., MARZIANO, M., SERPELLONI, M., UBERTI, D.L., et al. Wireless point-of-care platform with screen-printed sensors for biomarkers detection. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, v. 66, p. 2448-2455, 2017.

[17] HAYAT, A., MARTY, J.L. Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. **Sensors**, v. 14, p. 10432-10453, 2014.

[18] TUDORACHE, M., BALA, C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. **Analytical & Bionalytical Chemistry**, v. 388, p. 565-578, 2007.

[19] AL-KASSAWNEH, M., SADIQ, Z., Jahanshahi-Anbuhi, S. Pullulan-stabilized gold nanoparticles tablet as a nanozyme sensor for point-of-care applications. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 38, p. 100526, 2022.

[20] EL AZAB, N.F., MAHMOUD, A.M., TRABIK, Y.A. Point-of-care diagnostics for therapeutic monitoring of levofloxacin in human plasma utilizing electrochemical sensor mussel-inspired molecularly imprinted copolymer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 918, p. 116504, 2022.

[21] NANDINI, S., NALINI, S., BINDHU, S., SANDEEP, S., KARTHIK, C.S., NITHIN, K.S., et al. 15 - Current trends of functionalized nanomaterial-based sensors in point-of-care diagnosis. **Functionalized Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors**, Woodhead Publishing, 2022, p. 337-53.

- [22] MYKHAILIV, O., ZUBYK, H., PLONSKA-BRZEZINSKA, M.E. Carbon nano-onions: Unique carbon nanostructures with fascinating properties and their potential applications. **Inorganica Chimica Acta**, v. 468, p. 49-66, 2017.
- [23] IBÁÑEZ-REDÍN, G., FURUTA, R.H.M., WILSON, D., SHIMIZU, F.M., MATERON, E.M., ARANTES, L.M.R.B., et al. Screen-printed interdigitated electrodes modified with nanostructured carbon nano-onion films for detecting the cancer biomarker CA19-9. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 1502-1508, 2019.
- [24] DURAI, L., BADHULIKA, S. Highly selective trace level detection of DNA damage biomarker using iron-based MAX compound modified screen-printed carbon electrode using differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators Reports**, v. 3, p. 100057, 2021.
- [25] TONELLO, S., SERPELLONI, M., LOPOMO, N.F., ABATE, G., UBERTI, D.L., SARDINI, E. Screen-Printed Biosensors for the Early Detection of Biomarkers Related to Alzheimer Disease: Preliminary Results. **Procedia Engineering**, v. 168, p. 147-150, 2016.
- [26] KUNPATEE, K., KAEWDORN, K., DUANGTONG, J., CHAIYO, S., CHAILAPAKUL, O., KALCHER, K. et al., A new disposable electrochemical sensor for the individual and simultaneous determination of carbamate pesticides using a nanocomposite modified screen-printed electrode. **Microchemical Journal**, v. 177, p. 107318, 2022.
- [27] DOU, J., DING, A., CHENG, L., SEKAR, R., WANG, H., LI, S. A screen-printed, amperometric biosensor for the determination of organophosphorus pesticides in water samples. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, p. 956-962, 2012.
- [28] WESTMACOTT, K.L., CREW, A., DORAN, O., HART, J.P. A novel electroanalytical approach to the measurement of B vitamins in food supplements based on screen-printed carbon sensors. **Talanta**, v. 181, p. 13-18, 2018.
- [29] LIANG, X., LI, H., DOU, J., WANG, Q., HE, W., WANG, C., LI, D., LIN, J.-M., ZHANG, Y. Y. Stable and biocompatible carbon nanotube ink mediated by silk protein for printed electronics. **Advanced Materials**, v. 32, p. 2000165, 2020.
- [30] TRAN, T.S., DUTTA, N.K., CHOUDHURY, N.R. Graphene inks for printed flexible electronics: Graphene dispersions, ink formulations, printing techniques and applications. **Advances in Colloid and Interfaces Science**, v. 261, p. 41-61, 2018.

- [31] SAIDINA, D.S., EAWWIBOONTHANAKIT, N., MARIATTI, M. et al. Recent development of graphene-based ink and other conductive material-based inks for flexible electronics. **Journal of Electronic Materials**, v. 48, p. 3428-3450, 2019.
- [32] LI, J., ZHANG, X., LIU, X., LIANG, Q., LIAO, G., TANG, Z., et al. Conductivity and foldability enhancement of Ag patterns formed by PVAc modified Ag complex inks with low-temperature and rapid sintering. **Materials & Design**, v. 185, p. 108255, 2020.
- [33] FERRI J., LLINARES R.L., MORENO J., LIDÓN-ROGER J.V., GARCIA-BREIJO E. An investigation into the fabrication parameters of screen-printed capacitive sensors on e-textiles. **Textile Research Journal**, v. 90, p. 1749-1769, 2020.
- [34] CHU, Z., PENG, J., JIN, W. Chemical, Advanced nanomaterial inks for screen-printed chemical sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 919-926, 2017.
- [35] ZAVANELLI, N., YEO, W-H. Advances in screen printing of conductive nanomaterials for stretchable electronics. **ACS Omega**, v. 6, p. 9344-9351, 2021.
- [36] HUANG, L., HUANG, Y., LIANG, J., WAN, X., CHEN, Y. Graphene-based conducting inks for direct inkjet printing of flexible conductive patterns and their applications in electric circuits and chemical sensors. **Nano Research**, v. 4, p. 675-684, 2011.
- [37] LI, W., CHEN, M. Synthesis of stable ultra-small Cu nanoparticles for direct writing flexible electronics. **Applied Surface Science**, v. 290, p. 240-245, 2014.
- [38] MCCREERY, R.L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2646-2687, 2008.
- [39] 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.
- [40] YU, X., ZHOU, N., HAN, S., LIN, H., BUCHHOLZ, D.B., YU, J., et al. Flexible spray-coated TIPS-pentacene organic thin-film transistors as ammonia gas sensors. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, p. 6532-6535, 2013.
- [41] CHU, S.-Y., WATER, W., LIAW, J.-T. Influence of postdeposition annealing on the properties of ZnO films prepared by RF magnetron sputtering. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, p. 1593-1598, 2003.
- [42] LIN, C.-Y., CHEN, J.-G., HU, C.-W., TUNNEY, J.J., HO, K.-C. Using a PEDOT:PSS modified electrode for detecting nitric oxide gas. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 140, p. 402-406, 2009.

- [43] JEONG, H.Y., LEE, D.-S., CHOI, H.K., LEE, D.H., KIM, J.-E., LEE, J.Y., et al. Flexible room-temperature NO₂ gas sensors based on carbon nanotubes/reduced graphene hybrid films. **Applied Physics Letters**, v. 96, p. 213105, 2010.
- [44] SMITH, D.L., HOFFMAN, D.W. Thin-film deposition: principles and practice. **Physics Today**, v. 49, p. 60, 1996.
- [45] SCHEIDT, G. **Caracterização óptica de filmes finos de NbO_x obtidos por sputtering reativo**. Mestrado (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo, Brasil, (2014).
- [46] TAVARES, C.J. **Caracterização estrutural e mecânica de multicamadas de TiN/ZrN depositadas por PVD**. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada), **Universidade do Minho**, Portugal, (1997).
- [47] FONTANA, L.C. **Estudo da deposição de filmes de Ti e TiN e desenvolvimento do sistema modificado triodo-magnetron-sputtering**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 1997.
- [48] KOKKINOS, C., ECONOMOU, A., SPELIOTIS, T., PETROU, P., KAKABAKOS, S. Flexible Microfabricated Film Sensors for the in Situ Quantum Dot-Based Voltammetric Detection of DNA Hybridization in Microwells. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 853-857, 2015.
- [49] BRETT, A.M.O., MATYSIK, F.-M. AND 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, p. 209-212, 1997.
- [50] OLIVEIRA, G.C.M.d., CARVALHO, J.H.d.S., BRAZACA, L.C., VIEIRA, N.C.S., JANEGITZ, B.C. Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson's disease biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 152, p. 112016, 2020.
- [51] XU, M., OBODO, D., YADAVALLI, V.K. The design, fabrication, and applications of flexible biosensing devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 124-125, p. 96-114, 2019.
- [52] WILLSON, C.G., DAMMEL, R.R. REISER, A. Photoresist materials: a historical perspective. **Metrology, Inspection, and Process Control for Microlithography XI**, v. 3050, p. 38-51, 1997.
- [53] ACUAUTLA, M., BERNARDINI, S., GALLAIS, L., FIORIDO, T., PATOUT, L., BENDAHAN, M. Ozone flexible sensors fabricated by photolithography and laser

ablation processes based on ZnO nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 203, p. 602-611, 2014.

[54] FIGUEIREDO, M.J.P. **Optimização de sensores de filme fino metálico para a medição de condutibilidade térmica**. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica), Universidade de Lisboa, Lisboa, (2010).

[55] KANNAN, P.K., HU, C., MORGAN, H., MOSHKALEV, S.A., ROUT, C.S. Electrochemical sensing of bisphenol using a multilayer graphene nanobelt modified photolithography patterned platinum electrode. **Nanotechnology**, v. 27, p. 375504, 2016.

