

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS DESCARTÁVEIS COM TINTAS
CONDUTORAS E SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA SENSORIAMENTO E
BIOSSENSORIAMENTO DE DISFUNÇÕES HORMONAIS**

Jéssica Rocha Camargo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Materiais como requisito à
obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIA
DOS MATERIAIS

Orientador: Dr. Bruno Campos Janegitz

Agência Financiadora: FAPESP – Processo n°: 2019/23177-0

SOROCABA-SP

2024

“Seja forte. Seja aplicada. Seja conscienciosa. E isso nunca se consegue escolhendo o caminho fácil. Exceto claro, quando o caminho já seja fácil por si. Às vezes, acontece. Em tal caso, não busque um novo mais complicado. Só os mártires vão procurar os problemas de maneira deliberada. (...) Ria. Ria muito e com vontade. E, quando as circunstâncias pedirem silêncio, converta a risada em sorriso. Não se conforme. Descubra o que quer e persegue-o. E se não souber o que quer, tenha paciência. Todas as respostas chegarão ao seu devido tempo e verá que seus desejos estiveram diante de você todo o tempo.”

— *Julia Quinn*

*Dedico este trabalho aos meus pais
Cláudia e Luiz Rogério pelo
apoio e amor incondicionais*

Agradecimento

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por todas as oportunidades concedidas a mim, pela força e tranquilidade nos momentos de fraqueza e dificuldades.

À minha família, pelo amor incondicional e pelo apoio constante em todas as etapas da minha vida acadêmica. Aos meus pais, Claudia e Luiz Rogério, que sempre acreditaram em mim e incentivaram a seguir meus sonhos. As minhas avós Creuza e Maria Therezinha e ao meu avô Luiz Carlos por sempre estarem presentes na minha vida e me apoiarem. As minhas madrinhas Adriana e Fabiana, por sempre me acolherem nas necessidades. Ao meu noivo Pedro pelo amor, presença constante, incentivo e paciência, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

Ao meu orientador Bruno, pela paciência, orientação e ensinamentos valiosos que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

A minha professora Déborah “xuxu”, que além de amiga, me ensinou muito e me tornou mais confiante para falar, ler e escrever em inglês.

Aos meus amigos, que me apoiaram nos momentos de dificuldade e celebraram comigo as conquistas. Em especial a todos que passaram pelo LSNano de 2015 a 2024, por compartilharem essa jornada comigo.

A todos os colegas e professores que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e profissional, oferecendo conhecimentos, críticas construtivas e palavras de incentivo.

As agências de fomento, Capes, CNPQ e FAPESP, mas principalmente para a FAPESP que me fomentou durante toda graduação, doutorado direto e de Estágio de Pesquisa no Exterior

Por fim, dedico este trabalho a mim mesmo, pela perseverança, dedicação e esforço ao longo desta caminhada.

Resumo

Os avanços relacionados a novas plataformas sensoriais eletroquímicas que permitam a realização de análises rápidas, de forma miniaturizada e com alta sensibilidade são uma das vertentes que mais ganham destaque nos últimos anos. Esse destaque pode ser justificado devido a facilidade de confecção de sistemas eletroquímicos *lab-made*, os quais, mesmo em países emergentes, tem seu desenvolvimento possível devido ao baixo custo relativo. Os materiais utilizados para a confecção das tintas condutoras em geral são: veículo polimérico, material condutor e possíveis aditivos que em proporções adequadas formarão uma tinta adequada a ser impressa sobre um substrato inerte. Neste contexto, apresentamos algumas propostas de sensores preparados com tintas condutoras de baixo custo. No capítulo 1, uma nova tinta condutora à base de água foi desenvolvida para fabricar eletrodos descartáveis serigrafados, projetados especificamente para detecção ácido úrico (UA) e catecol. Esta ofereceu vantagens em termos de menor toxicidade e impacto ambiental. Para o UA observou-se a faixa linear de 8,0 a 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e limite de detecção, $\text{LOD} = 3,63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Em comparação aos eletrodos comerciais, o CGG/PET proposto é mais flexível e de menor custo, com um preço de fabricação estimado de apenas 0,006 dólares ou 0,033 reais por eletrodo. Para o catecol, a faixa linear foi de 0,5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O capítulo 2 concentrou-se no desenvolvimento de novas composições de tintas de prata para preparar eletrodos de pseudo-referência, essenciais em muitas aplicações eletroquímicas. Como prova de conceito das tintas de prata foi realizada a detecção de β -estradiol. Com concentrações de β -estradiol na faixa linear de 1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, no sistema referenciado pela tinta Ag e esmalte de unhas obteve-se o LOD de $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e ao sistema referenciado pela tinta Ag e goma laca, obteve-se o LOD de $9,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Custando cerca de US\$ 2,02/R\$ 11,06 o grama de tinta com esmalte para unhas e US\$ 2,40/R\$ 13,14 o grama de tinta com goma-laca. No capítulo 3, foi desenvolvido um sistema eletroquímico envolvendo goma laca, grafite, modificado com platina e o anticorpo anti-estrona para a detecção de estrona (E1), um hormônio esteroide que podem estar associados a condições médicas, como menopausa precoce, síndrome dos ovários policísticos e câncer de mama. Com concentrações de E1, na faixa de 5,0 a 1000 nmol L^{-1} e LOD de 0,70 nmol L^{-1} , com custo total 0,79 centavos de real por biossensor. Por fim, no capítulo 4, foram abordados os eletrodos serigrafados de *carbon black super p*, polivinilpirrolidona (PVP) e quitosana aplicados para a detecção de triptofano (TRP), um aminoácido essencial com diversas funções biológicas importantes. A faixa linear para o TRP foi de 0,5 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com LOD de 0,018 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Todas as tintas desenvolvidas nessa tese apresentaram resultados satisfatórios sendo ótimas alternativas para o desenvolvimento de construção de sistemas eletroquímicos descartáveis. Deste modo, as tintas e sistemas desenvolvidos são de baixo custo e podem ser aplicadas para a detecção de diferentes analitos, como os biomarcadores, que se relacionam com doenças que afetam diretamente a saúde humana.

Palavras-chave: Sensores eletroquímicos; Biossensores; Tintas Condutoras; Eletrodos Descartáveis;

Abstract

Development of disposable devices with conductive inks and low-cost substrates for sensing and biosensing of hormonal dysfunctions.

Advances in new electrochemical sensor architectures that enable rapid analysis in miniaturized form and with high sensitivity are one of the most important areas of recent years. This importance is since electrochemical systems are easy to produce in the laboratory and can be developed even in emerging countries due to their relatively low cost. The materials used to produce conductive inks usually include a polymeric vehicle, a conductive material and possible additives that, in appropriate proportions, form an ink suitable for printing on an inert substrate. In this context, we present some proposals for sensors made with low-cost conductive inks. In Chapter 1, a new water-based conductive ink was developed for the fabrication of disposable screen-printed electrodes specifically intended for the detection of uric acid (UA) and catechol. The choice of a water-based ink offers advantages in terms of reduced toxicity and environmental impact. For UA, the linear range was between 8.0 and 500.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a limit of detection (LOD) of $3.63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The proposed CGG/PET is more flexible and cost-effective than commercial electrodes, with an estimated manufacturing price of only 0.006 dollars or 0.033 reais per electrode. For catechol, the linear range was between 0.5 and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and a LOD of 0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Chapter 2 focused on developing new silver ink compositions to prepare pseudo-reference electrodes, which are essential for many electrochemical applications. As a proof of concept for the silver inks, the detection of β -estradiol was performed. At β -estradiol concentrations in the linear range of 1.0 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a LOD of $1.3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, was obtained for the system referenced by the Ag-NP ink. For the system referred to by the Ag-SL ink, a LOD of $9.5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The cost was approximately US\$ 2.02/R\$ 11.06 per gram of ink with nail polish and US\$ 2.40/R\$ 13.14 per gram of ink with shellac. In Chapter 3, an electrochemical system using shellac, graphite and platinum was developed for the biosensor of estrone (E1), a steroid hormone that may be associated with diseases such as premature menopause, polycystic ovary syndrome and breast cancer. At E1 concentrations ranging from 5.0 to 1000 nmol L^{-1} , with a LOD of 0.70 nmol L^{-1} , the total cost was 0.79 reais per biosensor. Finally, in Chapter 4, screen-printed electrodes made of Super P carbon black, polyvinylpyrrolidone (PVP) and chitosan were discussed for the detection of tryptophan (TRP), an essential amino acid with various important biological functions. The linear range for TRP was 0.5 to 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with an LOD of 0.018 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and an LOQ of 0.060 $\mu\text{mol L}^{-1}$. All inks developed in this thesis showed satisfactory results and are excellent alternatives for the development of disposable electrochemical systems. Thus, the developed inks and architectures are cost-effective and can be used for sensing and biosensing of various analytes and biomarkers related to diseases that directly affect human health.

Keywords: Electrochemical sensors; Electrochemical biosensors; Conductive inks; Disposable electrodes

Índice de Assuntos

	Pág.
Agradecimento.....	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice de Tabelas	x
Índice de Figuras	xii
Símbolos e Abreviaturas.....	xx
1 Introdução Geral	1
1.1 Sensores Descartáveis.....	1
1.2 Eletrodos Serigrafados	2
1.3 Tintas Condutoras	3
1.3.1 Tintas Condutoras À Base D'água.....	4
1.3.2 Tintas Metálicas	5
1.3.3 Tintas de Prata	6
1.4 Modificação de sensores eletroquímicos com metais.....	7
1.5 Biossensores.....	8
1.6 Analitos de Interesse	10
1.6.1 Estrona	10
1.6.2 Tirosinase.....	11
1.6.3 Ácido Úrico.....	12
1.6.4 β -Estradiol.....	13
1.6.5 Triptofano	14
2 Capítulo 1 - Nova tinta condutora à base de água para a preparação de eletrodos descartáveis serigrafados para aplicações sensoriais e biossensoriais.....	15
2.1 Objetivos.....	16
2.2 Experimental.....	16
2.2.1 Reagentes e soluções	16
2.2.2 Preparo das tintas	16
2.2.3 Preparo do sensor CGG/PET	17
2.2.4 Modificação do sensor CGG/PET para biossensor com Tirosinase	18

2.2.5	Equipamentos e caracterização do sistema	19
2.3	Resultados e Discussão	20
2.3.1	Eletrodo CGG/PET	20
2.3.2	Caracterização da tinta condutora de quitosana, grafite e glicerina.....	21
2.3.3	Determinação eletroquímica da concentração de UA com eletrodo descartável CGG/PET	27
2.3.4	Construção da curva analítica e análise de UA em amostras.....	29
2.4	Comparação com a literatura	32
2.5	Modificação com Tirosinase para a confecção do biossensor	33
2.6	Comparação com a literatura	37
2.7	Conclusão - Capítulo 1	40
3	Capítulo 2 - Desenvolvimento de novas composições de tintas de prata para a preparação de eletrodos de pseudo-referência.....	41
3.1	Objetivos.....	41
3.2	Experimental.....	41
3.2.1	Reagentes e soluções	41
3.2.2	Preparo das tintas	41
3.2.3	Equipamentos.....	43
3.2.4	Caracterização das tintas de prata	43
3.3	Resultados e discussão.....	44
3.3.1	Estudo das composições das tintas de prata.....	44
3.3.2	Caracterização morfológica das tintas condutoras Ag.....	46
3.3.3	Aplicação de tintas prata como pseudo-referências.....	52
3.3.4	Avaliação de estabilidade	54
3.4	Prova de conceito da aplicação de tintas prata como pseudo-referência	56
3.5	Conclusão - capítulo 2	58
4	Capítulo 3. Desenvolvimento de um sistema eletroquímico com goma laca, grafite e platina para biossensoriamento de estrona	60
4.1	Objetivos.....	60
4.2	Experimental.....	60
4.2.1	Reagentes e soluções	60
4.2.2	Preparo das tintas	60

4.2.3	Modificação do sensor para biossensor de Estrona	61
4.3	Resultados e discussão	63
4.3.1	Otimização da quantidade de platina eletrodepositada sobre o eletrodo de trabalho 63	
4.4	Construção do biossensor para Estrona (E1)	68
4.5	Otimização dos parâmetros para avaliação do biossensor para Estrona (E1).....	71
4.6	Construção da curva analítica do biossensor para Estrona (E1).....	79
4.6.1	Análise de amostras fortificadas com Estrona (E1).....	79
4.7	Comparação com a literatura	80
4.8	Conclusão – capítulo 3.....	81
5	Capítulo 4 - "Eletrodos Serigrafados de carbon black super P, PVP e quitosana utilizados para a detecção de triptofano”.....	83
5.1	Objetivos.....	83
5.2	Experimental.....	83
5.2.1	Reagentes e soluções	83
5.2.2	Equipamentos.....	84
5.2.3	Preparação dos Eletrodos Serigrafados (SPE).....	84
5.3	Resultados e Discussão	86
5.3.1	Produção da tinta CBSP e sistema SPE.....	86
5.3.2	Avaliação da quantidade de CBSP na tinta condutora	88
5.3.3	Estudo do número de vezes que o rodo passa sobre a tela.....	90
5.3.4	Estudo do comprimento do sensor.....	91
5.4	Caracterização morfológica	92
5.5	Caracterização eletroquímica.....	93
5.6	Determinação de Triptofano	96
5.6.1	Estudo dos efeitos dos parâmetros.....	97
5.7	Comparação com a literatura	101
5.8	Conclusão – Capítulo 4.....	103
6	Resumo dos trabalhos	104
7	Conclusão geral.....	106
8	Referências Bibliográficas	107
	Anexo 1 - Publicações no período do doutorado direto	121

Índice de Tabelas

Tabela 1. Determinação de UA pelo dispositivo CGG/PET	30
Tabela 2. Determinação da porcentagem de interferência de espécies concomitantes do UA pelo dispositivo CGG/PET	32
Tabela 3. Comparação entre o CGG/PET e sistemas sensoriais encontrados na literatura para a determinação de UA	33
Tabela 4. Determinação de catecol por cronoamperometria em amostra de água utilizando o biossensor Tyr-MWCNT- CGG/PET (n = 3).....	37
Tabela 5. Determinação da porcentagem de interferência de espécies concomitantes do Catecol pelo dispositivo Tyr-MWCNT-CGG/PET	37
Tabela 6. Comparação das características analíticas do sensor proposto com alguns sensores para UA e catecol relatados na literatura	39
Tabela 7. Composições para a produção de tinta condutora de prata.....	45
Tabela 8. Comparação entre as tintas de prata propostas para a fabricação de eletrodos pseudo-referência.....	58
Tabela 9. Combinações de experimentos utilizados para otimização de platina. Foi realizado uma variação de dois fatores, com concentração de platina de 0,01 a 5,0 mol L ⁻¹ e tempo técnica de cronoamperometria eletrodeposição, na qual aplicou-se o potencial de -0,6V , de 30 a 300 segundos.....	64
Tabela 10. Parametros da voltametria de onda quadrada e faixa de estudo utilizada para otimização da voltametria de onda quadrada	71
Tabela 11. Mapeamento de duas variáveis, Amplitude de modulação e Frequência, para otimização da voltametria de onda quadrada	74
Tabela 12. Mapeamento de duas variáveis, Amplitude de modulação e Frequência, com faixa reduzida dos experimentos, para otimização da voltametria de onda quadrada....	76
Tabela 13. Determinação de E1 por voltametria de onda quadrada em amostras de soro humano e Urina sintética utilizando o biossensor E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (n = 3).....	80
Tabela 14. Comparação do biossensor proposto com outros sistemas para E1/Estrogênios encontrados na literatura.....	81
Tabela 15. Estudo dos efeitos dos parâmetros no sinal de corrente	98

Tabela 16. Determinação de TRP em amostras farmacêuticas e alimentares utilizando o CBSP-PVP-CH/PES pela técnica de DPV (n = 3). Eletrólito de suporte: solução tampão salina de fosfato (pH 7,0)	100
Tabela 17. Desempenho analítico do CBSP-PVP-CH/PES para determinação de triptofano comparado com a literatura.....	102
Tabela 18. Resumo em tabela dos trabalhos desenvolvidos nos 4 capítulos apresentados na presente tese.....	105

Índice de Figuras

Figura 1. Esquemática do preparo do sensor CGG/PET. (passo 1) A solução de quitosana, o grafite e o glicerol foram misturados; (passo 2) A tinta foi agitada por 270s a 3500 rotações por minuto; (passo 3) O substrato foi preparado e um delimitador adesivo sobre o mesmo; (passo 4) A tinta foi espalhada o delimitador foi removido, e posterior tempo de secagem na estufa, o sensor está pronto para utilização na obtenção de sinais analíticos (passo 5)	18
Figura 2. Esquemática do preparo do biossensor. Um volume de 10 µL de uma solução contendo MWCNTs, DHP 1:1 mg/mL e 50 unidades de Tyr foi gotejada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, tornando-o o biossensor nomeado Tyr-MWCNT-CGG/PET..	19
Figura 3. Sensores descartáveis obtidos com tinta condutora de quitosana, grafite e glicerol sobre PET e sensores individualizados e delimitados (Foto com régua).	20
Figura 4. Voltamograma cíclico de CGG/PET em KCl 0,1 mol L ⁻¹ (tracejado) e equimolar [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (preto) 1,0 mmol L ⁻¹ , v = 50 mV s ⁻¹	22
Figura 5. (A) Voltametria cíclica do dispositivo CGG/PET na presença de [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ e KCl 0,1 mol L ⁻¹ , variando as velocidades de varredura de 25 a 175 mV s ⁻¹ (B) Gráfico de pontos I _p vs v ^{1/2}	23
Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo CGG/PET em KCl 0,1 mol L ⁻¹ na presença de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ para medições consecutivas realizadas com o mesmo (A) e diferentes eletrodos (B) (n=5); Velocidade de varredura: 50 mV/s	23
Figura 7. Espectros de FTIR do Grafite em pó (azul), do filme de quitosana (vermelho) e da tinta condutora de grafite, quitosana e glicerol (preto).	25
Figura 8. (a) Imagens de MEV obtidas para o CGG/PET com aumento de 220x; (b) e 800x; (c) mapeamento ColorSEM da superfície CGG/PET (ampliação de 1000 ×); (d) para o MWCNT-CGG/PET com aumento de 1200x; (e) para o Tyr-MWCNT-CGG/PET com aumento de 2000x.....	26
Figura 9. Medidas de ângulo de contato de (A) PET lixado e (B) do sensor CGG/PET. Essas medidas foram realizadas utilizando 70 mL de água deionizada e posterior gotejamento aguardou-se 10s para tirar as fotos;	27
Figura 10. Voltamogramas cíclicos CGG/PET utilizado em solução de tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) e UA nas concentrações 1,0×10 ⁻³ e 1,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em tampão fosfato (pH 7,0), v = 50 mV s ⁻¹	28

Figura 11. Possível reação de oxidação do UA.	29
Figura 12. (A) Voltamogramas lineares em presença de UA nas concentrações de 8,0; 10,0; 30,0; 50,0; 80,0; 100,0; 300,0 e 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0); $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ (B) Gráfico de pontos obtidos através da curva analítica para UA. 30	
Figura 13. Teste de interferência de analitos concomitantes. (A) $\text{CaCl}_2 \text{ H}_2\text{O} + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (B) $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (C) $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (D) UA, DA e AA sem espécies concomitantes, UA+DA e UA+AA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); (E) $\text{NaCl} + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (F) Uréia+UA e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$);	31
Figura 14. (a) Voltamogramas lineares de CGG/PET, MWCNT-CGG/PET e Tyr-MWCNT-CGG/PET em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) contendo catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} ; (b) Oxidação enzimática de catecol em o-quinona; (c) Cronoamperogramas registrados em diferentes concentrações de catecol (0,5; 1,0; 5,0; 8,0; 10,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0). Potencial aplicado = $-0,05 \text{ V}$ vs. Grafite (d) Curva analítica para catecol por Cronoamperometria (I vs. C_{catecol});	35
Figura 15. Cronoamperogramas registrados em diferentes concentrações de catecol (0,5; 1,0; 5,0; 8,0; 10,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) utilizando o MWCNT-CGG/PET. Potencial aplicado = $-0,05 \text{ V}$ vs. Grafite	36
Figura 16. Esquema da preparação (a) da tinta e dos pseudo-eletrodos de referência, utilizando (b) folhas de acetato, (c) grafite SPE; Para preparar as tintas foram misturados 0,5g de prata em pó com 0,5g esmalte e 0,6g de prata em pó com 0,4g de goma-laca, essas misturas foram devidamente agitadas e estavam prontas para utilização. As tintas foram utilizadas em folhas de acetato e eletrodos do tipo SPE, após secagem em temperatura ambiente por 24h ambos se encontram prontos para uso, bem como para futuras modificações.	42
Figura 17. Imagens dos eletrodos de pseudo-referência produzidos com (a) SPE e folhas de acetato com a tinta Ag-NP e (b) SPE e folhas de acetato com a tinta Ag-SL.	46
Figura 18. (a) Imagens MEV obtidas para tinta Ag-NP em ampliação de 5000x; (b) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-NP com ampliação de 5000x; (c) e tinta Ag-NP em ampliação de 2000x; (d) Tinta Ag-NP com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (e) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-NP com AgCl depositado em ampliação de 5000x;	

(f) e tinta Ag-NP com AgCl depositado em aumento de 2000x; (g) tinta Ag-SL com ampliação de 5000x; (h) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-SL (ampliação 5000x); (i) e tinta Ag-SL em 2000x; (j) Tinta Ag-SL com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (e) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-SL com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (f) e tinta Ag-SL com AgCl depositado em aumento de 2000x;.....	48
Figura 19. Mapeamento EDS de (a) tinta Ag-NP; (b) tinta Ag-NP com AgCl depositado; (c) tinta Ag-SL; (d) Tinta Ag-SL com AgCl depositado e (e) Tinta Ag Comercial.....	49
Figura 20. (a) Espectro de raios X de tintas condutoras de Ag, Ag-NP em (preto), Ag-SL em (vermelho) e tinta comercial (azul); (b) medidas de ângulo de contato para tintas Ag-NP (86°), Ag-SL (79°) e comercial (99°) espalhadas em folhas de acetato.....	51
Figura 21. As fotos do Teste de Fita Adesiva foram realizadas usando o sistema tipo SPE e as tintas Ag condutoras usadas sobre o eletrodo de referência. (a) representou a imagem do adesivo removido a 45°, e (b) 90° utilizando a tinta carbonácea Grafite e SL e a tinta Ag-SL. (c) e (d) representaram a imagem obtida do adesivo removido a 45° e 90°, respectivamente, utilizando as tintas carbonáceas Grafite e SL e tinta Ag-NP. <i>Insets</i> : fotos de dispositivos SPE após a extração.....	52
Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE e GP-SL/AS utilizando diferentes eletrodos de referência/pseudo-referência, utilizando KCl 0,1 mol L ⁻¹ como eletrólito suporte e [Fe(CN ₆)] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ como sonda eletroquímica. (a) GCE vs. (vermelho) Ag AgCl KCl(sat.); (preto) Tinta Comercial; (rosa) tinta Ag-NP; (azul) tinta Ag-SL; (Verde) tinta AgCl Ag-NP e (laranja) tinta AgCl Ag-SL. (b) GP-SL/AS vs. (vermelho) Ag AgCl KCl(sat.); (preto) Tinta Comercial; (rosa) tinta Ag-NP; (azul) tinta Ag-SL; (Verde) tinta AgCl Ag-NP; (laranja) tinta AgCl Ag-SL e (roxo) tinta de Grafite; Velocidade de varredura, 50 mV s ⁻¹	54
Figura 23. Medições de OCP com o sistema GP-SL/AS (SPE), utilizando tinta de grafite-SL (preto), tinta Ag-SL (rosa) e tinta Ag-NP (azul) como eletrodos de trabalho e Ag AgCl KCl(sat.) como eletrodo de referência para ambos os sistemas.	55
Figura 24. Medidas voltamétricas cíclicas sucessivas (n=100) obtidas para [Fe(CN ₆)] ^{3-/4-} 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ . (a) vs. Ag-NP e (b) vs. Ag-SL. Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹	56
Figura 25. Gráfico de potencial (V) vs. concentração das tintas de prata desenvolvidas (a) sistema GP-SL/AS referenciado por tinta Ag-NP; (b) sistema GP-SL/AS referenciado por	

tinta Ag-SL; Voltamograma de onda quadrada registrado em diferentes concentrações de β -estradiol, de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em solução salina de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) utilizando (c) a Tinta Ag-NP e (d) a tinta Ag-SL como pseudo-referência. Condições SWV: Frequência = 90 Hz, amplitude = 80 mV e Incremento de potencial = 9 mV. *Inset*: Gráfico de pontos da curva analítica para β -estradiol 57

Figura 26. Esquema da preparação (a) tinta condutora de grafite, goma laca e diluente para PU; (b) A tinta condutora pronta foi espalhada sobre a superfície de uma folha de acetato e um delimitador adesivo foi colado delimitando a área que entrará em contato com a amostra, o sensor foi nomeado GP-SL/AS; (c) sobre a superfície do GP-SL/AS foi realizada a eletrodeposição de Pt; (d) Grupos protetores, bem como o antígeno foram adicionados a superfície do Pt-GP-SL/AS formando o AntiE1-EDS/NHS-3MPA-Pt-GP-SL/AS, (E) o biossensor estará pronto para realizar as detecções de E1..... 62

Figura 27. a) Gráfico em 3D relacionado ao valor do quociente I_c/I_a . b) Gráfico em 2D relacionado ao valor do quociente I_c/I_a , estrela posicionada sobre os valores ótimos escolhidos. Percebe-se que a concentração ótima fica entre 0,05 e 1,0 mmol L^{-1} , com tempo de eletrodeposição inferior a 100 segundos, uma vez que buscamos o quociente I_c/I_a próximo ao valor 1 e o perfil com concentrações e maiores tempos apresentam resultados cada vez mais distantes de 1 referentes a relação I_c/I_a 65

Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo Pt-GP-SL/AS em KCl 0,1 mol L^{-1} na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L^{-1} para medições consecutivas realizadas em diferentes concentrações de PtCl_4 . Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} 66

Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo Pt-GP-SHL/OPS em KCl 0,1 mol L^{-1} na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L^{-1} para medições consecutivas realizadas em diferentes eletrodos. Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} 67

Figura 30. (a) Imagens de MEV obtidas para o Pt-GP-SL/AS com aumento de 1000x; (b) e 2000x; (c) mapeamento EDS da superfície CGG/PET (ampliação de 4000x); (d) 8000x; 68

Figura 31. Diagrama esquemático da fabricação do imunossensor para detecção do hormônio E1. Inicialmente 10 μL uma solução de 0,075 mmol L^{-1} de 3-MPA foi gotejada sobre o eletrodo de trabalho, este foi lavado com PBS pH 7,4 e seco sem contato direto do papel com a superfície modificada. Uma solução com 10 μL de EDC/NHS nas concentrações de 5,0 e 8,0 mmol L^{-1} foi gotejada sobre o eletrodo, por 1h30, e foi lavado

e seco conforme passo anterior. O anticorpo E1 diluído 1000x foi preparado em PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4), no volume de 10 µL, que foi gotejado também sobre o eletrodo de trabalho, deixou-se por 1h30, lavou-se o eletrodo com PBS pH 7,4 e secou-se conforme passos anteriores. O volume de 10 µL de BSA foi utilizado como bloqueador de sítios inespecíficos, desta forma, ele interage com as extremidades livres dos agentes de reticulação, promovendo melhor seletividade do biossensor. Por fim, a E1 foi preparada na faixa de concentração de 5,0 x 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ a 1,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , em PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4, está foi incubada também por 1h30.	69
Figura 32. Voltametrias cíclicas registradas com dispositivo Pt-GP-SL/AS e suas subsequentes modificações 3MPA, EDC/NHS, Anti E1 e E1, na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ e PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4), velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹	70
Figura 33. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AC modificando os parâmetros da técnica conforme triagem em meio de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ . Parâmetros da voltametria de onda quadrada descritos na Tabela 11;	73
Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AS modificando os parâmetros da técnica conforme mapeamento apresentado na Tabela 4, em meio de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ . Parâmetros SWV descritos na Tabela 10.	74
Figura 35. (a) Gráfico em 3D relacionado ao valor da corrente obtida na SWV. b) Gráfico em 2D relacionado ao valor da corrente, círculo vermelho posicionado sobre os valores de maior corrente	75
Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AS modificando os parâmetros da técnica conforme mapeamento apresentado na Tabela 12, em meio de PBS 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ . Parâmetros SWV descritos na Tabela 12.	77
Figura 37. (a) Gráfico em 3D relacionado ao valor da corrente obtida na voltametria de onda quadrada. b) Gráfico em 2D relacionado ao valor da corrente, círculo vermelho posicionado sobre os valores de maior corrente.	77
Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AC (preto), EDC/NHS,3-MPA-Pt-GP-SL/AC (vermelho), Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-	

SL/AC (Azul), BSA-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (Rosa), E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (Verde), utilizando os parametros otimizados Incremento de potencial 5mV, Amplitude de modulação 70 mV e Frequência 5Hz em meio PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹..... 78

Figura 39. (A) Voltamogramas de onda quadrada em presença de diferentes concentrações de E1, utilizando o sistema E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC, nas concentrações de 5,0 a 1000 nmol L⁻¹ em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4); Incremento de potencial = 5 mV s⁻¹; amplitude = 70 mV s⁻¹; frequência = 5 Hz (B) Gráfico de pontos da curva analítica para E1..... 79

Figura 40. Esquema de preparação do SPE utilizando a tinta CBSP. (1) Para preparar a solução polimérica, foram utilizados 1,0 g de PVP, 1,0 g de Quitosana e 50 mL de uma solução de ácido acético a 2%. (2) A mistura foi agitada por 2 horas com a ajuda de um agitador. (3) Para a tinta de CBSP, foram misturados 1,0 g de CBSP, 0,6 g de glicerol e 18,4 g da solução polimérica por 24 horas com a ajuda de um agitador. (4) A tinta estava pronta para ser utilizada. (5) A máquina de serigrafia foi usada para realizar o sistema SPE, o rodo passou sobre a tela três vezes para garantir uma superfície uniforme para a tinta de carbono. Esta tinta de carbono foi aplicada em um substrato de poliéster e seca a 60°C por 30 minutos. Em seguida, a pasta de Ag/AgCL foi aplicada para formar a camada do eletrodo de referência e seca a 60°C por 30 minutos. Por fim, para delimitar a área da amostra e cobrir os terminais, uma tinta dielétrica foi usada. O sensor foi seco a 60°C por 12 horas para garantir que estivesse pronto para uso. 85

Figura 41. Fotos de sistemas de detecção descartáveis preparados usando PVP-quitosana, glicerol e CBSP aplicados em poliéster, com 16,0 mm (comprimento) x 8,0 mm (largura). Este dispositivo foi denominado CBSP-PVP-CH/PES 87

Figura 42. (A) Voltamogramas cíclicos do CBSP-PVP-CH/PES com diferentes porcentagens de CBSP em KCl 0,1 mol L⁻¹ e ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹, v = 50 mV s⁻¹; (B) Fotos de diferentes porcentagens de tinta CBSP e sistemas CBSP-PVP-CH/PES; (C) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de tinta com 3% de CBSP em 0,1 mol L⁻¹ KCl na presença de 1,0 mmol L⁻¹ de ferrocenometanol para medições realizadas com cinco eletrodos diferentes, v = 50 mV s⁻¹; (D) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de tinta com 5% de CBSP em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹ para medições realizadas com cinco eletrodos diferentes, v = 50 mV s⁻¹;

(E) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de tinta com 7% de CBSP em KCl 0,1 mol L ⁻¹ na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ para medições realizadas com cinco eletrodos diferentes, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	89
Figura 43. (A) Voltamogramas cíclicos do CBSP-PVP-CH/PES comparando o número de vezes que o rodo passou sobre a tela, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ e ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Teste de reprodutibilidade de CBSP-PVP-CH/PES feito com o rodo passado apenas uma vez para cinco eletrodos; (C) Teste de reprodutibilidade de CBSP-PVP-CH/PES feito com duas passadas do rodo para cinco eletrodos; (D) Teste de reprodutibilidade de CBSP-PVP-CH/PES feito com três passadas do rodo para cinco eletrodos	90
Figura 44. Imagens de diferentes comprimentos de cauda 7,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 35,0 mm. Voltamogramas cíclicos de CBSP-PVP-CH/PES comparando diferentes comprimentos de cauda, em KCl 0,1 mol L ⁻¹ e ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	91
Figura 45. Microestrutura da tinta composta observada por MEV. As partículas de CBSP estão uniformemente dispersas dentro de uma matriz de quitosana e PVP, mostrando uma estrutura homogênea (A) Imagens de MEV obtidas para CBSP-PVP-CH/PES com aumento de 5000x; (B) Imagens de MEV obtidas para CBSP-PVP-CH/PES com aumento de 1000x;	92
Figura 46. Espectroscopia Raman do sensor CBSP-PVP-CH/PES.....	93
Figura 47. Diagramas de Nyquist para CBSP-PVP-CH/PES em ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , $E = 130 \text{ mV}$. <i>Inset</i> : circuito equivalente [R(RQ)([RW]Q)]	94
Figura 48. Voltamogramas cíclicos realizados em KCl 0,1 mol L ⁻¹ na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ . Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1}	95
Figura 49. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com CBSP-PVP-CH/PES na presença de KCl 0,1 mol L ⁻¹ e ferrocenometanol 1,0 mmol L ⁻¹ , para diferentes velocidades de varredura, de 5,0 a 100 mV s ⁻¹ (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mV s ⁻¹); (B) A correlação linear obtida entre picos de corrente anódica e catódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).....	96
Figura 50. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com CBSP-PVP-CH/PES na ausência e presença de TRP 100 μmol L ⁻¹ . Eletrólito de suporte: solução tampão de fosfato 0,10 mol L ⁻¹ (pH 7,0). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (B) Mecanismo de oxidação eletroquímica do TRP;	97

Figura 51. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com CBSP-PVP-CH/PES na presença de TRP $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. (A) Amplitude de Modulação e (B) Gráfico de pontos da Amplitude de Modulação; (C) Tempo de Intervalo e (D) Gráfico de pontos do Tempo de Intervalo; (E) Tempo de Modulação e (F) Gráfico de pontos do Tempo de Modulação

Figura 52. (A) Voltamogramas de pulso diferencial na presença de TRP em concentrações de 0,5, 5,0, 10,0, 30,0, 50,0, 80,0, 100,0, 200,0 e 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0); (B) Gráfico de pontos obtidos por meio da curva analítica para TRP

Figura 53. Resultados obtidos (%) para o estudo de interferência usando diferentes espécies para determinação de TRP. Eletrólito de suporte: solução tampão salina de fosfato (pH 7,0) 101

Símbolos e Abreviaturas

Ag: Prata

AS: Folhas de acetato (*acetate sheets*)

CB: Negro de fumo (*Carbon Black*)

CBSP: Negro de fumo super P (*Carbon Black Super P*)

CH: Quitosana (*chitosan*)

CV: Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)

CGG/PET: Eletrodo descartável a base d'água confeccionado com quitosana (*Chitosan*), grafite (*graphite*) e glicerol (*glycerol*) sobre substrato PET.

DHP: dihexadecil fosfato (*dihexadecyl phosphate*)

DRX: Difração de Raios-X (*X-Ray Powder Diffractometer*)

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

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

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

GCE: Eletrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)

GP: Grafite

GP-SL/AS: Eletrodo descartável de goma laca e grafite sobre substrato de acetato

KCl: Cloreto de potássio

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

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

MEV: Microscopia eletrônica de varredura (*Scanning electron microscopy*)

MWCNT: Nanotubos de paredes múltiplas (*multiwalled carbon nanotubes*)

NP: Esmalte para unhas (*Nail polish*)

PET: Poli(tereftalato de etileno)

PES: Substrato de Poliéster (*Polyester Substrate*)

POC: Ponto de atendimento (*Point-of-care*)

PVP: Polivinilpirrolidona (*Polyvinylpyrrolidone*)

Pt: Platina

OCP: Potencial de Circuito aberto (*Open circuit potential*)

SD: Desvio padrão (*Standard deviation*)

SL: Goma laca (*shellac*)

SPE: Eletrodo impresso (*Screen-printed electrode*)

SWV: Voltametria de onda quadrada (*Square wave voltammetry*)

Tyr: Tirosinase (*tyrosinase*)

UA: Ácido Úrico (*Uric Acid*)

β: beta

μ: micro

1 Introdução Geral

1.1 Sensores Descartáveis

O desenvolvimento de dispositivos descartáveis que promovam o sensoriamento de analitos de interesse vem aumentando significativamente na comunidade científica [1]. Esse aumento é devido, principalmente, a possibilidade de automação completa do processo de fabricação [2]. A confecção dos sensores descartáveis, pode ser realizada em massa e utilizando materiais de relativo baixo custo, promovendo assim uma acessibilidade as pesquisas em torno desses [1, 3, 4]. Alinhado a confecção de dispositivos descartáveis, a redução dos volumes amostrais e a possibilidade de detecções *in situ*, viabilizam a construção e pesquisas em torno desses sistemas [5-7].

Os sensores eletroquímicos operam por meio de reações químicas que produzem sinais elétricos que podem ser medidos e interpretados. O eletrodo de trabalho é onde as reações eletroquímicas com o analito alvo acontecem. O eletrodo de referência, que possui um potencial de referência estável e um contra eletrodo, que realiza as operações inversas ao eletrodo de trabalho e garante que o eletrodo de referência não receba nenhuma corrente [8].

A evolução em torno dos sensores se mostra viável, já que avanços nos estudos promovem dispositivos capazes de fornecer respostas rápidas e confiáveis mesmo em situações complexas e dispendiosas. Os sensores descartáveis são passíveis de modificação em seu *design* e estrutura, possibilitando otimizações dos sensores confeccionados além de uma particularização dos mesmos [9].

Nesse contexto, para a criação de sensores descartáveis, uma das técnicas mais utilizadas é a de serigrafia, do inglês *screen-printed*, que consiste na aplicação de uma tinta através de uma tela, sobre um substrato [10-12]. Para reduzir mais ainda os custos de produção, pode-se adaptar essa técnica utilizando máscaras delimitadoras adesivas e um posterior espalhamento da tinta condutora sobre uma superfície inerte. Desta forma, adaptando a técnica de impressão e por meio da produção de tintas condutoras de baixo custo, pode-se obter infinitas possibilidades à criação de sensores, os quais possibilitam detecções simples e em tempo real. Na literatura encontra-se diversos dispositivos confeccionados desta forma, os quais promoveram a criação de sistemas uteis e funcionais mesmo com custos reduzidos [3, 5, 13].

1.2 Eletrodos Serigrafados

Os eletrodos serigrafados (SPEs) são sistemas geralmente desenvolvidos a partir de uma tinta condutora em um substrato inerte e têm propriedades como portabilidade, baixo custo e facilidade ao uso [14]. A tecnologia de eletrodos serigrafados permite a fabricação de dispositivos em uma ampla variedade de designs e tamanhos [15]. A capacidade de produzir dispositivos portáteis, vestíveis e/ou flexíveis torna esses dispositivos ideais para análises no local e em tempo real [16, 17].

A fabricação de dispositivos SPE é baseada em uma tela de malha que possui porosidade suficiente para permitir que a tinta penetre e se fixe ao substrato [18]. O substrato pode ser papel, plástico, tecido, cerâmica ou qualquer outro que seja inerte e possa suportar a temperatura de cura e os solventes usados no desenvolvimento de tintas condutoras [19-21]. Nesse sentido, a tinta é aplicada na superfície da tela e um raspador distribui uniformemente a tinta passando pela tela no substrato [22]. A tinta é então seca a uma certa temperatura, que depende da composição, e os sensores estão prontos para uso [23, 24]. Nesse contexto, propriedades como viscosidade e granulometria precisam ser avaliadas para a fabricação e uso dessas tintas condutoras [25]. Portanto, os parâmetros usados para otimizar a tinta devem ser correlacionados com as propriedades eletroquímicas necessárias para o desenvolvimento do sensor, como condutividade elétrica [26].

Ao combinar uma base polimérica, solventes e materiais condutores, existem infinitas possibilidades para fazer essas tintas condutoras [27]. A base polimérica ajuda a formar um filme e estabilizar as partículas condutoras no substrato, os materiais condutores promovem as propriedades condutoras do compósito resultante e o solvente fornece viscosidade apropriada [28]. No entanto, outros componentes como plastificantes e complexos metálicos também podem ser adicionados, o que pode fornecer propriedades interessantes em termos de adesão ao substrato e amplificação do sinal eletroquímico, dentre outras vantagens [27]. Dessa forma, o uso de diferentes composições de tinta pode melhorar propriedades como homogeneidade, facilidade de aplicação e adesão ao substrato, levando a uma melhoria nos sinais eletroquímicos desses sensores.

Avanços na síntese de materiais estão contribuindo diretamente para a fabricação e melhoria de sistemas SPE, já que esses novos materiais e compósitos oferecem

excelentes propriedades em termos de condutividade e a seletividade desses sistemas [29, 30]

1.3 Tintas Condutoras

As tintas condutoras começaram a ser reportadas na literatura a algumas décadas, as quais inicialmente foram aplicadas na construção e reparo de circuitos elétricos [31, 32]. No contexto atual, as tintas condutoras aplicadas ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos, por meio, prioritariamente de métodos *screen-printing*, tornaram-se uma linha de pesquisa interessante, visto que essas promovem a construção de sensores que se assemelham em eficiência aos sensores sólidos já consolidados na literatura [1, 33]. A comercialização dessas tintas no Brasil ainda é escassa e seu alto custo agregado dificulta a produção desses dispositivos. Desta forma, buscando reduzir os custos envolvidos no processo, a confecção de tintas *lab made*, produzidas em laboratório, é um caminho para a confecção de dispositivos portáteis e de uso único.

Criadas a partir da junção de uma base polimérica, solventes e materiais condutoras, existem infindas possibilidades para a confecção dessas tintas [34, 35]. A base polimérica auxilia na formação de filmes e estabilização das partículas condutoras sobre o substrato, os materiais condutores promoverão características condutoras ao compósito criado e o solvente proporcionará a obtenção de uma viscosidade adequada [36]. Ainda, outros componentes podem ser adicionados, como agentes plastificantes e complexos metálicos, que poderão proporcionar características interessantes em relação a fixação ao substrato e melhora de sinais eletroquímicos [37].

Até o momento, encontra-se algumas bases poliméricas para construção de eletrodos impressos como, esmalte de unha [3], goma-laca [38], poliuretano [39], quitosana [40], verniz vitral [41], acetato de celulose [42] e resina alquídica [43]. Esses estudos justificam a utilização dessas bases para propor novas tintas condutoras. Em relação aos materiais condutores, na literatura, encontra-se tintas condutoras à base de materiais carbonáceos e metais. Nanotubos de carbono [44], grafite [3], grafeno [45], negro de fumo [46], cobre [47], prata [48], ouro [49] tem sua funcionalidade comprovada para promover características condutoras a essas tintas. Encontra-se também na literatura tintas que possuem agentes condutores carbonáceos e metálicos em conjunto, os quais promovem propriedades ótimas a aplicação na confecção de sensores [50].

Nesse sentido, o Carbon Black (CB) é um material à base de carbono que contém quantidades mínimas de oxigênio, hidrogênio e nitrogênio além de carbono [51]. O CB é menos caro do que outros materiais como grafeno e nanotubos e também oferece a vantagem de uma maior condutividade elétrica [51, 52]. Além disso, sua capacidade de formar dispersões estáveis, e não requerer tratamentos adicionais, torna o CB um material interessante para o desenvolvimento de tintas condutoras [53]. CBSP é um CB modificado com “Super P”, um aditivo que melhora a condutividade e otimiza as propriedades de transferência de elétrons [54]. Essas melhorias na transferência de elétrons foram descritas no trabalho de Cho et al. [54], que é um dos primeiros a mostrar o uso de CBSP como aditivo para baterias de íon de lítio. Veloso et al. [55] desenvolveram um compósito de CBSP e quitosana para a detecção de antibióticos macrolídeos e mostraram que o CBSP era essencial para o desenvolvimento do sensor eletroquímico. Nesse sentido, o CBSP foi um material à base de carbono interessante para desenvolver tintas condutoras.

