UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

Letícia Francine Mendes

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO MODIFICADO COM
POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIP) VISANDO À
QUANTIFICAÇÃO DE CORTISOL

Versão Corrigida da dissertação defendida

SÃO PAULO
Data do depósito na SPG:
16/03/2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Letícia Francine Mendes

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO MODIFICADO COM
POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIP) VISANDO À
QUANTIFICAÇÃO DE CORTISOL**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestra em Ciências (no Programa de
Química)*

Orientador: Prof. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão

SÃO PAULO

Data do depósito na SPG:

16/03/2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M 538d   Mendes, Letícia Francine
                 DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO
                 MODIFICADO COM POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS
                 (MIP) VISANDO À QUANTIFICAÇÃO DE CORTISOL / Letícia
                 Francine Mendes. - São Paulo, 2018.
                 117 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: Paixão, Thiago Regis Longo Cesar da

1. Cortisol. 2. Eletrodo modificado. 3. MIP. 4.
Dispositivo descartável. I. T. II. Paixão, Thiago
Regis Longo Cesar da , orientador.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, amigo e abrigo presente em todos os momentos, ao meu pai Marco e minha mãe Walkiria, que são os grandes responsáveis pela pessoa que sou e a minha irmã Larissa, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as portas que abriu em meu caminho durante essa etapa da minha vida, por sempre estar ao meu lado me iluminando, me amparando e me protegendo.

Agradeço também aos meus pais e minha irmã por todo o apoio, carinho, dedicação e por sempre acreditarem em mim, fazendo o possível para me ajudarem em minhas conquistas.

Ao prof^o. Dr. Thiago Regis Longo Cesar da Paixão, orientador que com sabedoria soube dirigir meus passos e pensamentos para o alcance de meus objetivos. Principalmente por sempre me auxiliar prontamente, e pela amizade, compartilhando comigo seus conhecimentos.

Aos amigos de laboratório e do grupo de pesquisa por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Em especial ao William Reis de Araujo, por me socorrer nos momentos difíceis da pesquisa, pela amizade e incentivo, compartilhando comigo seus conhecimentos e me auxiliando nos momentos necessários. Também dedico um agradecimento especial a Vanessa Neiva de Ataíde, Thiago Matheus Guimarães Selva, Jéssica Soares, Raphael Bacil de Prata, Akira Ameku e Rafael Silva, por toda a amizade, o companheirismo e incentivo.

À Maria Cristina, técnica do laboratório, por toda a amizade, carinho, incentivo e ajuda que me deu durante essa etapa de minha vida, sendo uma segunda mãe para mim.

À FAPESP pela bolsa de mestrado (Processo: 2016/07416-6 e suporte financeiro concedido, assim como à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro ao laboratório e a bolsa no período inicial do projeto.

Aos meus colegas pelo companheirismo de sempre, por sempre me apoiarem, e por me darem o prazer da amizade tornando essa etapa de minha vida muito mais especial e divertida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização dessa dissertação de mestrado.

*“Se a meta principal de um capitão fosse preservar seu barco,
ele o conservaria no porto para sempre.”*

São Tomás de Aquino

RESUMO

MENDES, Leticia Francine. Desenvolvimento de sensor eletroquímico modificado com polímeros molecularmente impressos (MIP) visando à quantificação de cortisol. 2018. 117f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O cortisol é um hormônio associado a vários processos fisiológicos importantes. Esta dissertação apresenta estudos sobre o desenvolvimento de um sensor eletroquímico simples e de baixo custo visando à quantificação do cortisol sem a necessidade de modificação da superfície do sensor com biomoléculas. Inicialmente, o foco do trabalho foi o desenvolvimento de um método analítico visando à detecção direta de cortisol utilizando eletrodos não modificados de carbono vítreo. Estes estudos mostraram problemas de reprodutibilidade devido à grande adsorção da molécula de cortisol ou seus produtos de redução na superfície do eletrodo. Assim, avaliou-se o uso de eletrodos de grafite como dispositivos descartáveis em plataformas de papel. Uma boa linearidade foi observada em um intervalo de concentração semelhante ao apresentado nos estudos envolvendo o eletrodo de carbono vítreo (10 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Diante desse resultado, os dispositivos portáteis de baixo custo apresentaram ótimas características analíticas em comparação ao método anterior mostrando à potencialidade para aplicação em amostras reais.