[56] HONDRED, J.A., STROMBERG, L.R., MOSHER, C.L., CLAUSSEN, J.C. High-Resolution Graphene Films for Electrochemical Sensing via Inkjet Maskless Lithography. **ACS Nano**, v. 11, p. 9836-9845, 2017.

[57] PURWIDYANTRI, A., CHEN, C.-H., HWANG, B.-J., LUO, J.-D., CHIOU, C.-C., TIAN, Y.-C., et al. Spin-coated Au-nanohole arrays engineered by nanosphere lithography for a Staphylococcus aureus 16S rRNA electrochemical sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 1086-1094, 2016.

[58] CHYAN, Y., YE, R., LI, Y., SINGH, S.P., ARNUSCH, C.J., TOUR, J.M. Laser-Induced Graphene by Multiple Lasing: Toward Electronics on Cloth, Paper, and Food. **ACS Nano**, v. 12, p. 2176-2183, 2018.

[59] DIXIT, N., SINGH, S.P. Laser-Induced Graphene (LIG) as a Smart and Sustainable Material to Restrain Pandemics and Endemics: A Perspective. **ACS Omega**, v. 7, p. 5112-5130, 2022.

[60] LIU, H., CHEN, Y. Laser-Induced Graphene Film and Its Applications in Flexible Electronics. **Applied Sciences**, v. 12, p. 11233, 2022.

[61] BEHRENT, A., GRIESCHE, C., SIPPEL, P., BAEUMNER, A.J. Process-property correlations in laser-induced graphene electrodes for electrochemical sensing. **Microchimica Acta**, v. 188, p. 159, 2021.

[62] LI, J., BO, X., Laser-enabled flexible electrochemical sensor on finger for fast food security detection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, p. 127014, 2022.

[63] ZHANG, L., WANG, L., LI, J., CUI, C., ZHOU, Z., WEN, L. Surface Engineering of Laser-Induced Graphene Enables Long-Term Monitoring of On-Body Uric Acid and pH Simultaneously. **Nano Letters**, v. 22, p. 5451-5458, 2022.

[64] COSTA, W.R.P., ROCHA, R.G., de FARIA, L.V. et al. Affordable equipment to fabricate laser-induced graphene electrodes for portable electrochemical sensing. **Microchimica Acta**, v. 189, p. 185, 2022.

- [65] de ARAUJO, W.R., FRASSON, C.M.R., AMEKU, W.A., SILVA, J.R., ANGNES, L., PAIXÃO, T.R.L.C. Single-step reagentless laser scribing fabrication of electrochemical paper-based analytical devices. **Angew. Chem. Int.**, v. 129, p. 15309-15313, 2017.
- [66] ZHANG, W. L., LEI, Y. J., MING, F. W., JIANG, Q., COSTA, P. M. F. J., ALSHAREEF, H. N. Lignin Laser Lithography: A Direct-Write Method for Fabricating 3D Graphene Electrodes for Microsupercapacitors. **Advanced Energy Materials**, v. 8, p. 1801840, 2018.
- [67] DOU, X., HASA, I., SAUREL, D., VAALMA, C., WU, L., BUCHHOLZ, D., et al. Hard carbons for sodium-ion batteries: Structure, analysis, sustainability, and electrochemistry. **Materials Today**, v. 23, p. 87-104, 2019.
- [68] HARPER, S.H.T., LYNCH, J.M. The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 32, p. 1057-1062, 1981.
- [69] GARCIA-MARAVAR, A., SALVACHÚA, D., MARTÍNEZ, M.J., DIAZ, L.F., ZAMORANO, M. Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees, **Waste Management**. v. 33, p. 2245-2249, 2013.
- [70] MOSHI, A.A.M., RAVINDRAN, D., BHARATHI, S.R.S., INDRAN, S., SARAVANAKUMAR, S.S., LIU, Y. Characterization of a new cellulosic natural fiber extracted from the root of Ficus religiosa tree. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 212-221, 2020.
- [71] YE, R., CHYAN, Y., ZHANG, J., LI, Y., HAN, X., KITTRELL, C., TOUR, J. M. Laser-Induced Graphene Formation on Wood. **Advanced Materials**, v. 29, p. 1702211, 2017.
- [72] SANTOS, S.O., ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Lauraceae, **Rodriguésia**, v. 63, p. 689-703, 2012.
- [73] FETAL, J.d.A.M. **Exames laboratoriais de triagem e emergências hospitalares: Relatório referente a aplicabilidade das tecnologias “Point-of-care”(POC) e “Lab-on-a-chip”(LOC)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Saúde), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, (2021).
- [74] KACI, K., DEL CAÑO, R., LUNA, M., MILÁN-ROIS, P., CASTELLANOS, M., ABREU, M. et al. Paving the way to point of care (POC) devices for SARS-CoV-2 detection. **Talanta**, v. 247, p. 123542, 2022.

- [75] CHEN, P., CHUNG, M.T., MCHUGH, W., NIDETZ, R., LI, Y., FU, J. et al. Multiplex Serum Cytokine Immunoassay Using Nanoplasmonic Biosensor Microarrays. **ACS Nano**, v. 9, p. 4173-4181, 2015.
- [76] LUPPA, P.B., MÜLLER, C., SCHLICHTIGER, A., SCHLEBUSCH, H. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. **Trends Analyt Chem**, v. 30, p. 887-898, 2011.
- [77] AZAHAR ALI, M., SRIVASTAVA, S., SOLANKI, P.R., AGRAWAL, V.V, JOHN, R., MALHOTRA, B.D. Nanostructured anatase-titanium dioxide based platform for application to microfluidics cholesterol biosensor. **Applied Physics Letters**, v. 101, p. 084105, 2012.
- [78] WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, p. 368-373, 2006.
- [79] FU, L.-M., WANG, Y.-N. Detection methods and applications of microfluidic paper-based analytical devices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 107, p. 196-211, 2018.
- [80] CHARLES, P.T., ADAMS, A.A., HOWELL, P.B., TRAMMELL, S.A., DESCHAMPS, J.R., KUSTERBECK, A.W. Fluorescence-based sensing of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) using a multi-channeled poly(methyl methacrylate) (PMMA) microimmunosensor. **Sensors**, v. 10, p. 876-889, 2010.
- [81] SENEL, M., DERVISEVIC, E., ALHASSEN, S., DERVISEVIC, M., ALACHKAR, A., CADARSO, V.J., et al. Microfluidic Electrochemical Sensor for Cerebrospinal Fluid and Blood Dopamine Detection in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Analytical Chemistry**, v. 92, p. 12347-12355, 2020.
- [82] CARDOSO, R.M., KALINKE, C., ROCHA, R.G., dos SANTOS, P.L., ROCHA, D.P., OLIVEIRA, P.R., et al. Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1118, p. 73-91, 2020.
- [83] AMBROSI, A., PUMERA, M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, p. 2740-2755, 2016.
- [84] RAVI, A.K., DESHPANDE, A., HSU, K.H. An in-process laser localized pre-deposition heating approach to inter-layer bond strengthening in extrusion based polymer additive manufacturing. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 24, p. 179-185, 2016.
- [85] MILENIUS, D.L. **ABS extrusion compositions**, U.S. Patent, n. 4,150,009, 1979.
- [86] KATSELI, V., ECONOMOU, A., KOKKINOS, C. A novel all-3D-printed cell-on-a-chip device as a useful electroanalytical tool: Application to the simultaneous

voltammetric determination of caffeine and paracetamol. **Talanta**, v. 208, p. 120388, 2020.

[87] RICHTER, E.M., ROCHA, D.P., CARDOSO, R.M., KEEFE, E.M., FOSTER, C.W., MUNOZ, R.A.A., et al. Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform. **Analytical Chemistry**, v. 91, p. 12844-12851, 2019.

[88] BAKKER, E., TELTING-DIAZ, M. Electrochemical Sensors. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2781-800, 2002.

[89] COSTA, A.R., RIBEIRO, E.B., RIBEIRO, D.B., BLASQUES, R.V., MARQUES, P.R.d.O., NUNES, G.S. Biossensores à Base de Acetilcolinesterase para Detecção de Pesticidas organofosforados: Tendências e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, 2021.

[90] ROTARIU L, ZAMFIR LG, BALA C. A rational design of the multiwalled carbon nanotube-7,7,8,8-tetracyanoquinodimethan sensor for sensitive detection of acetylcholinesterase inhibitors. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 81-88, 2012.

[91] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E. STADERINI, M., MARLAND, J.R.K., GRAY, M.E., UÇAR, A., DUNARE, C., et al. In vivo application of an implantable tri-anchored methylene blue-based electrochemical pH sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 197, p. 113728, 2022.

[92] da SILVA, V.N.C., FARIAS, E.A.d.O., ARAÚJO, A.R., MAGALHÃES, F.E.X., FERNANDES, J.R. N., SOUZA, J.M.T., et al., Rapid and selective detection of dopamine in human serum using an electrochemical sensor based on zinc oxide nanoparticles, nickel phthalocyanines, and carbon nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 210, p. 114211, 2022.