Desta forma, a utilização de diferentes composições para a fabricação dessas tintas possibilita o melhoramento de características como homogeneidade, facilidade na aplicação e aderência ao substrato, resultando em sinais eletroquímicos com maior definição e magnitude de corrente obtidos por esses sensores [56]. Os sensores eletroquímicos descartáveis criados a partir dessas tintas mostram sua versatilidade em relação a detecção de analitos de interesse [3, 57, 58]. Outra vantagem interessante desses sistemas, é que eles possibilitam a imobilização de partículas biológicas sobre sua superfície, tornando-os biossensores seletivos. Essas vantagens, alinhadas ao baixo custo de produção, motiva-nos a ampliar pesquisas nesse assunto [5, 59].

1.3.1 Tintas Condutoras À Base D’água

Em busca de diferentes metodologias e materiais para a confecção de tintas condutoras para a construção de sensores e biossensores, as tintas com bases aquosas podem ser um caminho para a confecção de dispositivos recicláveis e com baixa toxicidade.

As tintas à base de água se divergem das tintas com solventes orgânicos em dois aspectos principais, desempenho e toxicidade. A dificuldade de secagem da água e seu

baixo poder de solubilização da maioria das espécies poliméricas, utilizadas comumente no desenvolvimento de tintas, dificulta a criação dessas [28, 35].

No entanto, motiva-se superar essas dificuldades em vista da preocupação com a natureza. Deste modo, a tecnologia em torno da criação dessas tintas condutoras se mostra viável, já que tintas baseadas em água como solvente reduzem a utilização de compostos orgânicos emitidos a atmosfera e contaminando as águas [35]. Além disso, também reduzem o risco de explosões e incêndios que solventes orgânicos podem gerar [33, 35].

Na literatura encontra-se poucos trabalhos que confeccionaram tintas condutoras a base d'água. Um exemplo deles foi o desenvolvido por Crouch e colaboradores [33] os quais confeccionaram um biossensor amperométrico para a detecção de glicose, o dispositivo foi criado a partir da técnica de serigrafia utilizando tinta de carbono à base de água e foi eficaz em amostras de soros comerciais. Por esses fatores pretende-se propor uma composição de tinta à base d'água para a confecção de sistemas sensoriais e biossensoriais.

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina [60, 61]. A quitina é um dos polímeros mais abundantes no mundo e é encontrada em carapaças de crustáceos [61]. Sua forma desacetilada é amplamente utilizada para modificação de sensores e biossensores principalmente por sua biocompatibilidade e excelente capacidade para formação de filmes estáveis [60]. Este biopolímero se mostrou apropriado no trabalho desenvolvido por Dinesh e co-autores [56], os quais desenvolveram uma tinta de *carbon black*, quitosana e ácido acético para a modificação de um sensor de carbono vítreo. A quitosana também foi utilizada por Dervin e colaboradores [62] para o desenvolvimento de um nanocompósito de óxido de grafeno e quitosana. Neste trabalho, foi utilizado um compósito como modificador para um sensor eletroquímico flexível e descartável que foi confeccionado utilizando pasta de carbono comercial sobre um substrato de PVC para a detecção de tirosina. Por esses fatores esse polímero se mostra ideal a confecção de uma tinta condutora.

1.3.2 Tintas Metálicas

As tintas metálicas estão em ascensão, uma vez que promovem características condutoras excelentes a diversas áreas. Criadas inicialmente para o uso na área de

eletrônicos, as tintas condutoras metálicas têm flexibilidade e podem ser impressas com certa facilidade, possibilitando assim seu uso em células solares, monitores, baterias, sensores entre outras aplicações [63]. Para a confecção dos sensores, os metais mais utilizados são a prata, o cobre, o ouro e a platina. Os dois últimos têm um alto custo relacionado, sendo interessantes apenas quando utilizado como modificadores, por isso o foco é em desenvolver sistemas utilizando prata ou cobre, principalmente pelo custo mais acessível. É importante ressaltar também que as tintas comercializadas atualmente são em geral escassas e custosas. Por isso, a confecção de eletrodos a partir de tintas condutoras *lab-made*, barateando ao máximo os custos é interessante. Muitos trabalhos são encontrados na literatura, uma vez que os metais promovem características interessantes ao desenvolvimento de sensores [64]. Por exemplo, Inam e colaboradores [65] desenvolveram um sistema confeccionado a partir de uma tinta de prata com eletrodeposição de cobre para detecção de nitrato em água. Neste contexto, o dispositivo mostrou versatilidade e foi aplicado em amostras de águas contendo metais.

1.3.3 Tintas de Prata

A prata possui excelentes propriedades de condutividade e estabilidade, também relata-se na literatura suas características antimicrobianas [66]. Por ser estável e compatível com os mais diversos substratos, esse metal pode proporcionar a confecção de sensores uniformes em condutividade e baixa temperatura de cura relacionada [63]. Outro aspecto positivo é seu baixo custo e sua abundância em relação a outros metais, como a platina e ouro [67]. Deste modo, as propriedades unidas promovem a confecção de eletrodos de pseudo-referência eficazes dentro de um sistema eletroquímico de três eletrodos [68].

O eletrodo de referência tem um potencial estável e conhecido para o qual o eletrodo de trabalho de uma célula eletroquímica pode ser controlado ou medido [69]. Mudanças na velocidade de transferência de elétrons da reação alvo podem causar desvios no potencial, podendo promover reações secundárias indesejadas de constituintes de eletrólitos e até mesmo do próprio material do eletrodo [70]. Por isso, é importante que o potencial do eletrodo de referência permaneça estável, dentro de um limite, ao longo de sua vida útil. Na literatura podemos encontrar algumas propostas de confecção de eletrodos de referência utilizando prata, como os desenvolvidos por Dawkins et al. e por

Søpstad et al. [71, 72]. A tinta desenvolvida por Prado *et al.* [73] foi confeccionada pela mistura dos precursores Ag e AgCl com os solventes ciclohexanona-acetona e o acetato de celulose como veículo polimérico. Essa composição era de fácil produção e obteve sucesso na aplicação como pseudo-referência na detecção eletroquímica de carbendazim. Além desses podemos encontrar também dispositivos referenciados com tintas comerciais de prata, como os desenvolvidos por Lan *et al.* [74] que estudam a criação de eletrodos de referência utilizando papel como substrato. Outro trabalho interessante é o de Moya *et al.* que desenvolvem eletrodos de referência por meio de impressão a jato de tinta [75].

1.4 Modificação de sensores eletroquímicos com metais

Buscando melhorar o desempenho eletroquímico dos sensores SPE, bem como a estabilidade, a especificidade e sensibilidade das análises desses sistemas, modificações nos SPEs podem ser realizadas [76]. Os materiais que podem ser utilizados bem como a forma como podem ser adicionados ao sistema são diversos. Os SPEs podem ser modificados com nanopartículas metálicas, materiais carbonáceos, óxidos, complexos de forma a amplificar os sinais eletroquímicos obtidos [77-79]. A modificação das superfícies além de melhorarem a plataforma como um todo também podem auxiliar em quesitos como a cinética eletroquímica, de modo a melhorar a velocidade de transferência de elétrons [80].

A platina (Pt) é um metal denso e raro. É altamente valorizado por sua raridade, durabilidade e resistência à corrosão, por isso é usada em vários setores, incluindo joias, catalisadores automotivos, dispositivos eletrônicos e equipamentos médicos [81]. Para a confecção de sensores e biossensores, a platina em geral é utilizada em finas camadas, confeccionando o sistema por completo, como é apresentado no trabalho de Oliveira e colaboradores [82] ou eletrodepositada sobre a superfície do sensor, como podemos ver no trabalho de Zou e colaboradores [83]. A adição desse metal, apesar de seu alto custo, pode ser justificada pela série de vantagens que esse sistema proporciona para a confecção de biossensores como, melhora na biocompatibilidade, superfície mais estável e reproduzível, melhorando o desempenho do sistema [84].

Nesse contexto, as nanopartículas metálicas como a Pt e Au podem ser adicionadas a interface desses sistemas para fornecer ambientes adequados a imobilização

de anticorpos, uma vez que a ligação de biomoléculas de forma covalente ao carbono, não promove revestimento estável e também impede que a orientação dos anticorpos seja controlada [85, 86]. Entretanto, todas essas adversidades podem ser superadas através da eletrodeposição dos metais, os quais levam a ligações mais fortes e definidas das estruturas biossensoriais [80, 87].

Por esses motivos, na literatura podemos encontrar sensores do tipo SPE modificados com metais como Pt e Au para a confecção de biossensores. Baradoke e colaboradores [80] compararam a utilização tanto do Au quanto da Pt para a criação de uma plataforma para a imobilização promovendo assim um microambiente adequado para a detecção do CA125, um importante biomarcador para câncer. Ambos os metais foram eficientes para auxílio na imobilização bem como aumento nas velocidades de transferência de elétrons dos SPE utilizados no estudo.

1.5 Biossensores

Por serem uma alternativa aos métodos de detecção dispendiosas e com alto custo, sem perdas de eficiência, a pesquisa em torno de sensores e biossensores eletroquímicos é um caminho para as detecções com baixos custos, por meio de dispositivos portáteis e em tempo real. Os sensores eletroquímicos são sistemas capazes de detectar sinais mensuráveis em relação a reações de oxidação e redução que ocorrem em sua superfície [88]. Entretanto algumas espécies possuem potenciais de redução e oxidação próximos, tornando impossível distingui-las em matrizes mais complexas. Por esses motivos os biossensores foram inicialmente propostos, buscando tornar os sensores mais seletivos a determinadas moléculas [45, 88, 89].

Os biossensores são sensores modificados com biomoléculas, as quais permitem a análise através de eventos biológicos, que se convertem em sinais eletroquímicos mensuráveis [90]. Assim, dentro do campo dos biossensores, as biomoléculas utilizadas podem ser enzimas, DNAs, anticorpos, aptâmeros, entre outros [91].

Os biossensores enzimáticos são frequentemente usadas devido à sua alta especificidade, uma vez que as enzimas são proteínas que catalisam reações bioquímicas específicas [92]. Como exemplo temos os biossensores de glicose, por meio da utilização da enzima glicose oxidase, permite medir os níveis de glicose no sangue [93, 94]. Seu funcionamento se dá, pois, a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose e nessa reação se produz o peróxido de hidrogênio, que é facilmente detectado eletroquimicamente [94].

Os biossensores de DNA são interessantes devido à sua capacidade de se ligarem de forma complementar a sequências específicas de nucleotídeos [95, 96]. Deste modo, esses podem ser utilizados para detectar mutações genéticas ou identificar presença de vírus, bactérias e outros microrganismos, sendo uma ferramenta essencial para diagnósticos rápidos [97, 98].

Os biossensores do tipo Aptâmeros são sequências curtas de DNA ou RNA que podem ser dobradas em estruturas tridimensionais as quais permitem que os alvos se liguem com alta afinidade e especificidade [99, 100]. Apesar do alto custo dos aptâmeros eles tem vantagem sobre os anticorpos pois além de uma estabilidade maior, essas estruturas podem ser facilmente modificadas para melhorar funcionalidade e resistência a adversidades [101, 102].

Os biossensores que utilizam anticorpos, são comumente chamados de imunossensores [103]. Anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imune as quais se ligam especificamente a antígenos (substâncias estranhas ao corpo). Esse imunossensoriamento funciona através do complexo formado pelo antígeno e anticorpo, o qual proporciona aumento na seletividade e especificidade do mesmo [104, 105]. Com a formação do complexo, um impedimento entre a superfície do sensor e a sonda redox é formado, proporcionando mudanças nos sinais eletroquímicos comprovando o funcionamento do imunossensor [106].

As biomoléculas devem ser imobilizadas de forma eficaz na superfície do transdutor para manter sua atividade biológica e estabilidade [92]. Existem algumas técnicas de imobilização dessas biomoléculas, alguns exemplos são imobilização por aprisionamento, encapsulamento e superfície confinada, que são técnicas que envolvem a incorporação das biomoléculas em matrizes poliméricas ou géis [107]. Estas são mais estáveis e confiáveis, entretanto geralmente são menos sensíveis devido a limitação do transporte de massa e falta de controle de orientação favorável [108].

O uso de grupos protetores, agentes formadores de ligações covalentes e adsorção física são exemplos de metodologias com custo reduzido [109]. Desta forma, em busca da melhora na seletividade dos sensores descartáveis construídos, confeccionou-se biossensores por meio da imobilização de material biológico, utilizando para isso agentes formadores de ligações covalentes, de ligações cruzadas ou apenas por adsorção física, que são metodologias mais baratas.

Assim, a escolha da biomolécula adequada permite a personalização dos biossensores para diversas aplicações, proporcionando benefícios como alta especificidade, sensibilidade e a possibilidade de realizar detecções em tempo real [110]. Essas características tornam os biossensores ferramentas valiosas em diagnóstico médico, monitoramento ambiental, segurança alimentar, biotecnologia e muitas outras áreas.

1.6 Analitos de Interesse

As evoluções trazidas ao longo dos últimos anos, as quais criam sistemas capazes de fazer a detecção de analitos com relação direta a saúde e bem-estar só crescem. Existem métodos que possibilitam a detecção rápida, mas essas comumente têm um alto custo agregado, inviabilizando sua utilização em países subdesenvolvidos e emergentes. Os sensores e biossensores eletroquímicos podem ser um caminho para contornar esses problemas. Por serem estruturas simplificadas, que possuem um baixo custo total e que propõem diagnósticos rápidos e em tempo real, esses se mostram viáveis para tal feito.

As doenças originadas por descontroles hormonais são extremamente comuns, principalmente entre as mulheres. A detecção rápida nas alterações nos níveis de estrogênios mostra-se importante, uma vez que esta pode ser utilizada como método de triagem. Posterior triagem, onde o dispositivo pretendido atuará, pode-se iniciar o tratamento adequado. Essa rapidez na detecção de desníveis hormonais, por exemplo, pode facilitar o tratamento de doenças com rápida evolução como é o caso do câncer de mama, a qual quanto antes for descoberta, maiores as chances de tratamento.

Assim, com o diagnóstico rápido de doenças, as chances de cura e a qualidade de vida dos pacientes aumentam significativamente. Por isso, busca-se desenvolver arquiteturas que possibilitem diagnóstico rápido e portabilidade, as quais auxiliem diretamente na qualidade de vida.

1.6.1 Estrona

Os estrogênios têm como principal função o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies [89]. Apresentam em sua estrutura grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxila alifático que é o caso da estrona. Os estrogênicos podem ser sintéticos e naturais e geralmente são aplicados como métodos contraceptivos e em tratamentos de distúrbios hormonais [111, 112].

O Câncer de mama é um dos principais causadores de morte em mulheres no Brasil e no mundo [112, 113]. Após a menopausa, o índice de mulheres com câncer aumenta exponencialmente e isso pode estar relacionado ao descontrole hormonal causado nesse período [112]. Quanto mais rapidamente o câncer for descoberto, maiores as chances de cura do mesmo, por isso os autoexames e o controle hormonal podem ser caminhos para a diminuição dessa mortalidade [114].

A estrona (E1) é um dos três principais estrógenos presentes no organismo das mulheres e esses desempenham papéis vitais na fertilidade e saúde. Estudos associam o descontrole desses hormônios com o aumento de risco em diversas doenças, entre essas o câncer de mama [115-117]. Por não ser eletroativo, comumente, é detectado por meio de técnicas de alto custo como cromatografia líquida de alta eficiência [116, 117]. Por isso, a confecção de biossensores eletroquímicos pode ser um meio para diminuir os custos envolvidos e facilitar a análise desses estrógenos.

Os níveis de estrona variam ao longo da vida, dependendo da idade e estado hormonal da pessoa. Resultados normais vão de 13,5 a 81,1 nmol L⁻¹ para mulheres pré-menopausa e 2,70 a 16,2 nmol L⁻¹ para mulheres pós-menopausa.

Encontra-se na literatura artigos que reportam a análise de estrona a partir de imunossensores descartáveis. Um desses exemplos é o trabalho desenvolvido por Gao e colaboradores [118], o qual confeccionou um sensor de platina que foi modificado com polipirrol e anti-estrona. A ligação específica entre o antígeno imobilizado sobre a superfície do sensor e o anticorpo presente nas amostras foi avaliada por meio da diminuição na resposta eletroquímica, comprovando sua funcionalidade.

Deste modo, utilizando o antígeno e a anti-estrona ligados a agentes imobilizadores sobre a superfície do sensor descartável, é possível torna-lo um biossensor que pode detectar baixas concentrações de forma rápida, menos poluente e mais barata em relação a métodos já existentes.

1.6.2 Tirosinase

A tirosinase (Tyr) é uma enzima presente em diversas reações que ocorrem em seres vivos [119, 120]. Uma das doenças mais conhecidas a qual a tirosinase tem relação é o albinismo, doença hereditária gerada por falta desta enzima no corpo [121, 122]. O controle dessa atividade enzimática é importante também pois quando descontrolada, pode desencadear um aumento significativo na síntese da melatonina provocando casos

de melasma e manchas na pele [122]. Desde modo, por atuar diretamente na catalisação de grupos fenólicos, a utilização dessa enzima é uma estratégia conveniente para melhorar os níveis de detecção desses compostos fenólicos. Uma vez que em contato com compostos fenólicos, a tirosinase auxilia na oxidação destes transformando-os em quinonas e água, facilitando assim o tratamento posterior desses compostos [123].

Os compostos fenólicos tornaram-se um grupo de contaminantes preocupante, pois esses podem estar presentes em medicamentos, comidas e águas [119]. Desta forma, sua detecção se mostra interessante e importante para a saúde humana e da natureza [124]. Na literatura encontra-se relatos de que essa enzima não somente aumenta a sensibilidade a compostos fenólicos como também pode ser utilizada na detecção de fármacos, pesticidas [119, 124-127]. Song e colaboradores [128] descrevem a confecção de um biossensor descartável por meio da técnica de *screen-printed* e posterior imobilização da enzima tirosinase com nanopartículas de ouro para o monitoramento de compostos fenólicos, como o catecol. Shaikshavali *et al.* [129] desenvolveram um biossensor baseado na combinação de nanopartículas de Fe₃O₄, nanotubos de carbono de paredes múltiplas, tirosinase e sílica sol-gel sobre um eletrodo de carbono vítreo para a detecção de catecol e hidroquinona em águas. Mercante e colaboradores [130] uniram nanofibras modificadas com nanopartículas de ouro com tirosinase para a detecção do Bisfenol A. Assim, a modificação sensorial com a tirosinase se mostra interessante, pois esta enzima é versátil para catecolaminas e tem um custo reduzido em comparação a outras biomoléculas. Desta forma, a utilização desta sobre os dispositivos descartáveis é importante, uma vez que podemos entender os aspectos de imobilização e funcionamento dos biossensores pretendidos.

1.6.3 Ácido Úrico

O ácido úrico, (2,6,8-trihidroxipurina; UA), é o principal resultante final do metabolismo da purina, o qual se torna amplamente eliminado pelos rins [131-134]. Em geral o UA é encontrado distribuído em fluídos biológicos como soro humano, sangue e urina. Nesses fluídos, para um adulto saudável, em média, encontra-se 240 – 520 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 120 - 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,2 - 4,4 mmol L^{-1} de UA respectivamente [131, 132, 134, 135]. Desníveis de UA podem estar relacionados com diversas doenças.

O metabolismo excessivo das purinas ou incapacidade dos rins de excretar esse componente pode ocasionar altas doses do mesmo no sangue [131, 134, 136]. Níveis considerados maiores que a normalidade pode ser vistos em pacientes com diabetes, gota, hiperuricemia, síndrome de Lesch-Nyhan e insuficiência renal [133, 134]. Já baixos níveis de UA podem estar associados à deficiência de molibdênio, toxicidade de cobre e agravamento da esclerose múltipla [131, 137].

Deste modo, por estar relacionado com diversas doenças o UA é um dos preditores mais utilizados em pacientes hipertensos, com doenças cardiovasculares e disfunções renais, por ser marcador clínico desses males [131, 132]. Apesar do UA estar relacionado com diversas enfermidades, este possui ações benéficas, já que é um importante antioxidante no plasma humano adulto e está envolvido em alterações patológicas, importantes ao corpo humano [131, 138, 139].

O UA pode ser analisado por meio de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, entretanto essas implicam em análises custosas. Por ser um composto eletroquimicamente ativo, e já detectado através de eletrodos à base de carbono, a detecção eletroquímica mostra-se viável para este analito, apresentando uma seletividade maior, além de ser a metodologia menos dispendiosa [131, 132]. Por esses fatos a determinação da concentração de UA se mostra importante devido ao seu papel primordial no monitoramento da saúde [131-134, 136].

No trabalho desenvolvido por Wahyuni *et al.* [140], há o desenvolvimento de um eletrodo de carbono serigrafado a partir de grafite para poliestireno, para os eletrodos de trabalho e contra eletrodos, e pseudo-referência de prata e poliestireno. Esse sistema foi utilizado com sucesso para a detecção de ácido úrico na urina humana.

1.6.4 β -Estradiol

O β -estradiol é um hormônio essencial ao organismo humano, principalmente para o desenvolvimento e manutenção do tecido reprodutivo, além de efeitos significativos no cérebro e nos ossos [141]. Além do papel benéfico do β -estradiol, este é considerado um disruptor endócrino. Assim, detecções precisas do β -estradiol são, portanto, necessárias, uma vez que além do diagnóstico de doenças correlacionadas, por

meio da detecção e quantificação desse componente pode-se verificar a eficácia frente a terapias de reposição hormonal e avaliar seu impacto como poluentes em águas [142] .

As doenças originadas por descontroles hormonais são extremamente comuns, principalmente entre as mulheres. A detecção rápida nas alterações nos níveis de estrogênios mostra-se importante, uma vez que este pode ser utilizada como metodologia de triagem [143, 144]. Neste sentido, dispositivos de resposta simultânea podem facilitar o tratamento de doenças com rápida evolução como é o caso do câncer de mama. Com isso, há maiores as chances de tratamento dos pacientes. Por isso, busca-se desenvolver arquiteturas que possibilitem diagnóstico rápido e portabilidade, as quais auxiliem diretamente na qualidade de vida. Os estrogênios têm como principal função o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies [89]. Os estrogênicos podem ser sintéticos e naturais e geralmente são aplicados como métodos contraceptivos e em tratamentos de distúrbios hormonais [111, 112].

Na literatura podemos encontrar os trabalhos desenvolvidos por Silva *et al.* [145] que utilizaram eletrodos modificados de pasta de carbono com nanopartículas de ouro e de óxido de silício para detecção eletroanalítica do β -estradiol. Já Wong *et al.*[146] desenvolveram um eletrodo descartável serigrafado feito de tinta de carbono modificada com ftalocianina de cobre, carbono Printex 6L e filme de Nafion para determinação sensível do β -estradiol em diferentes matrizes, como águas e urina.

1.6.5 Triptofano

O triptofano (TRP) é um biomarcador importante, principalmente devido à sua atividade pleiotrópica, que pode influenciar respostas bioquímicas e fisiológicas no corpo humano [147]. O triptofano está entre os produtos farmacêuticos comercializados livremente em vários países. Ele atua fortemente como auxiliar no sono, supressor do apetite e também como antidepressivo [148, 149]. Além disso, também é relatado como eficaz para outras condições, como dores de cabeça e obesidade [150]. Nesse contexto, a detecção de TRP é interessante porque ele funciona como suplemento dietético e, portanto, pode ser encontrado em alimentos, produtos farmacêuticos e amostras de origem humana.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é comumente usada para a detecção desse composto [151], mas essa tecnologia, embora eficiente, também é cara e

lenta. Portanto, a detecção por métodos eletroanalíticos é interessante pois é mais barato e rápido, sem que se perca a eficiência.

Beitollahi et al. [152] desenvolveram um SPE modificado com óxido de grafeno (GO) e nanopartículas de Fe_3O_4 modificadas com dióxido de silício (SiO_2) para formar o nanocompósito $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2/\text{GO}$. A partir deste trabalho, fica claro que as modificações feitas na superfície do SPE foram cruciais para a determinação de TRP a um pH de 7,0 para evitar os problemas mencionados acima com a degradação ou evolução de oxigênio. Com esse sistema, foi possível detectar TRP com uma faixa linear de 1,0-400,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O triptofano é um precursor essencial para a síntese de neurotransmissores como serotonina e melatonina. No qual a melatonina é responsável por modular muitos processos fisiológicos, incluindo o controle das fases e amplitude do ritmo circadiano e processos neuroendócrinos em humanos [153]. Sendo responsável pela sincronização metabólica e comportamental do ciclo claro-escuro, é geralmente usado como suplemento dietético para o tratamento de distúrbios do sono e *jet lag*. Sendo um potente antioxidante, também é um excelente eliminador de radicais livres e é usado terapêuticamente em doenças como Parkinson, Alzheimer e até mesmo COVID-19 [154-156].

Por esses motivos, a necessidade de medir o teor de triptofano em amostras biológicas e farmacêuticas está aumentando, levando a avanços no desenvolvimento de sensores eletroquímicos de baixo custo, sensíveis e rápidos.

2 Capítulo 1 - Nova tinta condutora à base de água para a preparação de eletrodos descartáveis serigrafados para aplicações sensoriais e biossensoriais

2.1 Objetivos

Desenvolver sensores e biossensores a partir da criação de uma tinta condutora a base d'água, sobre substratos eletroquimicamente inertes. Obter diferentes composições de tintas condutoras e confeccionar sistemas os quais auxiliem na análise de Ácido Úrico e Catecol.

2.2 Experimental

2.2.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para a confecção das tintas, bem como para o preparo de soluções de eletrólitos suporte, sondas eletroquímicas e outras amostras foram todos de grau analítico, obtidos da Fisher, Dinâmica, Sigma-Aldrich ou Fluka. As soluções foram preparadas com água purificada através do sistema Heal Force (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Nas medidas realizadas para a caracterização eletroquímica dos sensores confeccionados foi utilizado solução de KCl (Sigma-Aldrich, Xerém, Duque de Caxias) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte uma mistura equimolar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Labsynth, Diadema, São Paulo) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica. Como suporte, para a deposição da tinta à base d'água, utilizou-se o PET, que foi obtido de garrafas anteriormente utilizadas para armazenamento de bebidas, como refrigerantes. Para imobilização de Tirosinase na superfície do sensor, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) foram funcionalizados seguindo a metodologia relatada por Cardoso et al. [157].

2.2.2 Preparo das tintas

Para o preparo das tintas foi utilizado uma centrífuga assimétrica dupla, SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K (FlackTec Inc., Landrum, EUA). Para o desenvolvimento da tinta apresentada no Capítulo 1, a quitosana (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), foi utilizada como base polimérica, possui médio peso molecular, com grau de desacetilação entre 75-80%. A dispersão foi preparada a partir da mistura de quitosana em pó em 2% (v/v) de ácido acético (Dinâmica Química Contemporânea®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) em água desionizada para melhor solubilização da mesma

com grafite em pó P.A. Fisher Chemical™ e a Glicerol (Dinâmica Química Contemporânea®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Sendo 1% (m/V) de quitosana preparada em solução de 2% (v/v) de ácido acético, grafite em pó e glicerol. Preparou-se então 3,5 g de tinta condutora, pesando 1,855g da solução de quitosana preparada na etapa anterior (53%, m/m), 1,575g de grafite em pó (45%, m/m) e 0,07g de glicerol, (2%, m/m) e esse foi denominado CGG/PET.

2.2.3 Preparo do sensor CGG/PET

Como ilustrado na Figura 1, as tintas condutoras foram preparadas em metodologias semelhantes. Primeiramente, misturou-se a base polimérica, o material condutor e possíveis aditivos de acordo com as características desejadas (passo 1). Para a completa homogeneização da tinta foi utilizado uma centrifuga dual assimétrica, SpeedMixer™ (modelo DAC 150.1 FVZ) (passo 2). Delimitadores foram confeccionados com o auxílio da impressora de corte Silhouette Cameo 3, os quais definiram um formato padrão para os dispositivos. Esses delimitadores adesivos foram colados sobre superfícies eletroquimicamente inertes, que foram lixadas e higienizadas com álcool 70% (passo 3). Assim, tinta condutora foi espalhada sobre esse substrato delimitado. Definiu-se um tempo padrão de 24 horas a 50°C para a completa secagem. Desta forma, o sensor estará pronto (passo 4). Em busca de melhores sinais analíticos, a superfície do eletrodo de trabalho ainda poderá ser modificada. Com o auxílio de um potenciostato sinais analíticos em relação as reações de oxidação e redução de espécies foram obtidas (passo 5).



Figura 1. Esquemática do preparo do sensor CGG/PET. (passo 1) A solução de quitosana, o grafite e o glicerol foram misturados; (passo 2) A tinta foi agitada por 270s a 3500 rotações por minuto; (passo 3) O substrato foi preparado e um delimitador adesivo sobre o mesmo; (passo 4) A tinta foi espalhada o delimitador foi removido, e posterior tempo de secagem na estufa, o sensor está pronto para utilização na obtenção de sinais analíticos (passo 5)

2.2.4 Modificação do sensor CGG/PET para biossensor com Tirosinase

Para a modificação do sensor CGG/PET para biossensor utilizou-se DHP (dihexadecil fosfato, Sigma-Aldrich) 1mg/mL e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), semelhante a metodologia aplicada por Araújo e colaboradores [158]. Posteriormente imobilizou-se a Tirosinase (Tyr, de cogumelos, Sigma-Aldrich), por meio do método de aprisionamento, ver Figura 2, e foi utilizada como analito para

caracterização eletroquímica e o Catecol (Sigma-Aldrich). Tyr foi imobilizado na superfície CGG/PET por meio do gotejamento de 10 μL de uma dispersão de MWCNTs e DHP 1:1 mg/mL contendo 50 unidades de Tyr o qual foi armazenado por 2h na geladeira. Esse biossensor foi denominado Tyr-MWCNT-CGG/PET.

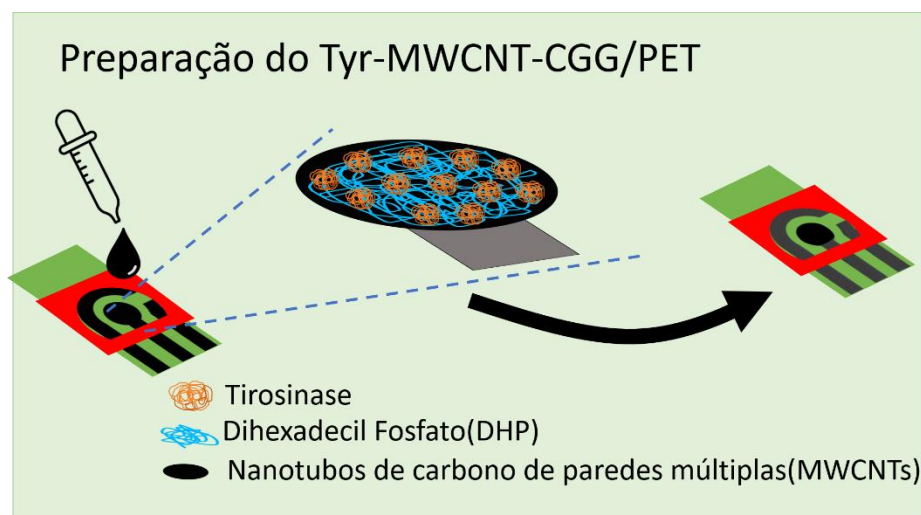


Figura 2. Esquemática do preparo do biossensor. Um volume de 10 μL de uma solução contendo MWCNTs, DHP 1:1 mg/mL e 50 unidades de Tyr foi gotejada sobre a superfície do eletrodo de trabalho, tornando-o o biossensor nomeado Tyr-MWCNT-CGG/PET.

2.2.5 Equipamentos e caracterização do sistema

Para as análises eletroquímicas (voltametria cíclica (CV), potencial de circuito aberto (OCP), voltametria linear (LSV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV)) foi utilizado um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm (Eco Chemie, Metrohm Autolab, Utrecht, Holanda), gerenciado pelo *software* Nova 2.1.5. A configuração SPE, composta por um eletrodo de trabalho (diâmetro de 4,95 mm), um contra eletrodo e um eletrodo de pseudo-referência.

Para realizar a conexão do sistema eletroquímico ao potenciostato utilizou-se conector proposto por Orzari e colaboradores [159]. O volume da gota utilizado sobre o sensor foi de 70 μL . Para as análises de Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado o espectrofotômetro Bruker Tensor II, em resolução de 4,0 cm^{-1} e modo de transmissão de 400 a 4000 cm^{-1} , com as amostras preparadas em KBr na proporção de 1:100. Para o FTIR da quitosana, secou-se sobre uma placa de petri, a solução de 1% de quitosana em 2% de ácido acético à 50°C por 2h e

raspou-se com auxílio de uma espátula, esse conteúdo foi macerado e preparado em KBr na proporção de 1:100. Para o DRX (X-Ray Powder Diffractometer, Rigaku, MiniFlex 600), as tintas de prata foram secas e raspadas. A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura Thermo Scientific Prisma E com Tecnologia ColorSEM integrado à espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS). E por fim, para as análises de ângulo de contato foi utilizado o equipamento desenvolvido por Silva e colaboradores [160].

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Eletrodo CGG/PET

Utilizando a metodologia descrita no item 2.2.3, foram confeccionados sensores de quitosana, glicerol e grafite, os quais foram depositados sobre PET reutilizados de garrafas de refrigerante e esse dispositivo foi nomeado CGG/PET. As imagens dos sensores prontos e com delimitador são mostradas na Figura 3.

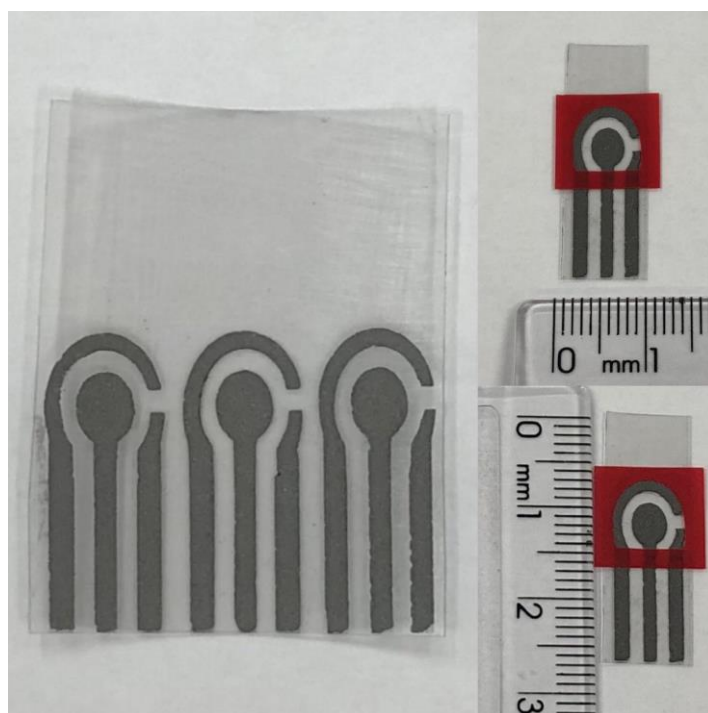


Figura 3. Sensores descartáveis obtidos com tinta condutora de quitosana, grafite e glicerol sobre PET e sensores individualizados e delimitados (Foto com régua).

2.3.2 Caracterização da tinta condutora de quitosana, grafite e glicerina

Para confeccionar tintas condutoras utilizadas na arquitetura dos sensores é necessário que seus componentes interajam de maneira a permitir uma condutividade suficiente para que as reações de oxidação e redução ocorram em sua superfície. Não se encontra muitas tintas condutoras a base d'água na literatura, por isso, é ideal aplicar métodos rápidos e de baixo custo para avaliar se a mistura de componentes está adequada para a funcionalidade.

A quitosana foi escolhida justamente por ser um polímero que pode ser solubilizado em água, o grafite é uma das substâncias carbonáceas de baixo custo que, assim como em outros artigos, se mostrou funcional para o desenvolvimento de tintas condutoras. O glicerol, por outro lado, foi usado como aditivo para melhorar a fluidez da tinta, e foi escolhido por ser também miscível à água.

Desta forma para iniciar a preparação da tinta, foram feitas soluções de quitosana em três diferentes concentrações, 1, 2 e 3% (m/v) em solução aquosa de ácido acético a 2,0% (v/v). No entanto, quando os sensores preparados com as tintas formuladas com concentrações de quitosana de 2% e 3% foram testados eletroquimicamente. Notou-se que a maior quantidade de biopolímero promoveu uma queda nos sinais eletroquímicos por atuar como uma camada isolante. No mesmo sentido, concentrações menores de 1% de quitosana tornavam a tinta muito líquida, impossibilitando a confecção dos sensores. Como aditivo, utilizou-se o glicerol e testou-se 1, 2, 3, 4 e 5% (m/m). Maiores concentrações de glicerol tornaram a tinta muito líquida, dificultando o preparo dos sensores, e a concentração que proporcionou melhor fluidez e melhor desempenho eletroquímico foi de 2% (m/m). Por fim, após a escolha da quantidade de quitosana a ser utilizada na solução e a quantidade de glicerol, também foram utilizadas diferentes proporções de grafite em relação à solução de quitosana. Percebeu-se que quantidades acima de 50% (m/m) deixavam a tinta com aspecto de pasta de carbono, tanto na hora da mistura quanto depois de seco, o que não é o objetivo, então optou-se por 45% (m/m) de grafite, que foi a maior quantidade possível, mantendo as características ideais a técnica de *screen-printed*.

Desta forma para iniciar a caracterização eletroquímica da tinta confeccionada, o dispositivo CGG/PET foi submetido a uma voltametria cíclica. Utilizou-se uma solução de KCl 1,0 mmol L⁻¹ e como sonda eletroquímica uma solução [Fe(CN)₆]^{3-/4-} equimolar

1,0 mmol L⁻¹, em uma velocidade de 50 mV s⁻¹. Pode-se observar um pico anódico de 174 μA a 0,18V e um pico catódico de -167 μA a 0,01V (Figura 4). A relação I_a/I_c calculada é 1,04 e a separação pico a pico corresponde a 174 mV. Esses parâmetros voltamétricos são bastante satisfatórios considerando a literatura recente dedicada à fabricação de SPEs [41, 161-163].

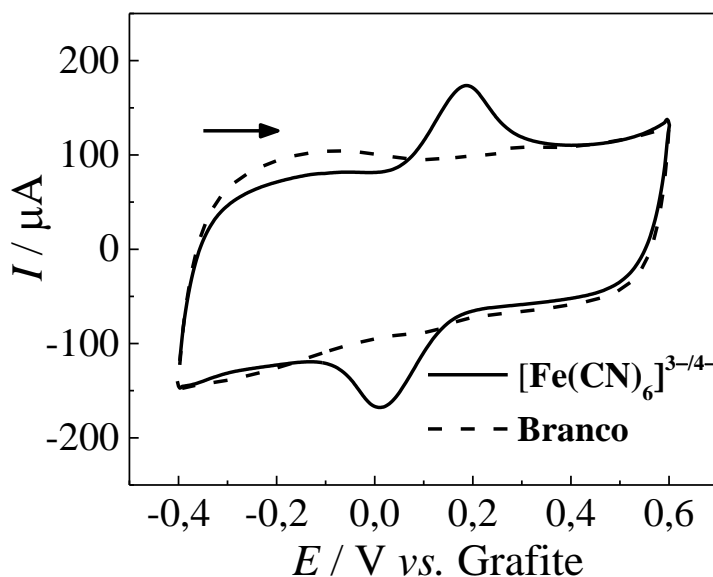


Figura 4. Voltamograma cíclico de CGG/PET em KCl 0,1 mol L⁻¹ (tracejado) e equimolar [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (preto) 1,0 mmol L⁻¹, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

A área eletroquímica ativa do eletrodo CGG/PET (Figura 5) foi estimada com base na equação de Randles–Ševčík (Equação 1), em velocidades de varredura variando de 25 a 175 mV s⁻¹ utilizando [Fe(CN)₆]^{3-/4-} equimolar a 1,0 mmol L⁻¹ como sonda, em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹

Equação 1, Randles–Ševčík:

$$I_p = \pm 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A C D^{3/2} v^{1/2}$$

Onde I_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons na reação, A é referente ao valor da área eletroativa, C a concentração da sonda redox, D o coeficiente de difusão da sonda e v a velocidade de varredura. A inclinação do gráfico I_{pa} vs. $v^{1/2}$ dos voltamogramas cíclicos registrados em diferentes velocidades de varredura na presença equimolar da sonda eletroquímica [Fe(CN)₆]^{3-/4-} foi usada para estimar A . O coeficiente de difusão D é o coeficiente de difusão das espécies eletroativas ($D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $6,5 \times 10^{-6}$

$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ espécies a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, respectivamente [164] e v é a velocidade de varredura. A área eletroquimicamente ativa média obtida das correntes anódica e catódica foi $(0,47 \pm 0,01) \text{ cm}^2$. A área geométrica dos eletrodos é de $0,14 \text{ cm}^2$ para o eletrodo de trabalho. Utilizando a seguinte eq. $\% \text{ Real} = (\text{Areal} / \text{Ageo}) \times 100$ [165], o $\% \text{ Real}$ é 335,71%, o que significa que a área eletroativa obtida foi 3 vezes maior que a área geométrica. Além disso, foram obtidos valores de repetibilidade e reprodutibilidade de 0,45% e 7,13% ($n = 5$), respectivamente (Figura 6)

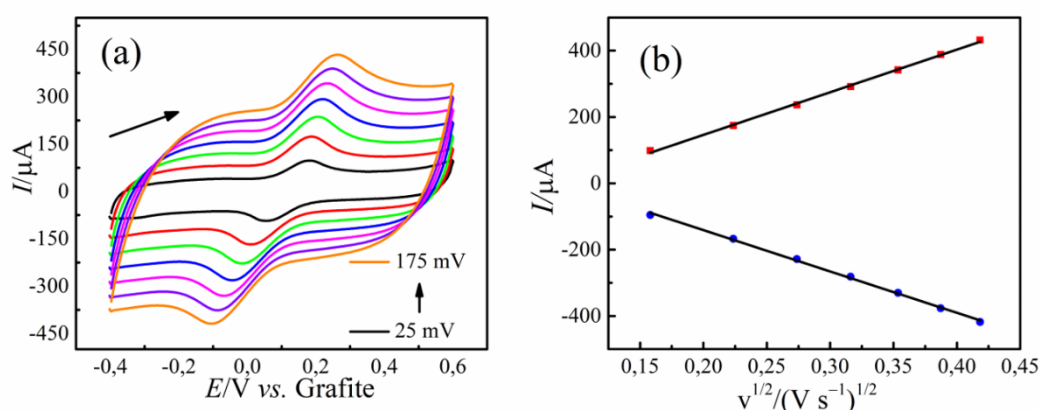


Figura 5. (A) Voltametria cíclica do dispositivo CGG/PET na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, variando as velocidades de varredura de 25 a 175 mV s^{-1} (B) Gráfico de pontos I_p vs $v^{1/2}$

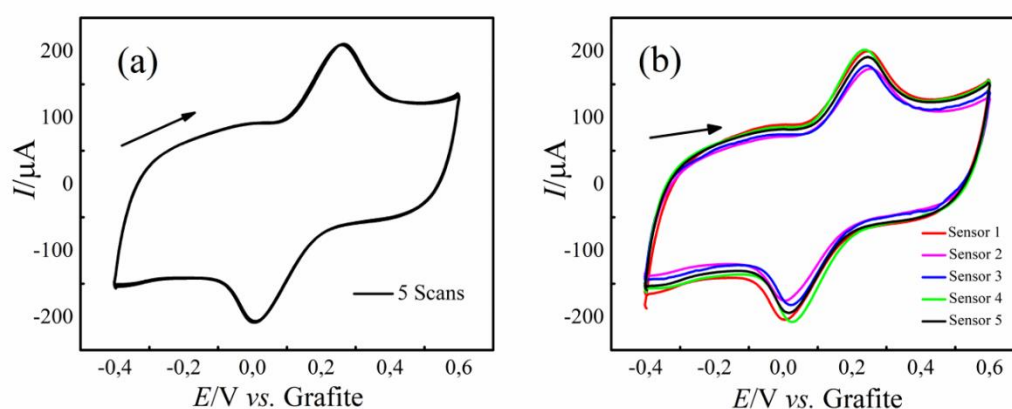


Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo CGG/PET em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para medições consecutivas realizadas com o mesmo (A) e diferentes eletrodos (B) ($n=5$); Velocidade de varredura: 50 mV/s

A tinta de quitosana, grafite e glicerol também foi caracterizada pelo uso da técnica FTIR. Com os resultados dessa caracterização pode-se prever quais grupos funcionais estarão disponíveis no material, bem como justificar o comportamento eletroquímico obtido. A Figura 7 demonstra os espectros de FTIR do grafite, do compósito grafite, quitosana e glicerol e do filme de quitosana. O espectro da quitosana exibe as bandas de absorção distintas em 1622 cm^{-1} (Amida I), 1571 cm^{-1} (Amida II) e 1410 cm^{-1} (Amida III). As bandas de absorção em 1160 cm^{-1} (alongamento anti-simétrico do C–O–C), 1073 e 1032 cm^{-1} (vibrações envolvendo o alongamento C–O) são características de sua estrutura de sacarídeo [166, 167]. No espectro da tinta condutora, observamos uma diminuição na banda amina em 1622 cm^{-1} . A diminuição na banda C–O pode estar relacionada à alta quantidade de grafite no eletrodo o que promove um impedimento parcial das bandas da quitosana, uma vez que as bandas se assemelham no espectro, mas em intensidade reduzida. É possível observar bandas semelhantes nos espectros obtidos para os três materiais: nas faixas de vibração N–H de e faixas de O–H, 3442 , 3437 e 3430 cm^{-1} , atribuídas a ligações de hidrogênio; bandas C=C e C=O a 1630 e 1637 cm^{-1} referentes a alcenos e bandas C–C a 1402 e 1410 cm^{-1} , referentes a alcanos. Portanto, os resultados do FTIR sugerem a existência de interações entre os grupos O–H do grafite e a N–H da quitosana. Além disso, nota-se a semelhança entre os espectros de grafite em pó e da tinta condutora, exceto pelo deslocamento das bandas na região dos 3400.

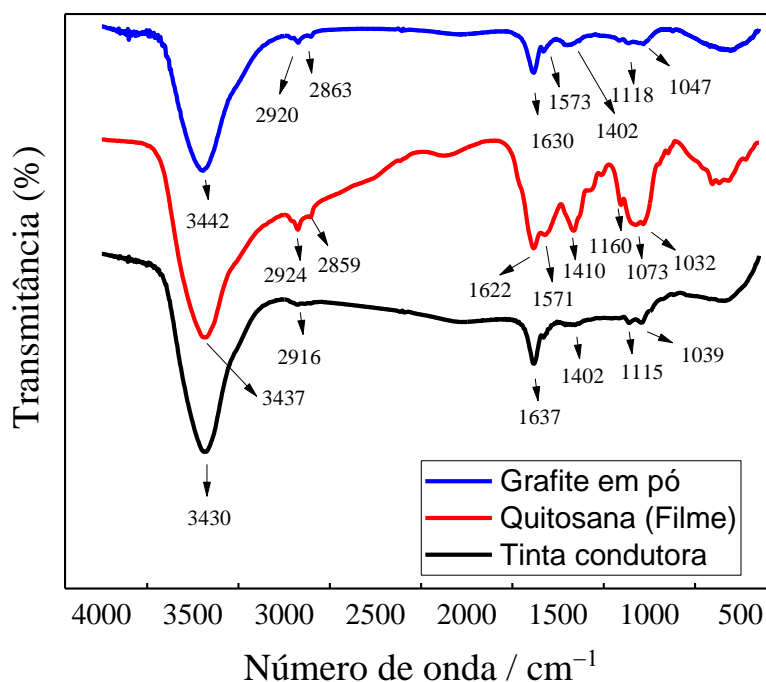


Figura 7. Espectros de FTIR do Grafite em pó (azul), do filme de quitosana (vermelho) e da tinta condutora de grafite, quitosana e glicerol (preto).

Caracterizou-se também por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens MEV foram obtidas para o CGG/PET em 220x e 800x (Figura 8 (a) e (b)) mostram uma superfície homogênea e rugosa. O mapeamento ColorSEM (Figura 8 (c)) mostra a predominância de elementos de carbono na superfície do eletrodo. A Figura 8 (d) e (e) mostram as imagens MEV obtidas para Tyr-MWCNT-CGG/PET e MWCNT-CGG/PET.

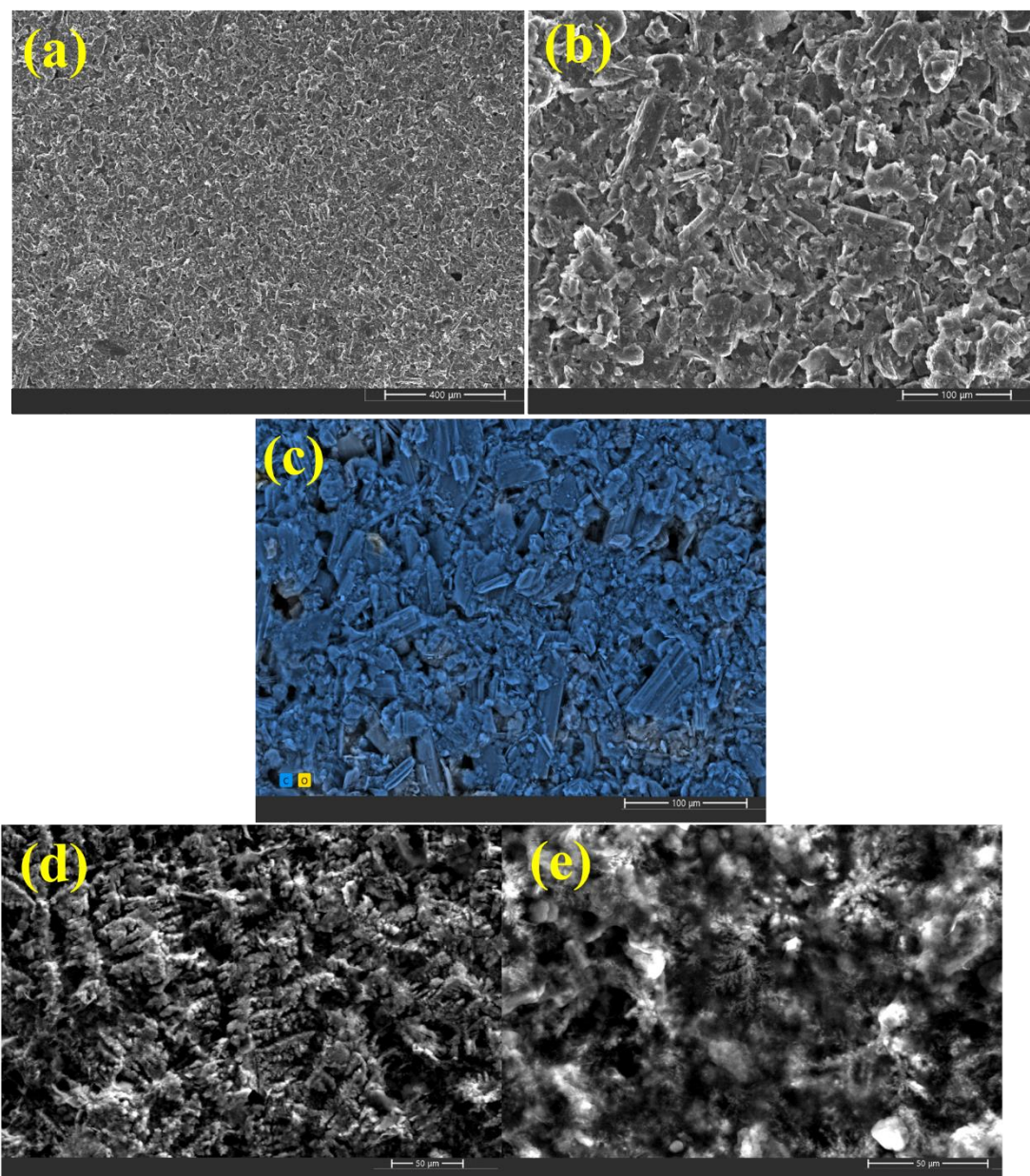


Figura 8. (a) Imagens de MEV obtidas para o CGG/PET com aumento de 220x; (b) e 800x; (c) mapeamento ColorSEM da superfície CGG/PET (ampliação de 1000 ×); (d) para o MWCNT-CGG/PET com aumento de 1200x; (e) para o Tyr-MWCNT-CGG/PET com aumento de 2000x

Também se realizou a medida de ângulo de contato, pois este é um parâmetro para a verificação dos comportamentos hidrofílicos e hidrofóbicos de determinada superfície. Para a medição dos ângulos utilizou-se 70 μL de água desionizada e posterior gotejamento aguardou-se 10s para tirar as fotos. Na literatura encontra-se que os materiais

gráfficos em geral possuem características variando de hidrofílicas a hidrofóbicas, possuindo variáveis angulares de 64 a 150°, de acordo com o tipo de estrutura gráffica [168, 169]. Os parâmetros dessa técnica segundo Silva [160] são: superfícies com $\theta < 10^\circ$ apresentam caráter super-hidrofílico, $\theta < 90^\circ$ hidrofílico, $90^\circ < \theta < 150^\circ$ hidrofóbico e $\theta > 150^\circ$ super-hidrofóbico. Nesse sentido, o PET lixado apresentou um ângulo de contato com a água de 58,51° (Figura 9a), e o CGG/PET apresentou um valor semelhante de 56,14° (Figura 9b), o que é concordante com uma característica hidrofílica do PET e do sensor proposto. Por ser uma tinta à base d'água acreditava-se que a mesma apresentaria superfície de caráter hidrofílico, entretanto, a angulação obtida permite a realização de medidas voltamétricas sem maiores problemas.

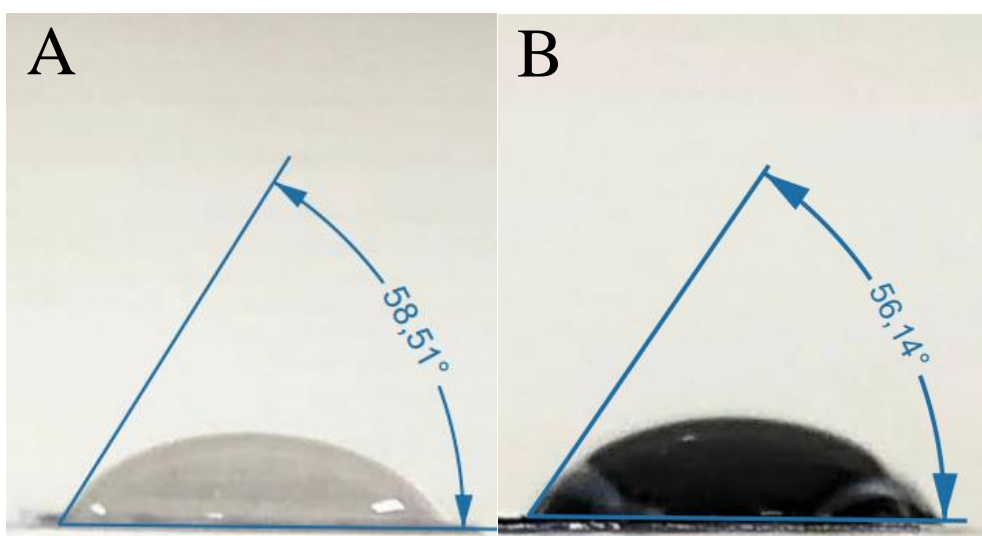


Figura 9. Medidas de ângulo de contato de (A) PET lixado e (B) do sensor CGG/PET. Essas medidas foram realizadas utilizando 70 mL de água deionizada e posterior gotejamento aguardou-se 10s para tirar as fotos;

Com os resultados obtidos até então considerou-se prosseguir para a aplicação desse dispositivo na determinação das concentrações de ácido úrico (UA).

2.3.3 Determinação eletroquímica da concentração de UA com eletrodo descartável CGG/PET

Para a determinação eletroquímica da concentração de UA, primeiramente realizou-se a voltametria cíclica, para que os picos correspondentes à oxidação e redução

fossem avaliados em relação as magnitudes de sinal pelo sensor confeccionado. Realizou-se a voltametria cíclica na presença de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) entre $-0,4\text{V}$ a $0,6\text{V}$ em velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} . Os eletrodos desenvolvidos apresentaram respostas eletroquímicas para a oxidação do UA (Figura 10). E devido à resposta voltamétrica de caráter irreversível, o pico anódico foi usado para a posterior quantificação de UA.

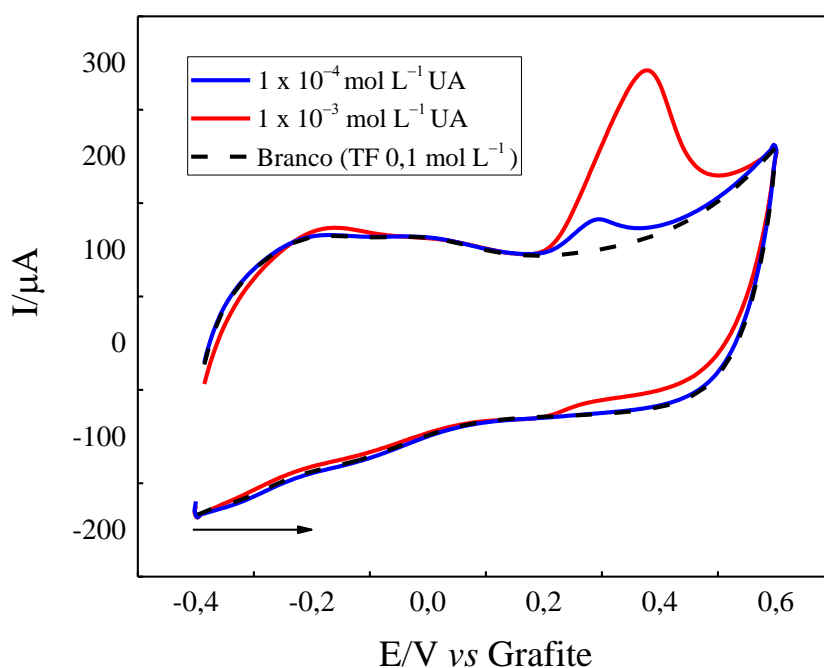


Figura 10. Voltamogramas cíclicos CGG/PET utilizado em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e UA nas concentrações $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,0), $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

Uma possível reação do UA é ilustrado na Figura 11. Resultados típicos desse mecanismo são mostrados nos artigos desenvolvidos por Wang et al. [134] e Roy et al. [132], em que ocorrem uma eletro-oxidação do UA, a qual envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons. Nessa reação são geradas espécies instáveis como a diimina, que são atacadas pela água e de maneira gradual são transformadas em imina-álcool e depois em UA-4,5-diol. O composto UA-4,5-diol produzido também apresenta instabilidade e decompõe-se em diferentes produtos, dependendo do pH da solução.

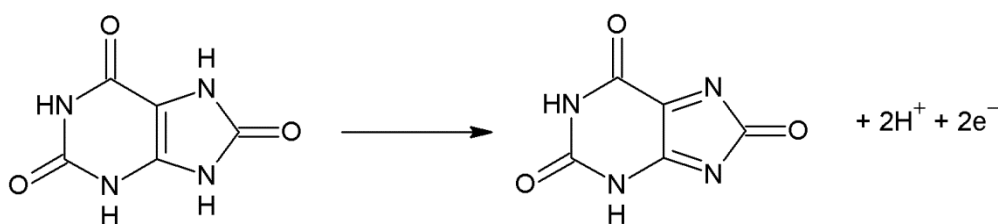


Figura 11. Possível reação de oxidação do UA.

2.3.4 Construção da curva analítica e análise de UA em amostras

Posterior a otimização dos parâmetros da técnica selecionada, realizou-se a construção da curva analítica como observamos na Figura 13. Os voltamogramas lineares para o sensor confeccionado foram obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Todas as medidas foram realizadas em triplicata. As voltametrias foram obtidas em diferentes concentrações de UA sendo elas 8,0; 10,0; 30,0; 50,0; 80,0; 100,0; 300,0 e $500,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Houve um aumento da corrente de pico catódica com o aumento da concentração de UA de maneira linear como observado na Figura 13B, seguindo a equação da reta: $I (\mu\text{A}) = 0,16547 C_{(\text{UA})} + 6,53468 \times 10^{-8}$, com coeficiente de correlação igual a 0,997. O limite de detecção (LOD) estimado para UA foi $3,63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, calculado a partir da equação abaixo:

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD/SL} \quad \text{Eq. 2}$$

O qual SD é o desvio padrão da curva analítica e SL é o coeficiente angular da curva analítica.

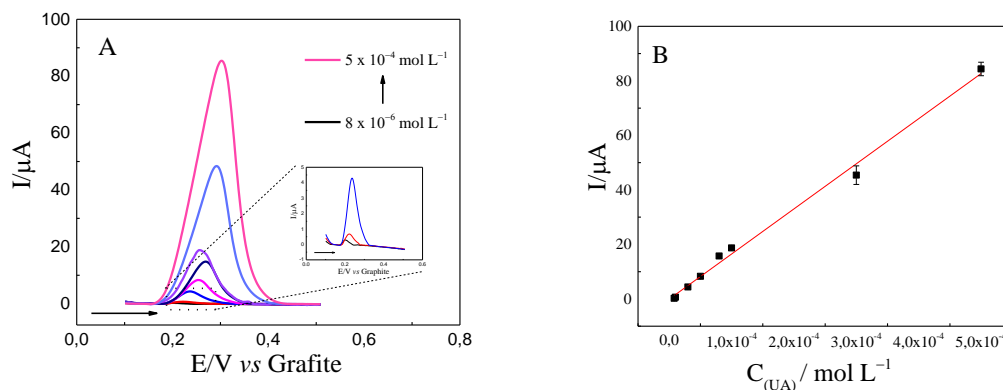


Figura 12. (A) Voltamogramas lineares em presença de UA nas concentrações de 8,0; 10,0; 30,0; 50,0; 80,0; 100,0; 300,0 e 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0); $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ (B) Gráfico de pontos obtidos através da curva analítica para UA.

Para verificar a aplicabilidade de CGG/PET, o eletrodo foi submetido a análises para detecção da concentração de UA urina sintética. A amostra de urina foi preparada de acordo com o artigo desenvolvido por Campos e colaboradores [170], contendo 6,25 g de ureia, 0,35 g de NaH_2PO_4 , 0,73 g de NaCl , 0,56 g de Na_2SO_4 , 0,40 g de KCl , 0,27 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 25 g de NH_4Cl em 250 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} . A amostra de urina foi então fortificada com concentrações conhecidas de UA e o valor de corrente obtido, respectivo para cada concentração, foi calculado pela equação da reta proposta. A Tabela 1 mostra as concentrações variando de 85,51 a 105,18%, demonstrando que o dispositivo proposto pode ser utilizado para análise dessas amostras.

Tabela 1. Determinação de UA pelo dispositivo CGG/PET

Amostra	Adicionado (mol L^{-1})	Encontrado (mol L^{-1})	Recuperado (%)
Urina sintética	$5,00 \times 10^{-5}$	$4,28 \times 10^{-4}$	85,51
	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,61 \times 10^{-5}$	98,09
	$5,00 \times 10^{-4}$	$5,26 \times 10^{-4}$	105,18

Para comprovar a funcionalidade do sensor mesmo frente a espécies concomitantes foram realizados o estudo de interferentes. Dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e alguns sais presentes na urina como $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , Na_2SO_4 , NaCl e Ureia foram as espécies testadas. Todos os testes foram feitos em triplicata com a mesma concentração do interferente em relação ao UA. Os voltamogramas podem ser vistos na Figura 14. A Tabela 2 mostra as porcentagens de desvio, variando de 0,49 a 13,68%, demonstrando que o sensor foi eficaz mesmo em meio a espécies concomitantes.

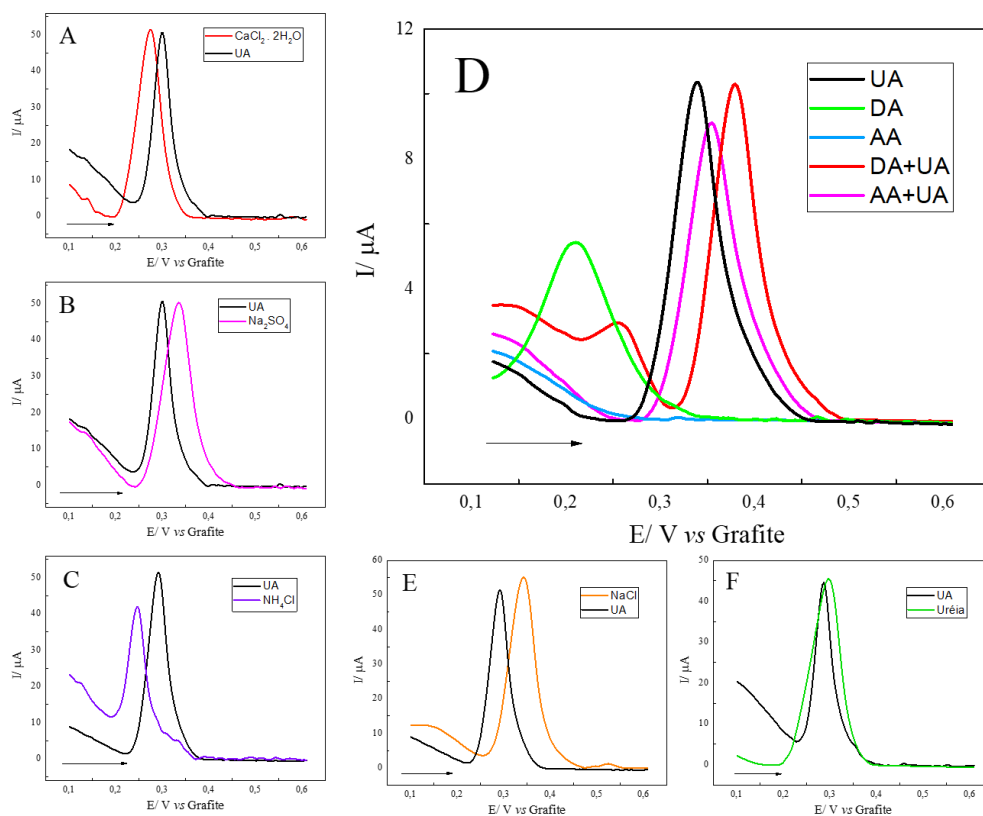


Figura 13. Teste de interferência de analitos concomitantes. (A) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (B) $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (C) $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (D) UA, DA e AA sem espécies concomitantes, UA+DA e UA+AA ($8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); (E) $\text{NaCl} + \text{UA}$ e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); (F) Ureia+UA e UA ($3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$);

Tabela 2. Determinação da porcentagem de interferência de espécies concomitantes do UA pelo dispositivo CGG/PET

Espécie concomitante	% de interferência (n=3)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	+ 0,76
NH ₄ Cl	- 7,12
Na ₂ SO ₄	+ 1,55
NaCl	+ 8,57
Uréia	+ 4,18
DA	+0,49
AA	+13,68

2.4 Comparação com a literatura

O CGG-PET foi comparado a outros trabalhos da literatura, conforme apresentado na Tabela 3. Os trabalhos selecionados apresentam algumas semelhanças, como o uso de materiais de carbono, detecção de UA e/ou possibilidade de descartabilidade. Baig e colaboradores [171] desenvolveram um eletrodo descartável baseado em camadas alternadas de nanopartículas de ouro (AuNP) e grafeno para a determinação simultânea de dopamina e ácido úrico, apresentando excelente atividade eletrocatalítica, baixos limites de detecção (0,024 µM para dopamina e 0,029 µM para ácido úrico) e boa sensibilidade e seletividade, tornando-os tanto reutilizáveis quanto descartáveis. Özcan e colaboradores [172] propuseram a preparação de eletrodos de grafite de lápis tratados eletroquimicamente (ETPG) em soluções de perclorato de lítio e carbonato de sódio, demonstrando alta seletividade e sensibilidade para a oxidação do ácido úrico e aplicação bem-sucedida em amostras de urina e soro humano. Yao e Zhang [172] desenvolveram um dispositivo analítico em papel microfluídico, com eletrodos de carbono serigrafados (SP-ACE-EC-µPAD), apresentando alta sensibilidade e reprodutibilidade na detecção de glicose e ácido úrico em soluções padrão, bem como em amostras de urina real. Por fim, Kong e colaboradores [173] desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com hidrocloreto de procatérol (ProH), no qual foi eletropolimerizado com

sucesso em para formar uma membrana de poli(hidrocloro de procaterol) (p-ProH), resultando em uma excelente capacidade electrocatalítica para a oxidação simultânea de dopamina (DA) e ácido úrico (UA) e na detecção em fluidos biológicos como soro humano e urina. Visto a simplicidade em relação a confecção deste dispositivo, seu baixo custo em relação aos outros citados e sua facilidade na obtenção podemos destacar um desempenho satisfatório em relação a sua faixa linear bem como o limite de detecção obtidos.

Tabela 3. Comparação entre o CGG/PET e sistemas sensoriais encontrados na literatura para a determinação de UA

Eletrodos	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referências
GR/Au/GR/Au/GPE	SWV	0,09 a 25,00	0,0290	[171]
ETPG-LPNC	DPV	0,05 a 10,00	0,0015	[172]
SP-ACE-EC- μ PAD	Cronoamperometria	300 a 2000	80,000	[174]
p-ProH/GCE	SWV	2,00 a 100,0	0,5000	[173]
CGG/PET	LSV	8,00 a 500,0	0,3630	Este trabalho

GR/Au/GR/Au/GPE: Um eletrodo descartável fabricado de lápis de grafite e modificado com camadas alternadas de nanopartículas de ouro e grafeno. **ETPG-LPNC:** Eletrodo confeccionado com grafite de lápis tratado eletroquimicamente em solução de LiClO_4 e Na_2CO_3 . **SP-ACE-EC- μ PAD:** Dispositivo microfluídico baseado em papel com eletrodos de carbono impressos. **p-ProH/GCE:** Eletrodo de carbono vítreo modificado através da eletropolimerização de Cloridrato de procaterol (ProH). **SWV:** voltametria de onda quadrada. **DPV:** voltametria de pulso diferencial. **LSV:** voltametria linear.

2.5 Modificação com Tirosinase para a confecção do biossensor

O desempenho do CGG/PET como plataforma para construção de biossensores foi avaliado pela imobilização de Tyr para desenvolver um biossensor de catecol. Para a modificação preparou-se uma solução de DHP e MWCNTs 1:1 mg/mL em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Outra solução foi preparada dispersando 50 unidades de Tyr em 10 mL da mistura de DHP e MWCNTs. Gotejou-se então $10 \mu\text{L}$ sobre a superfície do eletrodo de trabalho, aguardou-se duas horas, em geladeira. Lavou-se os biossensores e

os sensores estavam aptos a utilização, este sistema foi nomeado Tyr-MWCNT-CGG/PET.

A Figura 15a exibe a resposta voltamétrica do catecol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $0,6\text{V}$ a $-0,4\text{V}$ a 50 mV s^{-1} em CGG/PET e Tyr-MWCNT-CGG/PET. Há uma redução da corrente de pico nos três voltamogramas devido à redução da quinona gerada no potencial inicial; entretanto, a modificação com Tyr promoveu um aumento no sinal analítico, devido à redução de uma reação enzimática, que gerou quinona a partir do catecol [175]. Considerando os voltamogramas da Figura 15a, valores de corrente de pico iguais a $133 \mu\text{A}$, $172 \mu\text{A}$ e $390 \mu\text{A}$ foram obtidos para CGG/PET, MWCNT-CGG/PET e Tyr-MWCNT-CGG/PET, respectivamente. Levando em consideração a resposta voltamétrica mostrada na Figura 15a, selecionamos $-0,050 \text{ V}$ como potencial de trabalho para realizar os experimentos cronoamperométricos. A Figura 15c exibe os cronoamperogramas correspondentes para concentrações crescentes de catecol de $0,5$ a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a Figura 15d representa o gráfico de calibração correspondente uma sensibilidade de $0,231 \text{ A } \mu\text{mol}^{-1}$, equação da reta é: $I (\mu\text{A}) = -0,231 \text{ C (Catecol)} - 1,48521 \times 10^{-6}$ e um limite de detecção de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Experimentos semelhantes realizados no eletrodo sem tirosinase não mostraram resposta para adições sucessivas de catecol (Figura 16).

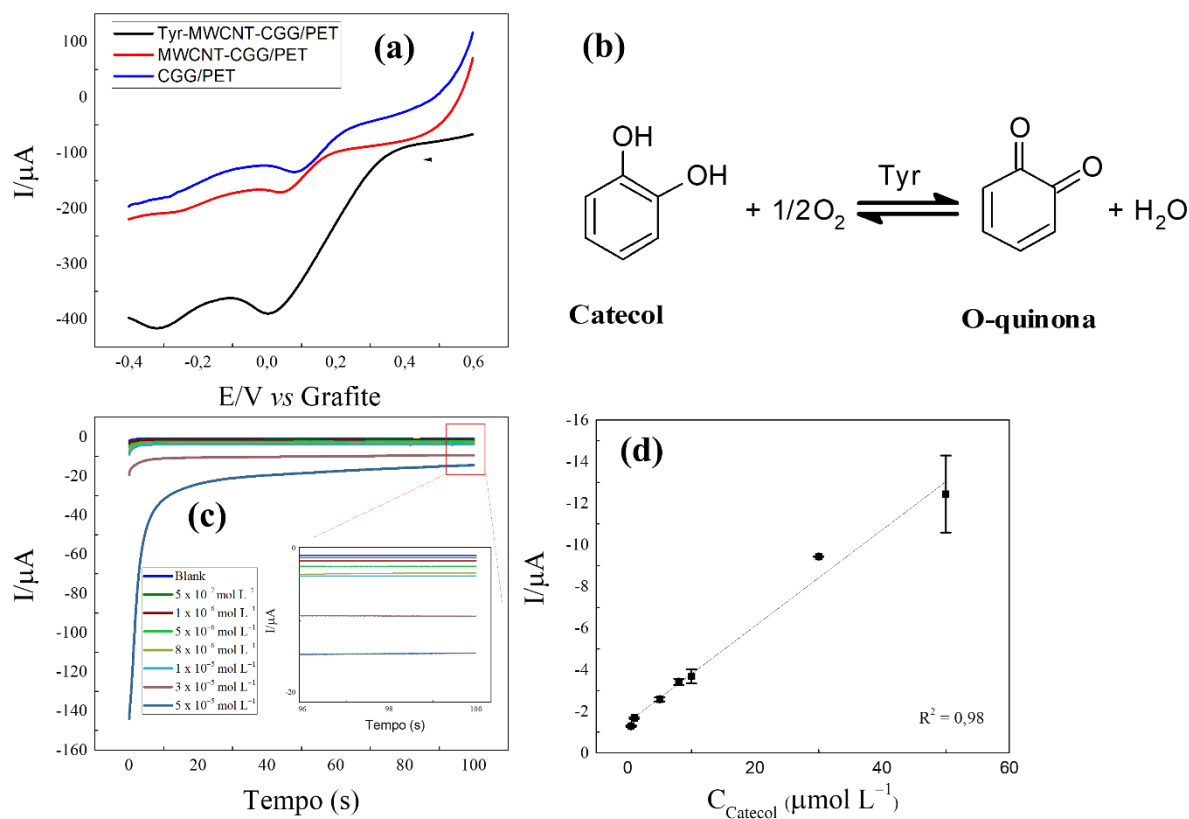


Figura 14. (a) Voltamogramas lineares de CGG/PET, MWCNT-CGG/PET e Tyr-MWCNT-CGG/PET em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo catecol $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} ; (b) Oxidação enzimática de catecol em o-quinona; (c) Cronoamperogramas registrados em diferentes concentrações de catecol ($0,5$; $1,0$; $5,0$; $8,0$; $10,0$; $30,0$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Potencial aplicado = $-0,05 \text{ V}$ vs. Grafite (d) Curva analítica para catecol por Cronoamperometria (I vs. C_{catecol});

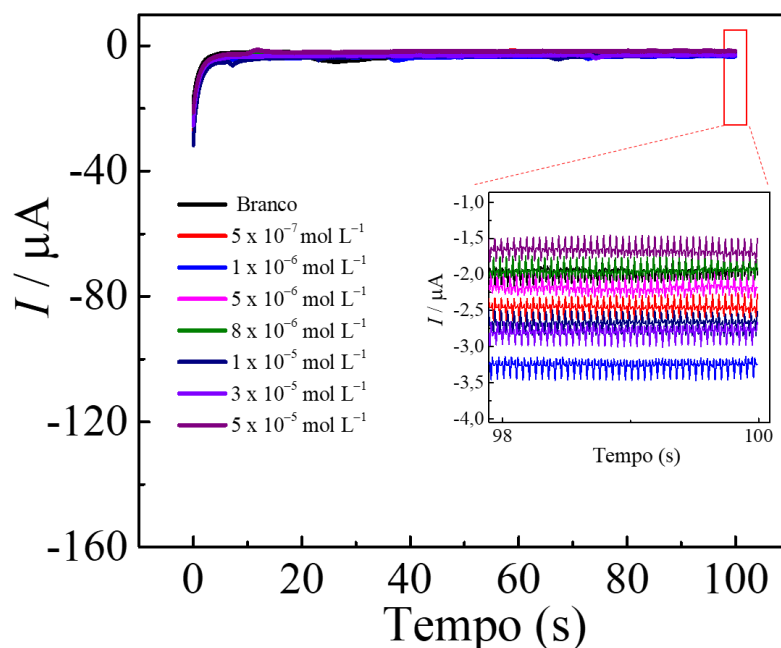


Figura 15. Cronoamperogramas registrados em diferentes concentrações de catecol (0,5; 1,0; 5,0; 8,0; 10,0; 30,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) utilizando o MWCNT-CGG/PET. Potencial aplicado = $-0,05$ V vs. Grafite

Para verificar a aplicação prática do Tyr-MWCNT-CGG/PET, avaliamos a recuperação de catecol em amostras enriquecidas de água advinda de um lago. Percentuais de recuperação entre 90,2 e 113,9% foram alcançadas para catecol (Tabela 4). Esses resultados demonstram a utilidade dos sensores propostos e o potencial para outras aplicações analíticas.

Para demonstrar as funcionalidades do biossensor Tyr-MWCNT-CGG/PET mesmo diante de espécies concomitantes, foi realizado o estudo de interferentes. No Tyr-MWCNT-CGG/PET, avaliou-se a possível interferência de compostos normalmente presentes em águas naturais como KCl, NaNO_3 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Os voltamogramas registrados na ausência e presença de cada concomitante. Todos os testes foram realizados em triplicata com a mesma concentração do interferente com o analito de interesse.

A Tabela 5 mostra as porcentagens relativas obtidas a partir da comparação das correntes voltamétricas registradas na presença e ausência dos concomitantes variando de

1,43 a 9,51%. Esses dados comprovaram a seletividade dos biossensores em relação a todas as substâncias potencialmente interferentes testadas.

Tabela 4. Determinação de catecol por cronoamperometria em amostra de água utilizando o biossensor Tyr-MWCNT- CGG/PET (n = 3).

Amostra	Adicionado (mol L^{-1})	Encontrado (mol L^{-1})	Recuperado (%)
Água do Lago	$3,00 \times 10^{-5}$	$(3,41 \pm 0,01) \times 10^{-5}$	113,9
	$5,00 \times 10^{-5}$	$(4,51 \pm 0,01) \times 10^{-5}$	90,3

Tabela 5. Determinação da porcentagem de interferência de espécies concomitantes do Catecol pelo dispositivo Tyr-MWCNT-CGG/PET

Espécie concomitante	% de interferência (n=3)
KCl	-9.51
NaNO ₃	+2.98
Pb(NO ₃) ₂	+2.13
CaCl ₂ .H ₂ O	-1.43

2.6 Comparação com a literatura

A Tabela 6 compara as características analíticas do Tyr-MWCNT-CGG/PET com outros sensores relatados anteriormente. Os trabalhos selecionados apresentam algumas semelhanças com o eletrodo proposto, como o uso de materiais de carbono e a descartabilidade. Cagnani e colaboradores [176], utilizaram sensores eletroquímicos totalmente impressos em larga escala, utilizando técnicas de produção como o processamento de rolo a rolo, os quais os sistemas desenvolvidos foram utilizados na detecção de compostos como o catecol em amostras de água. Cerrato-Alvarez e colaboradores [177] exploraram a aplicabilidade real da tecnologia de biossensores miniaturizados e portáteis para a estimativa do teor total de fenólicos em 15 cervejas

comerciais diferentes por meio de amperometria direta, utilizando eletrodos serigrafados de nanopartículas de ouro modificados com tirosinase (Tyr-AuNPS-SPCEs). Vicentini e colaboradores [178, 179], desenvolveram dois trabalhos para a detecção do catecol. No primeiro propuseram um biossensor utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) e tirosinase (Tyr) em um filme de dihexadecilfosfato. No segundo o mesmo eletrodo de carbono vítreo foi modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados (MWCNT), cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (líquido iônico = IL) e tirosinase (Tyr) em um filme de dihexadecilfosfato (DHP). Ambas modificações mostraram excelente ação biocatalítica para a oxidação de catecol em amostras de água. Silva e colaboradores [180], apresentaram um novo procedimento de tratamento químico sequencial para gerar óxido de grafeno reduzido (rGO) em eletrodos de ácido polilático (PLA) impressos em 3D, mostrando seu potencial para detecção e biossensoriamento, com aplicações na determinação de serotonina em urina sintética e catecol em amostras de água. Dada a simplicidade, com o procedimento de preparação da tinta condutora à base de água, bem como os eletrodos CGG/PET e o baixo custo dos materiais utilizados, o desempenho analítico do eletrodo proposto é notavelmente satisfatório com suas faixas lineares e LODs.

Tabela 6. Comparação das características analíticas do sensor proposto com alguns sensores para UA e catecol relatados na literatura

Eletrodo	Técnica	Analito	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
Tyr-CB ₄ /SPCE	CV	Catecol	5,0 a 100,0	1,90	[176]
Tyr-Au NPs/SPCE	Amperometria	Catecol	2,5 a 20,0	1,20	[177]
Tyr-AuNPs-DHP/GCE	Amperometria	Catecol	2,5 a 95,0	0,17	[178]
Tyr-IL-MWCNT/GCE	LSV	Catecol	4,9 a 1100	0,58	[179]
Tyr-DHP/rGO-PLA	SWV	Catecol	30 a 700,0	0,26	[180]
Tyr- MWCNT- CGG/PET	Cronoamperometria	Catecol	0,5 a 50,0	0,31	Esse trabalho

SPCE/Tyr-CB₄: eletrodos de carbono serigrafados (SPCEs) preparados com tintas de negro de fumo (CB) e modificados com Tyr; **SPCE/Tyr-AuNPs**: eletrodos serigrafados com nanopartículas de ouro modificados com tirosinase; **Tyr-AuNPs-DHP/GCE**: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) e Tyr; **Tyr-IL-MWCNT/GCE**: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados (MWCNT), cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio (líquido iônico = IL) e Tyr; **Tyr-DHP/rGO-PLA**: tyr e óxido de grafeno reduzido (rGO) em eletrodos de ácido polilático (PLA) impressos em 3D **CV**: voltametria cíclica; **SWV**: voltametria de onda quadrada. **DPV**: voltametria de pulso diferencial. **LSV**: voltametria de varredura linear

2.7 Conclusão - Capítulo 1

Em resumo, este capítulo demonstrou a preparação de uma tinta condutora de carbono à base de água ecologicamente correta. Com base na incorporação de quitosana à mistura de grafite e glicerol, foram apresentadas as vantagens do desenvolvimento de novos eletrodos descartáveis por serigrafia. O resultado foi uma tinta condutora a base d'água em PET reciclado, utilizada para desenvolver eletrodos serigrafados muito baratos, competitivos e descartáveis. A utilidade analítica dos eletrodos resultantes foi demonstrada por meio do desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a quantificação de ácido úrico em níveis submicromolares e como plataforma para construir um biossensor enzimático de catecol. A resposta dos eletrodos resultantes abre as portas para diversas aplicações analíticas, especialmente aquelas conectadas com biossensores para medições de ponto de atendimento, especialmente conectadas com biossensores. Em comparação aos eletrodos comerciais, o CGG/PET proposto é mais flexível e de menor custo, com um preço de fabricação estimado de apenas 0,006 dólares ou 0,033 reais por eletrodo.

3 **Capítulo 2 - Desenvolvimento de novas composições de tintas de prata para a preparação de eletrodos de pseudo-referência**

3.1 **Objetivos**

Desenvolver novas composições de tinta de prata que sejam de fácil produção e utilização e de menor custo em comparação com as tintas comerciais

3.2 **Experimental**

3.2.1 **Reagentes e soluções**

Os reagentes utilizados para a confecção das tintas, bem como para o preparo de soluções de eletrólitos suporte, sondas eletroquímicas e outras amostras foram todos de grau analítico, obtidos da Fisher, Dinâmica, Sigma-Aldrich ou Fluka. As soluções foram preparadas com água purificada através do sistema Heal Force (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Nas medidas realizadas para a caracterização eletroquímica dos sensores confeccionados foi utilizado solução de KCl (Sigma-Aldrich, Xerém, Duque de Caxias) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte uma mistura equimolar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Labsynth, Diadema, São Paulo) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica.

3.2.2 **Preparo das tintas**

Para o preparo das tintas foi utilizado uma centrífuga assimétrica dupla, SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K (FlackTec Inc., Landrum, EUA). Para o desenvolvimento da tinta de prata foi utilizado Prata em pó P.A. (Dinâmica Química Contemporânea®, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) dispersas em esmalte para unhas (Base Brilho Cuidados, Cora®, São Paulo, Brasil) goma laca (Acrilex®, São Bernardo do Campo, Brasil). As tintas Ag propostas neste trabalho foram preparadas utilizando dois grupos de composições com esmalte incolor (Cora®, Brasil) e goma-laca (Acrilex®, Brasil), e pó de Ag. Nesse sentido, foram criadas oito composições de tintas utilizando esses polímeros. No entanto, apenas uma composição de cada polímero foi selecionada para dar continuidade aos testes. Para preparar o esmalte (NP) e a tinta prata (tinta Ag-NP), misturou-se 0,5 g de pó Ag com 0,5

g NP na proporção de 1:1 (m/m). Além disso, para preparar a goma-laca (SL) e a tinta de prata (denominada tinta Ag-SL), misturou-se 0,6 g de prata com 0,4 g de goma-laca, 3:2 (m/m), ver Figura 17. Delimitadores foram confeccionados com o auxílio da impressora de corte Silhouette Cameo 3, os quais definiram um formato padrão para os dispositivos. Esses delimitadores adesivos foram colados sobre superfícies eletroquimicamente inertes, que no caso foi utilizado folhas de acetato (AC). Assim, tinta condutora foi espalhada sobre esse substrato delimitado. O sistema confeccionado foi chamado de GP-SL/AC e após secagem em temperatura ambiente por 24h esse sensor se encontra pronto para uso, bem como para futuras modificações.