[93] KUNPATEE, K., CHAMSAI, P., MEHMETI, E., STANKOVIC, D.M., ORTNER, A., KALCHER, K., et al. A highly sensitive fenobucarb electrochemical sensor based on graphene nanoribbons-ionic liquid-cobalt phthalocyanine composites modified on screen-printed carbon electrode coupled with a flow injection analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 855, p. 113630, 2019.

[94] PIANO, M., SERBAN, S., BIDDLE, N., PITTSO, R., DRAGO, G.A., HART, J.P. A flow injection system, comprising a biosensor based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt coated with glucose dehydrogenase, for the measurement of glucose. **Analytical Biochemistry**, v. 396, p. 269-274, 2010.

[95] HARSINI, M., WIDYANINGRUM, B.A., FITRIANY, E., PARAMITA, D.R.A., FARIDA, A.N., BAKTIR, A., et al. Electrochemical synthesis of polymelamine/gold

nanoparticle modified carbon paste electrode as voltammetric sensor of dopamine. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 50, p. 100052, 2022.

[96] WEI, P., WANG, S., WANG, W., NIU, Z., RODAS-GONZALEZ, A., LI, K., et al. CoNi bimetallic metal–organic framework and gold nanoparticles-based aptamer electrochemical sensor for enrofloxacin detection. **Applied Surface Science**, v. 604, p. 154369, 2022.

[97] SUN, L., GUO, H., PAN, Z., LIU, B., ZHANG, T., YANG, M., et al. In-situ reducing platinum nanoparticles on covalent organic framework as a sensitive electrochemical sensor for simultaneous detection of catechol, hydroquinone and resorcinol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 635, p. 128114, 2022.

[98] AHMED, R.K., SAAD, E.M., FAHMY, H.M., EL NASHAR, R.M., Design and application of molecularly imprinted Polypyrrole/Platinum nanoparticles modified platinum sensor for the electrochemical detection of Vardenafil. **Microchemical Journal**, v. 171, p. 106771, 2021.

[99] KARYAKIN, A.A., KARYAKINA, E.E., GORTON, Lo. On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 1, p. 78-82, 1999.

[100] NOSSOL, E. **Filmes finos, transparentes e multifuncionais de nanocompósitos entre nanotubos de carbono e azul da Prússia**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, (2013).

[101] THI, L.N., PHAN, T.T.T., NGOC, T.N., VISWANATH, N.S.M., LE, H.T.T., THI, L.T., et al. Prussian Blue decorated g-C₃N₄ – From novel synthesis to insight study on charge transfer strategy for improving visible-light driven photo-Fenton catalytic activity. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 916, p. 165331, 2022.

[102] KIMMEL, D.W., LEBLANC, G., MESCHIEVITZ, M.E., CLIFFEL, D.E., Electrochemical sensors and biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 685-707, 2012.

[103] WEI, M., QIAO, Y., ZHAO, H., LIANG, J., LI, T., LUO, Y., et al. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: recent progress and perspectives. **Chemical Communications**, v. 56, p. 14553-14569, 2020.

[104] PERUMAL, V., HASHIM, U., Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, p. 1-15, 2014.

[105] MASCAGNI, D.B.T. **Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido**. Tese (Doutorado em

Ciência e Tecnologia de Materiais), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Sorocaba, SP, (2017).

[106] FELISARDO, R.J.A., LUQUE, A.M., SILVA, Q.S., SOARES, C.M.F., FRICKS, A.T., LIMA, Á.S., et al. Biosensor of horseradish peroxidase immobilized onto self-assembled monolayers: Optimization of the deposition enzyme concentration. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 879, p. 114784, 2020.

[107] BRAVO, I., PRATA, M., TORRINHA, Á., DELERUE-MATOS, C., LORENZO, E., MORAIS, S. Laccase bioconjugate and multi-walled carbon nanotubes-based biosensor for bisphenol A analysis. **Bioelectrochemistry**, v. 144, p. 108033, 2022.

[108] MAHAJAN, A.P., KONDAWAR, S.B., MAHORE, R.P., MESHARAM, B.H., VIRUTKAR, P.D. Polyaniline/MnO₂ Nanocomposites Based Stainless Steel Electrode Modified Enzymatic Urease Biosensor. **Procedia Materials Science**, v. 10, p. 699-705, 2015.

[109] RAYMUNDO-PEREIRA, P.A., SILVA, T.A., CAETANO, F.R., RIBOVSKI, L., ZAPP, E., BRONDANI, D., et al. Polyphenol oxidase-based electrochemical biosensors: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1139, p. 198-221, 2020.

[110] ZHANG, P., SUN, T., RONG, S., ZENG, D., YU, H., ZHANG, Z., et al. A sensitive amperometric AChE-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugated polymer and Ag-rGO-NH₂ nanocomposite. **Bioelectrochemistry**, v. 127, p. 163-170, 2019.

[111] YOON, J., LEE, S.N., SHIN, M.K., KIM, H.-W., CHOI, H.K., LEE, T., et al. Flexible electrochemical glucose biosensor based on GOx/gold/MoS₂/gold nanofilm on the polymer electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 140, p. 111343, 2019.

[112] FERRI S, KOJIMA K, SODE K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 5, p. 1068-1076, 2011.

[113] BANKAR, S.B., BULE, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 489-501, 2009.

[114] HECHT, H.J., KALISZ, H.M., HENDLE, J., SCHMID, R.D., SCHOMBURG, D. CRYSTAL Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Reslution. **Journal of Molecular Biology**, v. 229, p. 153-72, 1993.

[115] FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M., SANROMÁN, M.Á., MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.

- [116] LIU, D.-M., CHEN, J., SHI, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332-342, 2018.
- [117] SOUZA, L.T., VERÍSSIMO, L.A., PESSELA, B.C., SANTORO, R.R., RESENDE, R.R., MENDES, A.A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** v. 4, p. 529-568, 2017.
- [118] HAN, K.-K., RICHARD, C., DELACOURTE, A. Chemical cross-links of proteins by using bifunctional reagents. **International Journal of Biochemistry**, v. 16, p. 129-145, 1984.
- [119] YANG, L., LI, Y., ERF, G.F. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157:H7. **Analytical Chemistry**, v. 76, 1107-1113, 2004.
- [120] RICCARDI, C.d.S., COSTA, P.I.d., YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, p. 16-320, 2002.
- [121] HOCK, B. Antibodies for immunosensors a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 347, p. 177-186, 1997.
- [122] GOPINATH, S.C.B., TANG, T.-H., CITARTAN, M., CHEN, Y., LAKSHMIPRIYA, T. Current aspects in immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 292-302, 2014.
- [123] SMITH, S.M. Strategies for the Purification of Membrane Proteins. **Methods Mol Biol**, v. 1485, p. 389-400, 2017.
- [124] SELLECK M.J., SENTHIL M., WALL N.R. Making Meaningful Clinical Use of Biomarkers. **Biomark Insights**, v. 12, p. 1177271917715236, 2017.
- [125] HUSS, R. CHAPTER 19 - BIOMARKERS, IN: A. ATALA, J.G. ALLICKSON (Eds.), Translational Regenerative Medicine. **Academic Press, Boston**, v. 2015, p. 235-241, 2015.
- [126] NGAMCHUEA, K., CHAISIWAMONGKHOL, K., BATCHELOR-MCAULEY, C., COMPTON, R.G. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers – a tutorial review. **Analyst**, v. 143, p. 81-99, 2018.
- [127] LIU, D., YUN, Y., YANG, D., HU, X., DONG, X., ZHANG, N., et al. What is the biological function of uric acid? An antioxidant for neural protection or a biomarker for cell death. **Disease Markers**, v. 2019, p. 4081962, 2019.

- [128] LAKSHMI, D., WHITCOMBE, M.J., DAVIS, F., SHARMA, P.S. AND PRASAD, B.B. Electrochemical detection of uric acid in mixed and clinical samples: a review. **Electroanalysis**, v. 23, p. 305-320, 2011.
- [129] IYYAPPAN, E., JUSTIN, S.J.S., WILSON, P., PALANIAPPAN, A. Hydroxyapatite for Electrochemical Sensing of Uric Acid: Roles of Mesopore Volume and Surface Acidity. **ACS Appl. Nano Mater.**, v. 3, p. 7761-7773, 2020.
- [130] MISRA, N., KUMAR, V., BORDE, L., VARSHNEY, L. A.B. Localized surface plasmon resonance-optical sensors based on radiolytically synthesized silver nanoparticles for estimation of uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 178, p. 371-378, 2013.
- [131] LISMONT, C., REVENCO, I., FRANSEN, M. Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 3673, 2019.
- [132] SEN, S., KAWAHARA, B., CHAUDHURI, G. Maintenance of higher H₂O₂ levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: Important roles of bioactive catalase and PP2A. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 1541-1551, 2012.
- [133] CHANG, D., HU, Z.L., ZHANG, L., ZHAO, Y.S., MENG, Q.H., GUAN, Q.B., et al. Association of catalase genotype with oxidative stress in the predication of colorectal cancer: modification by epidemiological factors. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 25, p. 56-162, 2012.
- [134] BELOTTE J., FLETCHER N.M., SAED M.G., ABUSAMAAN M.S., DYSON G., ET AL. DIAMOND, et al., A single nucleotide polymorphism in catalase is strongly associated with ovarian cancer survival. **PLOS ONE**, v. 10, p. e0135739, 2015.
- [135] ARFIN, S., JHA, N.K., JHA, S.K., KESARI, K.K., RUOKOLAINEN, J., ROYCHOUDHURY, S., RATHI, B., KUMAR, D. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism, Antioxidants (Basel). **Antioxidants**, v. 10, p. 642, 2021.
- [136] CENINI, G., LLORET, A., CASCELLA, R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 2105607, 2019.
- [137] COBLEY, J.N., FIORELLO, M.L., BAILEY, D.M. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 15, p. 490-503, 2018.
- [138] DESILLES, J.-P., MESEGUER, E., LABREUCHE, J., LAPERGUE, B., SIRIMARCO, G., GONZALEZ-VALCARCEL, J., et al. Diabetes mellitus, admission

glucose, and outcomes after stroke thrombolysis: a registry and systematic review. **Stroke**, v. 44, p. 1915-1923, 2013.