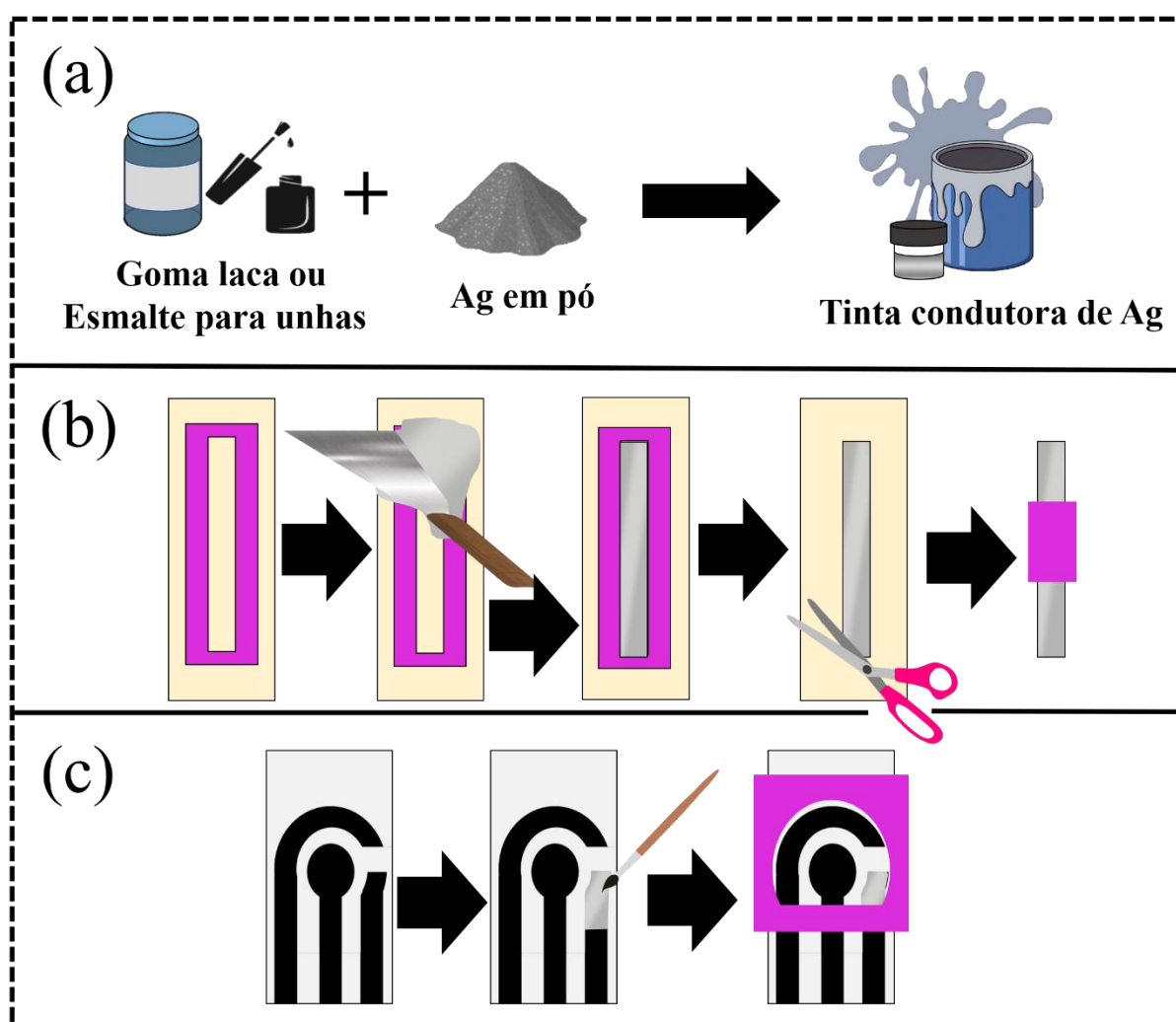


Figura 16. Esquema da preparação (a) da tinta e dos pseudo-eletrodos de referência, utilizando (b) folhas de acetato, (c) grafite SPE; Para preparar as tintas foram misturados 0,5g de prata em pó com 0,5g esmalte e 0,6g de prata

em pó com 0,4g de goma-laca, essas misturas foram devidamente agitadas e estavam prontas para utilização. As tintas foram utilizadas em folhas de acetato e eletrodos do tipo SPE, após secagem em temperatura ambiente por 24h ambos se encontram prontos para uso, bem como para futuras modificações.

3.2.3 Equipamentos

Para as análises eletroquímicas foi utilizado um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm (Eco Chemie), gerenciado pelo *software* Nova 2.1.4. Para realizar a conexão do sistema eletroquímico ao potenciostato utilizou-se conector proposto por Orzari e colaboradores [159]. O volume da gota utilizado sobre o sensor foi de 70 μL . Para as análises de Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado o espectrofotômetro Bruker Tensor II, em resolução de $4,0\text{ cm}^{-1}$ e modo de transmissão de 400 a 4000 cm^{-1} , com as amostras preparadas em KBr na proporção de 1:100. Para o DRX das tintas de prata foram secas e raspadas, na faixa de registro angular de 20° a 80° (X-Ray Powder Diffractometer, Rigaku, MiniFlex 600). A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura Thermo Scientific Prisma E com Tecnologia ColorSEM integrado à espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS). E por fim, para as análises de ângulo de contato foi utilizado o equipamento desenvolvido por Silva e colaboradores [160].

3.2.4 Caracterização das tintas de prata

A medição do potencial de circuito aberto (OCP) foi usada para atestar a estabilidade das tintas em diferentes substratos, usando solução de KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ por 1 h. O experimento foi conduzido em um sistema de dois eletrodos, no qual a pseudo-referência proposta foi o eletrodo de trabalho enquanto $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}(\text{sat.})$ foi o eletrodo de referência.

Voltamogramas de onda quadrada para GP-SL/AC, referenciados com as tintas preparadas, foram obtidos em tampão fosfato salino (PBS) $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0). Os parâmetros utilizados na técnica foram semelhantes aos utilizados por Pradela-Filho et al. [41] (frequência = 90 Hz, amplitude de modulação = 80 mV e potencial de passo = 9

mV). Todas as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$). A solução estoque de β -estradiol $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi preparada em etanol 50%. As seguintes diluições foram feitas usando PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0)

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada usando as folhas de acetato e sensores SPE pintados com as tintas Ag desenvolvidas como eletrodo de trabalho, platina como contra eletrodo e $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}(\text{sat.})$ como eletrodo de referência. Uma solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$, como sonda redox e eletrólito suporte e o potencial aplicado foi de $0,1 \text{ V}$.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Estudo das composições das tintas de prata

Para a formulação de tintas condutoras, é necessário avaliar as proporções entre o veículo polimérico e o material condutor [38, 181]. Se necessário, outros aditivos podem ser adicionados, principalmente para controlar a viscosidade e o tempo de secagem [182]. Nesse sentido, foram testadas oito composições utilizando dois tipos diferentes de polímeros (goma-laca, SL e esmalte para unhas incolor, NP). As proporções de otimização podem ser vistas na Tabela 7. As tintas 1, 2 e 3 foram feitas com NP e pó de Ag. Avaliando as tintas pelo aspecto físico, a melhor composição obtida com o NP foi a tinta 1, com pó de Ag e NP, na proporção (1:1 (m/m)), que foi homogêneo nos testes de espalhamento, enquanto as formulações 2 e 3, proporções (3:2 e 3:7 (m/m), respectivamente) não foram homogêneas e algumas regiões ficaram sem prata durante o espalhamento. É importante mencionar que, nas composições feitas a partir de NP não eram necessários os aditivos, uma vez que o NP já possui solventes em sua composição e estes são suficientes para controlar o tempo de secagem e proporcionar a adesão necessária para a tinta. Por outro lado, a adição de solventes pode ser interessante para melhorar o tempo de secagem e a viscosidade da tinta, quando utilizado o SL como polímero, conforme relatado na literatura [38]. Portanto, o uso de solventes para SL foi testado. As tintas 4, 5, 6, 7 e 8 foram feitas com SL, Acrilex®. As tintas 4 e 5 que possuíam 33 e 50% de solvente (m/m), respectivamente, apresentavam aparência homogênea, porém seu uso era inviável para aplicação em sensores descartáveis, pois o solvente, antes da secagem, também diluía o grafite condutor do sistema SPE. Portanto, nas tintas 6, 7 e 8, apenas a mistura de SL e Ag em pó foi testada. A SL é uma base

polimérica mais fluída que o NP e a proporção de tinta 6 tinha uma pequena quantidade de Ag, dificultando a homogeneidade dos sensores. Por outro lado, a tinta 7 era muito espessa e dificultava o espalhamento, por isso foi escolhida a tinta 8, pois os eletrodos de referência obtidos eram homogêneos, e ficavam completamente preenchidos com prata, além de não interferir no sistema de grafite utilizado para fabricar os demais. Assim, as tintas 1, denominada tinta Ag-NP, e 8, denominada tinta Ag-SL, foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho. A Figura 18 mostra fotos dos sistemas modificados com a tinta condutora de Ag.

Tabela 7. Composições para a produção de tinta condutora de prata.

Tinta	Composição	Porcentagem (%) (m/m)
1	Prata em pó e esmalte para unhas	50/50
2	Prata em pó e esmalte para unhas	40/60
3	Prata em pó e esmalte para unhas	30/60
4	Prata em pó, goma laca e solvente para poliuretano.	25/25/50
5	Prata em pó, goma laca e solvente para poliuretano.	33/33/33
6	Prata em pó e goma laca	50/50
7	Prata em pó e goma laca	70/30
8	Prata em pó e goma laca	60/40

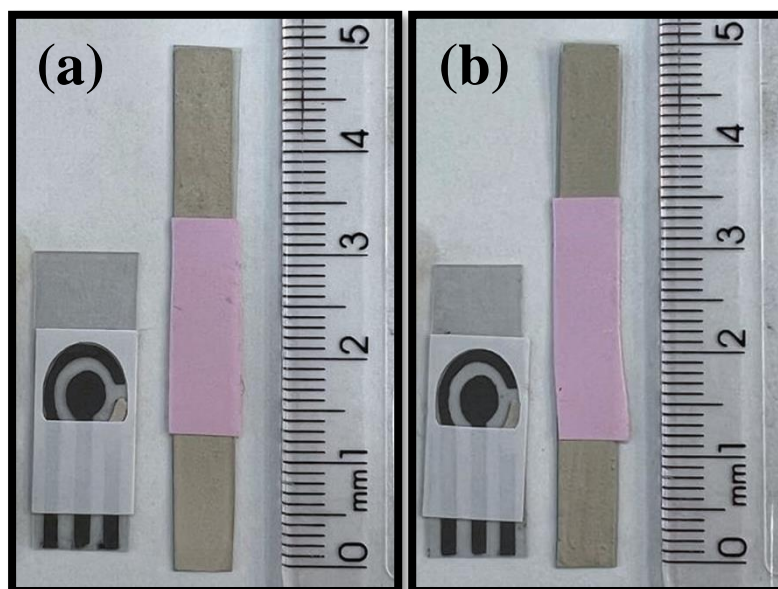


Figura 17. Imagens dos eletrodos de pseudo-referência produzidos com (a) SPE e folhas de acetato com a tinta Ag-NP e (b) SPE e folhas de acetato com a tinta Ag-SL.

3.3.2 Caracterização morfológica das tintas condutoras Ag

Para análise morfológica dessas tintas (Ag-NP e Ag-SL), foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens MEV mostraram uma superfície homogênea e rugosa para a tinta Ag-NP, conforme observado na Figura 19a e 19c, e o mapeamento ColorSEM (Figura 19b) mostrou a predominância de Ag e oxigênio na superfície do eletrodo. Provavelmente, o oxigênio vem do ar, desempenhando um papel significativo na dispersão das partículas de Ag. De acordo com Wiley e colaboradores [183], o ataque oxidativo ajuda a promover a dissolução inicial e dispersão das partículas de Ag na matriz polimérica.

Além disso, após a deposição de AgCl nas tintas Ag-NP, foi possível observar uma superfície rugosa e alguns aglomerados de AgCl na superfície (Figura 19d). Os resultados concordam com o mapeamento ColorSEM realizado (Figura 19e), que mostra a predominância de cloro, prata e oxigênio na superfície do eletrodo após a deposição.

Para realizar a deposição do AgCl na superfície, uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl foi utilizada, e a eletrodeposição foi realizada aplicando $+1,0 \text{ V}$ por 120 e 600 segundos, conforme descrito no procedimento do livro de Fatibello-Filho et al. [184], para os sistemas SPEs e Ag/AS, respectivamente."

Semelhante à tinta Ag-NP, as imagens MEV foram obtidas para a tinta Ag-SL e também apresentaram uma superfície homogênea e rugosa, com aparente a natureza truncada das partículas de Ag (Figura 19g e 19i) e o mapeamento ColorSEM (Figura 19 h) exibiu a predominância de prata e oxigênio na superfície do eletrodo. Além disso, imagens de MEV obtidas após a deposição de AgCl revelaram uma superfície rugosa, com aglomerados esféricos de AgCl. O mapeamento ColorSEM realizado (Figura 19 (k)) mostrou a predominância de cloro, prata e oxigênio na superfície do eletrodo

As medidas de EDS corroboram com os resultados obtidos por meio de mapeamentos de cores (Figura 19) e mostraram a predominância dos elementos Ag e oxigênio na superfície do eletrodo (Figura 20a e 20c). Após a eletrodeposição de cloreto de prata, a EDS também confirmou a deposição de AgCl na superfície da pseudo-referência (Figura 20 b e 20d).

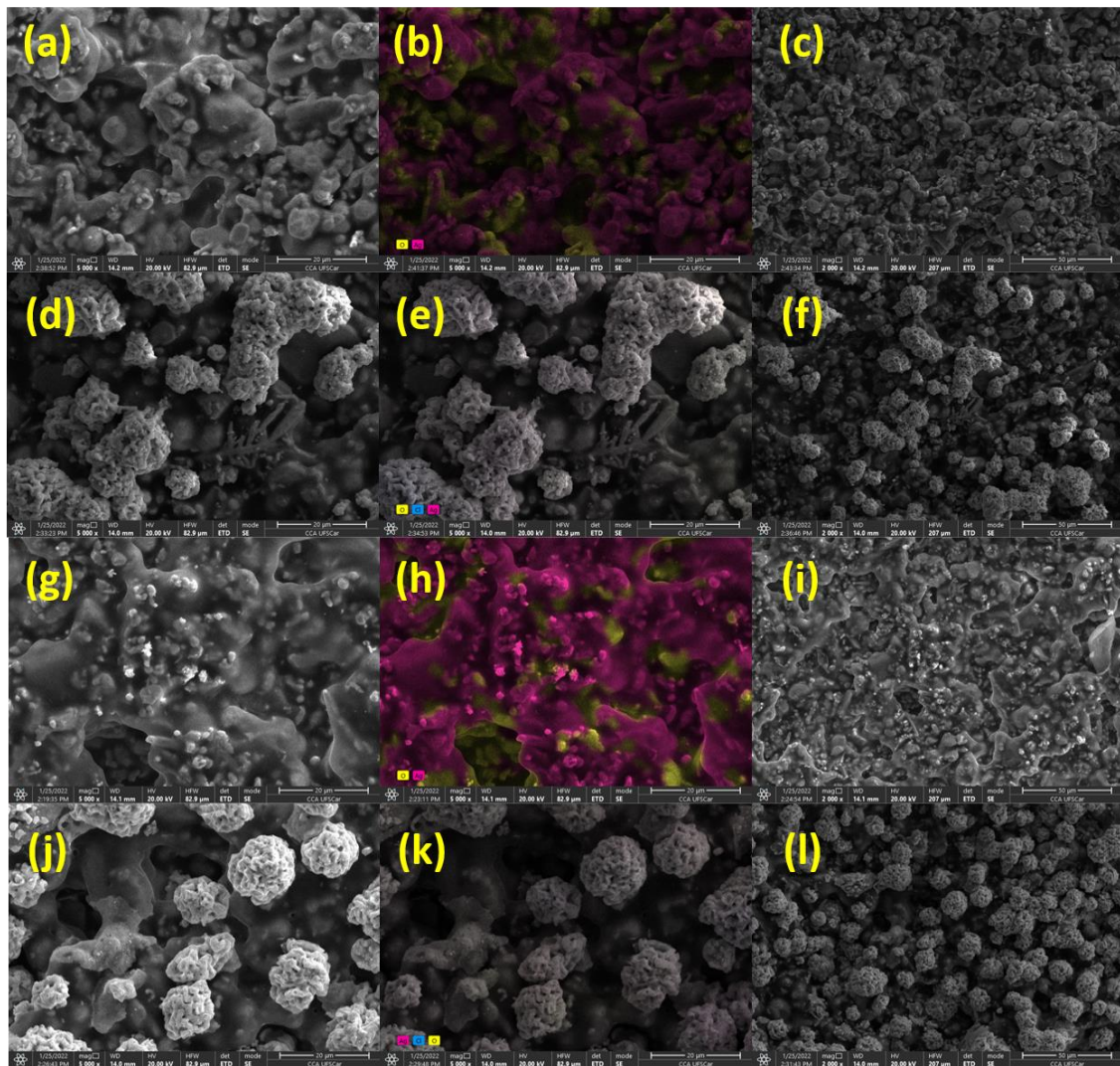


Figura 18. (a) Imagens MEV obtidas para tinta Ag-NP em ampliação de 5000x; (b) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-NP com ampliação de 5000x; (c) e tinta Ag-NP em ampliação de 2000x; (d) Tinta Ag-NP com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (e) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-NP com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (f) e tinta Ag-NP com AgCl depositado em aumento de 2000x; (g) tinta Ag-SL com ampliação de 5000x; (h) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-SL (ampliação 5000x); (i) e tinta Ag-SL em 2000x; (j) Tinta Ag-SL com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (e) Mapeamento ColorSEM da tinta Ag-SL com AgCl depositado em ampliação de 5000x; (f) e tinta Ag-SL com AgCl depositado em aumento de 2000x;

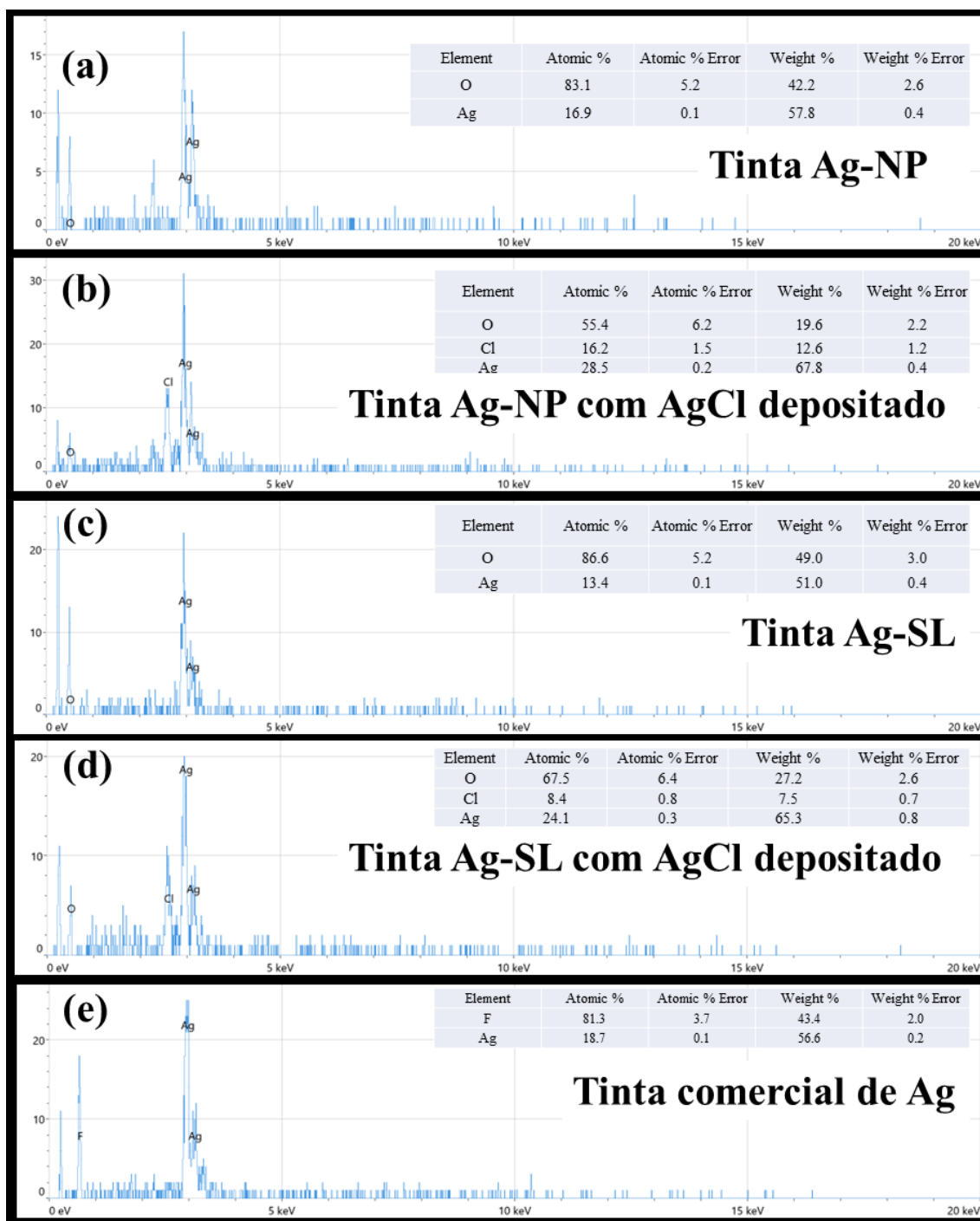


Figura 19. Mapeamento EDS de (a) tinta Ag-NP; (b) tinta Ag-NP com AgCl depositado; (c) tinta Ag-SL; (d) Tinta Ag-SL com AgCl depositado e (e) Tinta Ag Comercial

Adicionalmente, foram realizadas medidas de difração de raios X das tintas propostas e comerciais, conforme mostrado na Figura 21a. Os padrões de difração mostram quatro linhas de difração nítidas e bem definidas em $2\theta = 39,25^\circ, 44,22^\circ, 65,33^\circ$

e $78,23^\circ$, que podem ser atribuídas às reflexões da estrutura cúbica de face centrada (fcc), (111), (200), (220) e (311) de prata metálica, para todas as tintas. Esses resultados são semelhantes aos obtidos na literatura para partículas de prata [185-187]. Neste contexto, eles demonstram que essas partículas de prata estão disponíveis e os polímeros utilizados para a composição das tintas não interferem em sua funcionalidade. o sistema desenvolvido por Silva et al. [188]. Para realizar este experimento, as tintas foram espalhadas em folhas de acetato, no tamanho de $1,0 \text{ cm}^2$. Este estudo permite verificar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico da superfície. Para medir os ângulos de contato, uma alíquota de $50 \mu\text{L}$ de água ultrapura foi gotejada sobre a superfície de tinta comercial, tinta Ag-NP e tinta Ag-SL, respectivamente. As fotos foram tiradas 30s após o gotejamento. 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 superhidrofóbico ($\theta > 150^\circ$). Assim, as superfícies com as tintas desenvolvidas apresentaram perfis hidrofílicos, com ângulos de contato de $86 \pm 1^\circ$, $79 \pm 1^\circ$ para Ag-NP, Ag-SL respectivamente e a tinta $99 \pm 1^\circ$, mostrou um perfil considerado hidrofóbico (Figura 21b).

As medidas de EDS, que podem ser encontradas na Figura 20, mostram as diferentes porcentagens de composição elementar na superfície das tintas testadas. Desta forma, considere-se que os diferentes ângulos de contato podem ser devidos ao percentual de Ag e oxigênio nas tintas desenvolvidas neste trabalho, ou flúor na tinta comercial [189].

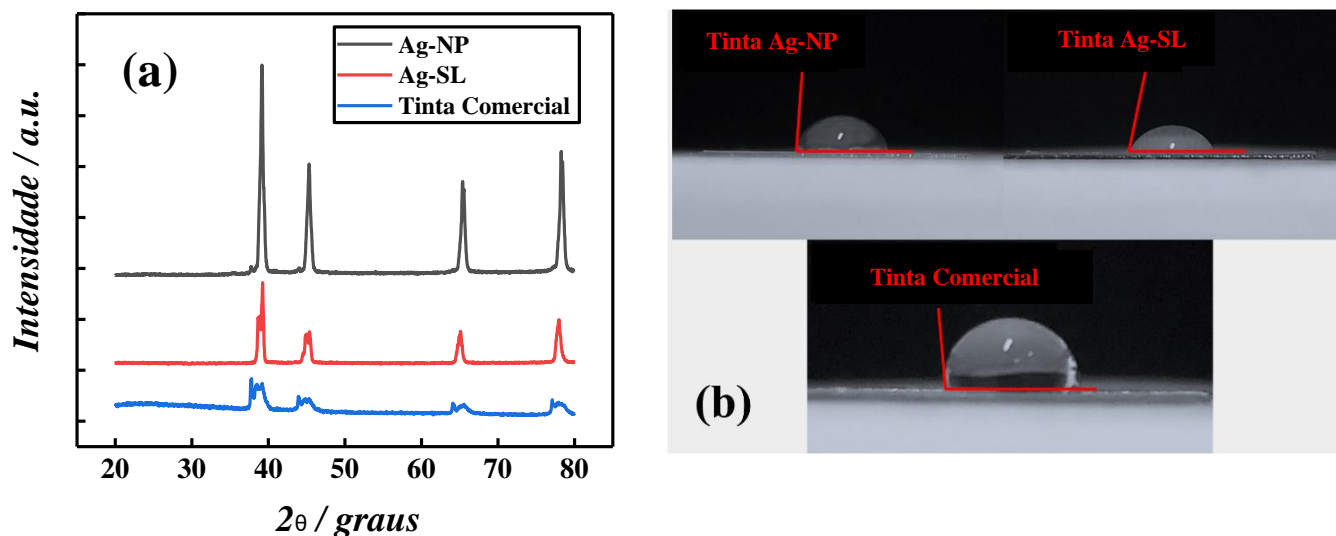


Figura 20. (a) Espectro de raios X de tintas condutoras de Ag, Ag-NP em (preto), Ag-SL em (vermelho) e tinta comercial (azul); (b) medidas de ângulo de contato para tintas Ag-NP (86°), Ag-SL (79°) e comercial (99°) espalhadas em folhas de acetato.

Inspirada na técnica ASTM Ink Adhesion Tape Test [190, 191], uma fita adesiva foi colada e removida sobre os sensores do tipo SPE, modificados com as tintas Ag desenvolvidas. A fita adesiva utilizada é constituída por uma película de polipropileno biorientado (BOPP) e o adesivo é à base de resina e borracha sintética. A adesão do adesivo foi realizada verticalmente e puxando-o rapidamente (sem solavancos), no sentido transversal (45°) e vertical (90°). Na Figura 22(a) está representada a imagem do adesivo removido a 45°, e 22(b) 90° utilizando a tinta carbonácea Grafite e SL e a tinta prata Ag-SL. Nas imagens 22(c) e 22(d) estão representadas as fotos obtidas do adesivo removido a 45° e 90° utilizando as tintas carbonáceas Grafite e SL e a tinta prata Ag-NP. Pode-se observar que, em comparação com a tinta de carbono utilizada para fabricar os dispositivos do tipo SPE, ambas as tintas de prata desenvolvidas permaneceram aderidas ao substrato, obtendo apenas vestígios de pelling.

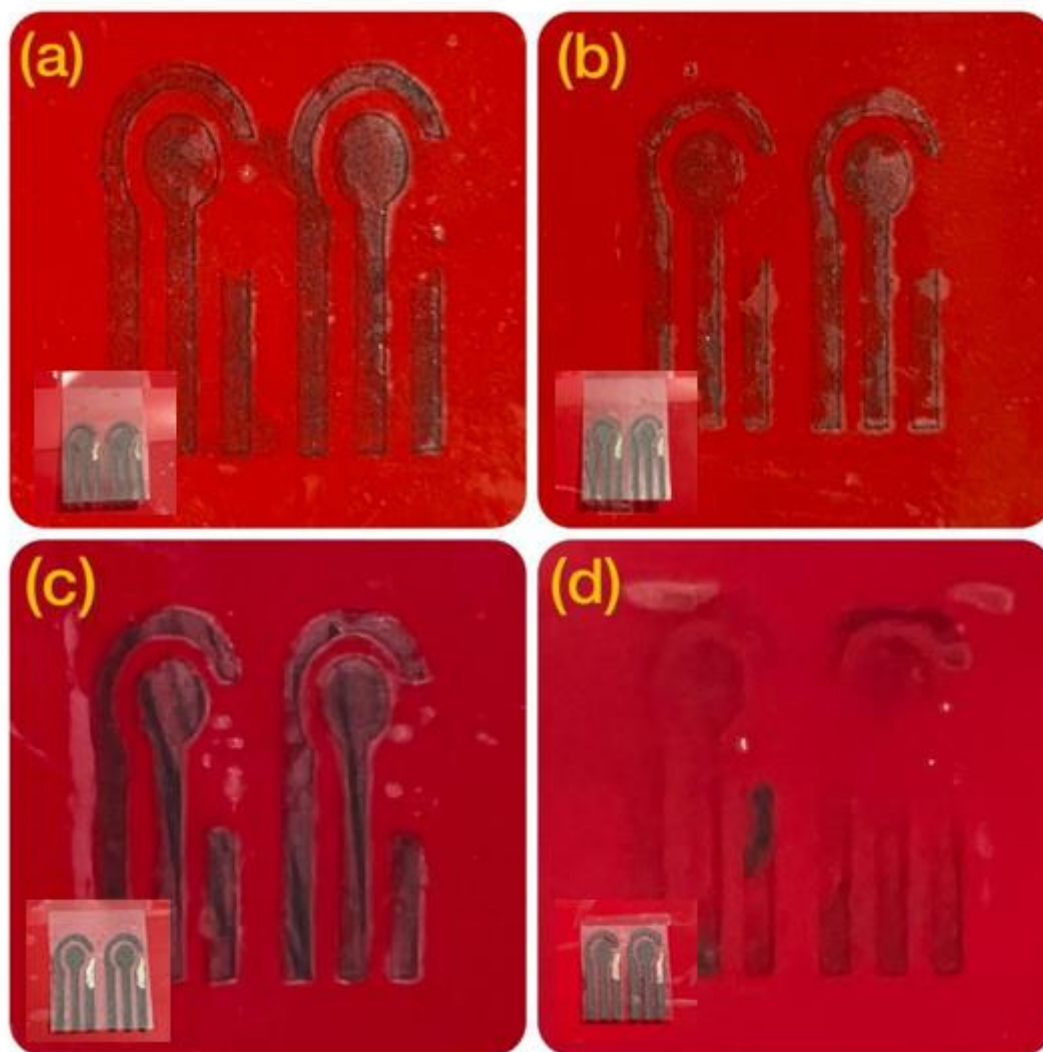


Figura 21. As fotos do Teste de Fita Adesiva foram realizadas usando o sistema tipo SPE e as tintas Ag condutoras usadas sobre o eletrodo de referência. (a) representou a imagem do adesivo removido a 45°, e (b) 90° utilizando a tinta carbonácea Grafite e SL e a tinta Ag-SL. (c) e (d) representaram a imagem obtida do adesivo removido a 45° e 90°, respectivamente, utilizando as tintas carbonáceas Grafite e SL e tinta Ag-NP. *Insets*: fotos de dispositivos SPE após a extração

3.3.3 Aplicação de tintas prata como pseudo-referências

Para demonstrar a funcionalidade dos eletrodos de pseudo-referência preparados com a tinta Ag proposta, voltamogramas cíclicos foram realizados utilizando

$[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como sonda redox e eletrólito de suporte, respectivamente; (Figura 23). Primeiramente, GCE e platina foram usados como eletrodos de trabalho e auxiliares (Figura 23a). Os eletrodos de pseudo-referência com tinta comercial foram produzidos de maneira semelhante à descrita na seção 3.2.2.

Notou-se que ambas as tintas desenvolvidas mantiveram o potencial quando comparadas às comerciais, (em torno de $+0,1 \text{ V}$ para redução e $+0,17 \text{ V}$ para processos de oxidação de $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ com picos deslocados em 100 mV devido à diferença de potencial entre as tintas Ag e os eletrodos de referência convencionais. Essa diferença pode ser explicada principalmente pela alta concentração de cloreto presente na solução, que conseqüentemente vai para a superfície do eletrodo, e promove um equilíbrio entre o cloreto na solução e a prata cloreto depositado na superfície. Isso porque diferentes concentrações de cloreto promovem estabilidade em diferentes potenciais [164]. Posteriormente, os eletrodos de pseudo-referências foram testados em dispositivos descartáveis feitos de goma-laca e grafite [38]. Ambas as tintas de prata desenvolvidas mantiveram a potencial em torno de $+0,05\text{V}$ e $+0,18\text{V}$ para processos de redução e oxidação, respectivamente; resultando em um ΔE de 100 a 190 mV em média, para sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$. Semelhante ao estudo anterior, obteve-se uma discrepância de potencial de 100 mV em média quando comparado ao eletrodo de referência convencional $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}(\text{sat.})$. O eletrodo de carbono também foi avaliado como referência, e pode-se observar que não apresentou diferença significativa. No entanto, como já justificado, o carbono não mantém o potencial estável por muito tempo, sendo necessário substituir o sistema com frequência. Os demais eletrodos de pseudo-referência estavam próximos e considera-se que foram eficientes para manter o potencial estável.

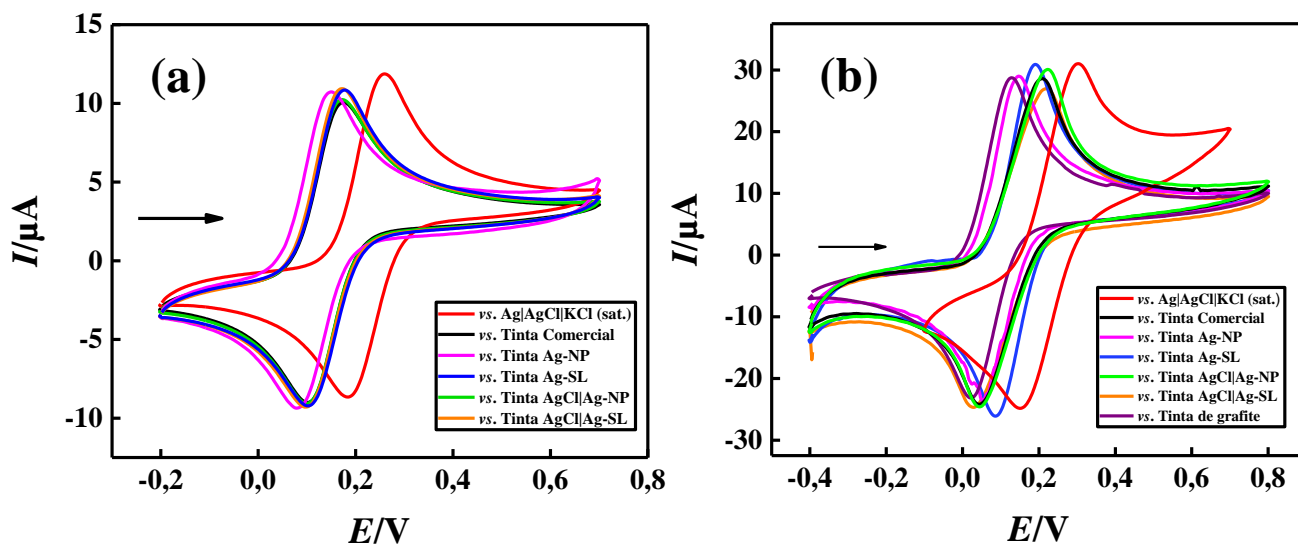


Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos com GCE e GP-SL/AS utilizando diferentes eletrodos de referência/pseudo-referência, utilizando KCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e [Fe(CN₆)]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹ como sonda eletroquímica. (a) GCE vs. (vermelho) Ag|AgCl|KCl(sat.); (preto) Tinta Comercial; (rosa) tinta Ag-NP; (azul) tinta Ag-SL; (Verde) tinta AgCl|Ag-NP e (laranja) tinta AgCl|Ag-SL. (b) GP-SL/AS vs. (vermelho) Ag|AgCl|KCl(sat.); (preto) Tinta Comercial; (rosa) tinta Ag-NP; (azul) tinta Ag-SL; (Verde) tinta AgCl|Ag-NP; (laranja) tinta AgCl|Ag-SL e (roxo) tinta de Grafite; Velocidade de varredura, 50 mV s⁻¹

3.3.4 Avaliação de estabilidade

A estabilidade de potencial dos eletrodos de pseudo-referência foi avaliada em um intervalo de 1h pela medida de potencial de circuito aberto, OCP (do inglês, *Open Circuit Potential*). Essa metodologia foi semelhante às demonstradas nos artigos de Dawkins et al. e por Sørstad et al. [71, 72]. Foi utilizado um sistema de dois eletrodos: Ag|AgCl|KCl(sat.) foi usado como referência, como eletrodo de trabalho os eletrodos de Ag que foram confeccionados seguindo a metodologia da Figura 17c. Assim, foi realizado um OCP (Figura 23), pode-se observar que nos sistemas em que foram utilizadas as tintas de prata desenvolvidas, o potencial se manteve próximo de 90 mV.

De acordo com a literatura, uma variação superior a 30 mV em medidas OPC indica que o eletrodo não é adequado para uso como referência [192]. Os eletrodos de

pseudo-referência produzidos em diferentes substratos usando as tintas de prata propostas, que forneceram potenciais relativamente constantes (variações inferiores a 30 mV) ao longo do período de tempo avaliado (~1h). De fato, os substratos sem o revestimento de tintas condutoras exibiram variações potenciais consideráveis, cerca de 400 mV, para o sistema GP-SL/AC, durante as medições, confirmando a eficácia das tintas prata. Além disso, para confirmar a estabilidade a longo prazo dos eletrodos de pseudo-referência, foram realizadas medições sucessivas ($n = 100$) por CV utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sonda redox em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, como eletrólito de suporte (Figura 24). Desvios potenciais menores que 8,0 mV para todos os eletrodos de pseudo-referência foram alcançados, o que atestou sua estabilidade na presença de processos redox.

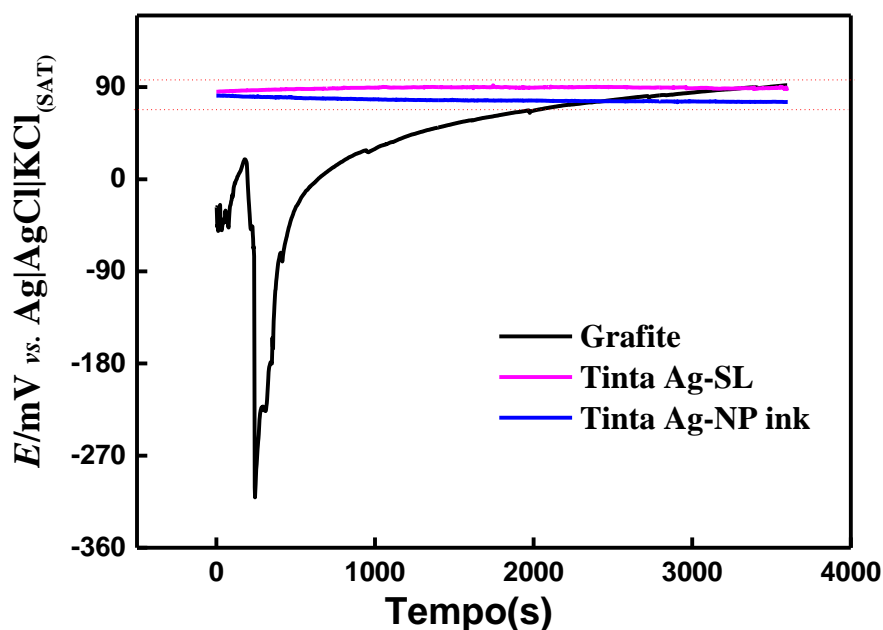


Figura 23. Medições de OCP com o sistema GP-SL/AS (SPE), utilizando tinta de grafite-SL (preto), tinta Ag-SL (rosa) e tinta Ag-NP (azul) como eletrodos de trabalho e $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}(\text{sat.})$ como eletrodo de referência para ambos os sistemas.

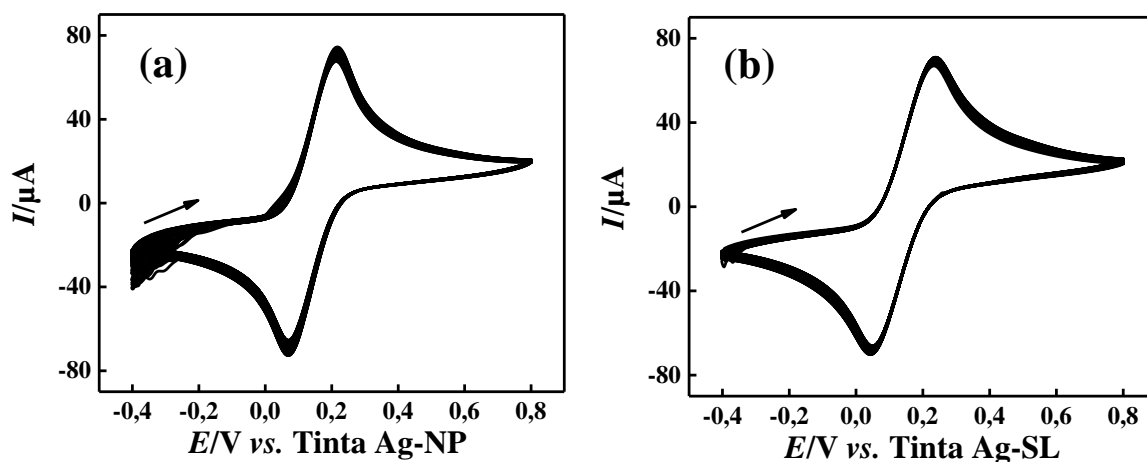


Figura 24. Medidas voltamétricas cíclicas sucessivas ($n=100$) obtidas para $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (a) vs. Ag-NP e (b) vs. Ag-SL. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1}

3.4 Prova de conceito da aplicação de tintas prata como pseudo-referência

A Voltametria de Onda Quadrada foi aplicada em diferentes concentrações de β -estradiol, variando de $1,0$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, para o sistema GP-SL/AC, Figura 26a referenciada pela tinta Ag-NP e Figura 26b referenciada pela tinta Ag-SL. Para o sistema GP-SL/AS referenciado pela tinta Ag-NP, a equação de regressão linear é $I (\mu\text{A}) = 0,07 \text{ C } (\beta\text{-estradiol}) + 1,56 \times 10^{-6}$, com $R^2 = 0,998$ e LOD de $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Quanto ao sistema referenciado pela tinta Ag-SL, a equação de regressão linear é $I (\mu\text{A}) = 0,04 \text{ C } (\beta\text{-estradiol}) + 2,70 \times 10^{-6}$, com $R^2 = 0,992$ e LOD de $9,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Houve um aumento na corrente anódica de pico com uma concentração crescente de β -estradiol em uma faixa linear. O limite estimado de detecção (LOD) para β -estradiol foi calculado como $\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/\text{S}$, onde SD é o desvio padrão em branco e S é a sensibilidade. Por fim, para a verificação e melhor visualização da estabilidade que as tintas prata proporcionam aos sensores descartáveis mesmo quando a curva é construída utilizando

um eletrodo por ponto, foram plotadas as concentrações por potencial obtidas, conforme mostra a Figura 26.