[139] MOKGALABONI, K., PHOSWA, W.N. Cross-link between type 2 diabetes mellitus and iron deficiency anemia. A mini-review. **Clinical Nutrition Open Science** v. 45, p. 57-71, 2022.

[140] DEV, S., BABITT, J.L. Overview of iron metabolism in health and disease. **Hemodialysis International**, v. 21, p. S6-S20, 2017.

[141] RAMOS-HERNÁNDEZ, W.M., SOTO, L.F., DEL ROSARIO-TRINIDAD, M., FARFAN-MORALES, C.N., DE JESÚS-GONZÁLEZ, L.A., MARTÍNEZ-MIER, G., et al. Leukocyte glucose index as a novel biomarker for COVID-19 severity. **Scientific Reports**, v. 12, p. 14956, 2022.

[142] MNIF, F., ZARGNI, A., EL ARBI, K., MISSAOUI, A.M., BEN SALAH, D., HADJKACEM, F. et al., IDF21-0555 Diabetes mellitus: The silent epidemic overrunning developing countries. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 186, p. 109572, 2022.

[143] SAEEDI, P., PETERSOHN, I., SALPEA, P., MALANDA, B., KARURANGA, S., UNWIN, N., et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, p. 107843, 2019.

[144] SCOGNAMIGLIO, V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 12-25, 2013.

[145] MACIEJCZYK, M., ŻEBROWSKA, E., CHABOWSKI, A. Insulin resistance and oxidative stress in the brain: what's new?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 874, 2019.

[146] ROM, S., HELDT, N.A., GAJGHATE, S., SELIGA, A., REICHENBACH, N.L., PERSIDSKY, Y. Hyperglycemia and advanced glycation end products disrupt BBB and promote occludin and claudin-5 protein secretion on extracellular microvesicles. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-14, 2020.

[147] PAVÃO, M.L., FERIN, R., LIMA, A., BAPTISTA, J. Chapter Three - Cysteine and related aminothiols in cardiovascular disease, obesity and insulin resistance. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 109, p. 75-127, 2022.

[148] GE, S. YAN, M. LU, J., ZHANG, M., YU, F., YU, J., et al. Electrochemical biosensor based on graphene oxide–Au nanoclusters composites for l-cysteine analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p. 49-54, 2012.

- [149] PONTI, G., MACCAFERRI, M., RUINI, C., TOMASI, A., OZBEN, T. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 57, p. 389-399, 2020.
- [150] HASANBASIC, S., JAHIC, A., KARAHMET, E., SEJLANIC, A., PRNJAVORAC, B. The role of cysteine protease in Alzheimer disease. **Mater Sociomed.**, v. 28, p. 235, 2016.
- [151] WANG, N., CHEN, M., GAO, J., JI, X., HE, J., ZHANG, J., et al. A series of BODIPY-based probes for the detection of cysteine and homocysteine in living cells, **Talanta**, v. 195, p. 281-289, 2019.
- [152] ZHANG, W., LIU, J., YU, Y., HAN, Q., CHENG, T., SHEN, J., et al. A novel near-infrared fluorescent probe for highly selective detection of cysteine and its application in living cells. **Talanta**, v. 185, p. 477-482, 2018.
- [153] WANG, L., WANG, Y., YE, D., LIU, Q. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence, *Int J Antimicrob Agents*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, p. 105948, 2020.
- [154] LIMA, C.M.A.D.O. Information about the new coronavirus disease (COVID-19), **Radiologia Brasileira**, v. 53, p. V-VI, 2020.
- [155] LAI, C.-C., SHIH, T.-P., KO, W.-C., TANG, H.-J., HSUEH, P.-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, p. 105924, 2020.
- [156] HOFFMANN, M., ARORA, P., GROß, R., SEIDEL, A., HÖRNICH, B.F., HAHN, A.S., et al. SARS-CoV-2 variants B. 1.351 and P. 1 escape from neutralizing antibodies. **Cell**, v. 184, p. 2384-2393, 2021.
- [157] LI, Q., NIE, J., WU, J., ZHANG, L., DING, R., WANG, H., et al. SARS-CoV-2 501Y. V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. **Cell Press Journal**, v. 184, 2362-2371, 2021.
- [158] LI, Q., WU, J., NIE, J., ZHANG, L., HAO, H., LIU, S., et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. **Cell**, v. 182, p. 1284-1294, 2020.
- [159] KORBER, B., FISCHER, W.M., GNANAKARAN, S., YOON, H., THEILER, J., ABFALTERER, W., et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. **Cell**, v. 182, p. 812-827, 2020.

- [160] TEGALLY, H., WILKINSON, E., LESSELLS, R.J., GIANDHARI, J., PILLAY, S., MSOMI, N., et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa. **Nature Medicine**, v. 27, p. 440-446, 2021.
- [161] CASCELLA. M., RAJNIK. M., ALEEM. A., Dulebohn. S.C., Di Napoli. R. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). **StatPearls**, (2023).
- [162] KUO, L., HURST, K.R., MASTERS, P.S. Exceptional flexibility in the sequence requirements for coronavirus small envelope protein function. **Journal of Virology**, v. 81, p. 2249-2262, 2007.
- [163] YAN, R., ZHANG, Y., LI, Y., XIA, L., GUO, Y., ZHOU, Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**, v. 367, p. 1444-1448, 2020.
- [164] PALÚ, I.d.A. A virologia do Sars-CoV-2. **Connection Line - Revista eletrônica do univag**, (2021).
- [165] JACKOWSKA, K., KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, p. 3753-3771, 2013.
- [166] RIZEK, P., KUMAR, N., JOG, M.S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **Cmaj**, v. 188, p. 1157-1165, 2016.
- [167] EMAMZADEH, F.N., SURGUCHOV, A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. **Front Neurosci**, v. 12, p. 612, 2018.
- [168] AHLKOG, J.E., MUENTER, M.D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Movement Disorders**, v. 16, p. 448-458, 2001.
- [169] TAMBASCO, N., SIMONI, S., MARSILI, E., SACCHINI, E., MURASECCO, D., CARDAIOLI, G., et al. Clinical Aspects and Management of Levodopa-Induced Dyskinesia, Parkinson's. **Disease**, v. 2012, p. 745947, 2012.
- [170] FOYE, W.O. Foye's principles of medicinal chemistry: **Lippincott Williams & Wilkins**; 2008.
- [171] HAWKINS, R.A., MOKASHI, A., SIMPSON, I.A. An active transport system in the blood-brain barrier may reduce levodopa availability. **Exp Neurol.**, v. 195, p. 267-271, 2005.
- [172] HARVEY, C.J., LÉBOUF, R.F., STEFANIAK, A.B. Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1790-6, 2010.

- [173] AZEREDO, N.F.B., GONÇALVES, J.M., ROSSINI, P.O., et al. Uric acid electrochemical sensing in biofluids based on Ni/Zn hydroxide nanocatalyst. **Microchimica Acta**, v. 187, p. 379, 2020.
- [174] ANDREOTTI, I.A.d.A., ORZARI, L.O., CAMARGO, J.R. , FARIA, R.C., MARCOLINO-JUNIOR, L.H., BERGAMINI, M.F., et al. Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 840, p. 109-116, 2019.
- [175] HUSMANN, S., ORTH, E.S., ZARBIN, A.J.G. A multi-technique approach towards the mechanistic investigation of the electrodeposition of Prussian blue over carbon nanotubes film. **Electrochimica Acta**, v. 312, p. 380-391, 2019.
- [176] SUSANTO, H., SAMSUDIN, A.M., ROKHATI, N., WIDIASA, I.N. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p. 386-392, 2013.
- [177] ISFAHANI, V.B., DIZAJI, H.R., MEMARIAN, N., ARAB, A. Electrodeposition of prussian blue films: study of deposition time effect on electrochemical properties. **Materials Research Express**, v. 6, p. 096449, 2019.
- [178] WENG, Y.-X., JIN, Y.-J., MENG, Q.-Y., WANG, L., ZHANG, M., WANG, Y.-Z. Biodegradation behavior of poly (butylene adipate-co-terephthalate)(PBAT), poly (lactic acid)(PLA), and their blend under soil conditions. **Polymer Testing**, v. 32, p. 918-926, 2013.
- [179] KULESZA, P.J., MALIK, M.A., DENCA, A., STROJEK, J.W. "Espectroeletróquímica in Situ FT-IR/ATR do Azul da Prússia no Estado Sólido." **Química Analítica**, v. 68, p. 2442-2446, 1996.
- [180] ROCHA, R.G., STEFANO, J.S., CARDOSO, R.M., ZAMBIAZI, P.J., BONACIN, J.A., RICHTER, E.M. et al. Electrochemical synthesis of Prussian blue from iron impurities in 3D-printed graphene electrodes: Amperometric sensing platform for hydrogen peroxide. **Talanta**, v. 219, p. 121289, 2020.
- [181] PAIXÃO, T.R.L.C., BERTOTTI, M. Fabrication of disposable voltammetric electronic tongues by using Prussian Blue films electrodeposited onto CD-R gold surfaces and recognition of milk adulteration. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 137, p. 266-273, 2019.