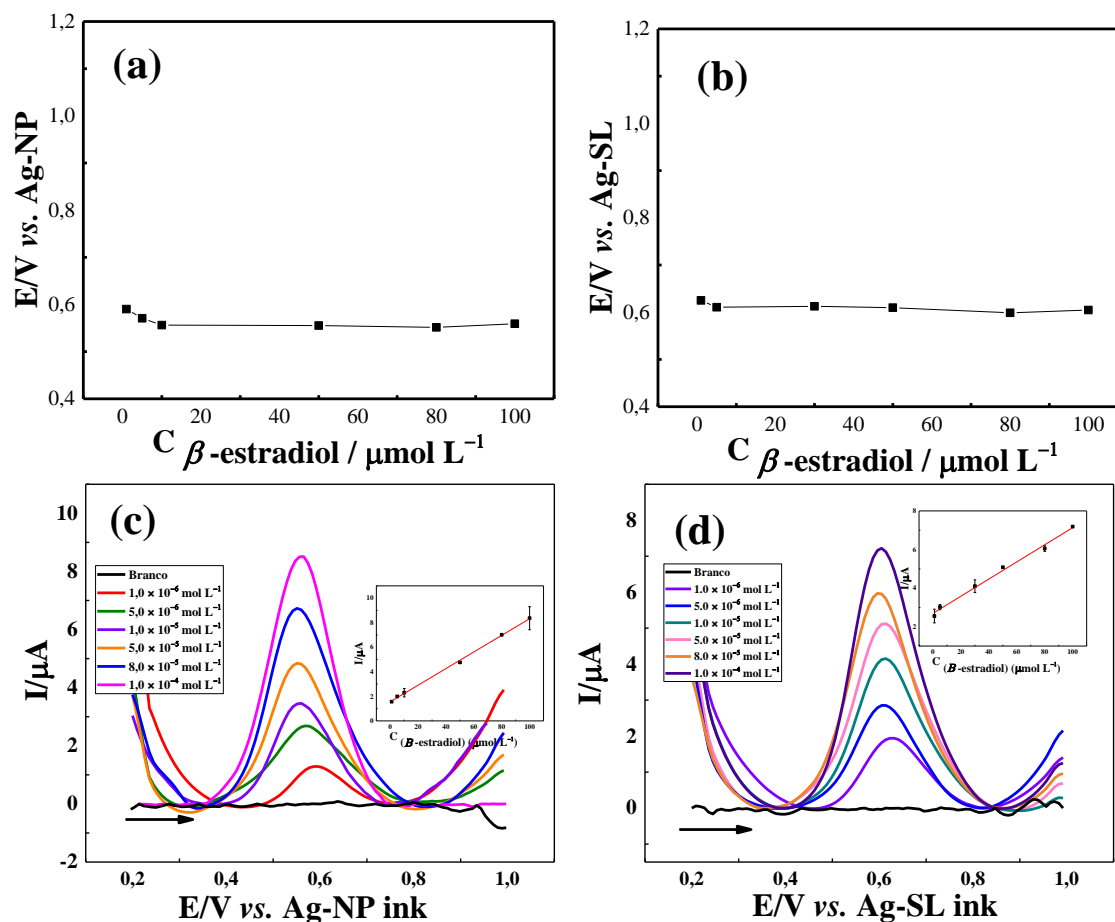


Figura 25. Gráfico de potencial (V) vs. concentração das tintas de prata desenvolvidas (a) sistema GP-SL/AS referenciado por tinta Ag-NP; (b) sistema GP-SL/AS referenciado por tinta Ag-SL; Voltamograma de onda quadrada registrado em diferentes concentrações de β -estradiol, de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em solução salina de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) utilizando (c) a Tinta Ag-NP e (d) a tinta Ag-SL como pseudo-referência. Condições SWV: Frequência = 90 Hz, amplitude = 80 mV e Incremento de potencial = 9 mV. *Inset*: Gráfico de pontos da curva analítica para β -estradiol

As características das tintas propostas foram comparadas com outras tintas condutoras à base de Ag encontradas na literatura. Percebe-se que a maioria das tintas desenvolvidas utiliza prata nanoparticulada e, em geral, esse processo envolve a síntese

de nanopartículas, além de tempo e temperatura adequados para sinterização. Portanto, considera-se que as tintas condutoras Ag desenvolvidas neste trabalho podem ser aplicadas para facilitar a produção de eletrodos pseudo-referência, principalmente por não necessitarem de sínteses em seu processo, aditivos e solventes tóxicos, ou altas temperaturas para cura e sinterização. Além disso, como é simples de sintetizar, as tintas desenvolvidas também se mostraram economicamente viáveis, custando cerca de US\$ 2,02 por grama para esmalte e US\$ 2,40 para goma-laca.

Tabela 8. Comparação entre as tintas de prata propostas para a fabricação de eletrodos pseudo-referência

Tinta	Tamanho da partícula Ag	Polímero	Aditivos	Temperatura de cura	Ref.
Tinta Ag/AgCl	Micro	Acetato de celulose	Ciclohexanona, acetona	90 °C	[73]
I-6	Nano	-	Etilenoglicol, água, etanol, etanolamina, hiperdispersante	Ambiente	[193]
Tinta AgNP	Nano	PVP	Etilenoglicol /Metanol	Ambiente	[194]
Tinta Ag-NP	Micro	Esmalte para unhas incolor	-	Ambiente	Este Trabalho
Tinta Ag-SL	Micro	Goma laca	-	Ambiente	Este Trabalho

Tinta Ag/AgCl: Nanopartículas feitas de AgNO₃, acetato e acetona de celulose e ciclohexanona como solventes; **I-6:** Nanopartículas de prata com etilenoglicol, água, etanol, etanolamina, hiperdispersante (Solsperse 20000); **Tinta AgNP:** Nanopartículas de prata com EG (Etilenoglicol) e PVP (Polivinilpirrolidona).

3.5 Conclusão - capítulo 2

Duas tintas condutoras de prata metálica foram preparadas e aplicadas em dois sistemas diferentes, um para ser usado em uma célula eletroquímica tradicional e outro para ser usado em um sistema descartável, SPE. Ambas as composições de tintas

produzidas, utilizando esmalte e goma-laca, foram aplicadas com sucesso no desenvolvimento de eletrodos de pseudo-referência. Além de serem fáceis de fabricar e utilizar, essas tintas possibilitam a criação de sistemas mais robustos, que, mesmo em sistemas descartáveis, podem ser usados por mais tempo sem interferências no potencial. Desta forma, percebeu-se que por meio de caracterizações eletroquímicas, medidas de OCP e voltametria cíclica, o potencial se manteve, mesmo após uma hora. Além disso, as medidas de MEV mostraram que a eletrodeposição de AgCl na superfície foi eficiente e que as tintas feitas são homogêneas. Na análise de raios-X, foi possível verificar um padrão de difração semelhante à tinta prata comercial. Por esses motivos, acredita-se que essas novas tintas possam ser vendidas a um custo menor do que as atuais no mercado, além de poderem ser aplicadas em diversos tipos de sensores. Além disso, por serem simples de sintetizar, as tintas desenvolvidas também se mostraram economicamente viáveis, custando cerca de US\$ 2,02/R\$ 11,06 o grama de tinta com esmalte para unhas e US\$ 2,40/R\$ 13,14 o grama de tinta com goma-laca.

4 **Capítulo 3. Desenvolvimento de um sistema eletroquímico com goma laca, grafite e platina para biossensoriamento de estrona**

4.1 **Objetivos**

Esse capítulo busca desenvolver um sistema eletroquímico utilizando goma laca, grafite e platina e investigar as propriedades eletroquímicas desses materiais quando aplicados ao biossensoriamento de estrona.

4.2 **Experimental**

4.2.1 **Reagentes e soluções**

Os reagentes utilizados para a confecção das tintas, bem como para o preparo de soluções de eletrólitos suporte, sondas eletroquímicas e outras amostras foram todos de grau analítico, obtidos da Fisher, Dinâmica, Sigma-Aldrich ou Fluka. As soluções foram preparadas com água purificada através do sistema Heal Force (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Nas medidas realizadas para a caracterização eletroquímica dos sensores confeccionados foi utilizado solução de KCl (Sigma-Aldrich, Xerém, Duque de Caxias) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte uma mistura equimolar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Labsynth, Diadema, São Paulo) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sonda eletroquímica.

4.2.2 **Preparo das tintas**

Para o preparo das tintas foi utilizado uma centrífuga assimétrica dupla, SpeedMixer™ Dac 150.1 FVZ-K (FlackTec Inc., Landrum, EUA). A tinta utilizada foi composta a partir de grafite em pó P.A. Fisher Chemical™, solvente/diluyente poliuretano (Itaquá®, Mogi das Cruzes, Brasil) e goma laca incolor (Acrilex®, São Bernardo do Campo, Brasil). Preparou-se então 4,0 g de tinta condutora, pesando 1,0 g de goma laca (25%, m/m), 1,0 g de grafite em pó (25%, m/m) e 2,0 g de solvente para poliuretano, (50%, m/m). Delimitadores foram confeccionados com o auxílio da impressora de corte Silhouette Cameo 3, os quais definiram um formato padrão para os dispositivos. Esses delimitadores adesivos foram colados sobre superfícies eletroquimicamente inertes, que no caso foi utilizado folhas de acetato (AS). Assim, tinta condutora foi espalhada sobre esse substrato delimitado. O sistema confeccionado foi chamado de GP-SL/AS e após

secagem em temperatura ambiente por 24h esse sensor se encontra pronto para uso, bem como para futuras modificações, ver Figura 27.

4.2.3 Modificação do sensor para biossensor de Estrona

Inicialmente, modificou-se o sistema GP-SL/AC com $PtCl_4$ por meio de eletrodeposição. Foram estudadas as melhores condições de tempo e concentração da Pt, confeccionando o sistema chamado de Pt-GP-SL/AC. Posteriormente adicionou-se alguns reagentes de reticulação, bem como os antígenos para a confecção do biossensor para E1. Assim, foram utilizados o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), N-etil-N'-[3-dimetilaminopropil]carbodi-imida/N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS), Anti-E1 para a modificação, tornando o biossensor nomeado AntiE1-EDS/NHS-3MPA-Pt-GP-SL/AC, ver Figura 26.

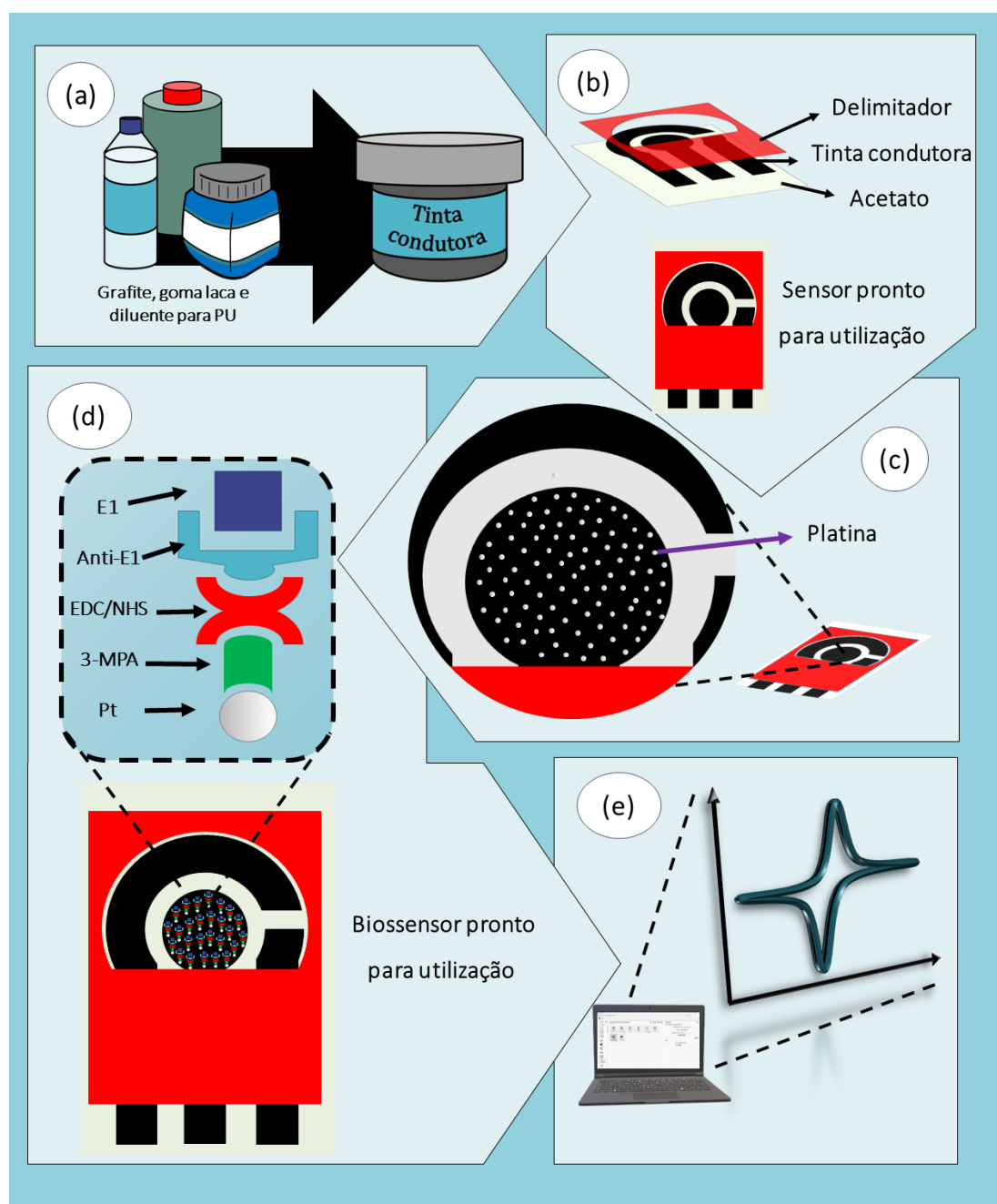


Figura 26. Esquema da preparação (a) tinta condutora de grafite, goma laca e diluente para PU; (b) A tinta condutora pronta foi espalhada sobre a superfície de uma folha de acetato e um delimitador adesivo foi colado delimitando a área que entrará em contato com a amostra, o sensor foi nomeado GP-SL/AS; (c) sobre a superfície do GP-SL/AS foi realizada a eletrodeposição de Pt; (d) Grupos protetores, bem como o antígeno foram adicionados a superfície do Pt-GP-SL/AS formando o AntiE1-EDS/NHS-3MPA-Pt-GP-SL/AS, (E) o biossensor estará pronto para realizar as detecções de E1.

4.3 Resultados e discussão

A formulação de tinta foi desenvolvida utilizando goma laca e grafite, no trabalho, “Disposable electrochemical sensor based on shellac and graphite for sulfamethoxazole detection” [38]. Utilizou-se essa tinta sobre o acetato como sistema eletroquímico para o desenvolvimento desse novo trabalho. Buscando melhorar os perfis obtidos nesse artigo e propor uma modificação utilizando metais, para que esses sirvam como ancoras as moléculas biológicas que serão implementadas no futuro. Deste modo, como metal a ser utilizado, escolheu-se a platina (Pt). A Pt pode ser utilizada através de eletrodeposição em eletrodos carbonáceos, por isso, no presente trabalho, o Pt/grafite foi fabricado de forma simples e robusta. O material resultante traz novas capacidades para dispositivos eletroquímicos usando a ação sinérgica de nanopartículas de Pt e grafite, assim como as vistas no trabalho desenvolvido por Zou et al.[83].

4.3.1 Otimização da quantidade de platina eletrodepositada sobre o eletrodo de trabalho

Assim, como primeiro passo faz-se necessário a otimização da concentração e do tempo que será utilizado para eletrodepositar a platina sobre o eletrodo de trabalho. Assim, realizou-se um estudo utilizando o software STATISTCA®, no qual variou-se as concentrações de platina e o tempo de aplicação do potencial. A otimização de forma multivariada foi escolhida pois desta forma, podemos superar interpretações errôneas por ignorar o efeito de possíveis interações entre os parâmetros [195]. As concentrações e tempo de eletrodeposição estudados foram retirados da literatura [196-198].

A platina foi obtida através do cloreto de platina (IV) obtido da Sigma/Aldrich, que foi preparado em uma solução de ácido clorídrico 0,5 mol L⁻¹, variando as concentrações de 0,10 a 5,00 mmol L⁻¹. Com as soluções prontas, utilizando a técnica de cronoamperometria eletrodeposição, aplicou-se o potencial de -0,6V por uma variação de tempo de 30 a 300 segundos. Na tabela temos valores maiores que a faixa que se queria estudar, isso se dá pois é necessário olhar os extremos para verificar que de fato a faixa escolhida é a melhor para realizar a otimização.

Para fazer o estudo, 30 diferentes sensores foram utilizados e 10 combinações de experimentos foram realizadas, Tabela 9.

Tabela 9. Combinações de experimentos utilizados para otimização de platina. Foi realizado uma variação de dois fatores, com concentração de platina de 0,01 a 5,0 mol L⁻¹ e tempo técnica de cronoamperometria eletrodeposição, na qual aplicou-se o potencial de -0,6V , de 30 a 300 segundos.

Experimento	Concentração (mol L ⁻¹)	Tempo (s)
1	0,10	30,00
2	0,10	300,0
3	5,00	30,00
4	5,00	300,0
5	0,06	165,0
6	6,01	165,0
7	2,55	25,92
8	2,55	355,9
9 (C)	2,55	165,0
10 (C)	2,55	165,0

Após realizar as triplicatas, realizou-se estudos de voltametria cíclica, utilizando para isso ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹ como sonda eletroquímica em KCl 0,1 mol L⁻¹, como eletrólito suporte. As respectivas correntes de oxidação e redução foram coletadas e as médias entre as triplicatas foram efetuadas. Utilizando-se então do software STATISTICA, buscou-se o sistema com I_C/I_A mais próximos possível do valor 1, que implica em sistemas reversíveis.

Desta forma, através dos gráficos obtidos (ver Figura 28 e 29), percebe-se que a concentração ótima fica entre 0,05 e 1,0 mmol L⁻¹, com tempo de eletrodeposição inferior

a 100 segundos, uma vez que o perfil com concentrações e maiores tempos apresentam resultados cada vez mais distantes de 1 referentes a relação I_c/I_a .

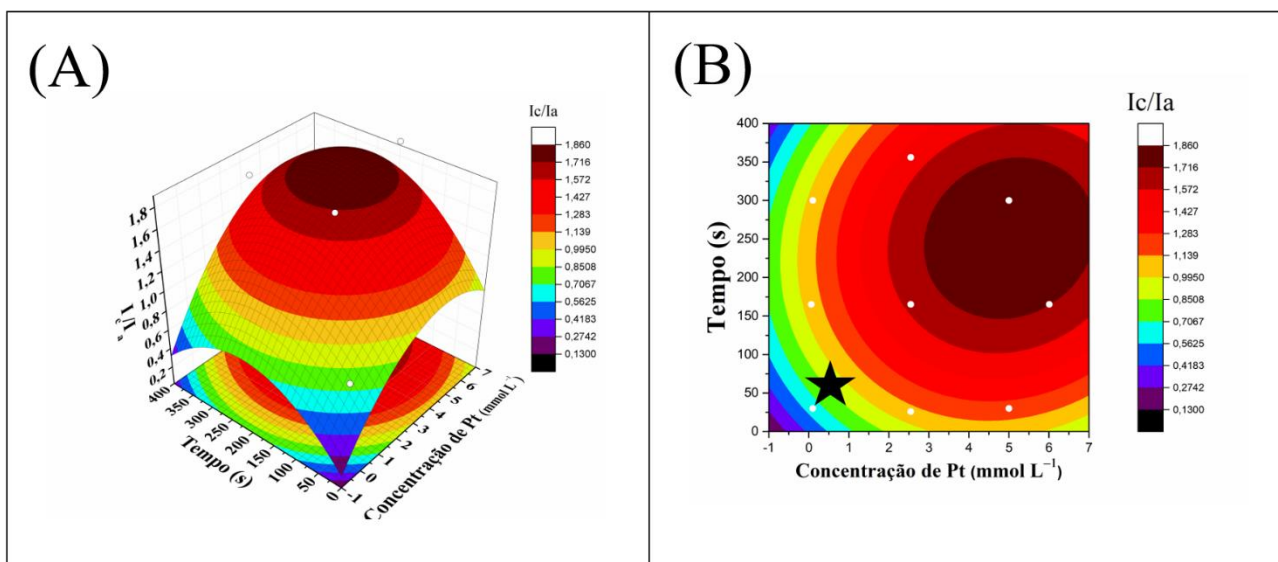


Figura 27. a) Gráfico em 3D relacionado ao valor do quociente I_c/I_a . b) Gráfico em 2D relacionado ao valor do quociente I_c/I_a , estrela posicionada sobre os valores ótimos escolhidos. Percebe-se que a concentração ótima fica entre $0,05$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com tempo de eletrodeposição inferior a 100 segundos, uma vez que buscamos o quociente I_c/I_a próximo ao valor 1 e o perfil com concentrações e maiores tempos apresentam resultados cada vez mais distantes de 1 referentes a relação I_c/I_a

Para dar continuidade a otimização da quantidade de Pt a ser adicionada sobre o sensor, padronizou-se o tempo de 100s, e ainda aplicando potenciais de $-0,6\text{V}$, realizou-se eletrodeposições através de cronoamperometria, variando a concentração da platina de $0,05$ a $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, ver Figura 29. Posteriormente voltametrias cíclicas foram realizadas na presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Pode-se observar nesse estudo que, até a concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, o perfil voltamétrico se mostrou semelhante, com ΔE de 200mV , quociente I_c/I_a próximo a 1, e sem distorções nos perfis de redução. Entretanto, concentrações maiores aumentavam gradativamente as distorções no sentido de redução. Portanto, o valor otimizado foi de 100s na concentração de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, confeccionando o sistema chamado de Pt-GP-SL/AS

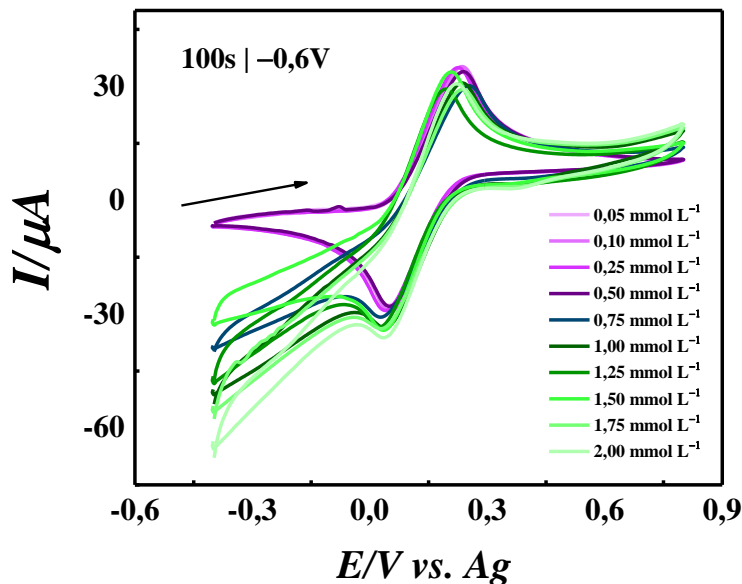


Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo Pt-GP-SL/AS em KCl 0,1 mol L^{-1} na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L^{-1} para medições consecutivas realizadas em diferentes concentrações de PtCl_4 . Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1}

Para dar continuidade as caracterizações, realizou-se o estudo de reprodutibilidade, no qual foram realizados voltamogramas cíclicos com diferentes eletrodos utilizando KCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L^{-1} como sonda eletroquímica. Esse estudo demonstrou que utilizando 5 eletrodos diferentes, obteve-se um desvio de 2,33%, mostrando que as eletrodeposições se assemelham em diferentes sensores, ver Figura 30.

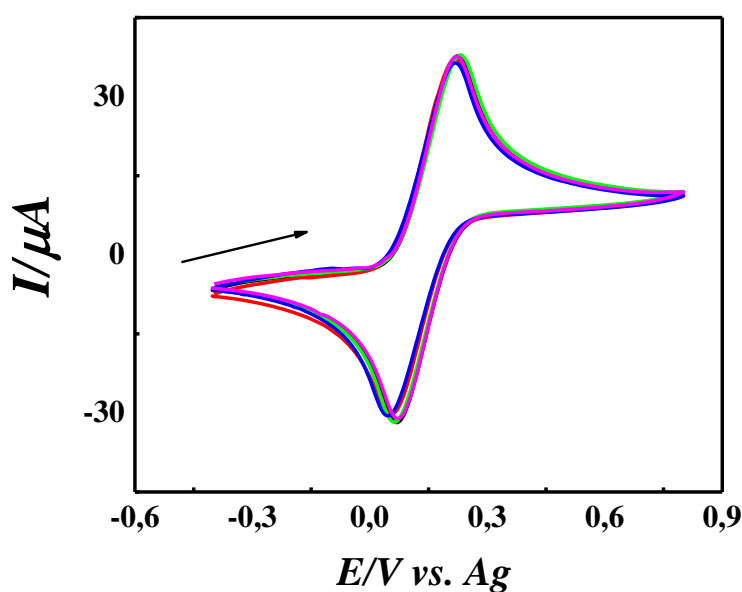


Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo Pt-GP-SHL/OPS em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹ para medições consecutivas realizadas em diferentes eletrodos. Velocidade de varredura = 50 mV s⁻¹

Para confirmar a presença de platina na superfície dos sensores realizou-se MEVs, Figura 31. As imagens MEV foram obtidas para o Pt-GP-SL/AS em 1000x, 2000x e 8000x (Figura 31 (a), (b), (d)) mostram uma superfície homogênea, rugosa e recoberta por Pt, que se encontra em escala nano. O mapeamento EDS (Figura 31 (c)) mostra a predominância de elementos de carbono e Pt na superfície do eletrodo, o que explica a boa condutividade elétrica verificada. Essa caracterização nos permitiu observar que a platina recobriu a superfície do grafite.

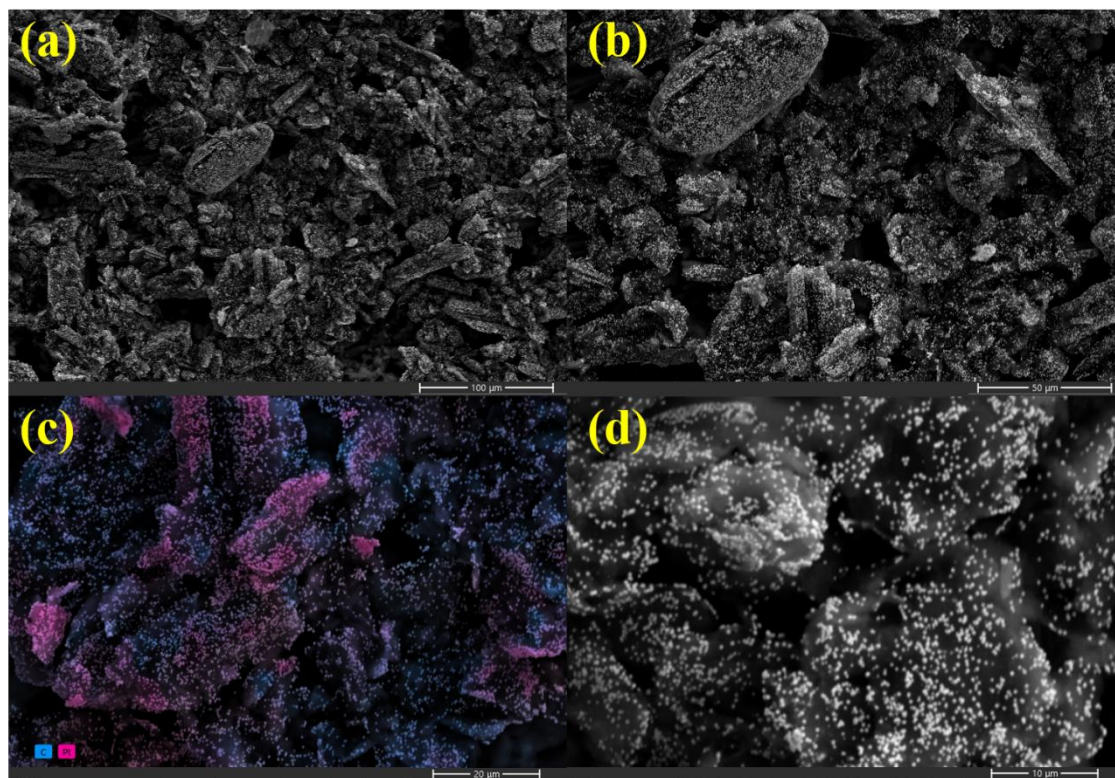


Figura 30. (a) Imagens de MEV obtidas para o Pt-GP-SL/AS com aumento de 1000x; (b) e 2000x; (c) mapeamento EDS da superfície CGG/PET (ampliação de 4000x); (d) 8000x;

4.4 Construção do biossensor para Estrona (E1)

Testes iniciais para a confecção do biossensor para a estrona foram realizados. Para a modificação dos sensores, fez-se a utilização de alguns reagentes em camadas, conforme protocolos já verificados na literatura [199, 200]. Assim, inicialmente preparou-se uma solução de $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3-MPA a qual foi gotejada sobre o eletrodo de trabalho, $10 \mu\text{L}$ em ambiente fechado para que não houvesse a secagem da gota por 1h30, lavou-se o eletrodo com água desionizada e secou-se superficialmente, sem que papel utilizado de fato encostasse na superfície modificada. Uma solução com EDC/NHS foi preparada nas concentrações de $5,0$ e $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. Essa solução também foi gotejada sobre o eletrodo, $10 \mu\text{L}$ por 1h30, e foi lavado e seco conforme passo anterior. O anticorpo E1 diluído 1000x foi preparado em tampão fosfato salino, PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), no volume de $10 \mu\text{L}$, que foi gotejado também sobre o eletrodo de trabalho. Deixou-se por 1h30, lavou-se o eletrodo com PBS pH 7,4 e secou-se conforme passos anteriores. O BSA foi utilizado como bloqueador de sítios

inespecíficos, desta forma, ele interage com as extremidades livres promovidas pelos grupos protetores, promovendo melhor seletividade do biossensor. Por fim, a E1 foi preparada na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, está foi incubada também por 1h30. A Figura 32 apresenta um esquema de procedimento simplificado da fabricação desse biossensor para detecção eletroquímica de E1.

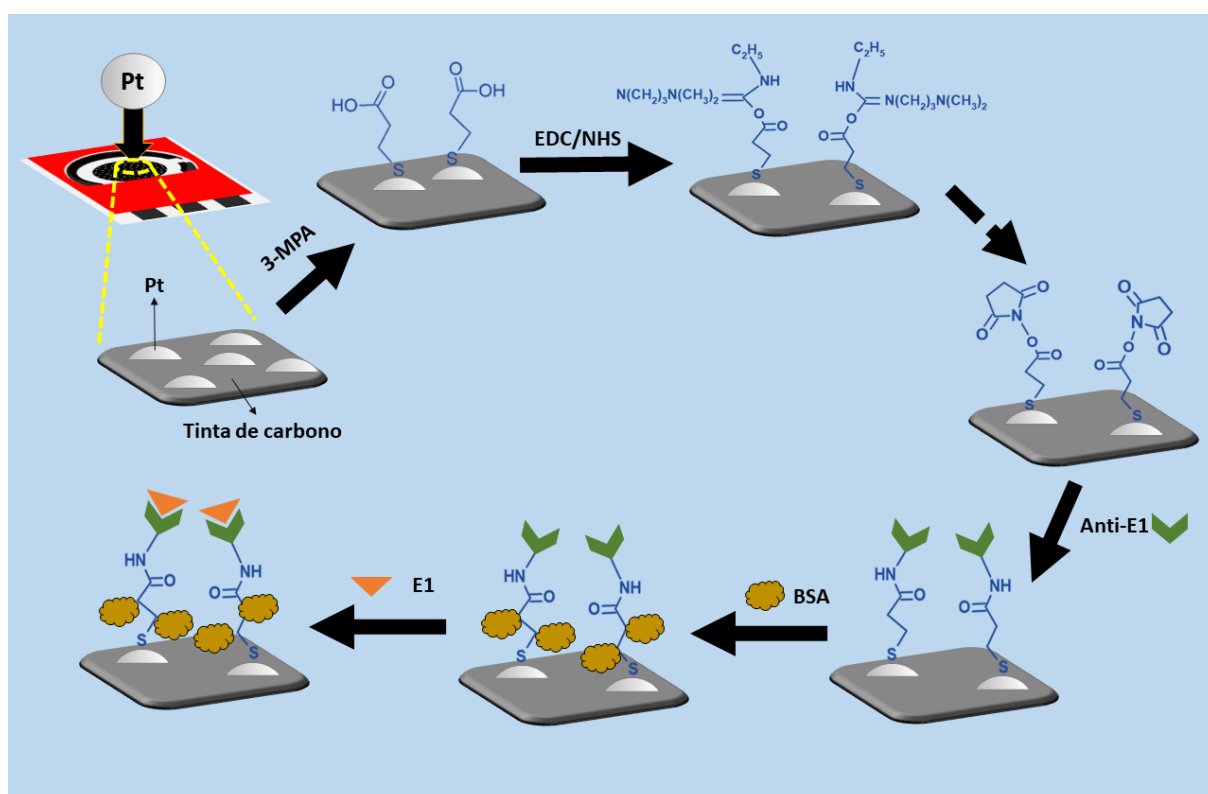


Figura 31. Diagrama esquemático da fabricação do imunossensor para detecção do hormônio E1. Inicialmente $10 \mu\text{L}$ uma solução de $0,075 \text{ mmol L}^{-1}$ de 3-MPA foi gotejada sobre o eletrodo de trabalho, este foi lavado com PBS pH 7,4 e seco sem contato direto do papel com a superfície modificada. Uma solução com $10 \mu\text{L}$ de EDC/NHS nas concentrações de $5,0$ e $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi gotejada sobre o eletrodo, por 1h30, e foi lavado e seco conforme passo anterior. O anticorpo E1 diluído 1000x foi preparado em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), no volume de $10 \mu\text{L}$, que foi gotejado também sobre o eletrodo de trabalho, deixou-se por 1h30, lavou-se o eletrodo com PBS pH 7,4 e secou-se conforme passos anteriores. O volume de $10 \mu\text{L}$ de BSA foi utilizado como bloqueador de sítios inespecíficos, desta forma, ele interage com as extremidades livres dos agentes de reticulação, promovendo melhor seletividade do biossensor. Por fim, a E1 foi preparada

na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4, está foi incubada também por 1h30.

Para a avaliação inicial das camadas, realizou-se voltametrias cíclicas em de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A cada etapa, pode-se verificar uma queda nas correntes obtidas, essas podem ser explicadas pois essas dificultam a transmissão de elétrons em direção a superfície do biossensor. À medida que os elementos de formação da monocamada, o anticorpo e a analito interagem com a superfície do eletrodo o valor de corrente tende a diminuir, indicando uma maior dificuldade na transferência de elétrons, sugerindo uma eficaz modificação, imobilização e detecção da analito alvo [201]. Ademais, a queda de corrente obtida na última etapa indicam que ocorreu a interação de combinação entre o anticorpo e a E1 alvo, o que assim como os outros dificultaram a transmissão de elétrons [202]. Dessa forma, por meio da adição das camadas pôde perceber-se uma redução na corrente obtida, o que corrobora para a certificação que, de fato, essas camadas estão ficando na superfície do sensor, ver Figura 33.

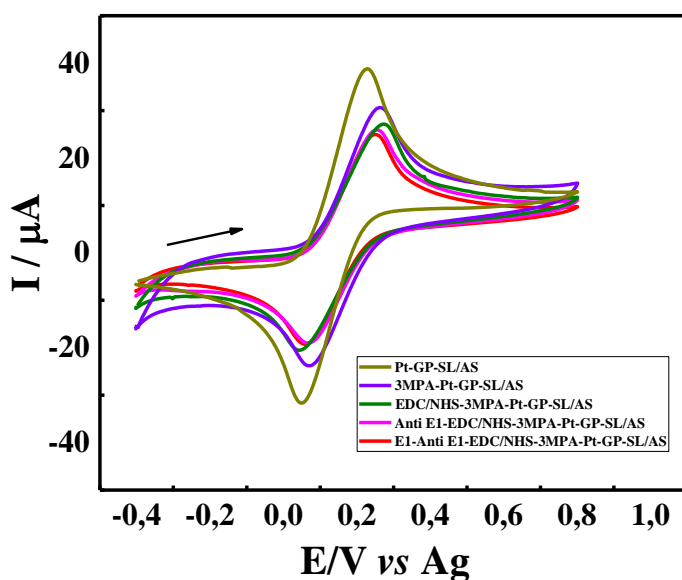


Figura 32. Voltametrias cíclicas registradas com dispositivo Pt-GP-SL/AS e suas subsequentes modificações 3MPA, EDC/NHS, Anti E1 e E1, na presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}

Visto que testes iniciais performaram de maneira adequada para o desenvolvimento do biossensor, idealizou-se realizar os estudos através de alguma técnica pulsada. Nesse contexto então foi utilizado a voltametria de onda quadrada, a qual é uma técnica rápida e amplamente utilizada para a determinação de estrogênios [203-207]. O trabalho desenvolvido por Liu *et al.* [208] demonstra a aplicação de voltametria de onda quadrada para avaliar o desempenho do imunossensor para estradiol, mostrando que essa técnica é rápida, efetiva e de baixo custo.

4.5 Otimização dos parâmetros para avaliação do biossensor para Estrona (E1)

Nesse contexto, portanto, a fim de se obter melhores condições a otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada foi realizada, utilizando o sistema Pt-GP-SL/AS em PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹. Utilizando metodologias de triagem alinhadas ao software STATISTICA® foram otimizados os parâmetros de Step, Amplitude de modulação e Frequência, ver Tabela 10 e 11.

Tabela 10. Parametros da voltametria de onda quadrada e faixa de estudo utilizada para otimização da voltametria de onda quadrada

Variável para voltametria de onda quadrada	Faixa do estudo
Incremento de potencial	1 a 10 mV
Amplitude de modulação	10 a 100 mV
Frequência	5 a 90 Hz

Tabela 11. Triagem parâmetros de voltametria de onda quadrada para três variáveis, incremento de potencial, amplitude de modulação e frequência. O incremento de potencial foi variado de $0,001 \text{ V s}^{-1}$ a $0,01 \text{ V s}^{-1}$, a amplitude de modulação foi variada de 0,01 a 0,1 V e a frequência de 5 a 90 Hz.

Triagem 2³					
	Variável	Xn	-1	0	1
	Incremento de potencial	X1	0,001	0,0055	0,01
	Amplitude de modulação	X2	0,01	0,055	0,1
	Frequência	X3	5	47,5	90
Experimento	X1 – Incremento de potencial	X2 – Amplitude de modulação	X3 – Frequência	Resultados	Ordem
1	0,001	0,01	5	4,036e-6	5
2	0,01	0,01	5	1,915e-6	6
3	0,001	0,1	5	2,263e-6	8
4	0,01	0,1	5	1,805e-5	1
5	0,001	0,01	90	1,421e-5	11
6	0,01	0,01	90	7,916e-7	2
7	0,01	0,1	90	3,365e-7	4
8	0,01	0,1	90	7,043e-6	10
9	0,0055	0,055	47,5	1,575e-6	3
10	0,0055	0,055	47,5	1,418e-6	7
11	0,0055	0,055	47,5	2,270e-6	9

Desta forma, realizando somente 11 experimentos de voltametria de onda quadrada foi possível definir que o parâmetro que menos interferiu dentre os três estudados foi o Incremento de potencial, o qual foi mantido no valor médio de 5,5 mV. Os voltamogramas de onda quadrada do experimento acima estão presentes na Figura 34.

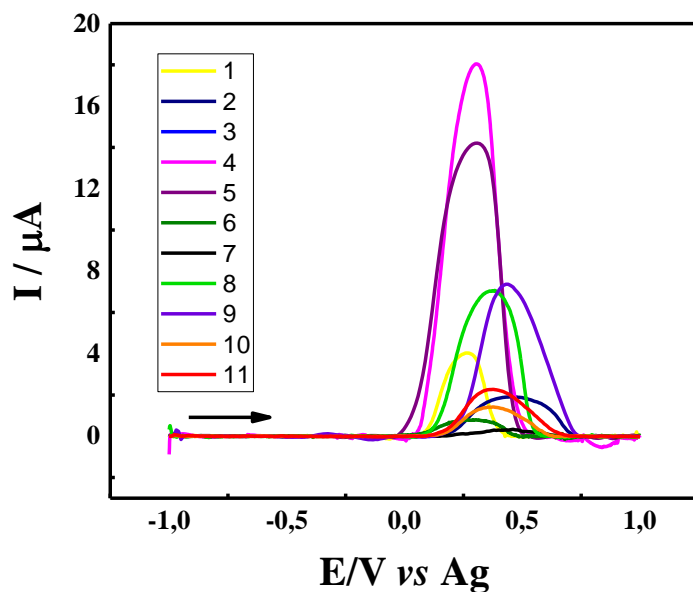


Figura 33. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AC modificando os parâmetros da técnica conforme triagem em meio de PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Parâmetros da voltametria de onda quadrada descritos na Tabela 11;

Realizou-se um novo mapeamento de experimentos mantendo o Incremento de potencial em $5,5 \text{ mV}$ e variando a Amplitude de modulação e a Frequência, na mesma faixa apresentada na Tabela 11. Seguindo os experimentos apresentados na Tabela 12, foram obtidos os voltamogramas de voltametria de onda quadrada apresentados na Figura 35, os quais também foram plotados segundo a corrente obtida, em 2D e 3D, ver Figura 36.

Tabela 11. Mapeamento de duas variáveis, Amplitude de modulação e Frequência, para otimização da voltametria de onda quadrada

Experimento	Amplitude de Modulação	Frequência
7	0,055	1,2604
5	0,008	47,500
3	0,100	5,0000
6	0,118	47,500
1	0,010	5,0000
8	0,055	107,60
2	0,010	90,000
10	0,055	47,500
4	0,10	90,000
9	0,055	47,500

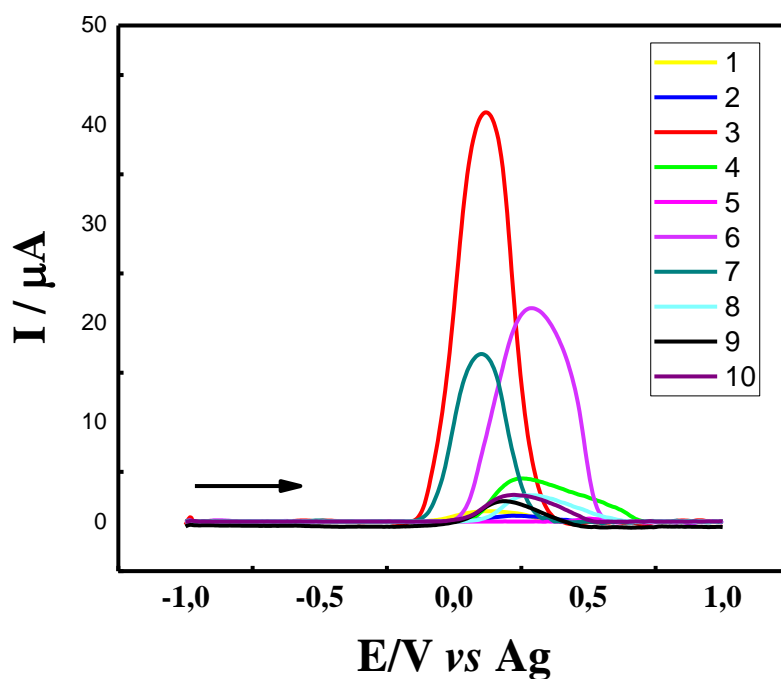


Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AS modificando os parâmetros da técnica conforme mapeamento apresentado na Tabela 4, em meio de

PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Parâmetros SWV descritos na Tabela 10.