- [182] CHEN, L., KÄTELHÖN, E., COMPTON, R.G. Unscrambling illusory inhibition and catalysis in nanoparticle electrochemistry: Experiment and theory. **Applied Materials Today**, v. 16, p. 141-145, 2019.
- [183] AMATORE, C., DA MOTA, N., SELLA, C., THOUIN, L. Theory and Experiments of Transport at Channel Microband Electrodes under Laminar Flows. 1. Steady-State Regimes at a Single Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 8502-8510, 2007.
- [184] LI, Y., XU, M., LI, P., DONG, J., Ai, S. Nonenzymatic sensing of methyl parathion based on graphene/gadolinium Prussian Blue analogue nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2157-2162, 2014.
- [185] BARD, A.J., FAULKNER, L.R., WHITE, H.S. Electrochemical methods: fundamentals and applications: **John Wiley & Sons**; 2022.
- [186] SHI, Z., LI, X., YU, L., WU, X., WU, J., GUO, C., et al. Atomic matching catalysis to realize a highly selective and sensitive biomimetic uric acid sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111421, 2019.
- [187] KHAN, M.M.I., HAQUE, A.-M.J., KIM, K. Electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid on electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 700, p. 54-59, 2013.
- [188] CARVALHO, J.H.S., STEFANO, J.S., BRAZACA, L.C., JANEGITZ, B.C. New conductive ink based on carbon nanotubes and glass varnish for the construction of a disposable electrochemical sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 937, p. 117428, 2023.
- [189] HUANG C.T., CHEN M.L., HUANG L.L., MAO. I.F. Uric acid and urea in human sweat. **Chin J Physiol**, v. 45, p. 109-115, 2002.
- [190] GUAN, Q. , GUO, H., XUE, R., WANG, M., ZHAO, X., FAN, T., et al. Electrochemical sensor based on covalent organic frameworks-MWCNT-NH₂/AuNPs for simultaneous detection of dopamine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 880, p. 114932, 2021.
- [191] YANG, L., LIU, D., HUANG, J., YOU, T. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p. 166-172, 2014.
- [192] XU, T.-Q., ZHANG, Q.-L., ZHENG, J.-N., LV, Z.-Y., WEI, J., WANG, A.-J., et al. Simultaneous determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid

using Pt nanoparticles supported on reduced graphene oxide. **Electrochimica Acta**, v. 115, p. 109-115, 2014.

[193] MAZZARA, F., PATELLA, B., AIELLO, G., O'RIORDAN, A., TORINO, C., VILASI, A., et al. Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using r-GO/NPs based sensors. **Electrochimica Acta**, v. 388, p. 138652, 2021.

[194] MADHUCHANDRA, H.D., SWAMY, B.E.K. Electrochemical determination of Adrenaline and Uric acid at 2-Hydroxybenzimidazole modified carbon paste electrode Sensor: A voltammetric study. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 3, p. 464-471, 2000.

[195] GUAN, Q., GUO, H., XUE, R., WANG, M., ZHAO, X., FAN, T., et al. Electrochemical sensor based on covalent organic frameworks-MWCNT-NH₂/AuNPs for simultaneous detection of dopamine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 880, p. 114932, 2021.

[196] XU, T.-Q., ZHANG, Q.-L., ZHENG, J.-N., LV, Z.-Y., WEI, J., WANG, A.-J., et al. Simultaneous determination of dopamine and uric acid in the presence of ascorbic acid using Pt nanoparticles supported on reduced graphene oxide. **Electrochimica Acta**, 115, p. 109-115, 2014.

[197] YANG, L., LIU, D., HUANG, J., YOU, T. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p. 166-172, 2014.

[198] CINKOVA, K., KIANIČKOVA, K., STANKOVIĆ, D.M., VOJS, M., MARTON, M., ŠVORC, L. The doping level of boron-doped diamond electrodes affects the voltammetric sensing of uric acid. **Analytical Methods**, v. 10, p. 991-996, 2018.

[199] KANG, B.-C., PARK, B.-S., HA, T.-J. Highly sensitive wearable glucose sensor systems based on functionalized single-wall carbon nanotubes with glucose oxidase-nafion composites. **Applied Surface Science**, v. 470, p. 13-18, 2019.

[200] YIN, H., SHI, Y., DONG, Y., CHU, X. Synthesis of spinel-type CuGa₂O₄ nanoparticles as a sensitive non-enzymatic electrochemical sensor for hydrogen peroxide and glucose detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 885, p. 115100, 2021.

[201] SEN, C.K., PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **The FASEB Journal**, v. 10, p. 709-720, 1996.

[202] DALTON, T.P., SHERTZER, H.G., PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 67-101, 1999.

- [203] HALLIWELL, B., CLEMENT, M.V., HUALONG, L. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS PRESS**, v. 486, p. 10-13, 2000.
- [204] GARATE, O., VEIGA, L.S., TANCREDI, P., MEDRANO, A.V., MONSALVE, L.N., YBARRA, G. High-performance non-enzymatic hydrogen peroxide electrochemical sensor prepared with a magnetite-loaded carbon nanotube waterborne ink. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 915, p. 116372, 2022.
- [205] CAO, G.S., WANG, P., LI, X., WANG, Y., WANG, G., LI, J. A sensitive nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on Fe₃O₄-Fe₂O₃ nanocomposites. **Bulletin of Materials Science**, v. 38, p. 163-167, 2015.
- [206] ŞENEL, M., ÇEVIK, E., ABASIYANIK, M.F. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 145, p. 444-450, 2010.
- [207] LEE, K.K., LOH, P.Y., SOW, C.H., CHIN, W.S. CoOOH nanosheet electrodes: Simple fabrication for sensitive electrochemical sensing of hydrogen peroxide and hydrazine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, p. 255-260, 2013.
- [208] WANG, Y., MA, X., WEN, Y., XING, Y., ZHANG, Z., YANG, H. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase based on gold nano-seeds dotted TiO₂ nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 2442-2446, 2010.
- [209] ATACAN, K., ÖZACAR, M. Construction of a non-enzymatic electrochemical sensor based on CuO/g-C₃N₄ composite for selective detection of hydrogen peroxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 266, p. 124527, 2021.
- [210] JIN, X., XI, F., LV, D., WU, Q., LIN, X. The effect of the chitosan membrane properties on the enzyme adsorption and performance for the construction of horseradish peroxidase biosensors. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 786-791, 2011.
- [211] WU, B., ZHANG, G., SHUANG, S., CHOI, M.M.F. Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. **Talanta**, v. 64, p. 546-553, 2004.
- [212] BANERJEE, S., SARKAR, P., TURNER, A.P.F. Amperometric biosensor based on Prussian Blue nanoparticle-modified screen-printed electrode for estimation of glucose-6-phosphate. **Analytical Biochemistry**, v. 439, p. 194-200, 2013.

- [213] NERY, E.W., KUNDYS, M., JELEN, P.S., JÖNSSON-NIEDZIÓŁKA, M. Electrochemical glucose sensing: is there still room for improvement?. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 11271-11282, 2016.
- [214] ZHANG, Y., LIU, Y., CHU, Z., SHI, L., JIN, W. Amperometric glucose biosensor based on direct assembly of Prussian blue film with ionic liquid-chitosan matrix assisted enzyme immobilization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 978-984, 2013.
- [215] JIANG, D., CHU, Z., PENG, J., JIN, W. Screen-printed biosensor chips with Prussian blue nanocubes for the detection of physiological analytes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 228, p. 679-687, 2016.
- [216] EKANAYAKE, E.M.I.M., PREETHICHANDRA, D.M.G., KANETO, K. Polypyrrole nanotube array sensor for enhanced adsorption of glucose oxidase in glucose biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 107-113, 2007.
- [217] VIJAYARAJ, K., HONG, S.W., JIN, S.-H., CHANG, S.-C., PARK, D.-S. Fabrication of a novel disposable glucose biosensor using an electrochemically reduced graphene oxide–glucose oxidase biocomposite. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6974-6981, 2016.
- [218] ORZARI, L.O., DE FREITAS, R.C., ANDREOTTI, I.A.D.A., GATTI, A., JANEGITZ, B.C. A novel disposable self-adhesive inked paper device for electrochemical sensing of dopamine and serotonin neurotransmitters and biosensing of glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 138, p. 111310, 2019.
- [219] JĘDRZAK, A., KUZNOWICZ, M., RĘBIŚ, T., JESIONOWSKI, T. Portable glucose biosensor based on polynorepinephrine@magnetite nanomaterial integrated with a smartphone analyzer for point-of-care application. **Bioelectrochemistry**, v. 145, p. 108071, 2022.
- [220] ŞENEL, M. Simple method for preparing glucose biosensor based on in-situ polypyrrole cross-linked chitosan/glucose oxidase/gold bionanocomposite film, **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 287-293, 2015.
- [221] JĘDRZAK, A., RĘBIŚ, T., KLAPISZEWSKI, Ł., ZDARTA, J., MILCZAREK, G., JESIONOWSKI, T. Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 256, p. 176-185, 2018.
- [222] TANG, Z., DU, X., LOUIE, R.F., KOST, G.J. Effects of drugs on glucose measurements with handheld glucose meters and a portable glucose analyzer, **American Journal of Clinical Pathology**, v. 113, p. 75-86, 2000.

- [223] YUAN, C.-J., HSU, C.-L., WANG, S.-C., CHANG, K.-S. Eliminating the interference of ascorbic acid and uric acid to the amperometric glucose biosensor by cation exchangers membrane and size exclusion membrane. **Electroanalysis**, v. 17, p. 2239-2245, 2005.
- [224] WANG, J., LIU, J., CHEN, L., LU, F. Highly selective membrane-free, mediator-free glucose biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 3600-3603, 1994.
- [225] GILMARTIN, M.A.T., HART, J.P., PATTON, D.T. Prototype, solid-phase, glucose biosenso. **Analyst**, v. 120, p. 1973-1981, 1995.
- [226] WANG, J., GOLDEN, T. Metalloporphyrin chemically modified glassy carbon electrodes as catalytic voltammetric sensors. **Analytical Chimica Acta**, v. 217, p. 343-351, 1989.
- [227] HOGAN, C.F., FORSTER, R.J. Mediated electron transfer for electroanalysis: transport and kinetics in tin films of [Ru (bpy) 2PVP10](ClO₄)₂. **Analytical Chimica Acta**, v. 396, p. 3-21, 1999.
- [228] JIA, W.-Z., WANG, K., XIA, X.-H. Elimination of electrochemical interferences in glucose biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 306-318, 2010.
- [229] Oliveira, G.C.M.d. **Desenvolvimento de sensores e imunossensor eletroquímico para detecção de analitos relacionados à doença de Parkinson**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, (2019).
- [230] SILVA, V.A.D, TARTARE, V.A., KALINKE, C., OLIVEIRA, P.R.D., SOUZA, D.C.D., BONACIN, J.A., et al. Construção de um suporte ajustável lab-made impresso em 3D para medição de ângulo de contato. **Química Nova**, v. 43, p. 1312-1319, 2020.
- [231] JOUNG, C.-K., KIM, H.-N., LIM, M.-C., JEON, T.-J., KIM, H.-Y., KIM, Y.-R. A nanoporous membrane-based impedimetric immunosensor for label-free detection of pathogenic bacteria in whole milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 210-215, 2013.
- [232] ROMONTI, D.E., SANCHEZ, A.V.G., MILOŠEV, I., DEMETRESCU, I., CERÉ, S. Effect of anodization on the surface characteristics and electrochemical behaviour of zirconium in artificial saliva. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 458-466, 2016.
- [233] FIGUEIREDO, A., VIEIRA, N.C.S., SANTOS, J.F.D., JANEGITZ, B.C., AOKI, S.M., JUNIOR, P.P., et al. Electrical Detection of Dengue Biomarker Using Egg Yolk Immunoglobulin as the Biological Recognition Element. **Scientific Reports**, v. 5, p. 7865, 2015.

- [234] SILVA, V.A.D, TARTARE, V.A., KALINKE, C., OLIVEIRA, P.R.D., SOUZA, D.C.D., BONACIN, J.A., et al. Construção de um suporte ajustável lab-made impresso em 3D para medição de ângulo de contato. **Química Nova**, v. 43, p. 1312-1319, 2020.
- [235] ANUAR, N.S., BASIRUN, W.J., SHALAUDDIN, MD., AKHTER, S. A dopamine electrochemical sensor based on a platinum–silver graphene nanocomposite modified electrode. **RSC Advances**, v. 10, p. 17336-17344, 2020.
- [236] ANGERSTEIN-KOZLOWSKA, H., CONWAY, B.E., SHARP, W.B.A. The real condition of electrochemically oxidized platinum surfaces: Part I. Resolution of component processes. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 43, p. 9-36, 1973.
- [237] PONTI, G., MACCAFERRI, M., RUINI, C., TOMASI, A., OZBEN, T. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression, **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 57, p. 389-399, 2020.
- [238] DOURADO, A.H.B., ARENZ, M., TORRESI, S.I.C.d. Mechanism of Electrochemical L-Cysteine Oxidation on Pt. **ChemElectroChem**, v. 6, p. 1009-1013, 2019.
- [239] DOURADO, A.H., ANGELIS, L.D.DE., ARENZ, M., TORRESI, S.I.C.d. L-cysteine oxidation on Pt and Au rotating disk electrodes: Insights on mixed controlled kinetics. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 880, p. 114920, 2021.
- [240] ZHOU, M., DING, J., GUO, L.-P., SHANG, Q.-K. Electrochemical Behavior of L-Cysteine and Its Detection at Ordered Mesoporous Carbon-Modified Glassy Carbon Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 5328-5335, 2007.
- [241] LAI, Y.-T., GANGULY, A., CHEN, L.-C., CHEN, K.-H. Direct voltammetric sensing of L-Cysteine at pristine GaN nanowires electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 1688-1691, 2010.
- [242] ABBAS, M.N., SAEED, A.A., SINGH, B., RADOWAN, A.A., DEMPSEY, E. A cysteine sensor based on a gold nanoparticle–iron phthalocyanine modified graphite paste electrode. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2529-2536, 2015.
- [243] KAWASAKI, T., AKANUMA, H., YAMANOUCHI, T. Increased Fructose Concentrations in Blood and Urine in Patients With Diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 353-357, 2022.
- [244] TAPPY, L., ROSSET, R. Fructose metabolism from a functional perspective: implications for athletes, **Sports Medicine**, v. 47, p. 23-32, 2017.

- [245] GROMPE, M.J.U.W. Disorders of tyrosine metabolism, **UpToDate [Internet]**, Waltham (MA), 2016.
- [246] MATHEW, T.K., ZUABIR, M., TADI, P. Blood glucose monitoring. **StatPearls [Internet]**, StatPearls Publishing, 2021.
- [247] SINGH, M., JAISWAL, N., TIWARI, I., FOSTER, C.W., BANKS, C.E. A reduced graphene oxide-cyclodextrin-platinum nanocomposite modified screen printed electrode for the detection of cysteine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 829, p. 230-240, 2018.
- [248] ATACAN, K. CuFe₂O₄/reduced graphene oxide nanocomposite decorated with gold nanoparticles as a new electrochemical sensor material for L-cysteine detection. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 791, p. 391-401, 2019.
- [249] GALLO, M.C., PIRES, B.M., TOLEDO, K.C.F., JANNUZZI, S.A.V., ARRUDA, E.G.R., FORMIGA, A.L.B., et al. The use of modified electrodes by hybrid systems gold nanoparticles/Mn-porphyrin in electrochemical detection of cysteine. **Synthetic Metals**, v. 198, p. 335-339, 2014.
- [250] BONACIN, J.A., DOS SANTOS, P.L., KATIC, V., FOSTER, C.W., BANKS, C.E. Use of Screen-printed Electrodes Modified by Prussian Blue and Analogues in Sensing of Cysteine. **Electroanalysis**, v. 30, p. 170-179, 2018.
- [251] ZIYATDINOVA, G., KOZLOVA, E., BUDNIKOV, H. Selective electrochemical sensor based on the electropolymerized p-coumaric acid for the direct determination of l-cysteine. **Electrochimica Acta**, v. 270, p. 369-377, 2018.
- [252] KALINKE, C., DE OLIVEIRA, P.R., JANEGITZ, B.C., BONACIN, J.A. Prussian blue nanoparticles anchored on activated 3D printed sensor for the detection of L-cysteine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 362, p. 131797, 2022.
- [253] FALKOWSKI, M., REBIS, T., KRYJEWSKI, M., POPENDA, L., LIJEWSKI, S., JURGA, S., et al. An enhanced electrochemical nanohybrid sensing platform consisting of reduced graphene oxide and sulfanyl metalloporphyrines for sensitive determination of hydrogen peroxide and l-cysteine. **Dyes and Pigments**, v. 138, p. 190-203, 2017.
- [254] LANG, P., MEKHALIF, Z., RAT, B., GAMIER, F. Self-assembled alkythiols monolayers onto platinum; Influence of the adsorbed oxygen. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 441, p. 83-93, 1998.
- [255] OLEAN-OLIVEIRA, A., SERAPHIM, P.M., TEIXEIRA, M.F.S. Methylated DNA impedimetric immunosensor based on azo-polymer-AuNPs dots and 5-methylcytosine

antibody using dissolved oxygen as a redox probe. **Electrochemistry Communications**, v. 136, p. 107242, 2022.