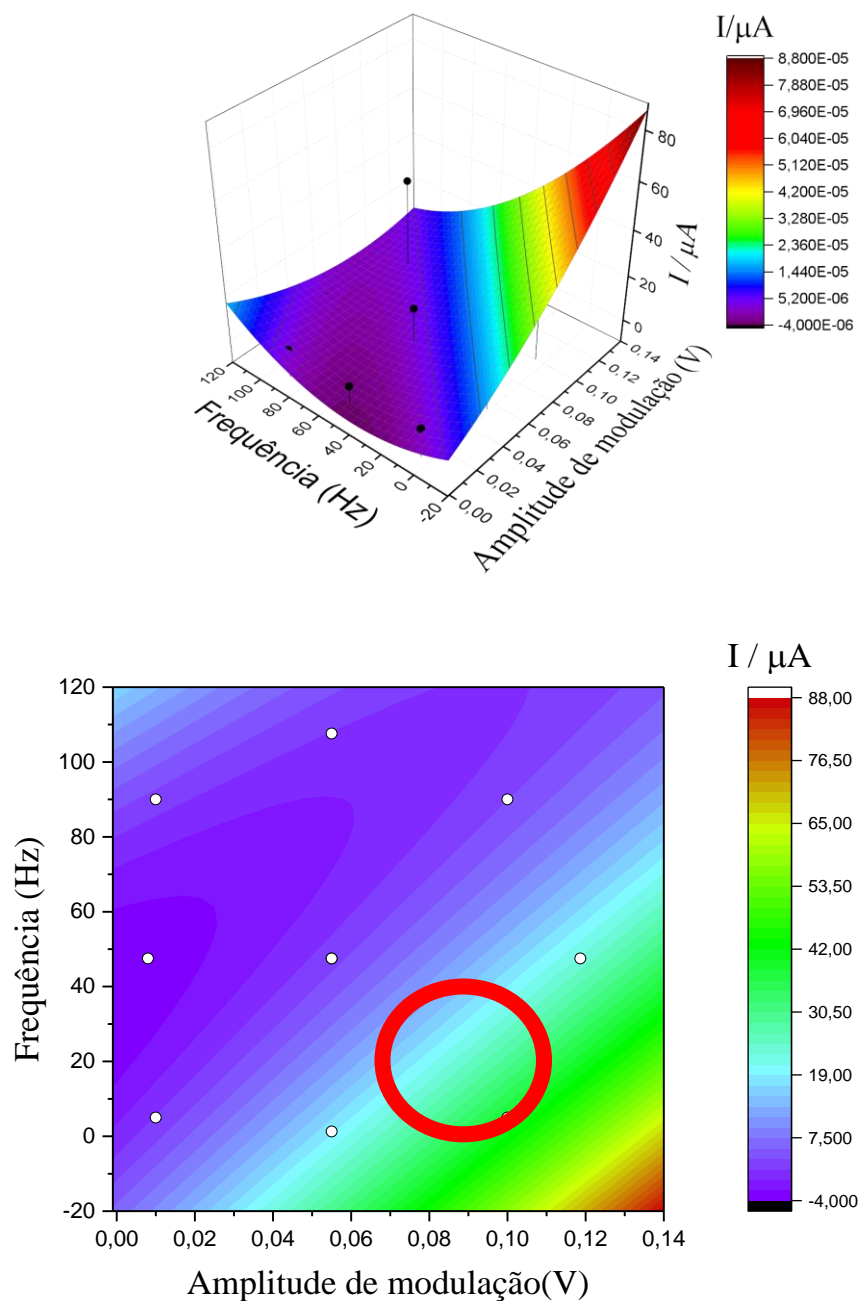


Figura 35. (a) Gráfico em 3D relacionado ao valor da corrente obtida na SWV. b) Gráfico em 2D relacionado ao valor da corrente, círculo vermelho posicionado sobre os valores de maior corrente

Com esse estudo, pode-se verificar que baixas frequências e altas amplitudes de modulação proporcionaram maiores valores de corrente nos experimentos realizados. Entretanto, devido aos valores otimizados terem ficado muito próximos aos extremos da faixa estudada, uma nova faixa foi proposta, a qual estudou-se de 50 a 100 mV a amplitude de modulação e a frequência de 5 a 25 Hz. Desta forma, foi possível realizar a otimização de maneira mais certa. O Mapeamento da nova faixa se encontra na Tabela 12, os voltamogramas do experimento na Figura 37 e os gráficos em 2D e 3D na Figura 38.

Tabela 12. Mapeamento de duas variáveis, Amplitude de modulação e Frequência, com faixa reduzida dos experimentos, para otimização da voltametria de onda quadrada

Experimento	Amplitude de modulação	Frequência
1	0,0750	29,142
2	0,1104	15,000
3	0,0750	15,000
4	0,0500	5,0000
5	0,1000	25,000
6	0,1000	5,0000
7	0,0396	15,000
8	0,0750	0,8579
9	0,0750	15,000
10	0,0500	25,000

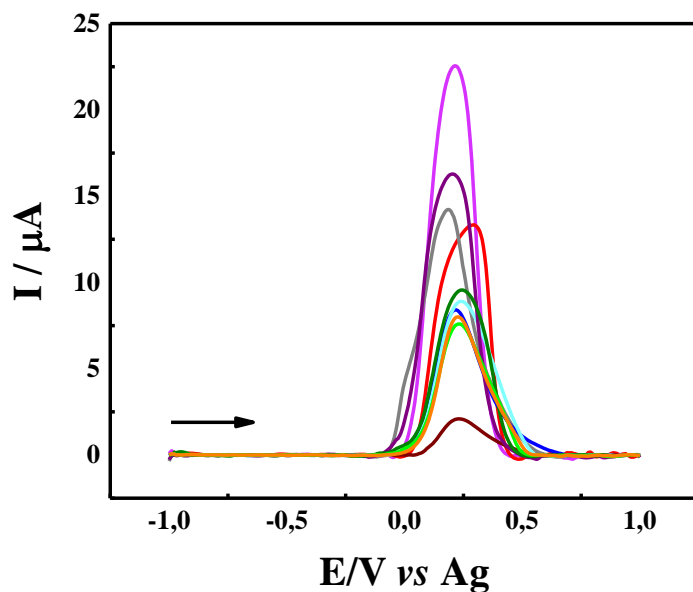


Figura 36. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AS modificando os parâmetros da técnica conforme mapeamento apresentado na Tabela 12, em meio de PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹. Parâmetros SWV descritos na Tabela 12.

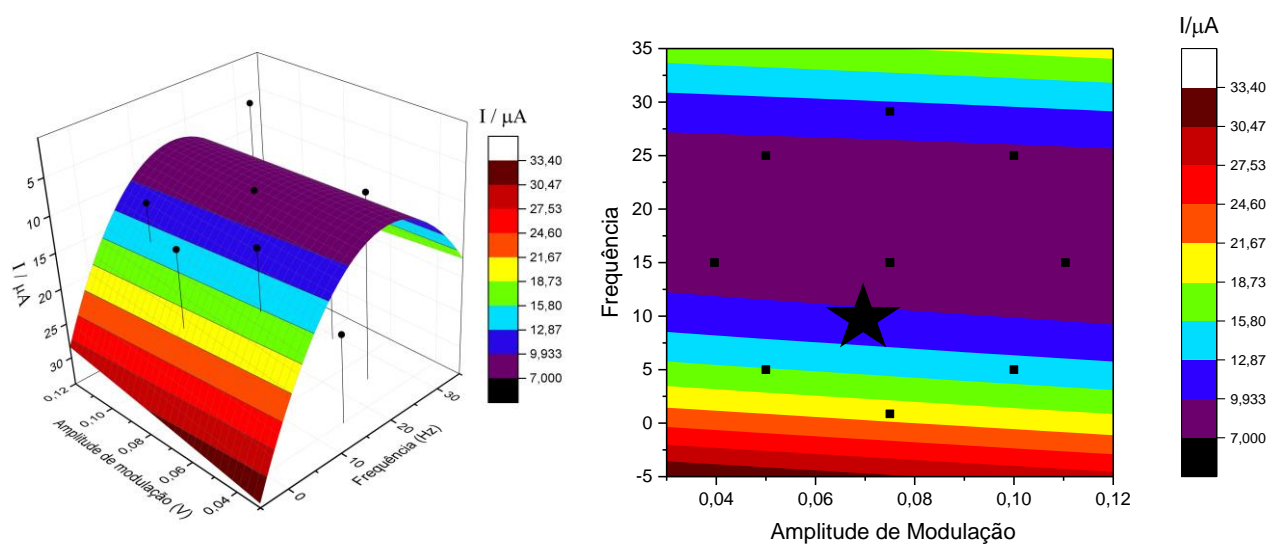


Figura 37. (a) Gráfico em 3D relacionado ao valor da corrente obtida na voltametria de onda quadrada. b) Gráfico em 2D relacionado ao valor da corrente, círculo vermelho posicionado sobre os valores de maior corrente.

Desta forma, os valores otimizados para a utilização na construção da curva e detecção do analito nas amostras foram Incremento de potencial 5mV, Amplitude de modulação 70 mV e Frequência 5Hz. Assim, semelhante aos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 33, o biossensor foi confeccionado por etapas, eletrodeposição de Pt, 3-MPA-EDC/NHS como agentes de reticulação, Anti-E1, BSA e pôr fim a E1 alvo. Em cada camada de modificação foram utilizados 10 mL e aguardou-se 1h30 para cada etapa. Entre as etapas foram feitas lavagens para retirar o excesso dos modificantes com PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4). Desta forma os voltamogramas de SWV foram obtidos e a cada camada, quedas no sinal da corrente de oxidação obtida foram observados, ver Figura 39.

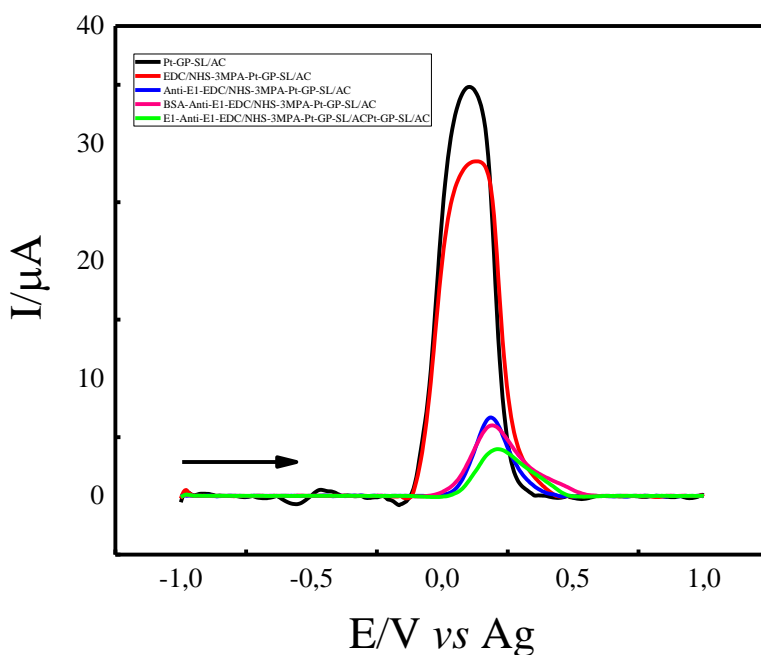


Figura 38. Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pt-GP-SL/AC (preto), EDC/NHS,3-MPA-Pt-GP-SL/AC (vermelho), Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (Azul), BSA-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (Rosa), E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (Verde), utilizando os parâmetros otimizados Incremento de potencial 5mV, Amplitude de modulação 70 mV e Frequência 5Hz em meio PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹

4.6 Construção da curva analítica do biossensor para Estrona (E1)

Para avaliar a aplicabilidade do biossensor criado, a análise de voltametria de onda quadrada foi realizada construindo gráficos de calibração usando diferentes concentrações de E1, imobilizadas por 1h30 em triplicata. Como sonda eletroquímica foi utilizado o ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e como eletrólito suporte PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). Desta forma, o sistema Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC foi então testado com diferentes concentrações de E1, na faixa de $5,0$ a 1000 nmol L^{-1} com equação de regressão linear $I(\mu\text{A}) = 3,5 C(\text{E1}) + 5,24 \times 10^{-6}$ e Limite de detecção (LOD) de $0,70 \text{ nmol L}^{-1}$, os voltamogramas desse estudo podem ser vistos na Figura 40.

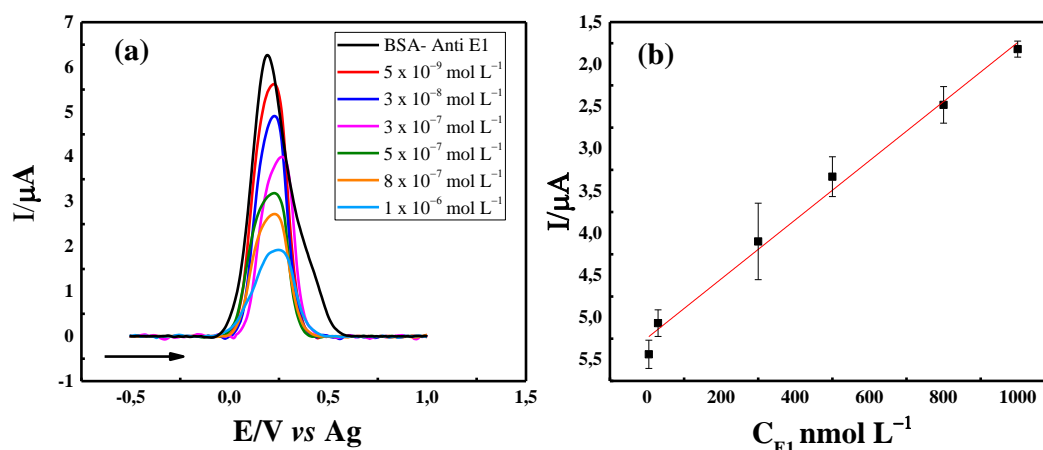


Figura 39. (A) Voltamogramas de onda quadrada em presença de diferentes concentrações de E1, utilizando o sistema E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC, nas concentrações de $5,0$ a 1000 nmol L^{-1} em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4); Incremento de potencial = 5 mV s^{-1} ; amplitude = 70 mV s^{-1} ; frequência = 5 Hz (B) Gráfico de pontos da curva analítica para E1

4.6.1 Análise de amostras fortificadas com Estrona (E1)

Para verificar a aplicação prática do E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AS, dois tipos de amostra foram utilizados, a urina sintética e o soro humano. A urina sintética foi preparada segundo Laube et. al [209] e o soro foi diluído em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) 1:10 e posteriormente ambas as amostras foram enriquecidas de E1. Percentuais de recuperação entre 90,40 e 111,1% foram alcançadas para E1 (Tabela 13).

Esses resultados demonstram a utilidade dos biossensores propostos mesmo frente a amostras mais complexas.

Tabela 13. Determinação de E1 por voltametria de onda quadrada em amostras de soro humano e Urina sintética utilizando o biossensor E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC (n = 3)

Amostra	Adicionado	Encontrado	Recuperado (%)
Soro humano	$3,0 \times 10^{-7}$	$2,71 \times 10^{-7}$	90,40
	$5,0 \times 10^{-7}$	$5,40 \times 10^{-7}$	108,0
	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$	104,8
Urina sintética	$5,0 \times 10^{-7}$	$5,75 \times 10^{-7}$	111,1
	$1,0 \times 10^{-6}$	$9,02 \times 10^{-7}$	90,20

4.7 Comparação com a literatura

A Tabela 14 compara as características analíticas E1-Anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC com outros sistemas relatados anteriormente. Os trabalhos selecionados apresentam algumas semelhanças com o eletrodo proposto, como detecção de E1 e uso de materiais de carbono. Na literatura são encontrados poucos trabalhos de imunossensor para E1 utilizando técnicas voltamétricas para análise. Mikhraliieva e colaboradores [210] utilizaram nanodots de carbono (R-CNDs) para a detecção eletroquímica de estrogênios em amostras de água e efluentes simulados de estações de tratamento de esgoto na Suécia. Os R-CNDs, sintetizados a partir de 2-aminofenol, foram integrados a membranas seletivas de quitosana e aplicados em eletrodos para a determinação voltamétrica de quatro estrogênios, apresentando um limite de detecção de $17,0 \text{ nmol L}^{-1}$ e demonstrando alta sensibilidade, seletividade e estabilidade em diversas amostras de água. Em geral, cromatografia com detectores de fluorescência são as metodologias mais comuns para a detecção do E1 [210]. Zhu e colaboradores [211] desenvolveram um biossensor com um eletrodo de pasta de carbono modificado por um compósito de grafeno e carbono mesoporoso ordenado (GR/OMC/CPE) para a determinação quantitativa de estrogênios naturais via voltametria de onda quadrada. O sensor exibiu excelente

atividade eletrocatalítica para a oxidação de estrona, estradiol e estriol, sendo aplicado com sucesso na análise de estrogênios em amostras de soro feminino. Nesse contexto, apesar de poucos trabalhos, pode-se perceber que o desempenho analítico do biossensor proposto foi satisfatório em relação as faixas lineares e LODs encontradas na literatura.

Tabela 14. Comparação do biossensor proposto com outros sistemas para E1/Estrogênios encontrados na literatura

Eletrodo	Analito	Técnica	Faixa linear (nmol L⁻¹)	Lod (nmol L⁻¹)	Ref
E1-anti-E1-EDC/NHS-3-MPA-Pt-GP-SL/AC	E1	SWV	5,0 a 1000	0,70	Este trabalho
GR/OMC/CPE	E1, estradiol, e estriol	SWV	5,0 a 2000	2,00	[211]
PGE-CNDs/chit	E1, estradiol, estriol, e etinil estradiol	DPV	50,0 a 400,0 e 400,0 a 4600	17	[210]

GR/OMC/CPE: eletrodo de pasta de carbono modificado com grafeno/composto de carbono mesoporoso ordenado, **PGE-CNDs/Chit:** Eletrodo de lápis-grafite modificado por quitosana com R-CNDs incorporados (**R-CNDs:** procedimento para a preparação de nanodots de carbono a partir de 2-aminofenol)

4.8 Conclusão – capítulo 3

Para auxiliar no ancoramento de material biológico, modificou-se o eletroquímico do sensor confeccionado de goma laca e com platina. Caracterizações eletroquímicas alinhadas a utilização de metodologias estatísticas permitiram chegar na melhor concentração e tempo possível para a eletrodeposição de Pt. Através da técnica de cronoamperometria, otimizou-se os valores através de estudo multivariado, e aplicou-se o potencial de $-0,6V$ por de 100s na concentração de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ para a obtenção do melhor perfil. Desta forma, a modificação do Pt-GP-SL/AC foi realizada com sucesso. Além disso, o biossensor para a estrona, utilizando a técnica de voltametria de onda

quadrada, se mostraram funcionais, uma vez que as correntes obtidas tiveram quedas consecutivas a cada etapa adicionada, corroborando para comprovar sua funcionalidade. Amostras de Urina sintética e Soro humano foram testadas e obtiveram valores de recuperação de 90 a 111%. Considerando somente o custo dos reagentes e materiais utilizados no desenvolvimento desses sistemas, cada unidade de sensor custa em torno de 0,019 reais. Já as modificações do biossensor custam por sistema 0,77 reais, resultando em um valor de 0,79 reais para a produção de cada sistema biossensorial. Desta forma, podemos concluir que o sistema confeccionado é eficiente para a detecção de E1 em baixas concentrações mesmo em amostras mais complexas como o soro humano.

5 Capítulo 4 - "Eletrodos Serigrafados de carbon black super P, PVP e quitosana utilizados para a detecção de triptofano"

5.1 Objetivos

Este capítulo teve como objetivo o desenvolvimento e investigação do sistema SPE por meio de uma nova tinta condutora à base de água com CBSP® em uma matriz polimérica de PVP-Quitosana para análise de triptofano.

5.2 Experimental

5.2.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados para preparar a tinta e as soluções de eletrólito de suporte, sondas eletroquímicas e outras amostras foram todos de grau analítico e foram adquiridos da Fisher, Merck ou Sigma-Aldrich. As soluções foram preparadas com água purificada usando o sistema Milli-Q Integral 3 da Millipore UK (Watford, Reino Unido) (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Nas medições realizadas para a caracterização eletroquímica dos sensores fabricados, foi utilizada uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte contendo uma mistura equimolar de ferricianeto de potássio (99%), ferrocianeto de potássio (98,5-102%), ou cloreto de hexaamminerutênio (III) (RuHex, 98%) e ferrocenometanol como sondas eletroquímicas. Os comprimidos de solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram adquiridos da Merck (Gillingham, Reino Unido). O carbono negro (Super P®, >99+%) foi adquirido da Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido). O volume da gota utilizado no sensor foi de $40 \mu\text{L}$. Amostras reais do medicamento EPAPLUS e amostras de alimentos, leite integral Longlife (Tesco) e suco de maçã (Naturis), foram obtidas em lojas de conveniência locais, na cidade de Manchester, Inglaterra.

5.2.2 Equipamentos

Um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab PGSTAT M204 controlado pelo software Nova 2.1.6 foi utilizado para análises eletroquímicas. O conector desenvolvido pela ADB sensores foi usado para conectar o sistema eletroquímico ao potenciostato. A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada usando um microscópio eletrônico de varredura por feixe de íons focado Crossbeam 350 (FIB-MEV) (Carl Zeiss Ltd., Cambridge, Reino Unido) equipado com uma fonte de elétrons de emissão de campo. A imagem foi realizada usando um detector de íons secundários de elétrons secundários (SESI). As amostras foram fixadas nos pinos de alumínio do MEV usando adesivos de carbono autoadesivos (diâmetro de 12 mm, Agar Scientific, Essex, Reino Unido). A espectroscopia Raman foi realizada usando um microscópio Raman controlado pelo software WiRE 2 da Renishaw PLC em um comprimento de onda do laser de 514 nm.

5.2.3 Preparação dos Eletrodos Serigrafados (SPE)

Telas de malha preparadas para a máquina de serigrafia microDEK1760RS (DEK, Weymouth, Reino Unido) foram utilizadas para produzir os sensores SPE. Desta forma, a tinta condutora à base de água de CBSP foi otimizada para a aplicação desejada. A solução polimérica foi preparada utilizando 1,0 g de PVP, 1,0 g de Quitosana e 50 mL de uma solução de ácido acético a 2% misturada por 2 horas com o auxílio de um agitador. A preparação da tinta condutora também foi realizada usando um agitador. A melhor proporção entre CBSP® e a solução polimérica de PVP-Quitosana foi escolhida para obter uma maior condutividade do eletrodo final, ainda foi adicionado 3% (m/m) de glicerol como aditivo para melhorar a aderência da tinta. O número de vezes que o rodo passou sobre a tela foi estudado, em busca de se obter uma superfície homogênea da tinta de carbono. Em seguida, a tinta foi serigrafada em um substrato de poliéster (PES) e cada camada foi seca a 60°C por 30 minutos. Após a tinta condutora de CBSP®, uma pasta de Ag/AgCL (SunChemical) foi usada para fazer a camada do eletrodo de referência. Por fim, para delimitar os três eletrodos e definir a área da amostra, uma tinta dielétrica

(SunChemical) foi usada para cobrir os terminais. O sensor final foi seco a 60°C por 12 horas e estava pronto para uso. Todo procedimento está ilustrado na Figura 41.

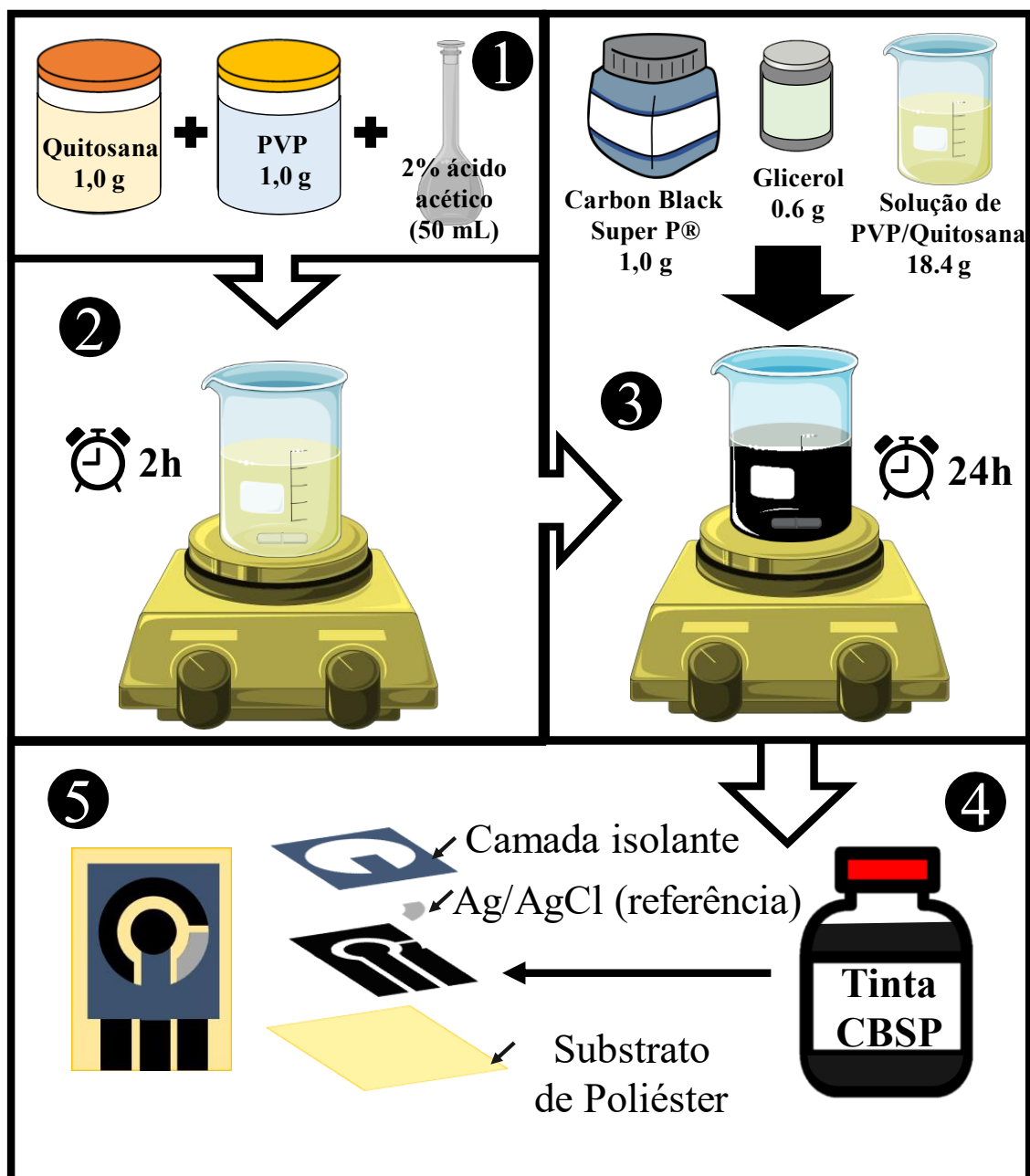


Figura 40. Esquema de preparação do SPE utilizando a tinta CBSP. (1) Para preparar a solução polimérica, foram utilizados 1,0 g de PVP, 1,0 g de Quitosana e 50 mL de uma solução de ácido acético a 2%. (2) A mistura foi agitada por 2 horas com a ajuda de um agitador. (3) Para a tinta de CBSP, foram misturados 1,0 g de CBSP, 0,6 g de glicerol e 18,4 g da solução polimérica por 24 horas com a ajuda de um agitador. (4) A tinta estava pronta para ser utilizada. (5) A máquina de serigrafia foi usada para realizar o sistema

SPE, o rodo passou sobre a tela três vezes para garantir uma superfície uniforme para a tinta de carbono. Esta tinta de carbono foi aplicada em um substrato de poliéster e seca a 60°C por 30 minutos. Em seguida, a pasta de Ag/AgCL foi aplicada para formar a camada do eletrodo de referência e seca a 60°C por 30 minutos. Por fim, para delimitar a área da amostra e cobrir os terminais, uma tinta dielétrica foi usada. O sensor foi seco a 60°C por 12 horas para garantir que estivesse pronto para uso.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Produção da tinta CBSP e sistema SPE

Usando a metodologia descrita no item 5.2.3, foram fabricados sensores de PVP quitosana, glicerol e CBSP, que foram depositados em poliéster, e este dispositivo foi denominado CBSP-PVP-CH/PES. Imagens dos sensores prontos para uso são mostradas na Figura 42.

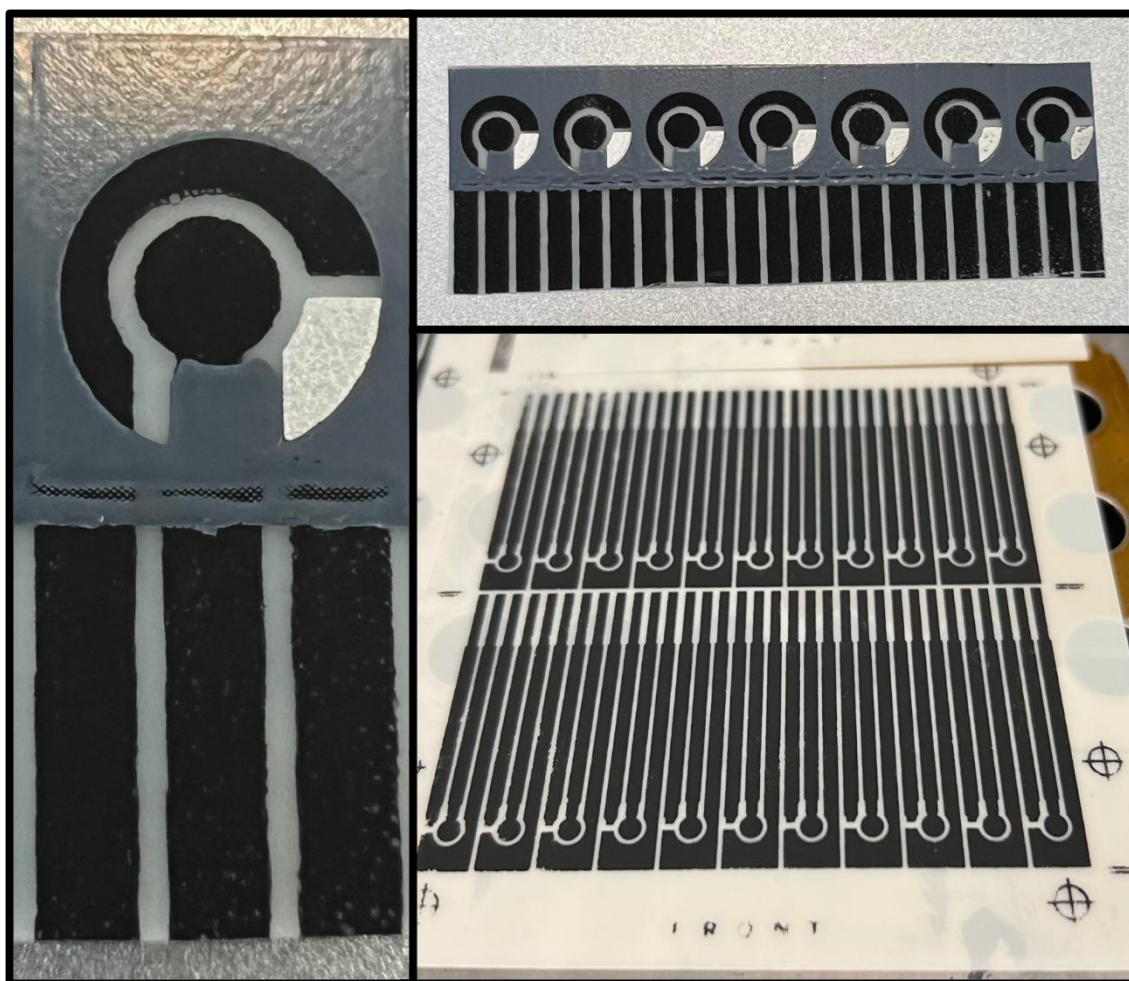


Figura 41. Fotos de sistemas de detecção descartáveis preparados usando PVP-quitosana, glicerol e CBSP aplicados em poliéster, com 16,0 mm (comprimento) x 8,0 mm (largura). Este dispositivo foi denominado CBSP-PVP-CH/PES

Para produzir a tinta, foi necessário primeiro testar como os polímeros em pó se solubilizavam em uma solução aquosa. Composições contendo apenas PVP e água resultaram em uma solução de baixa viscosidade que favoreceu a distribuição completa da tinta sobre a tela sem respeitar os padrões de malha. Sabe-se, a partir de trabalhos anteriores, que a quitosana permite a formação de soluções idealmente viscosas para o desenvolvimento da tinta. Nesse sentido, diferentes soluções foram preparadas com PVP e quitosana na mesma proporção. A proporção de 1,0 g de PVP e 1,0 g de quitosana em 50 mL de uma solução de ácido acético a 2% foi a mistura que teve viscosidade suficiente para permitir a adição de CBSP e não percolar através da malha da tela. A adição de

pequenas quantidades de glicerol melhora a adesão e a homogeneidade da tinta, então a quantidade de 3% foi mantida para todos os estudos subsequentes.

5.3.2 Avaliação da quantidade de CBSP na tinta condutora

Após determinada a solução polimérica e a quantidade de glicerol, foi testada a quantidade de CBSP na composição da tinta. Foram testadas três composições de tinta com 3, 5 e 7% de CBSP (ver Figura 43). As tintas com 3 e 5% de CBSP eram homogêneas, mas deve-se observar que o eletrodo feito com a tinta contendo 3% de CBSP não mostrou homogeneidade na serigrafia. A falta de homogeneidade também é evidente nos testes de voltametria cíclica realizados para cinco desses dispositivos. Na composição de 7%, pode-se observar a presença de aglomerados, o que mostra que esta composição não era homogênea. Esses aglomerados também dificultaram o processo de serigrafia. A composição que mostrou cobertura homogênea e completa do substrato durante a aplicação foi aquela com 5% de CBSP. Também mostrou boa reprodutibilidade com um desvio padrão relativo de 7,99%, $n = 5$.

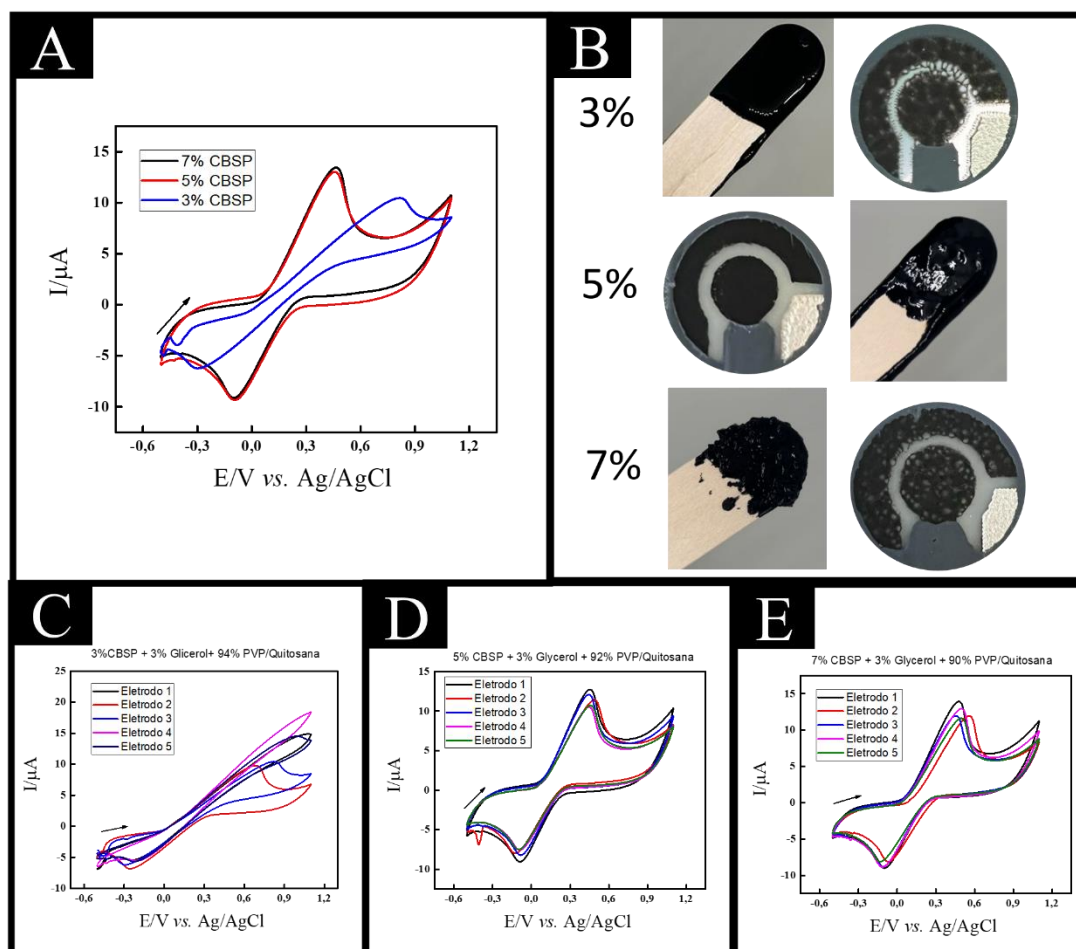


Figura 42. (A) Voltamogramas cíclicos do CBSP-PVP-CH/PES com diferentes porcentagens de CBSP em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Fotos de diferentes porcentagens de tinta CBSP e sistemas CBSP-PVP-CH/PES; (C) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de tinta com 3% de CBSP em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferrocenometanol para medições realizadas com cinco eletrodos diferentes, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (D) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de tinta com 5% de CBSP em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para medições realizadas com cinco eletrodos diferentes, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (E) Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodo de tinta com 7% de CBSP em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para medições realizadas com cinco eletrodos diferentes, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$

5.3.3 Estudo do número de vezes que o rodo passa sobre a tela

Após a composição da tinta ser finalizada, o número de passadas do rodo sobre a tela foi examinado. Uma, duas e três vezes de aplicação da tinta foram testadas, como é ilustrado na Figura 44. Com relação a este estudo, não foram observadas grandes mudanças eletroquímicas. No entanto, a eficiência em produzir sensores visualmente homogêneos foi muito melhor quando o rodo passou três vezes sobre a malha.

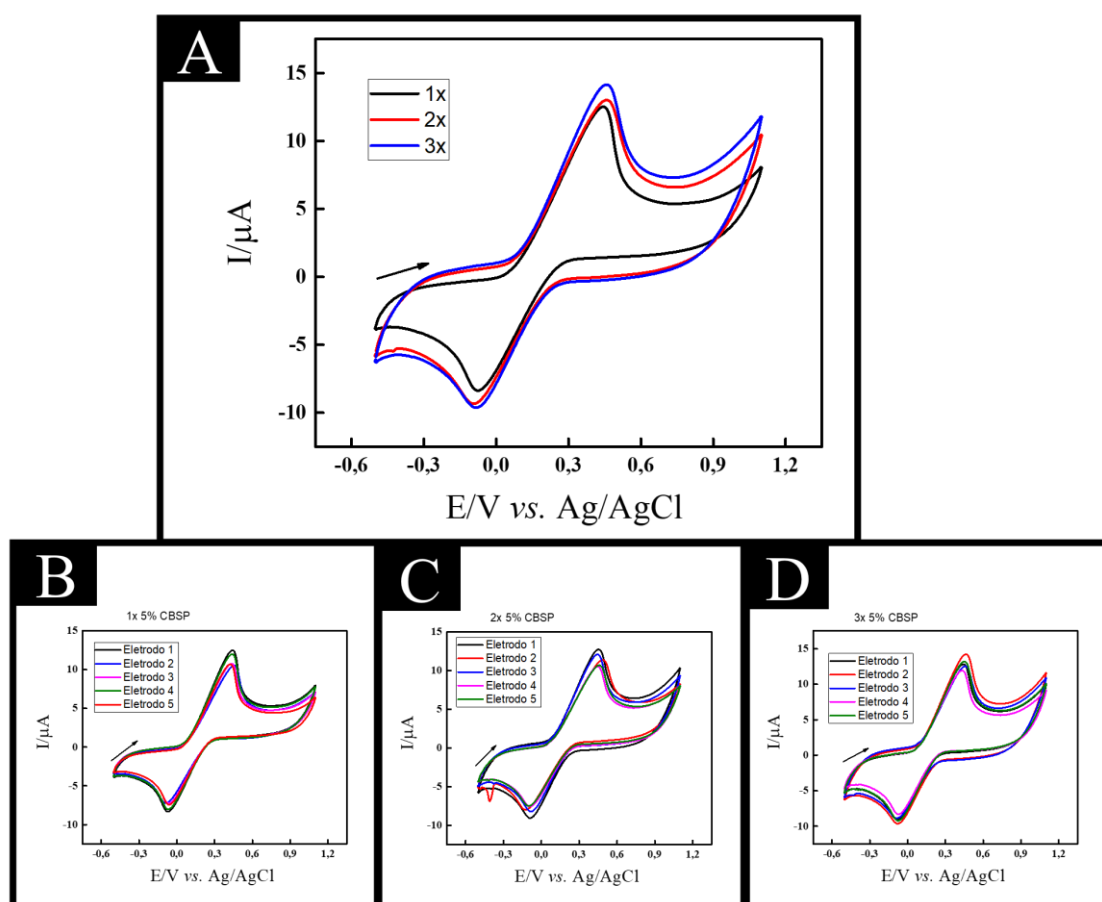


Figura 43. (A) Voltamogramas cíclicos do CBSP-PVP-CH/PES comparando o número de vezes que o rodo passou sobre a tela, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Teste de reprodutibilidade de CBSP-PVP-CH/PES feito com o rodo passado apenas uma vez para cinco eletrodos; (C) Teste de reprodutibilidade de CBSP-PVP-CH/PES feito com duas passadas do rodo para cinco eletrodos; (D) Teste de reprodutibilidade de CBSP-PVP-CH/PES feito com três passadas do rodo para cinco eletrodos

5.3.4 Estudo do comprimento do sensor

A tela usada para produzir os sensores tinha um comprimento de cauda de 35 mm. No entanto, buscando melhorar os sinais analíticos reduzindo a resistência, podemos encurtar o sistema fabricado. Com isso em mente, foram testados sistemas com comprimentos de cauda de 7,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 35,0 mm. As medições foram realizadas com um paquímetro. Como esperado, os eletrodos com os comprimentos encurtados de 7,0, 10,0 e 15,0 mm mostraram uma corrente mais alta do que aqueles com 20,0 e 35,0 mm. Portanto, um comprimento de 10 mm foi escolhido para a continuação do trabalho.

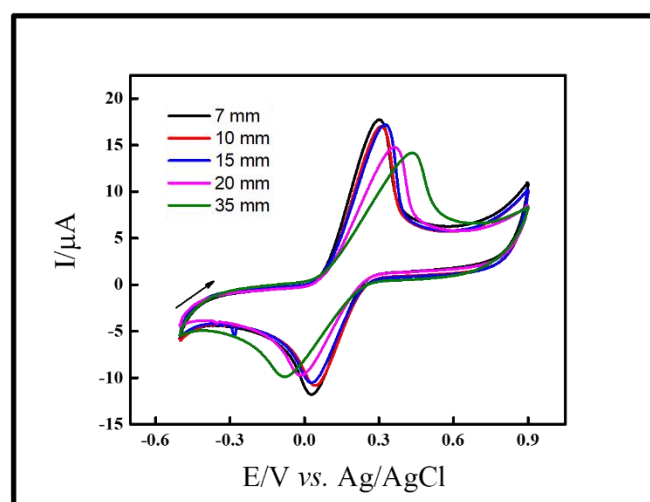
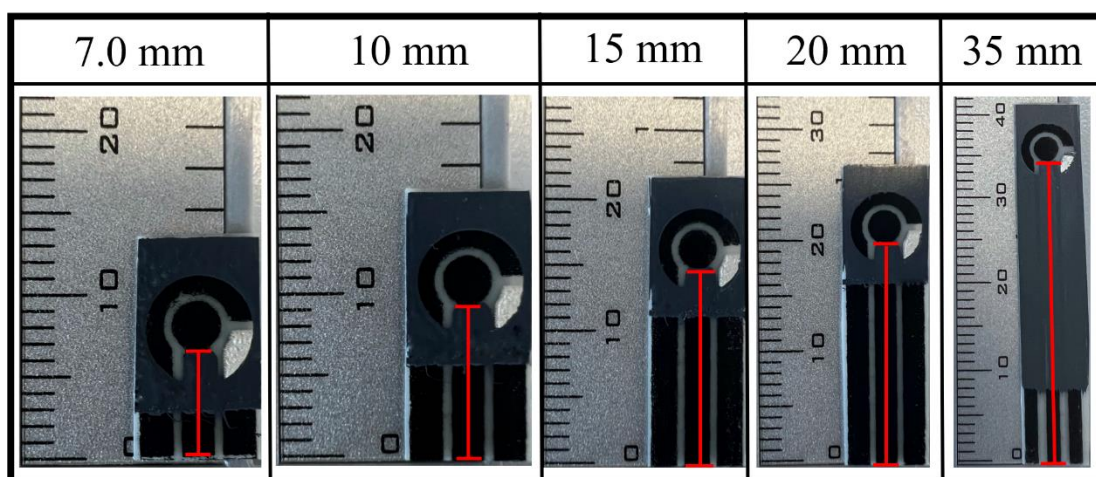


Figura 44. Imagens de diferentes comprimentos de cauda 7,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 35,0 mm. Voltamogramas cíclicos de CBSP-PVP-CH/PES comparando diferentes comprimentos de cauda, em KCl 0,1 mol L⁻¹ e ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$

5.4 Caracterização morfológica

A análise por MEV, ilustrada na Figura 46, foi realizada para elucidar a composição microestrutural da tinta contendo CBSP, quitosana e PVP. As imagens obtidas fornecem *insights* valiosos sobre a morfologia e as propriedades interfaciais da tinta composta. As imagens microscópicas mostram uma distribuição bem dispersa das partículas de CBSP por toda a matriz da tinta. A morfologia esférica e irregular do CBSP é evidente e mostra que ele foi integrado com sucesso na formulação da tinta. Além disso, a quitosana e o PVP contribuem para a estrutura geral e aparecem como uma matriz contínua que encapsula e interage com as partículas de CBSP. As imagens de MEV sugerem uma mistura homogênea dos componentes, indicando compatibilidade e dispersão eficazes dentro da tinta. A presença de quitosana e PVP parece influenciar as propriedades de superfície e contribuir para uma microestrutura mais homogênea.

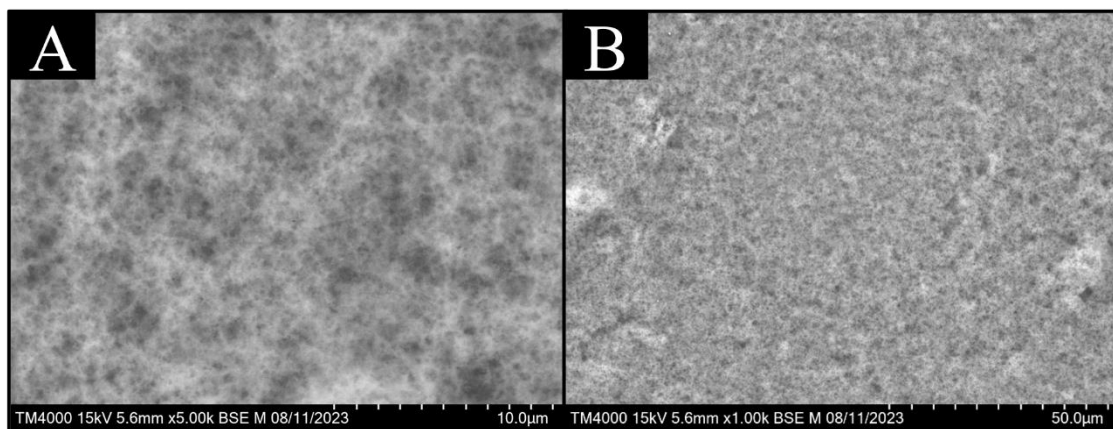


Figura 45. Microestrutura da tinta composta observada por MEV. As partículas de CBSP estão uniformemente dispersas dentro de uma matriz de quitosana e PVP, mostrando uma estrutura homogênea (A) Imagens de MEV obtidas para CBSP-PVP-CH/PES com aumento de 5000x; (B) Imagens de MEV obtidas para CBSP-PVP-CH/PES com aumento de 1000x;

A medidas de Raman, ilustradas na Figura 47, mostra bandas características em 1589 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} que provavelmente estão associadas a modos vibracionais

específicos no CBSP. A banda em 1589 cm^{-1} geralmente corresponde à banda G em materiais de carbono como grafeno e nanotubos de carbono [212]. A banda G geralmente representa a vibração de estiramento dos átomos de carbono sp^2 -hibridizados em uma estrutura de lâmina bidimensional. A presença dessa banda indica a natureza gráfica do material CBSP. A banda 1350 cm^{-1} está geralmente associada à banda D em materiais de carbono, o que indica defeitos estruturais ou desordens na rede de carbono [213]. A presença dessa banda pode indicar imperfeições ou áreas desordenadas dentro da tinta CBSP.

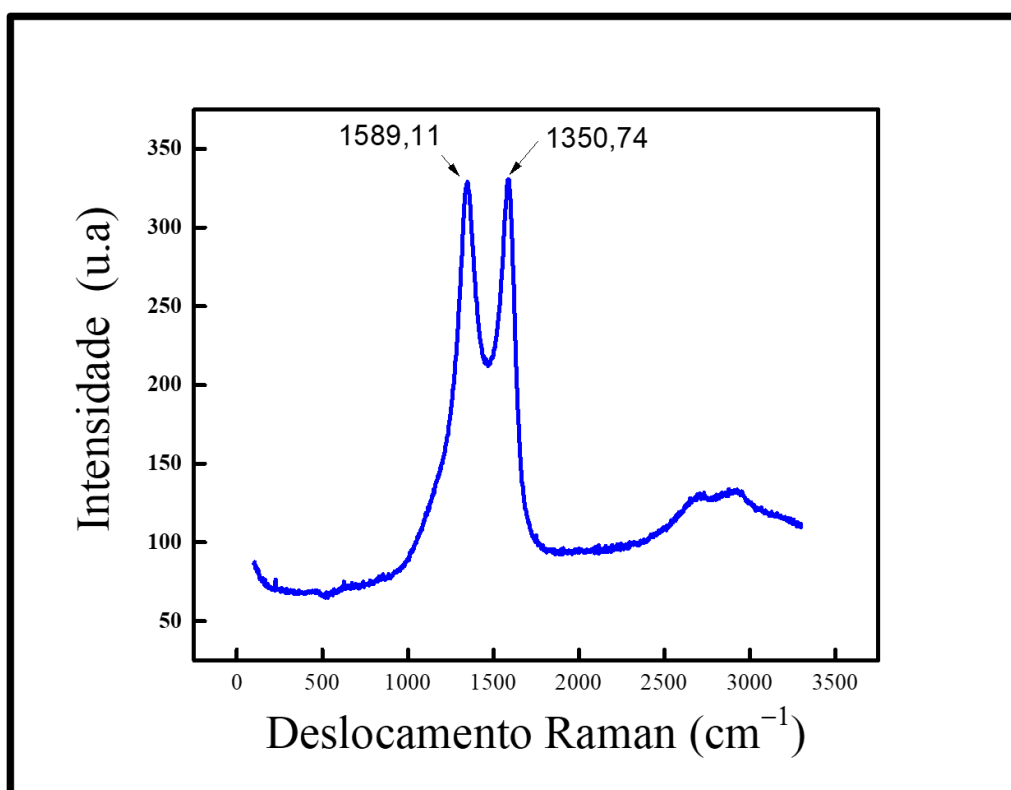


Figura 46. Espectroscopia Raman do sensor CBSP-PVP-CH/PES.

5.5 Caracterização eletroquímica

Na análise de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), o diagrama de Nyquist mostra um pequeno semicírculo seguido por outro semicírculo e um elemento de Warburg, que indica um sistema com múltiplos processos eletroquímicos. O pequeno

semicírculo representa um processo cinético rápido, possivelmente relacionado às etapas iniciais de transferência de carga. O semicírculo maior indica um processo eletroquímico mais lento, possivelmente envolvendo outra reação eletroquímica, e o elemento de Warburg indica um processo controlado por difusão no qual o movimento de íons contribui para a resposta de impedância. Os gráficos de Nyquist obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica em ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e o circuito equivalente foram apresentados na Figura 48.

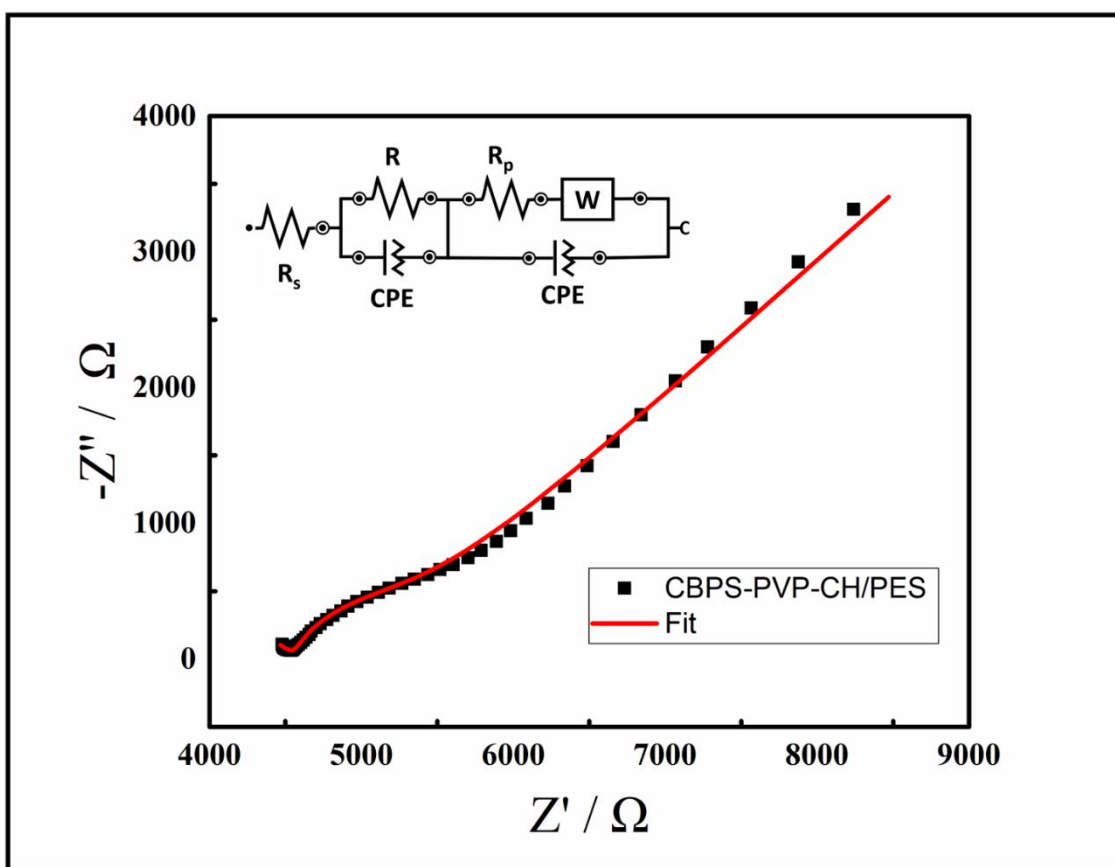


Figura 47. Diagramas de Nyquist para CBSP-PVP-CH/PES em ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $E = 130 \text{ mV}$. *Inset*: circuito equivalente [R(RQ)([RW]Q)]

Portanto, para iniciar a caracterização eletroquímica da tinta fabricada, o dispositivo CBSP-PVP-CH/PES foi submetido à voltametria cíclica. Uma solução de ferrocenometanol ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizada com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Um pico anódico de $19 \mu\text{A}$ a $0,33 \text{ V}$ e um pico catódico de $-14 \mu\text{A}$ a $0,01 \text{ V}$ podem ser observados (Figura 49). A razão calculada I_a/I_c é de $1,35$, e

a separação pico a pico corresponde a 326 mV. A separação de potencial de pico de 326 mV indica a natureza quase reversível do processo redox.

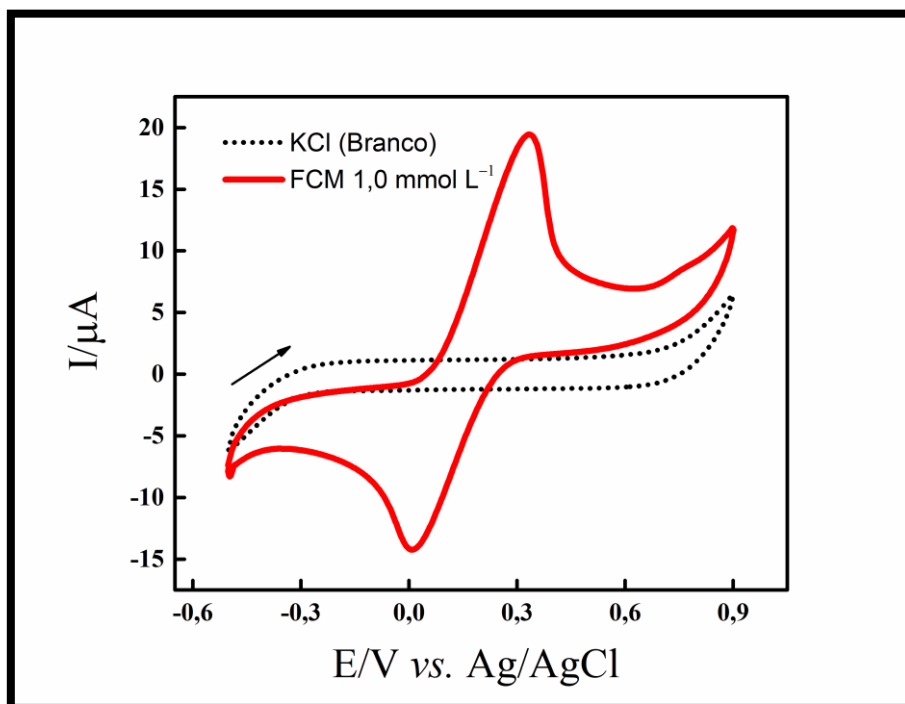


Figura 48. Voltamogramas cíclicos realizados em KCl 0,1 mol L⁻¹ na presença de ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹. Velocidade de varredura = 50 mV s⁻¹

A área eletroativa do eletrodo CBSP-PVP-CH/PES foi estimada com base na equação de Randles-Ševčík [165] (Equação 1) em velocidades de varredura variando de 5,0 a 100 mV s⁻¹ usando ferrocenometanol 1,0 mmol L⁻¹ como sonda em uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. O coeficiente de difusão da espécie eletroativa utilizado foi $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. A área eletroquimicamente ativa média obtida a partir das correntes anódica e catódica foi de $(0,0139 \pm 0,002) \text{ cm}^{-1}$. A área geométrica dos eletrodos é de 0,07 cm² para o eletrodo de trabalho. Usando a seguinte equação % Real = (Areal / Ageo) × 100, o % Real é de 19,86%, veja a Figura 50.

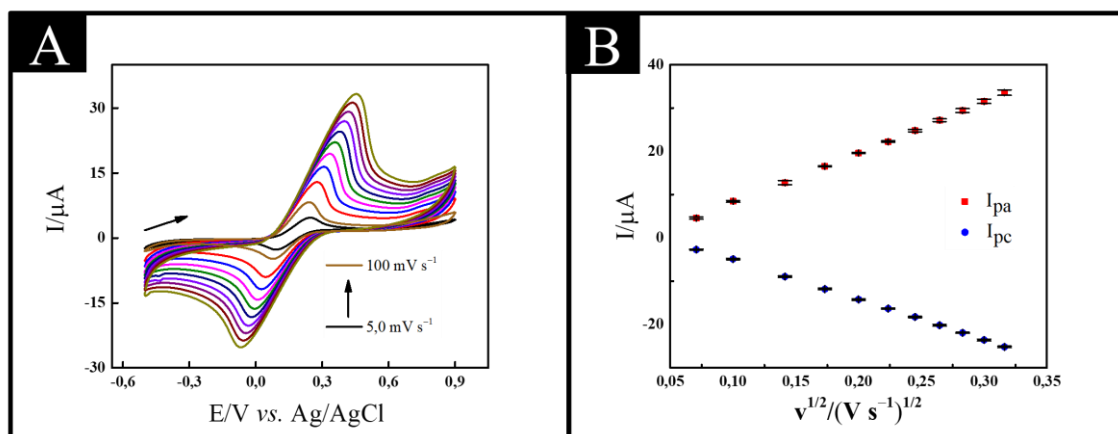


Figura 49. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com CBSP-PVP-CH/PES na presença de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ferrocenometanol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, para diferentes velocidades de varredura, de $5,0$ a 100 mV s^{-1} ($5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90$ e 100 mV s^{-1}); (B) A correlação linear obtida entre picos de corrente anódica e catódica e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$)

5.6 Determinação de Triptofano

Voltametrias cíclicas na ausência e presença de TRP 100 μmol L^{-1} de $0,0$ a $1,2$ V, com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} foram obtidas utilizando solução tampão de fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH $7,0$), veja a Figura 51a. O eletrodo CBSP-PVP-CH/PES mostrou um processo redox irreversível, atribuído à oxidação do TRP para ácido 2-amino-3-(5-oxo-3,5-dihidro-2H-indol-3-il) propiônico por meio de um processo de transferência de dois elétrons [214], conforme ilustrado na Figura 51b.

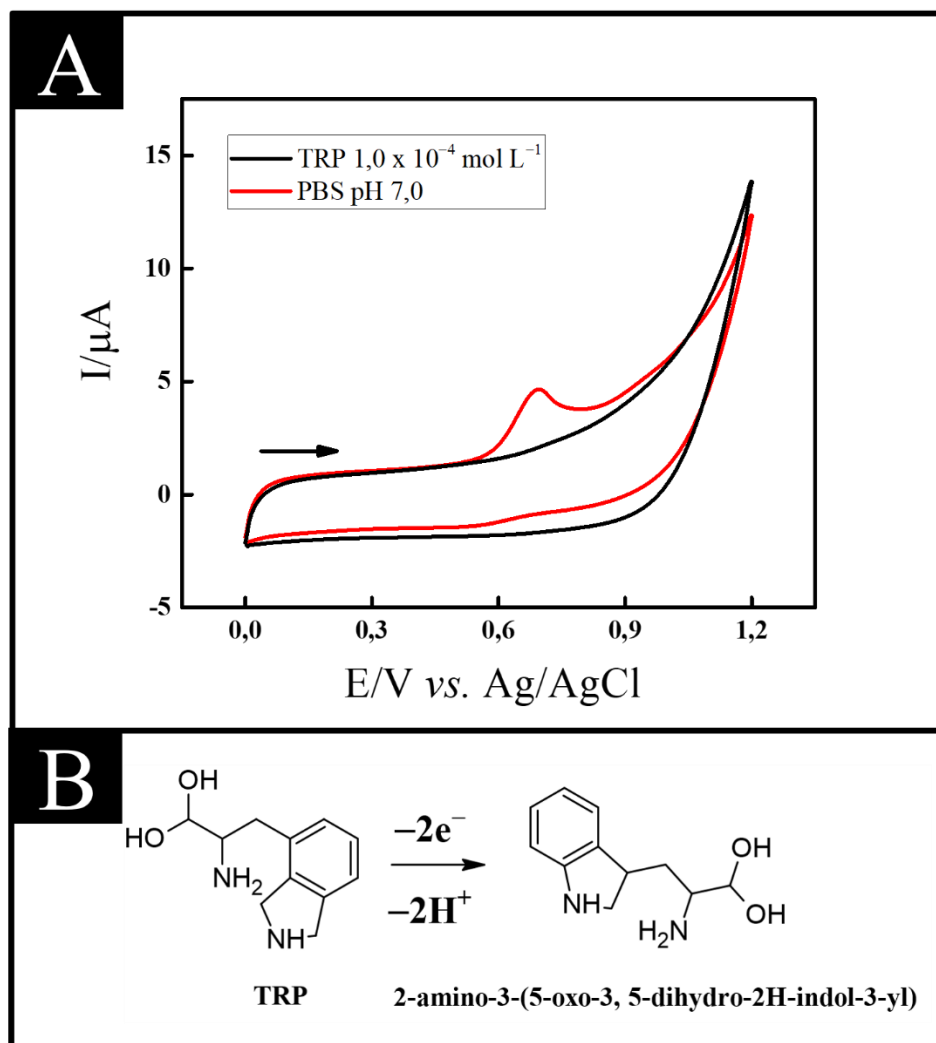


Figura 50. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com CBSP-PVP-CH/PES na ausência e presença de TRP $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eletrólito de suporte: solução tampão de fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (B) Mecanismo de oxidação eletroquímica do TRP;

5.6.1 Estudo dos efeitos dos parâmetros

A investigação dos efeitos dos parâmetros na voltametria de pulso diferencial (DPV) é importante para obter um maior sinal analítico. Este estudo envolve análises de parâmetros-chave, como amplitude de modulação, tempo de intervalo ou velocidade de varredura e tempo de modulação para compreender sua influência nos resultados do DPV. Nesse sentido, esses parâmetros foram estudados de acordo com a Tabela 15. As medições de DPV e o gráfico de pontos são mostrados na Figura 52.

Tabela 15. Estudo dos efeitos dos parâmetros no sinal de corrente

Parâmetros	Faixa do estudo	Valor Otimizado
Amplitude de Modulação	0,01 – 0,1 V	0,09 V
Tempo de Intervalo / velocidade de varredura	0,001 – 0,05 V s ⁻¹	0,005 V s ⁻¹
Tempo de Modulação	0,02 – 0,1 s	0,08 s

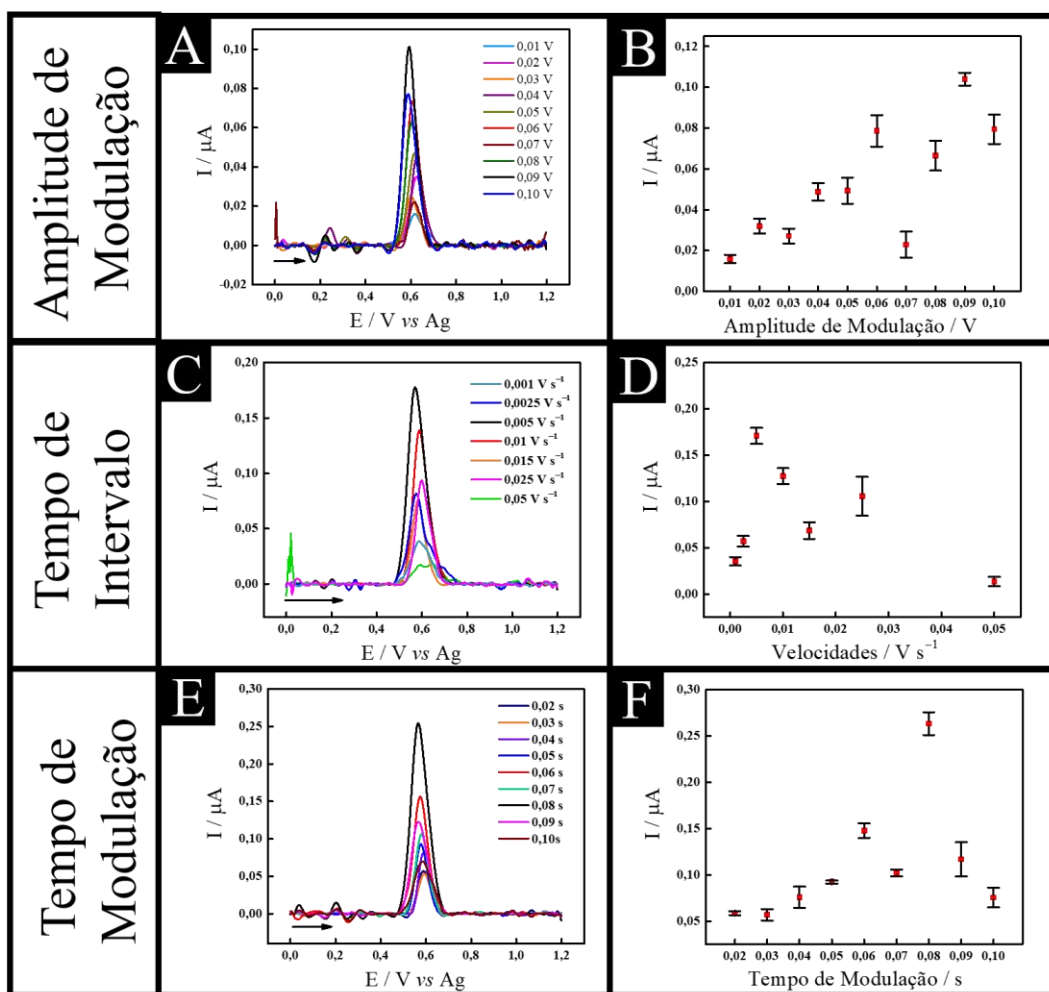


Figura 51. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com CBSP-PVP-CH/PES na presença de TRP 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (A) Amplitude de Modulação e (B) Gráfico de pontos da Amplitude de Modulação; (C) Tempo de Intervalo e (D) Gráfico de pontos do Tempo de Intervalo; (E) Tempo de Modulação e (F) Gráfico de pontos do Tempo de Modulação

Com o estudo dos efeitos dos parâmetros concluído, utilizando DPV com uma amplitude de modulação de 0,09V, um tempo de intervalo de 0,005 V s⁻¹ e um tempo de modulação de 0,08 s, foi realizada uma curva analítica. Estudos foram realizados em uma solução tampão de fosfato (pH 7,0). Em seguida, o desempenho analítico do CBSP-PVP-CH/PES foi investigado por meio de adições sucessivas e crescentes de concentrações de TRP. A curva analítica foi obtida em uma faixa linear (R² = 0,9946) de 0,5 a 300 μmol L⁻¹, seguindo a equação $I (\mu\text{A}) = 0,0056 [\text{TRP}] - 1,235 \times 10^{-8}$ (Figura 53). O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados calculando três e dez vezes o desvio padrão da interseção, respectivamente, dividido pelo coeficiente angular do gráfico de calibração [3]. O valor de LOD resultante foi determinado como 0,018 μmol L⁻¹, e o valor de LOQ foi estabelecido em 0,060 μmol L⁻¹.

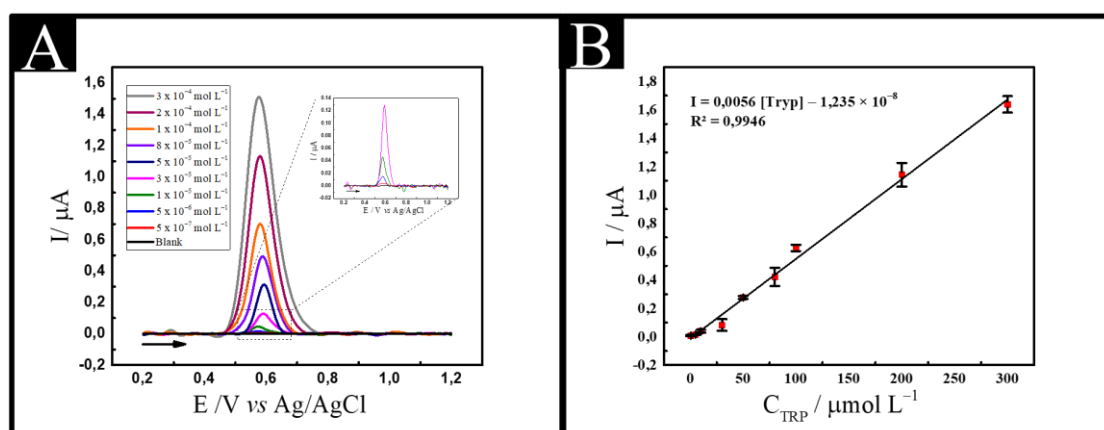


Figura 52. (A) Voltamogramas de pulso diferencial na presença de TRP em concentrações de 0,5, 5,0, 10,0, 30,0, 50,0, 80,0, 100,0, 200,0 e 300,0 μmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); (B) Gráfico de pontos obtidos por meio da curva analítica para TRP

A determinação de TRP também foi realizada em TRP farmacêutico (comprimidos) e bebidas adulteradas (suco de maçã e leite de vaca). A Tabela 16 mostra as concentrações de TRP adicionadas e encontradas e os valores de recuperação para as amostras respectivas. Foi possível encontrar valores de recuperação de 86,2 a 114% considerando todas as amostras avaliadas. Isso demonstra que o método proposto também foi bem-sucedido na determinação de TRP em diferentes amostras.

Tabela 16. Determinação de TRP em amostras farmacêuticas e alimentares utilizando o CBSP-PVP-CH/PES pela técnica de DPV (n = 3). Eletrólito de suporte: solução tampão salina de fosfato (pH 7,0)

Amostra	Concentração do comprimido solubilizado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Detectado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Epaplus	5	-	4.57 (± 0.65)	91.40 (± 13.0)
	50	-	53.53 (± 2.78)	107.06 (± 5.57)
	200	-	227.7 (± 12.7)	113.89 (± 6.34)
Suco de Maça	-	10	8.75 (± 0.46)	87.47 (± 4.56)
	-	30	30.31 (± 1.50)	101.02 (± 5.02)
Leite de vaca	-	5	4.31 (± 0.17)	86.23 (± 3.48)
	-	100	103.6 (± 3.09)	103.6 (± 3.09)

Para o estudo de interferência, ilustrado na Figura 54, foram realizadas medições de DPV para a presença de espécies concomitantes, Ácido Ascórbico (AA), L-lisina (L-lis), Melatonina (MLT), Serotonina (STN) e Ácido Úrico (UA) na mesma concentração ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os percentuais de interferência variaram entre 2,08 e 9,15%, mostrando a funcionalidade deste sensor.

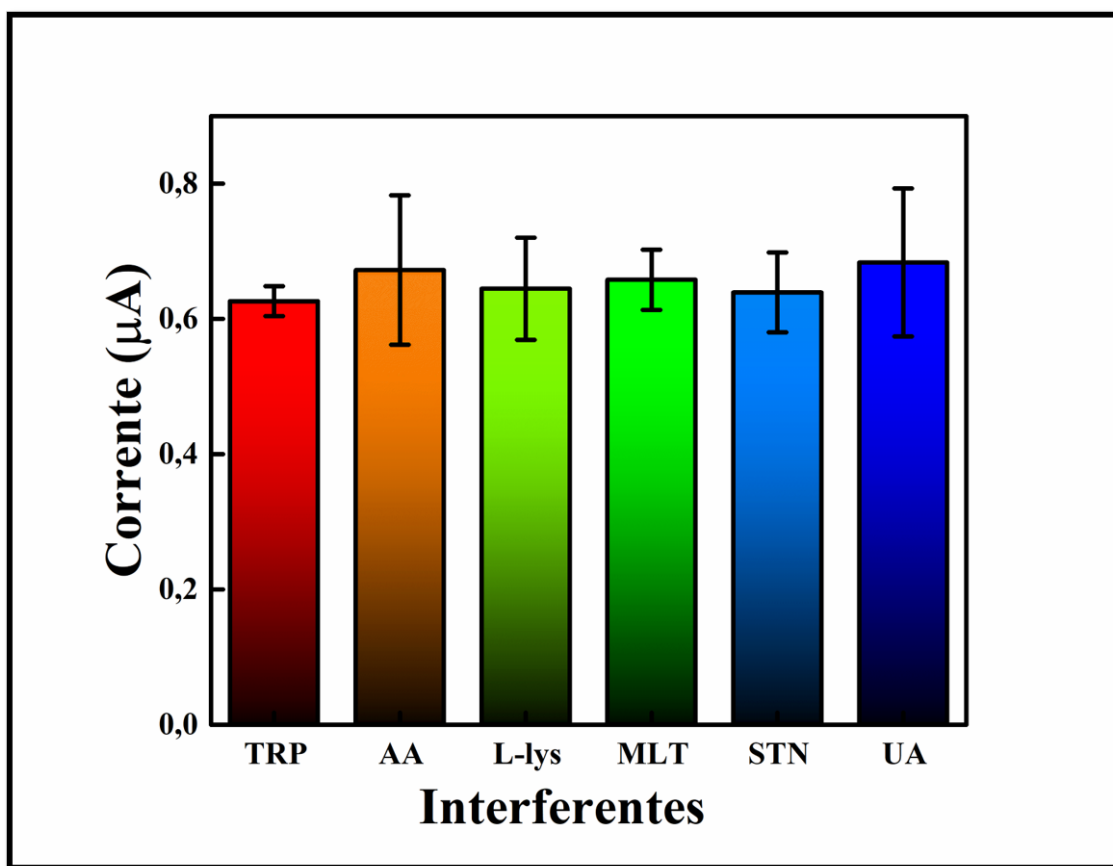


Figura 53. Resultados obtidos (%) para o estudo de interferência usando diferentes espécies para determinação de TRP. Eletrólito de suporte: solução tampão salina de fosfato (pH 7,0)

5.7 Comparação com a literatura

A Tabela 17 compara as características analíticas do sensor SPE desenvolvido com uma tinta CBSP® à base de água para o diagnóstico de triptofano com outros sensores relatados anteriormente. Os estudos selecionados têm semelhanças com o eletrodo proposto, como o uso de materiais de carbono e a abordagem descartável. Boonchiangma e colaboradores desenvolveram um sensor eletroquímico modificando eletrodos de carbono serigrafados (SPCE) com um filme híbrido de pontos quânticos de sulfeto de cádmio (Cys-CdS QDs) e polímero de p-fenilenodiamina (PPD). O sensor apresentou uma detecção seletiva de L-triptofano com limite de detecção de $14,74 \mu\text{mol L}^{-1}$ e boa precisão, sendo eficaz na análise de amostras de bebidas. Fooladi e colaboradores apresentaram um método para a determinação simultânea de triptofano e tirosina em leite,

utilizando eletrodos de carbono serigrafados modificados com óxido de grafeno funcionalizado com ácido carboxílico e quitosana (SPCE/GO–COOH/Quitosana). Nazarpour e colaboradores utilizaram folhas de *E. tereticornis* como agente redutor ecológico na síntese de nanopartículas de ouro/reduzido óxido de grafeno (rGO/AuNPs). O sensor eletroquímico baseado em rGO/AuNPs mostrou sensibilidade e seletividade para a oxidação de Triptofano, com faixa linear de 0,5–500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LOD de 0,39 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo adequado para análises em amostras biológicas. Por fim, Beitollahi e colaboradores utilizaram um eletrodo serigrafado de grafite modificado com nanocompósito $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{GO}$, sendo eficaz na medição de Triptofano em amostras reais. Devido à simplicidade do processo de fabricação da tinta condutora à base de água, dos eletrodos CBSP-PVP-CH/PES e ao custo acessível dos materiais utilizados, o desempenho analítico do sensor proposto é notavelmente satisfatório e é caracterizado por suas faixas lineares e limites de detecção (LODs).

Tabela 17. Desempenho analítico do CBSP-PVP-CH/PES para determinação de triptofano comparado com a literatura

Eletrodo	Técnica	Faixa linear (mol L⁻¹)	LOD (mol L⁻¹)	Ref.
QDs/GA/PPD/SPCE	SWV	100.0 to 500.0	14.74	[215]
SPCE/GO–COOH/ sensor de quitosana	DPV	0.4 to 40.0	0.1	[216]
SPE/rGO/AuNPs	DPV	0.5 to 500.0	0.39	[217]
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{GO}/\text{SPE}$	DPV	1.0 to 400.0	0.2	[152]
CBSP-PVP-CH/PES	DPV	0.5 to 300.0	0.018	Este trabalho

QDs/GA/PPD/SPCE: Filme de polímero de poli(p-fenilenodiamina)/pontos quânticos de sulfeto de cádmio sobre um eletrodo de carbono impresso em tela; **SPCE/GO–COOH/sensor de quitosana:** Eletrodo de carbono impresso em tela modificado com óxido de grafeno–COOH/quitosana eletrodepositado; **SPE/rGO/AuNPs:** Eletrodo impresso em tela modificado com óxido de grafeno reduzido/nanopartículas de ouro; **$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{GO}/\text{SPE}$:** Core–shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{GO}$ nano-compósito modificado eletrodo impresso em grafite;

5.8 Conclusão – Capítulo 4

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem avanços significativos, impulsionados pela demanda por dispositivos versáteis, econômicos e reproduzíveis. Este trabalho detalhou o desenvolvimento de um sensor SPE utilizando uma tinta CBSP® à base de água para o diagnóstico de triptofano. O desempenho analítico do CBSP-PVP-CH/PES foi investigado por adições sucessivas e crescentes de concentrações de TRP. A curva analítica foi obtida em uma faixa linear de 0,5 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com ($R^2 = 0,9946$) seguindo a equação $I (\mu\text{A}) = 0,0056 [\text{TRP}] - 1,235 \times 10^{-8}$, com LOD de 0,018 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LOQ de 0,060 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Estudos de interferência demonstraram a funcionalidade do sensor, com porcentagens de interferência variando de 2,08 a 9,15% para várias espécies concomitantes. O sensor apresentou determinação bem-sucedida de concentrações de triptofano em comprimidos farmacêuticos e bebidas adulteradas, com valores de recuperação variando de 86,2% a 114%. Estes resultados destacam a eficácia e versatilidade do sensor proposto para a determinação de triptofano em amostras diversas.

6 Resumo dos trabalhos

No capítulo 1, foi desenvolvida uma nova tinta condutora à base de água para fabricar eletrodos descartáveis serigrafados, projetados especificamente para a detecção de ácido úrico (UA) e catecol. Esta tinta apresentou vantagens em termos de menor toxicidade e impacto ambiental. Para o UA, o sensor utilizado obteve a faixa linear de 8,0 a 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção (LOD) de $3,63 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Para o catecol, o biossensor teve a faixa linear de 0,5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

O capítulo 2 focou no desenvolvimento de novas composições de tintas de prata para preparar eletrodos de pseudo-referência, essenciais em muitas aplicações eletroquímicas. Como prova de conceito, foi realizada a detecção de β -estradiol utilizando as tintas de prata. Para concentrações de β -estradiol na faixa linear de 1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, o sistema referenciado pela tinta Ag-NP apresentou um LOD de $1,3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto o sistema referenciado pela tinta Ag-SL obteve um LOD de $9,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

No capítulo 3, foi desenvolvido um sistema eletroquímico envolvendo goma-laca, grafite e platina para o biossensoriamento de estrona (E1), um hormônio esteroide associado a condições médicas como menopausa precoce, síndrome dos ovários policísticos e câncer de mama. A faixa de concentração de E1 foi de 5,0 a 1000 nmol L^{-1} , com um LOD de 0,70 nmol L^{-1} .

Finalmente, no capítulo 4, foram abordados os eletrodos serigrafados de Carbon Black Super P®, polivinilpirrolidona (PVP) e quitosana para detectar triptofano (TRP), um aminoácido essencial com diversas funções biológicas importantes. A faixa linear para o TRP foi de 0,5 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com um LOD de 0,018 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOQ de 0,060 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Todas as tintas desenvolvidas nesta tese são alternativas para a construção de sistemas eletroquímicos descartáveis. As tintas e arquiteturas desenvolvidas são de baixo custo e puderam ser aplicadas para o sensoriamento e biossensoriamento de diferentes analitos e biomarcadores, relacionados a doenças que afetam diretamente a saúde humana.

Tabela 18. Resumo em tabela dos trabalhos desenvolvidos nos 4 capítulos apresentados na presente tese

Capítulo	Tinta condutora	Sistema desenvolvido	Técnicas utilizadas	Analitos	Amostras testadas
1	Quitosana, grafite e glicerol em água	Sensor do tipo SPE	Voltametria Linear	Ácido Úrico	Urina Sintética
		Biossensor do tipo SPE	Cronoamperometria	Catecol	Água de Lago
2	Prata e Goma Laca	Eletrodos de pseudo-referência externo e aplicados em um sensor SPE	Voltametria Cíclica	β -estradiol	-
	Prata e Esmalte para unhas		Voltametria de onda quadrada		
			Potencial de Circuito Aberto		
3	Goma Laca, grafite e eletrodeposição de Platina	Biossensor do tipo SPE	Voltametria de onda quadrada	Estrona	Soro humano Urina Sintética
4	Quitosana, PVP, Carbon Black Super P®, glicerol e água	Sensor do tipo SPE	Voltametria de Pulso Diferencial	Triptofano	Leite de Vaca
					Suco de Maça
					Fármaco com triptofano

7 Conclusão geral

Considerando os quatro capítulos apresentados nessa tese, pode-se concluir que há um avanço significativo no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, impulsionado pela busca por dispositivos mais versáteis, econômicos e reprodutíveis. Em geral cada capítulo abordou a preparação e aplicação de diferentes tipos de tintas condutoras em eletrodos para diversas aplicações analíticas. No primeiro capítulo, foi demonstrada a preparação de uma tinta condutora à base de água ecologicamente correta, incorporando quitosana, grafite e glicerol. Essa tinta resultou em eletrodos serigrafados descartáveis, com excelente resposta para a quantificação de ácido úrico e construção de biossensores enzimáticos para a detecção de Catecol. O segundo capítulo descreveu a preparação de novas tintas condutoras de prata aplicadas em sistemas 3D e SPEs demonstrando sua eficácia na criação de eletrodos de pseudo-referência, com menor custo em comparação com as tintas comerciais de prata já existentes. No terceiro capítulo, foi realizado o aprimoramento de um sensor com modificação de platina para ancoramento de material biológico, alcançando eficiência na detecção de estrona em baixas concentrações, inclusive em amostras complexas como o soro humano. Por fim, o quarto capítulo detalhou o desenvolvimento de um sensor SPE utilizando uma tinta à base de água *com carbon black super P* para o diagnóstico de triptofano, demonstrando uma faixa linear de detecção ampla, baixos limites de detecção e quantificação, além de eficácia na determinação do triptofano em diferentes amostras, como comprimidos farmacêuticos e bebidas adulteradas. Em síntese, esses estudos demonstraram um progresso significativo na fabricação e aplicação de tintas condutoras e eletrodos para uma variedade de aplicações analíticas, destacando a importância desses avanços na área de biossensores e diagnóstico.