[256] MEHMANDOUST, M., GUMUS, Z.P., SOYLAK, M., ERK, N. Electrochemical immunosensor for rapid and highly sensitive detection of SARS-CoV-2 antigen in the nasal sample. **Talanta**, v. 240, p. 123211, 2022.

[257] ARMBRUSTER, D.A., PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation, **Clin Biochem Rev**, v. 29, p. S49-52, 2008.

[258] ERDEM, A., SENTURK, H., YILDIZ, E., MARAL, M. Amperometric immunosensor developed for sensitive detection of SARS-CoV-2 spike S1 protein in combined with portable device. **Talanta**, v. 244, p. 123422, 2022.

[259] FABIANI, L., SAROGLIA, M., GALATÀ, G., DE SANTIS, R., FILLO, S., LUCA, V., et al. Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 171, p. 112686, 2021.

[260] BRAZACA, L.C., IMAMURA, A.H., GOMES, N.O., ALMEIDA, M.B., Scheidt, D.T., Raymundo-Pereira, P.A., et al. Electrochemical immunosensors using electrodeposited gold nanostructures for detecting the S proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, p. 5507-5517, 2022.

[261] STEFANO, J.S., GUTERRES E SILVA, L.R., ROCHA, R.G., BRAZACA, L.C., RICHTER, E.M., MUÑOZ, R.A.A., et al. New conductive filament ready-to-use for 3D-printing electrochemical (bio)sensors: Towards the detection of SARS-CoV-2. **Analytica Chimica Acta**, v. 1191, p. 339372, 2022.

[262] LIV, L. Electrochemical immunosensor platform based on gold-clusters, cysteamine and glutaraldehyde modified electrode for diagnosing COVID-19. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106445, 2021.

[263] MUÑOZ, J., PUMERA, M. 3D-Printed COVID-19 immunosensors with electronic readout. **Chemical Engineering Journal**, v. 425, p. 131433, 2021.

[264] VÁSQUEZ, V., NAVAS, M.-C., JAIMES, J.A., OROZCO, J. SARS-CoV-2 electrochemical immunosensor based on the spike-ACE2 complex. **Analytica Chimica Acta**, v. 1205, p. 339718, 2022.

[265] BASSO, D., A. AITA, PADOAN, A., COSMA, C., NAVAGLIA, F., MOZ, S., et al. Salivary SARS-CoV-2 antigen rapid detection: A prospective cohort study. **Clinica Chimica Acta**, v. 517, p. 54-59, 2021.

- [266] SILVA, V.A.O.P., FERNANDES-JUNIOR, W.S., ROCHA, D.P., STEFANO, J.S., MUNOZ, R.A.A., Bonacin, J.A., et al. 3D-printed reduced graphene oxide/polylactic acid electrodes: A new prototyped platform for sensing and biosensing applications, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 170, p. 112684, 2020.
- [267] Brooks, T., Keevil, C.W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens, **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 203-206, 1997.
- [268] KUMAR, M., BHARDWAJ, R. Wetting characteristics of Colocasia esculenta (Taro) leaf and a bioinspired surface thereof. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-15, 2020.
- [269] KANG, H., GRAYBILL, P.M., FLEETWOOD, S., BOREYKO, J.B., JUNG, S. Seasonal changes in morphology govern wettability of Katsura leaves. **PLOS ONE**, v. 13, p. e0202900, 2018.
- [270] KRISHNAMACHARI, P., HASHAIKEH, R., TINER, M. Modified cellulose morphologies and its composites; SEM and TEM analysis. **Micron**, v. 42, p. 751-617, 2011.
- [271] ALTANGEREL, N., ARIUNBOLD, G.O., GORMAN, C., ALKAHTANI, M.H., BORREGO, E.J., BOHLMAYER, D., et al. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. **PNAS**, v. 114, p. 3393-3396, 2017.
- [272] SCROCCARELLO, A., ÁLVAREZ-DIDUK, R., PELLE, F.D., et al. One-Step Laser Nanostructuring of Reduced Graphene Oxide Films Embedding Metal Nanoparticles for Sensing Applications. **ACS Sensors**, v. 8, p. 598-609, 2023.
- [273] LE, T.-S.D., LEE, Y.A., NAM, H.K., JANG, K.Y., YANG, D., KIM, B., et al. Green Flexible Graphene–Inorganic-Hybrid Micro-Supercapacitors Made of Fallen Leaves Enabled by Ultrafast Laser Pulses. **Advanced Functional Materials**, v. 32, p. 2107768, 2022.
- [274] MENDES, L.F., FILHO, L.A.P., PAIXÃO, T.R.L.C. Polyimide adhesive tapes as a versatile and disposable substrate to produce CO₂ laser-induced carbon sensors for batch and microfluidic analysis. **Microchemical Journal**, v. 182, p. 107893, 2022.
- [275] ABDI, M.M., AZLI, N.F.W.M., LIM, H.N., TAHIR, P.M., KARIMI, G., HOONG, Y.B., et al. Polypyrrole/tannin biobased nanocomposite with enhanced electrochemical and physical properties. **RSC Advances**, v. 8, p. 2978-2985, 2018.
- [276] ARIFFIN, A.A., O'NEILL, R.D., YAHYA, M.Z.A., ZAIN, Z.M. Electropolymerization of ortho-Phenylenediamine and its Use for Detection on Hydrogen Peroxide and Ascorbic Acid by Electrochemical Impedance Spectroscopy. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 10154-10163, 2012.

- [277] BUK, V., PEMBLE, M.E. A highly sensitive glucose biosensor based on a micro disk array electrode design modified with carbon quantum dots and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, v. 298, p. 97-105, 2019.
- [278] GONGONI, J.L.M., FILHO, L.A.P., DE FARIAS, D.M., ARANTES, I.V.S., PAIXÃO, T.R.L.C. Modulating the Electrochemical Response of Eco-Friendly Laser-Pyrolyzed Paper Sensors Applied to Nitrite Determination. **ChemElectroChem**, v. 10, p. e202201018, 2023.
- [279] PAIXÃO, T.R.L.C. Measuring Electrochemical Surface Area of Nanomaterials versus the Randles–Ševčík Equation. **ChemElectroChem**, v. 7, p. 3414-3415, 2020.
- [280] ABOUELAMAIEM, D.I., MOSTAZO-LÓPEZ, M.J., HE, G., PATEL, D., NEVILLE, T.P., PARKIN, I.P., et al. New insights into the electrochemical behaviour of porous carbon electrodes for supercapacitors. **Journal of Energy Storage**, v. 19, p. 337-347, 2018.
- [281] SWINYA, D.L., MARTÍN-YERGA, D., WALKER, M., UNWIN, P.R. Surface Nanostructure Effects on Dopamine Adsorption and Electrochemistry on Glassy Carbon Electrodes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 126, p. 13399-13408, 2022.
- [282] SHRIVASTAVA, A., GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, p. 21, 2011.
- [283] WAN, M., JIMU, A., YANG, H., ZHOU, J., DAI, X., ZHENG, Y., et al. MXene quantum dots enhanced 3D-printed electrochemical sensor for the highly sensitive detection of dopamine. **Microchemical Journal**, v. 184, p. 108180, 2023.
- [284] JIA, D., DAI, J., YUAN, H., LEI, L., XIAO, D. Selective detection of dopamine in the presence of uric acid using a gold nanoparticles-poly(luminol) hybrid film and multi-walled carbon nanotubes with incorporated β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 85, p. 2344-2351, 2011.
- [285] SHARMA, V., SINGH, P., KUMAR, A., GUPTA, N. Electrochemical detection of dopamine by using nickel supported carbon nanofibers modified screen printed electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 133, p. 109677, 2023.
- [286] KALINKE, C., NEUMSTEIR, N.V., APARECIDO, G.d.O., FERRAZ, T.V.d.B., DOS SANTOS, P.L., Janegitz, B.C., et al. Comparison of activation processes for 3D printed PLA-graphene electrodes: electrochemical properties and application for sensing of dopamine. **Analyst**, v. 145, p. 1207-1218, 2020.