8 Referências Bibliográficas

1. Hayat, A. and J.L. Marty, *Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring*. Sensors, 2014. **14**(6): p. 10432-10453.
2. Nascimento, V.B. and L. Angnes, *Eletrodos fabricados por "silk-screen"*. Química Nova, 1998. **21**: p. 614-629.
3. de Araujo Andreotti, I.A., et al., *Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2019. **840**: p. 109-116.
4. Lesch, A., et al., *Large scale inkjet-printing of carbon nanotubes electrodes for antioxidant assays in blood bags*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2014. **717**: p. 61-68.
5. Hayat, A. and J. Marty, *Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring*. Sensors, 2014. **14**(6): p. 10432-10453.
6. Ostojić, J., et al., *Advantages of an Electrochemical Method Compared to the Spectrophotometric Kinetic Study of Peroxidase Inhibition by Boroxine Derivative*. Molecules, 2017. **22**(7): p. 1120.
7. Chiu, M.-H., et al., *A disposable screen-printed silver strip sensor for single drop analysis of halide in biological samples*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **24**(10): p. 3008-3013.
8. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. Sensors (Basel, Switzerland), 2008. **8**(3): p. 1400-1458.
9. Wang, X., et al., *Inkjet-printed flexible sensors: From function materials, manufacture process, and applications perspective*. Materials Today Communications, 2022. **31**: p. 103263.
10. Hill, H.A.O., et al., *Strip electrode with screen printing*. 1998, Google Patents.
11. Nagata, R., et al., *A glucose sensor fabricated by the screen printing technique*. Biosensors and Bioelectronics, 1995. **10**(3-4): p. 261-267.
12. Honeychurch, K.C. and J.P. Hart, *Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(7): p. 456-469.
13. Figueredo, F., M.S. Gonzalez-Pabon, and E. Corton, *Low Cost Layer by Layer Construction of CNT/Chitosan Flexible Paper-based Electrodes: A Versatile Electrochemical Platform for Point of Care and Point of Need Testing*. Electroanalysis, 2018. **30**(3): p. 497-508.
14. Lakhera, P., et al., *Recent developments and fabrication of the different electrochemical biosensors based on modified screen printed and glassy carbon electrodes for the early diagnosis of diverse breast cancer biomarkers*. Materials Today Chemistry, 2022. **26**: p. 101129.
15. Li, M., et al., *Applications of screen-printed electrodes in current environmental analysis*. Current Opinion in Electrochemistry, 2017. **3**(1): p. 137-143.
16. Paschoalin, R.T., et al., *Wearable sensors made with solution-blow spinning poly (lactic acid) for non-enzymatic pesticide detection in agriculture and food safety*. Biosensors and Bioelectronics, 2022. **199**: p. 113875.
17. Plus, E.C.S.S., *An Overview on Recent Progress in Screen-Printed Electroanalytical (Bio) Sensors*. ECS Sensors Plus, 2022. **023401**.

18. Oliveira, A., A. Pereira, and M. Resende, *Fabrication of low-cost screen-printed electrode in paper using conductive inks of graphite and silver/silver chloride*. *Electroanalysis*.
19. Pavličková, M., et al., *Facile fabrication of screen-printed MoS₂ electrodes for electrochemical sensing of dopamine*. *Scientific reports*, 2022. **12**(1): p. 1-11.
20. Palley, B.F., et al., *Screen-Printed Electrodes on Tyvek Substrate as Low-Cost Device to Applications in Alzheimer's Disease Detection*. *Journal of The Electrochemical Society*, 2022. **169**(3): p. 037505.
21. Zhang, Z., et al., *Thermoelectricity and antivibration properties of screen-printed nanodoped In₁₋₃₅ZnO₂. 11/In₂O₃ thin-film thermocouples on alumina substrates*. *Ceramics International*, 2022. **48**(18): p. 25747-25755.
22. Sher, M., et al., *Nano-engineered screen-printed electrodes: A dynamic tool for detection of viruses*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021. **143**: p. 116374.
23. Koivikko, A., et al., *Screen-printed curvature sensors for soft robots*. *IEEE Sensors Journal*, 2017. **18**(1): p. 223-230.
24. Jaiswal, N., et al., *Highly sensitive amperometric sensing of nitrite utilizing bulk-modified MnO₂ decorated Graphene oxide nanocomposite screen-printed electrodes*. *Electrochimica Acta*, 2017. **227**: p. 255-266.
25. Dimitriou, E. and N. Michailidis, *Printable conductive inks used for the fabrication of electronics: An overview*. *Nanotechnology*, 2021. **32**(50): p. 502009.
26. Somalu, M.R., et al., *Screen-printing inks for the fabrication of solid oxide fuel cell films: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017. **75**: p. 426-439.
27. Camargo, J.R., et al., *Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors*. *Microchemical Journal*, 2021. **164**: p. 105998.
28. Huang, L., et al., *Graphene-based conducting inks for direct inkjet printing of flexible conductive patterns and their applications in electric circuits and chemical sensors*. *Nano Research*, 2011. **4**(7): p. 675-684.
29. Zhang, J. and C.M. Li, *Nanoporous metals: fabrication strategies and advanced electrochemical applications in catalysis, sensing and energy systems*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(21): p. 7016-7031.
30. Chen, D., H. Feng, and J. Li, *Graphene oxide: preparation, functionalization, and electrochemical applications*. *Chemical reviews*, 2012. **112**(11): p. 6027-6053.
31. Wang, J. and M. Musameh, *Carbon nanotube screen-printed electrochemical sensors*. *Analyst*, 2004. **129**(1): p. 1-2.
32. Bolon, D.A., G.M. Lucas, and S.H. Schroeter, *Radiation curable conductive ink*. *IEEE Transactions on Electrical Insulation*, 1978(2): p. 116-121.
33. Crouch, E., et al., *A novel, disposable, screen-printed amperometric biosensor for glucose in serum fabricated using a water-based carbon ink*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. **21**(5): p. 712-718.
34. Hart, J.P., et al., *Some Recent Designs and Developments of Screen-Printed Carbon Electrochemical Sensors/Biosensors for Biomedical, Environmental, and Industrial Analyses*. *Analytical Letters*, 2004. **37**(5): p. 789-830.
35. Laden, P., *Chemistry and technology of water based inks*. 2012: Springer Science & Business Media.

36. Li, H. and M.J. Tierney, *Electrochemical sensor ink compositions, electrodes, and uses thereof*. 2007, Google Patents: U.S. Patent No. 7,189,341. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
37. Rodrigues, V.C., et al., *Separation and identification of additives in paint by TLC-IR/ UATR and selective extraction*. *Polímeros*, 2016. **26**: p. 68-74.
38. Henrique, J.M., et al., *Disposable electrochemical sensor based on shellac and graphite for sulfamethoxazole detection*. *Microchemical Journal*, 2021. **170**: p. 106701.
39. Freitas, R.C., et al., *Electrochemical determination of melatonin using disposable self-adhesive inked paper electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2021. **897**: p. 115550.
40. Camargo, J.R., et al., *Novel eco-friendly water-based conductive ink for the preparation of disposable screen-printed electrodes for sensing and biosensing applications*. *Electrochimica Acta*, 2022. **409**: p. 139968.
41. Pradela-Filho, L.A., et al., *Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020. **305**: p. 127433.
42. Daniele, G.G., et al., *Development of Disposable and Flexible Supercapacitor Based on Carbonaceous and Ecofriendly Materials*. *C*, 2022. **8**(2): p. 32.
43. Raymundo-Pereira, P.A., et al., *Simultaneous detection of quercetin and carbendazim in wine samples using disposable electrochemical sensors*. *ChemElectroChem*, 2020. **7**(14): p. 3074-3081.
44. Luo, X.J., et al., *Wearable Carbon Nanotube-Based Biosensors on Gloves for Lactate*. *Sensors*, 2018. **18**(10).
45. Wisitorsaat, A., et al., *Printed organo-functionalized graphene for biosensing applications*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017. **87**: p. 7-17.
46. Tomei, M.R., et al., *Paper-based electroanalytical strip for user-friendly blood glutathione detection*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2019. **294**: p. 291-297.
47. Terzi, F., et al., *Amperometric paper sensor based on Cu nanoparticles for the determination of carbohydrates*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2017. **245**: p. 352-358.
48. Ghosale, A., et al., *Low-Cost Paper Electrode Fabricated by Direct Writing with Silver Nanoparticle-Based Ink for Detection of Hydrogen Peroxide in Wastewater*. *Analytical Chemistry*, 2017. **89**(1): p. 776-782.
49. Bergamini, M.F., et al., *A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2005. **39**(1-2): p. 54-59.
50. Song, W., et al., *Fabrication of streptavidin functionalized silver nanoparticle decorated graphene and its application in disposable electrochemical sensor for immunoglobulin E*. *Electrochemistry Communications*, 2013. **31**: p. 16-19.
51. Nelis, J.L.D., et al., *The benefits of carbon black, gold and magnetic nanomaterials for point-of-harvest electrochemical quantification of domoic acid*. *Microchimica Acta*, 2020. **187**(3): p. 164.
52. Jafari, S., et al., *Smartphone-based magneto-immunosensor on carbon black modified screen-printed electrodes for point-of-need detection of aflatoxin B1 in cereals*. *Analytica Chimica Acta*, 2022. **1221**: p. 340118.

53. Nelis, J.L.D., et al., *Highly sensitive electrochemical detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid with carbon black modified screen printed electrodes*. *Talanta*, 2021. **228**: p. 122215.
54. Cho, I., et al., *A comparative investigation of carbon black (Super-P) and vapor-grown carbon fibers (VGCFs) as conductive additives for lithium-ion battery cathodes*. *RSC advances*, 2015. **5**(115): p. 95073-95078.
55. Veloso, W.B., et al., *Rapid and sensitivity determination of macrolides antibiotics using disposable electrochemical sensor based on Super P carbon black and chitosan composite*. *Microchemical Journal*, 2022. **172**: p. 106939.
56. Dinesh, B., R. Saraswathi, and A.S. Kumar, *Water based homogenous carbon ink modified electrode as an efficient sensor system for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid*. *Electrochimica Acta*, 2017. **233**: p. 92-104.
57. Monerri, M.J., et al., *Electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles deposited on a conductive polymer to determine estrone in water samples*. *Microchemical Journal*, 2016. **129**: p. 71-77.
58. Leigh, S.J., et al., *A simple, low-cost conductive composite material for 3D printing of electronic sensors*. *PloS one*, 2012. **7**(11): p. e49365.
59. Yang, T.-H., et al., *An electrochemically preanodized screen-printed carbon electrode for achieving direct electron transfer to glucose oxidase*. *Electrochemistry Communications*, 2008. **10**(7): p. 1094-1097.
60. Hudari, F.F., *Eletrodos impressos descartáveis e de carbono vítreo modificados com grafeno e compósito de nanotubos de carbono-quitosana aplicados na determinação de corantes de cabelo*. 2014.
61. Kang, X., et al., *Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **25**(4): p. 901-905.
62. Dervin, S., P. Ganguly, and R.S. Dahiya, *Disposable Electrochemical Sensor Using Graphene Oxide-Chitosan Modified Carbon-Based Electrodes for the Detection of Tyrosine*. *IEEE Sensors Journal*, 2021. **21**(23): p. 26226-26233.
63. Bhat, K.S., et al., *Cost-effective silver ink for printable and flexible electronics with robust mechanical performance*. *Chemical Engineering Journal*, 2019. **373**: p. 355-364.
64. Tang, Z.-j., et al., *A review on in situ monitoring technology for directed energy deposition of metals*. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 2020. **108**(11): p. 3437-3463.
65. Inam, A.K.M.S., et al., *Flexible Screen-Printed Electrochemical Sensors Functionalized with Electrodeposited Copper for Nitrate Detection in Water*. *ACS Omega*, 2021. **6**(49): p. 33523-33532.
66. Nie, X., H. Wang, and J. Zou, *Inkjet printing of silver citrate conductive ink on PET substrate*. *Applied surface science*, 2012. **261**: p. 554-560.
67. Lee, B., et al., *A low-cure-temperature copper nano ink for highly conductive printed electrodes*. *Current Applied Physics*, 2009. **9**(2): p. e157-e160.
68. De Araujo, W. and T. Paixao, *Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper*. *Analyst*, 2014. **139**(11): p. 2742-2747.
69. Ciobanu, M., et al., *Miniaturized reference electrodes based on Ag/Ag₂X internal reference elements. I. Manufacturing and performance*. *Electroanalysis: An*

- International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 2002. **14**(14): p. 989-997.
70. Bindra, D.S., et al., *Design and in vitro studies of a needle-type glucose sensor for subcutaneous monitoring*. 1991. **63**(17): p. 1692-1696.
 71. Dawkins, R.C., et al., *A screen-printed Ag/AgCl reference electrode with long-term stability for electroanalytical applications*. *Electrochimica Acta*, 2021. **393**: p. 139043.
 72. Sjøpstad, S., et al., *Long-term stability of screen-printed pseudo-reference electrodes for electrochemical biosensors*. *Electrochimica Acta*, 2018. **287**: p. 29-36.
 73. Martimiano do Prado, T., et al., *Homemade Silver/Silver chloride ink with low curing temperature for screen-printed electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2022. **915**: p. 116316.
 74. Lan, W.-J., et al., *based electroanalytical devices with an integrated, stable reference electrode*. *Lab on a Chip*, 2013. **13**(20): p. 4103-4108.
 75. Moya, A., et al., *Stable Full-Inkjet-Printed Solid-State Ag/AgCl Reference Electrode*. *Analytical Chemistry*, 2019. **91**(24): p. 15539-15546.
 76. Arduini, F., et al., *Effective electrochemical sensor based on screen-printed electrodes modified with a carbon black-Au nanoparticles composite*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. **212**: p. 536-543.
 77. Khairy, M., B.G. Mahmoud, and C.E. Banks, *Simultaneous determination of codeine and its co-formulated drugs acetaminophen and caffeine by utilising cerium oxide nanoparticles modified screen-printed electrodes*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018. **259**: p. 142-154.
 78. Wang, X., et al., *Applications of electrochemical biosensors based on functional antibody-modified screen-printed electrodes: a review*. *Analytical Methods*, 2022. **14**(1): p. 7-16.
 79. Khairy, M. and C.E. Banks, *A screen-printed electrochemical sensing platform surface modified with nanostructured ytterbium oxide nanoplates facilitating the electroanalytical sensing of the analgesic drugs acetaminophen and tramadol*. *Microchimica Acta*, 2020. **187**(2): p. 1-10.
 80. Baradoke, A., et al., *Properties of Anti-CA125 antibody layers on screen-printed carbon electrodes modified by gold and platinum nanostructures*. *Electrochimica Acta*, 2019. **306**: p. 299-306.
 81. Hughes, A.E., et al., *Platinum group metals: A review of resources, production and usage with a focus on catalysts*. *Resources*, 2021. **10**(9): p. 93.
 82. Oliveira, G.C.M., et al., *Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson's disease biomarkers*. *Biosensors & bioelectronics*, 2020. **152**: p. 112016.
 83. Zou, Y., et al., *Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol-gel*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008. **23**(7): p. 1010-1016.
 84. Pandey, G., et al., *Fluorescent biocompatible platinum-porphyrin-doped polymeric hybrid particles for oxygen and glucose biosensing*. *Scientific reports*, 2019. **9**(1): p. 1-12.
 85. Rafique, S., et al., *Comparative study of label-free electrochemical immunoassay on various gold nanostructures*. *Journal of Applied Physics*, 2013. **114**(16): p. 164703.

86. Qi, H., C. Wang, and N. Cheng, *Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for the determination of human immunoglobulin G*. *Microchimica acta*, 2010. **170**(1): p. 33-38.
87. Stephens, M.E., et al., *Streptococcal protein G enhances antibody binding to platinum sensor surfaces*. *Journal of Sensor Technology*, 2015. **5**(01): p. 1.
88. Weetall, H.H., *Biosensor technology What? Where? When? and Why?* *Biosensors and Bioelectronics*, 1996. **11**(1): p. i-iv.
89. Wang, J., *Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006. **21**(10): p. 1887-1892.
90. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures*. *Sensors*, 2008. **8**(3): p. 1400-1458.
91. Wang, Q., et al., *Development of the DNA-based biosensors for high performance in detection of molecular biomarkers: More rapid, sensitive, and universal*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022. **197**: p. 113739.
92. Nemiwal, M., T.C. Zhang, and D. Kumar, *Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2022. **156**: p. 110006.
93. Pullano, S.A., et al., *Glucose biosensors in clinical practice: Principles, limits and perspectives of currently used devices*. *Theranostics*, 2022. **12**(2): p. 493.
94. Gaidukevic, J., et al., *A simple preparation of N-doped reduced graphene oxide as an electrode material for the detection of hydrogen peroxide and glucose*. *Electrochimica Acta*, 2023. **446**: p. 142113.
95. Hosseini, S.S., et al., *Perspectives and trends in advanced DNA biosensors for the recognition of single nucleotide polymorphisms*. *Chemical Engineering Journal*, 2022. **441**: p. 135988.
96. Hua, Y., et al., *DNA-based biosensors for the biochemical analysis: A review*. *Biosensors*, 2022. **12**(3): p. 183.
97. Liu, Q., et al., *Advances in the application of molecular diagnostic techniques for the detection of infectious disease pathogens*. *Molecular Medicine Reports*, 2023. **27**(5): p. 1-14.
98. Gopal, A., et al., *Biosensors and Point-of-Care Devices for Bacterial Detection: Rapid Diagnostics Informing Antibiotic Therapy*. *Advanced Healthcare Materials*, 2022. **11**(3): p. 2101546.
99. Kalita, J.J., P. Sharma, and U. Bora, *Recent developments in application of nucleic acid aptamer in food safety*. *Food Control*, 2023. **145**: p. 109406.
100. Qian, S., et al., *Aptamers from random sequence space: Accomplishments, gaps and future considerations*. *Analytica Chimica Acta*, 2022. **1196**: p. 339511.
101. Arshavsky-Graham, S., et al., *Aptasensors versus immunosensors—Which will prevail?* *Engineering in Life Sciences*, 2022. **22**(3-4): p. 319-333.
102. Wang, Y., et al., *Construction and bioapplications of aptamer-based dual recognition strategy*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022. **195**: p. 113661.
103. Santana, L.K.L., et al., *Imunossensores eletroquímicos e suas aplicações*.
104. Erbereli, C.R., *Desenvolvimento de um imunossensor descartável para o diagnóstico precoce da doença de Alzheimer*. 2016.
105. Riccardi, C.d.S., P.I.d. Costa, and H. Yamanaka, *Imunossensor amperométrico*. *Química Nova*, 2002. **25**: p. 316-320.

106. Chen, H., et al., *An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006. **117**(1): p. 211-218.
107. Paul, A.A., et al., *Alginate-Based Applications in Biotechnology with a Special Mention to Biosensors*. 2023.
108. Wang, J., *SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(16): p. 3011-3016.
109. Adam, M.R., et al., *Advances in adsorptive membrane technology for water treatment and resource recovery applications: A critical review*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022. **10**(3): p. 107633.
110. Ahmed, M.U., et al., *Personalized diagnostics and biosensors: a review of the biology and technology needed for personalized medicine*. Critical Reviews in Biotechnology, 2014. **34**(2): p. 180-196.
111. Zhang, Y., et al., *Label-free electrochemical immunosensor based on enhanced signal amplification between Au@ Pd and CoFe 2 O 4/graphene nanohybrid*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 23391.
112. Pasqualini, J., et al., *Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre-and postmenopausal breast cancer patients*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1996. **81**(4): p. 1460-1464.
113. Howarth, N.M., et al., *Estrone sulfamates: potent inhibitors of estrone sulfatase with therapeutic potential*. Journal of medicinal chemistry, 1994. **37**(2): p. 219-221.
114. Thuler, L.C., *Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino*. Rev bras cancerol, 2003. **49**(4): p. 227-38.
115. Coille, I., G. Gauglitz, and J. Hoebeke, *Characterisation of antibodies and analytes by surface plasmon resonance for the optimisation of a competitive immunoassay based on energy transfer*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2002. **372**(2): p. 293-300.
116. Sun, N., et al., *Bioassembled Nanocircuits of Mo6S9- x I x Nanowires for Electrochemical Immunodetection of Estrone Hapten*. Analytical chemistry, 2008. **80**(10): p. 3593-3597.
117. Su, P., X.X. Zhang, and W.B. Chang, *Direct immunoassay of estrone by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2003. **24**(18): p. 3197-3201.
118. Gao, H., et al., *Electrochemical immunoassay of estrone at an antibody-modified conducting polymer electrode towards immunobiosensors*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2006. **592**(1): p. 88-94.
119. Vidal, J.C., et al., *A comparative study of immobilization methods of a tyrosinase enzyme on electrodes and their application to the detection of dichlorvos organophosphorus insecticide*. Talanta, 2006. **68**(3): p. 791-799.
120. Calvo, E.J. and C. Danilowicz, *Amperometric enzyme electrodes*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 1997. **8**: p. 563-574.
121. Kim, Y.-J. and H. Uyama, *Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2005. **62**(15): p. 1707-1723.

122. Witkop, C., *Albinism: hematologic-storage disease, susceptibility to skin cancer, and optic neuronal defects shared in all types of oculocutaneous and ocular albinism*. The Alabama journal of medical sciences, 1979. **16**(4): p. 327-330.
123. Carralero Sanz, V., et al., *Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes: Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines*. Analytica Chimica Acta, 2005. **528**(1): p. 1-8.
124. Wu, L., et al., *Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **35**(1): p. 193-199.
125. Zarbin, A.J.G., *Química de (nano)materiais*. Química Nova, 2007. **30**: p. 1469-1479.
126. de Oliveira, D.P., et al., *Electrochemical biosensor based on enzyme tyrosinase for the determination of phenol in effluents*. Quim. Nova, 2015. **38**(7): p. 924-931.
127. Duran, N., et al., *Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review*. Enzyme Microb. Technol., 2002. **31**(7): p. 907-931.
128. Song, W., et al., *Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(7): p. 3181-3186.
129. Shaikshavali, P., et al., *Development of carbon-based nanocomposite biosensor platform for the simultaneous detection of catechol and hydroquinone in local tap water*. Journal of Materials Science: Materials in Electronics, 2021. **32**(4): p. 5243-5258.
130. Mercante, L.A., et al., *Electrochemical Detection of Bisphenol A by Tyrosinase Immobilized on Electrospun Nanofibers Decorated with Gold Nanoparticles*. Electrochem, 2021. **2**(1): p. 41-49.
131. Goyal, R.N., et al., *Voltammetric determination of uric acid at a fullerene-C60-modified glassy carbon electrode*. Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 2005. **17**(24): p. 2217-2223.
132. Roy, P.R., T. Okajima, and T. Ohsaka, *Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly (N, N-dimethylaniline) film-coated GC electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2004. **561**: p. 75-82.
133. Wang, X., et al., *Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a palladium nanoparticle/graphene/chitosan modified electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2013. **695**: p. 10-16.
134. Wang, Z., Y. Wang, and G. Luo, *A selective voltammetric method for uric acid detection at β -cyclodextrin modified electrode incorporating carbon nanotubes*. Analyst, 2002. **127**(10): p. 1353-1358.
135. Pachla, L., et al., *Analytical methods for measuring uric acid in biological samples and food products*. Journal-Association of official analytical chemists, 1987. **70**(1): p. 1-14.
136. Zhang, S., M. Xu, and Y. Zhang, *Simultaneous voltammetric detection of salsolinol and uric acid in the presence of high concentration of ascorbic acid with gold nanoparticles/functionalized multiwalled carbon nanotubes composite film modified electrode*. Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 2009. **21**(23): p. 2607-2610.

137. Pagana, K.D. and T.J. Pagana, *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests-E-Book*. 2013: Elsevier Health Sciences.
138. Burkhard, S., et al., *DNA oxidatively damaged by chromium (III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N-acetyl-nformyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**: p. 775-783.
139. Nieto, F.J., et al., *Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis?* *Atherosclerosis*, 2000. **148**(1): p. 131-139.
140. Wahyuni, W.T., et al., *A Simple approach to fabricate a screen-printed electrode and its application for uric acid detection*. *Int. J. Electrochem. Sci*, 2021. **16**: p. 210221.
141. Taraborrelli, S., *Physiology, production and action of progesterone*. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 2015. **94**: p. 8-16.
142. Chaves, K.S., *Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, b-estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona no rio Paraíba do Sul*.
143. Pisani, P., et al., *Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact*. *World journal of orthopedics*, 2016. **7**(3): p. 171.
144. Facina, V.B., *Evolução do estado nutricional de mulheres com cânceres de mama, ovário ou útero e associação com a ingestão alimentar e sintomas gastrintestinais*. 2010.
145. Silva, M.L.L.S., *Desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono modificados com nanopartículas de óxido de silício e ouro como biossensores para detecção de 17-beta-estradiol*. 2021.
146. Wong, A., et al., *Voltammetric determination of 17 β -estradiol in different matrices using a screen-printed sensor modified with CuPc, Printex 6L carbon and Nafion film*. *Microchemical Journal*, 2019. **147**: p. 365-373.
147. Delgado-Andrade, C., et al., *Tryptophan determination in milk-based ingredients and dried sport supplements by liquid chromatography with fluorescence detection*. *Food Chemistry*, 2006. **98**(3): p. 580-585.
148. Badawy, A.-B., *Plasma free tryptophan revisited: what you need to know and do before measuring it*. 2010. **24**(6): p. 809-815.
149. Dinu, A. and C. Apetrei, *A Review of Sensors and Biosensors Modified with Conducting Polymers and Molecularly Imprinted Polymers Used in Electrochemical Detection of Amino Acids: Phenylalanine, Tyrosine, and Tryptophan*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(3): p. 1218.
150. Gecse, K., et al., *Association of plasma tryptophan concentration with periaqueductal gray matter functional connectivity in migraine patients*. *Scientific reports*, 2022. **12**(1): p. 1-12.
151. Hanaoka, S., J.-M. Lin, and M. Yamada, *Chemiluminescence behavior of the decomposition of hydrogen peroxide catalyzed by copper (II)-amino acid complexes and its application to the determination of tryptophan and phenylalanine*. *Analytica chimica acta*, 2000. **409**(1-2): p. 65-73.
152. Beitollahi, H., et al., *Application of Fe₃O₄@ SiO₂/GO nanocomposite for sensitive and selective electrochemical sensing of tryptophan*. *Journal of Electrochemical Science and Engineering*, 2019. **9**(1): p. 45-53.
153. Apetrei, I.M. and C. Apetrei, *Voltammetric determination of melatonin using a graphene-based sensor in pharmaceutical products*. *Int J Nanomedicine*, 2016. **11**: p. 1859-66.

154. Mayo, J.C., et al., *Melatonin and Parkinson's disease*. *Endocrine*, 2005. **27**(2): p. 169-178.
155. Lin, L., et al., *Melatonin in Alzheimer's Disease*. 2013. **14**(7): p. 14575-14593.
156. Shneider, A., A. Kudriavtsev, and A. Vakhrusheva, *Can melatonin reduce the severity of COVID-19 pandemic?* *International Reviews of Immunology*, 2020. **39**(4): p. 153-162.
157. Cardoso, R.M., et al., *Multi-walled carbon nanotubes: Size-dependent electrochemistry of phenolic compounds*. *Electrochimica Acta*, 2015. **176**: p. 36-43.
158. Araújo, D.A.G., et al., *A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid*. *Microchemical Journal*, 2020. **158**: p. 105297.
159. Orzari, L.O., et al., *Disposable electrode obtained by pencil drawing on corrugated fiberboard substrate*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018. **264**: p. 20-26.
160. Silva, V.A.O.P.d., et al., *CONSTRUÇÃO DE UM SUPORTE AJUSTÁVEL LAB-MADE IMPRESSO EM 3D PARA MEDIÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO*. *Química Nova*, 2020. **43**: p. 1312-1319.
161. Araujo, D.A.G., et al., *A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid*. *Microchemical Journal*, 2020. **158**: p. 105297.
162. García-Miranda Ferrari, A., et al., *Determination of the Electrochemical Area of Screen-Printed Electrochemical Sensing Platforms*. *Biosensors*, 2018. **8**(2).
163. Morrin, A., A.J. Killard, and M.R. Smyth, *Electrochemical Characterization of Commercial and Home-Made Screen-Printed Carbon Electrodes*. *Analytical Letters*, 2003. **36**(9): p. 2021-2039.
164. Bard, A.J., et al., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. Vol. 2. 1980: wiley New York.
165. García-Miranda Ferrari, A., et al., *Determination of the Electrochemical Area of Screen-Printed Electrochemical Sensing Platforms*. *Biosensors*, 2018. **8**(2): p. 53.
166. Argüelles-Monal, W. and C. Peniche-Covas, *Study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and carboxymethyl cellulose*. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*, 1988. **9**(10): p. 693-697.
167. Peniche, C., et al., *Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation*. *Biomaterials*, 1999. **20**(20): p. 1869-1878.
168. Wu, C.-J., et al., *Contact Angle Hysteresis on Graphene Surfaces and Hysteresis-free Behavior on Oil-infused Graphite Surfaces*. *Applied Surface Science*, 2016. **385**: p. 153-161.
169. Lau, K.K., et al., *Superhydrophobic carbon nanotube forests*. *Nano letters*, 2003. **3**(12): p. 1701-1705.
170. Campos, A.M., et al., *Size Control of Carbon Spherical Shells for Sensitive Detection of Paracetamol in Sweat, Saliva, and Urine*. *ACS Applied Nano Materials*, 2018. **1**(2): p. 654-661.
171. Baig, N. and A.-N. Kawde, *A cost-effective disposable graphene-modified electrode decorated with alternating layers of Au NPs for the simultaneous*

- detection of dopamine and uric acid in human urine*. RSC advances, 2016. **6**(84): p. 80756-80765.
172. Özcan, A. and Y. Şahin, *Preparation of selective and sensitive electrochemically treated pencil graphite electrodes for the determination of uric acid in urine and blood serum*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **25**(11): p. 2497-2502.
 173. Kong, D., et al., *Simultaneous voltammetry detection of dopamine and uric acid in human serum and urine with a poly(procaterol hydrochloride) modified glassy carbon electrode*. Talanta, 2018. **185**: p. 203-212.
 174. Yao, Y. and C. Zhang, *A novel screen-printed microfluidic paper-based electrochemical device for detection of glucose and uric acid in urine*. Biomedical Microdevices, 2016. **18**(5): p. 92.
 175. Casanova, A., et al., *A sustainable amperometric biosensor for the analysis of ascorbic, benzoic, gallic and kojic acids through catechol detection. Innovation and signal processing*. Analyst, 2020. **145**(10): p. 3645-3655.
 176. Cagnani, G.R., et al., *Fully-printed electrochemical sensors made with flexible screen-printed electrodes modified by roll-to-roll slot-die coating*. Biosensors and Bioelectronics, 2020. **165**: p. 112428.
 177. Cerrato-Alvarez, M., et al., *Fast and direct amperometric analysis of polyphenols in beers using tyrosinase-modified screen-printed gold nanoparticles biosensors*. Talanta, 2019. **193**: p. 93-99.
 178. Campanhã Vicentini, F., et al., *A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water*. Enzyme Microb Technol, 2016. **84**: p. 17-23.
 179. Vicentini, F.C., et al., *Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. **188**: p. 1101-1108.
 180. Silva, V.A.O.P., et al., *3D-printed reduced graphene oxide/polylactic acid electrodes: A new prototyped platform for sensing and biosensing applications*. Biosensors and Bioelectronics, 2020. **170**: p. 112684.
 181. Kamyshny, A. and S. Magdassi, *Conductive nanomaterials for printed electronics*. Small, 2014. **10**(17): p. 3515-3535.
 182. Hong, H., J. Hu, and X. Yan, *UV curable conductive ink for the fabrication of textile-based conductive circuits and wearable UHF RFID tags*. ACS applied materials & interfaces, 2019. **11**(30): p. 27318-27326.
 183. Wiley, B., et al., *Polyol synthesis of silver nanoparticles: use of chloride and oxygen to promote the formation of single-crystal, truncated cubes and tetrahedrons*. Nano Letters, 2004. **4**(9): p. 1733-1739.
 184. JANEGITZ, O.F.-F.T.A.S.F.C.D.M.B.C., *Potentiometry: Theoretical and Practical Aspects*. Vol. 1°. 2019. 267.
 185. Shameli, K., et al., *Green biosynthesis of silver nanoparticles using Curcuma longa tuber powder*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 5603.
 186. Anandalakshmi, K., J. Venugobal, and V. Ramasamy, *Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using Pedalium murex leaf extract and their antibacterial activity*. Applied nanoscience, 2016. **6**(3): p. 399-408.
 187. Corsino, D.C. and M.D.L. Balela. *Room temperature sintering of printer silver nanoparticle conductive ink*. IOP Publishing.

188. da Silva, V.A.O.P., et al., *Lab-made 3D-printed contact angle measurement adjustable holder*. Química Nova, 2020. **43**(9): p. 1312-1319.
189. Good, R.J., *Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review*. Journal of adhesion science and technology, 1992. **6**(12): p. 1269-1302.
190. Astm, D., *D3359-Standard test method for measuring adhesion by tape test*. Tool and Tape, 2002.
191. Lee, Y.-I. and Y.-H. Choa, *Adhesion enhancement of ink-jet printed conductive copper patterns on a flexible substrate*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(25): p. 12517-12522.
192. Shitanda, I., H. Kiryu, and M. Itagaki, *Improvement in the long-term stability of screen-printed planar type solid-state Ag/AgCl reference electrode by introducing poly(dimethylsiloxane) liquid junction*. Electrochimica Acta, 2011. **58**: p. 528-531.
193. Fernandes, I.J., et al., *Silver nanoparticle conductive inks: synthesis, characterization, and fabrication of inkjet-printed flexible electrodes*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 8878.
194. Oliveira, A.E.F., et al., *Synthesis of a silver nanoparticle ink for fabrication of reference electrodes*. Talanta Open, 2022. **5**: p. 100085.
195. Ahmed, R.K., et al., *Multivariate experimental design: towards more reliable electrochemical detection*. Current Opinion in Electrochemistry, 2022. **31**: p. 100880.
196. Chu, X., et al., *Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode*. Talanta, 2007. **71**(5): p. 2040-2047.
197. Mahshid, S.S., et al., *Template-based electrodeposition of Pt/Ni nanowires and its catalytic activity towards glucose oxidation*. Electrochimica Acta, 2011. **58**: p. 551-555.
198. Chen, X., et al., *Pulsed electrodeposition of Pt nanoclusters on carbon nanotubes modified carbon materials using diffusion restricting viscous electrolytes*. Electrochemistry Communications, 2007. **9**(6): p. 1348-1354.
199. Farka, Z., et al., *Rapid immunosensing of Salmonella Typhimurium using electrochemical impedance spectroscopy: the effect of sample treatment*. 2016. **28**(8): p. 1803-1809.
200. Kalyani, T., A. Nanda, and S.K.J.A.C.A. Jana, *Detection of a novel glycodelin biomarker using electrochemical immunosensor for endometriosis*. 2021. **1146**: p. 146-154.
201. de Oliveira, G.C.M., et al., *Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson's disease biomarkers*. 2020. **152**: p. 112016.
202. Wu, X., et al., *A novel label-free electrochemical microRNA biosensor using Pd nanoparticles as enhancer and linker*. 2013. **138**(4): p. 1060-1066.
203. Monerris, M.J., et al., *Electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles deposited on a conductive polymer to determine estrone in water samples*. Microchemical Journal, 2016. **129**: p. 71-77.
204. Kuzikov, A.V., et al., *Electrochemical oxidation of estrogens as a method for CYP19A1 (aromatase) electrocatalytic activity determination*. Electrochimica Acta, 2020. **333**: p. 135539.

205. Zhu, Y., X. Liu, and J.J.A.M. Jia, *Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode*. 2015. **7**(20): p. 8626-8631.
206. Sun, N., et al., *Bioassembled Nanocircuits of MoS₂-x I x Nanowires for Electrochemical Immunodetection of Estrone Hapten*. 2008. **80**(10): p. 3593-3597.
207. Gao, H., et al., *Electrochemical immunoassay of estrone at an antibody-modified conducting polymer electrode towards immunobiosensors*. 2006. **592**(1): p. 88-94.
208. Liu, X., P.A. Duckworth, and D.K.Y. Wong, *Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **25**(6): p. 1467-1473.
209. Laube, N., B. Mohr, and A.J.J.o.C.G. Hesse, *Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines*. 2001. **233**(1-2): p. 367-374.
210. Mikhralieva, A., et al., *Carbon Nanodots with Solvatochromic Photoluminescence for the Electrochemical Determination of Estrogenic Steroids*. *ACS Applied Nano Materials*, 2022. **5**(8): p. 10962-10972.
211. Zhu, Y., X. Liu, and J. Jia, *Electrochemical detection of natural estrogens using a graphene/ordered mesoporous carbon modified carbon paste electrode*. *Analytical Methods*, 2015. **7**(20): p. 8626-8631.
212. Costa, S., et al., *Characterization of carbon nanotubes by Raman spectroscopy*. *Materials Science-Poland*, 2008. **26**(2): p. 433-441.
213. Poukhovoi, A., et al., *Assessment of spectroscopic methods for the characterisation of DLC films deposited by PECVD*. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 2012. **14**(March-April 2012): p. 383-392.
214. Ronkainen, N.J., H.B. Halsall, and W.R. Heineman, *Electrochemical biosensors*. *Chemical Society Reviews*, 2010. **39**(5): p. 1747-1763.
215. Boonchiangma, S., et al., *A highly selective electrochemical sensor for l-tryptophan based on a screen-printed carbon electrode modified with poly-p-phenylenediamine and CdS quantum dots*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014. **131**(11).
216. Fooladi, E., et al., *Application of carboxylic acid-functionalized of graphene oxide for electrochemical simultaneous determination of tryptophan and tyrosine in milk*. *SN Applied Sciences*, 2020. **2**(4): p. 527.
217. Nazarpour, S., R. Hajian, and M.H. Sabzvari, *A novel nanocomposite electrochemical sensor based on green synthesis of reduced graphene oxide/gold nanoparticles modified screen printed electrode for determination of tryptophan using response surface methodology approach*. *Microchemical Journal*, 2020. **154**: p. 104634.

Anexo 1 - Publicações no período do doutorado direto

1. Araújo, D.A.G., **Camargo J. R.**, Pradela-Filho, L. A., Lima A. P., Muñoz, R. A.A., Takeuchi, R. M., Janegitz B. C. & Santos, A. L. “A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid”, **Microchemical Journal**, Volume 158, 2020, 105297, ISSN 0026-265X.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105297>
2. de Oliveira, G. C. M., **Camargo, J. R.**, Vieira, N. C. S., & Janegitz, B. C. (2020). “A new disposable electrochemical sensor on medical adhesive tape”. **Journal of Solid State Electrochemistry**, Volume 24, 10, 2271-2278.
<https://doi.org/10.1007/s10008-020-04732-w>
3. Gustani, F. M., Silva, T. A., **Camargo, J. R.**, Carvalho, J. H. d. S., Janegitz, B. C., Fujihara, R. T. “Synthesis, attractiveness and effectiveness of chitosan-tapioca encapsulates in *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)”. **Journal of Polymers and the Environment**. vol. 29, p. 2869–2880, 2021.
<https://doi.org/10.1007/s10924-021-02084-8>
4. Henrique, Júlia M.; **Camargo, J. R.**; Oliveira, Geiser G.; Stefano, Jéssica, S.; Janegitz, Bruno C. “Disposable electrochemical sensor based on shellac and graphite for sulfamethoxazole detection”. **Microchemical Journal**, vol. 170, art. 106701, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106701>
5. **Camargo, J. R.**; Orzari, Luiz O.; Araújo, Diele A. G.; Oliveira, Paulo R.; Kalinke, Cristiane; Rocha, Diego P.; Santos, André L.; Takeuchi, Regina M.; Muñoz, Rodrigo A. A.; Bonacin, Juliano A.; Janegitz, Bruno C. “Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors”. **Microchemical Journal**, vol. 164, art. 105998, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.105998>

6. **Camargo, J. R.**, Almeida Silva, Tiago, Rivas, Gustavo A. Janegitz, Bruno C. “Novel eco-friendly water-based conductive ink for the preparation of disposable screen-printed electrodes for sensing and biosensing applications”. **Electrochimica Acta**. vol. 409, art. 139968, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2022.139968>
7. **Camargo, J. R.**, Fernandes-Junior W. S., Azzi, D. C., Rocha, R. G, Faria L. V. Richter, E. M., Muñoz R. A. A., Janegitz B. C. “Development of New Simple Compositions of Silver Inks for the Preparation of Pseudo-Reference Electrodes” **Journal Biosensors**. Vol. 12, Issue 9, Pages 761, MDPI, 2022
<https://doi.org/10.3390/bios12090761>
8. Blasques, R. V., Stefano J. S., **Camargo J. R.**, Guterres e Silva, L. R., Brazaca L. C., Janegitz B. C. “Disposable Prussian blue-anchored electrochemical sensor for enzymatic and non-enzymatic multi-analyte detection” **Sensors and Actuators Reports**. Vol. 4, art. 100118, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100118>
9. Silva R. M., da Silva A. D., **Camargo, J. R.**, de Castro B. S., Meireles L. M., Silva, P. S., Janegitz B. C., Silva T. A. “Carbon nanomaterials-based screen-printed electrodes for sensing applications” **Biosensors**, Vol. 13, Issue 4, Pages 453, MDPI, 2023.
<https://doi.org/10.3390/bios13040453>
10. Orzari, L. O., **Camargo, J. R.**, Blasques, R. V., Marcolino-Junior, L. H., Bergamini M. F., Janegitz, B. C. “Use of Metallic Nanostructures in Electrochemical Biosensing of SARS-CoV-2” Book “**Covid-19 Metabolomics and Diagnosis: Volume 2**”, pages 61-70, 2023.
11. Ferreira, L. M. C., Reis, I. F., Martins, P. R., Marcolino-Junior, L. H., Bergamini, M. F., **Camargo, J. R.**, Janegitz, B. C., Vicentini, F. C., “Using low-cost disposable immunosensor based on flexible PET screen-printed electrode modified with carbon

black and gold nanoparticles for sensitive detection of SARS-CoV-2” *Talanta open*, Vol. 7, art. 100201, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.talo.2023.100201>

12. Brazaca, L. C., Imamura, A. H., Blasques, R. V., **Camargo, J. R.**, Janegitz, B. C., Carrilho, E. “The use of biological fluids in microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs): Recent advances, challenges and future perspectives” **Biosensors and Bioelectronics**. Art. 115846, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115846>

13. Crapnell, R. D., Arantes, I. V. S., **Camargo, J. R.**, Bernalte, E., Whittingham, M. J., Janegitz, B. C, Paixão, T. R. L. C., Banks C. E. “Multi-walled carbon nanotubes/carbon black/rPLA for high-performance conductive additive manufacturing filament and the simultaneous detection of acetaminophen and phenylephrine” **Microchimica Acta**. Vol. 191, issue 2, page 96, 2024.

<https://doi.org/10.1007/s00604-023-06175-2>

14. de Oliveira, P. R., de Freitas, R. C., Carvalho, J. H. de S., **Camargo, J. R.**, Guterres e Silva, L. R., Janegitz, B. C., “Overcoming disposable sensors pollution: Using of circular economy in electrodes application”, **Current Opinion in Environmental Science & Health**, Vol. 38, Art. 100540, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2024.100540>.

15. Camargo, J. R, Cleto, S., Neumann, A., Azzi, D.C., Crapnell, R. D., Banks, C. E., Janegitz, B. C., “Edible gold leaf as a viable modification method for screen-printed sensors” **Electrochimica Acta**. Vol. 478, Art. 143825, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.143825>