- [287] APARNA, T.K., SIVASUBRAMANIAN, R., DAR, M.A. One-pot synthesis of Au-Cu₂O/rGO nanocomposite based electrochemical sensor for selective and simultaneous detection of dopamine and uric acid. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 741, p. 1130-1141, 2018.
- [288] LIU, R., ZENG, X., LIU, J., et al. A glassy carbon electrode modified with an amphiphilic, electroactive and photosensitive polymer and with multi-walled carbon nanotubes for simultaneous determination of dopamine and paracetamol. **Microchimica Acta**, v. 183, p. 1543-1551, 2016.
- [289] SHARMA, V., SINGH, P., KUMAR, A., GUPTA, N. Electrochemical detection of dopamine by using nickel supported carbon nanofibers modified screen printed electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 133, p. 109677, 2023.
- [290] HAGHIGHI, L., HAGHNAZARI, N., KARAMI, C. Tungsten disulfide quantum dots (WS₂ QDs) as a fluorescence probe for detection of dopamine (DA). **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 32, p. 28042-28050, 2021.
- [291] WU, S., SUN, T., WANG, H., FAN, Z., LI, L., FAN, B., et al. A sandwich-structured, layered CoTMPyP/Sr₂Nb₃O₁₀ nanocomposite for simultaneous voltammetric determination of dopamine and ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 873, p. 114403, 2020.
- [292] LIU, L., GE, Y., LIU, X., RUAN, J., CAO, J., WEI, C., et al. One-pot ball-milling preparation of cetylpyridinium chloride/ α -zirconium phosphate composite for simultaneous detection of ascorbic acid and dopamine. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 860, p. 157927, 2021.
- [293] YANG, L., LIU, S., ZHANG, Q., Li, F. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid using AuNPs@polyaniline core-shell nanocomposites modified electrode. **Talanta**, v. 89, p. 136-141, 2012.
- [294] BLASQUES, R.V., STEFANO, J.S., CAMARGO, J.R., SILVA, L.R.G., BRAZACA, L.C., JANEGITZ, B.C. Disposable Prussian blue-anchored electrochemical sensor for enzymatic and non-enzymatic multi-analyte detection. **Sensors and Actuators Reports**, v. 4, p. 100118, 2022.
- [295] CARVALHO, J.H.S., GOGOLA, J.L., BERGAMINI, M.F., MARCOLINO-JUNIOR, L.H., JANEGITZ, B.C. Disposable and low-cost lab-made screen-printed electrodes for voltammetric determination of L-dopa. **Sensors and Actuators Reports**, v. 3, p. 100056, 2021.

- [296] ELGRISHI, N., ROUNTREE, K.J., MCCARTHY, B.D., ROUNTREE, E.S., EISENHART, T.T., DEMPSEY, J.L. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, p. 197-206, 2018.
- [297] Palakollu, V.N., Thapliyal, N., Chiwunze, T.E., Karpoormath, R., Karunanidhi, S. Cherukupalli, S. Electrochemically reduced graphene oxide/Poly-Glycine composite modified electrode for sensitive determination of l-dopa. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 394-404, 2017.
- [298] ĐURĐIĆ, S., STANKOVIĆ, V., VLAHOVIĆ, F., OGNJANOVIĆ, M., KALCHER, K., MANOJLOVIĆ, D., et al. Carboxylated single-wall carbon nanotubes decorated with SiO₂ coated-Nd₂O₃ nanoparticles as an electrochemical sensor for L-DOPA detection. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106416, 2021.
- [299] HATEFI-MEHRJARDI, A., KARIMI, M.A., BARANI, A., SOLEYMANZADEH, M. Poly-dianix blue/multi-walled carbon nanotube modified electrode for detection of levodopa in the presence of high concentrations of ascorbic and uric acids. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 193-201, 2017.
- [300] TAKEDA, H.H., SILVA, T.A., JANEGITZ, B.C., VICENTINI, F.C., MATTOSO, L.H.C., FATIBELLO-FILHO, O. Electrochemical sensing of levodopa or carbidopa using a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film. **Analytical Methods**, v. 8, p. 1274-1280, 2016.
- [301] STANKOVIĆ, D.M., JOVIĆ, M., OGNJANOVIĆ, M., et al. Point-of-care amperometric determination of L-dopa using an inkjet-printed carbon nanotube electrode modified with dandelion-like MnO₂ microspheres. **Microchimica Acta**, v. 186, p. 532, 2019.
- [302] GUO, X., YUE, H., HUANG, S., et al. Electrochemical method for determination of levodopa in the presence of uric acid using In₂S₃ nanospheres on 3D graphene-modified ITO glass electrode. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 31, p. 13680-1367, 2020.
- [303] AFKHAMI, A., KAFRASHI, F. AND MADRAKIAN, T. Electrochemical determination of levodopa in the presence of ascorbic acid by polyglycine/ZnO nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes-modified carbon paste electrode. **Ionics**, v. 21, p. 2937-2947, 2015.
- [304] JI, D., XU, N., LIU, Z., SHI, Z., LOW, S.S., LIU, J., et al. Smartphone-based differential pulse amperometry system for real-time monitoring of levodopa with carbon

nanotubes and gold nanoparticles modified screen-printing electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 129, p. 216-223, 2019.

[305] YUE, H.Y., WU, P.F., HUANG, S., et al. Electrochemical determination of levodopa in the presence of uric acid using ZnO nanoflowers-reduced graphene oxide. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 30, p. 3984-3993, 2019.

[306] ROHANIFAR, A., DEVASURENDRA, A.M., YOUNG, J.A., KIRCHHOFF, J.R. Determination of l-DOPA at an optimized poly(caffeic acid) modified glassy carbon electrode. **Analytical Methods**, v. 8, p. 7891-7897, 2016.

[307] BAIÃO, V., TOMÉ, L.I.N., BRETT, C.M.A. Iron Oxide Nanoparticle and Multiwalled Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrodes. Application to Levodopa Detection. **Electroanalysis**, v. 30, p. 1342-1348, 2018.

[308] GANJALI, M.R., SALIMI, H., TAJIK, S., BEITOLLAHI, H., REZAPOUR, M., LARIJANI, B. Application of Fe₃O₄@ SiO₂/MWCNT film on glassy carbon electrode for the sensitive electroanalysis of levodopa. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, p. 5243-5253, 2017.

[309] BAGHAYERI, M., BEITOLLAHI, H., AKBARI, A., et al. Highly Sensitive Nanostructured Electrochemical Sensor Based on Carbon Nanotubes-Pt Nanoparticles Paste Electrode for Simultaneous Determination of Levodopa and Tyramine. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 54, p. 292-301, 2018.

[310] YUE, H.Y., SONG, S.S., HUANG, S., ZHANG, H., GAO, X.P.A., GAO, X., et al. Preparation of MoS₂-graphene Hybrid Nanosheets and Simultaneously Electrochemical Determination of Levodopa and Uric Acid. **Electroanalysis**, v. 29, p. 2565-2571, 2017.

[311] SILVA, R.A.B.d. **Caracterizações e aplicações analíticas de eletrodos compósitos modificados com Azul da Prússia e determinações simultâneas em sistemas de análise por injeção em batelada empregando somente um eletrodo de trabalho**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, (2012).

[312] SHERVEDANI, R.K., BAGHERZADEH, M., MOZAFFARI, S.A. Determination of dopamine in the presence of high concentration of ascorbic acid by using gold cysteamine self-assembled monolayers as a nanosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 115, p. 614-621, 2006.

[313] XUE, C., HAN, Q., WANG, Y., WU, J., WEN, T., WANG, R., et al. Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold

nanoparticles doped molecularly imprinted polymers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 199-203, 2013.

[314] LI, B., ZHOU, Y., WU, W., LIU, M., MEI, S., ZHOU, Y., et al. Highly selective and sensitive determination of dopamine by the novel molecularly imprinted poly(nicotinamide)/CuO nanoparticles modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 121-128, 2015.

[315] del POZO, M., MEJÍAS, J., HERNÁNDEZ, P., QUINTANA, C. Cucurbit[8]uril-based electrochemical sensors as detectors in flow injection analysis. Application to dopamine determination in serum samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p. 62-69, 2014.

[316] CHEN, P.-Y., VITTAL, R., NIEN, P.-C., HO, K.-C. Enhancing dopamine detection using a glassy carbon electrode modified with MWCNTs, quercetin, and Nafion®. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3504-3509, 2009.

[317] WONG, A., SANTOS, A.M., FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 85, p. 68-73, 2018.

[318] GIMENES, D.T., dos SANTOS, W.T.P., TORMIN, T.F., MUNOZ, R.A.A., RICHTER, E.M. Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, v. 22, p. 74-78, 2010.

[319] JÚNIOR, L.R., FERNANDES, J.C.B., OLIVEIRA NETO, G.d.O., KUBOTA, L.T. Development of a new FIA-potentiometric sensor for dopamine based on EVA-copper(II) ions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 481, p. 34-41, 2000.

[320] SÝS, M., MUKHERJEE, A., JASHARI, G., ADAM, V., ASHRAFI, A.M., NOVÁK, M., RICHTER, L. Bis(2,2'-bipyridil)Copper(II) Chloride Complex: Tyrosinase Biomimetic Catalyst or Redox Mediator?. **Materials**, v. 15, p. 4595, 2021.

[321] YAO, T., OKANO, G. Simultaneous Determination of l-Glutamate, Acetylcholine and Dopamine in Rat Brain by a Flow-Injection Biosensor System with Microdialysis Sampling. **Analytical Sciences**, v. 24, p. 1469-1473, 2008.

[322] Yeh, W.-L., Kuo, Y.-R., Cheng, S.-H. Voltammetry and flow-injection amperometry for indirect determination of dopamine. **Electrochemistry Communications**, v. 10, p. 66-70, 2008.