Concomitantemente, polímeros impressos molecularmente (MIPs) fabricados por processos químicos e eletroquímicos foram estudados com o intuito de aumentar a seletividade para a análise de cortisol. Os MIPs quimicamente fabricados foram sintetizados usando acrilamida como monômero e N, N'-metilenobisacrilamida como agente de reticulante. Este material recombina-se com sucesso com o analito segundo os estudos de UV-Vis, no entanto a imobilização na superfície do eletrodo não foi possível. Assim, a polimerização eletroquímica do pirrol foi avaliada como uma maneira simples de produzir o MIP diretamente na superfície do eletrodo. A recombinação da molécula molde com os eletrodos modificados foi verificada por voltametria cíclica e técnica de microbalança eletroquímica de cristal de quartzo. A segunda abordagem apontou resultados promissores para o desenvolvimento de sensor piezelétrico modificado para detecção de cortisol.

Palavras-chave: Cortisol, eletrodo modificado, MIP, dispositivo descartável.

ABSTRACT

MENDES, Leticia Francine. Development of electrochemical sensor modified with molecularly imprinted polymers (MIP) aiming cortisol quantification. 2018. 117f. Masters dissertation – Graduate Program in Chemistry. Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Cortisol is a hormone associated with several important physiological processes. This master's dissertation reports studies about the development of a simple and low cost electrochemical sensor aiming at the quantification of cortisol without the need of biomolecules immobilized at sensor surface. Initially, the focus was the development of an analytical method for the direct detection of cortisol using bare glassy carbon electrodes. These studies have shown problems of reproducibility due to large adsorption of the cortisol molecule or its reduction products on the electrode surface. Thus, it was evaluated the use of graphite electrodes as disposable devices in paper-based platform. A good linearity was observed in a concentration range similar to that obtained in studies involving the glassy carbon electrode (from 10 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). In light of this result, the proposed low-cost portable devices presented great analytical features and low-cost in comparison with the previous method with potentiality for application in real samples.

Concomitantly, molecularly imprinted polymers (MIPs) fabricated by chemical and electrochemical processes were studied to enhance the selectivity for cortisol analysis. The chemically manufactured MIPs were synthesized using acrylamide as monomer and N, N'-methylenebisacrylamide as crosslinking agent. This material recombine successfully with the analyte according the UV-Vis study, but it was difficult to immobilize this material at the electrode surface. The electrochemical polymerization of pyrrole was evaluated as a simple way to produce the MIP directly on the electrode surface. The recombination of the template molecule with the modified electrodes was verified by cyclic voltammetry and electrochemical quartz crystal microbalance technique. The second approach pointed out promisor results to the development of modified piezoelectric sensor for cortisol detection.

Keywords: Cortisol, modified electrode, MIP, disposable device.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema geral dos principais componentes de um sensor químico. Adaptada com permissão da referência [1].	23
Figura 1.2. Diferentes tipos de voltametria.	29
Figura 1.3. Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso.	31
Figura 1.4. Sinal de excitação de potencial na voltametria de pulso diferencial e os respectivos A) pontos de amostragem de corrente e B) parâmetros importantes da técnica.	32
Figura 1.5. Sinal de excitação de potencial na voltametria de onda quadrada, A) os parâmetros importantes da técnica B) e os respectivos pontos de amostragem de corrente.	33
Figura 1.6. Estruturas químicas de hormônios esteróides.	36
Figura 1.7. Resposta do corpo ao estresse. Adaptado da referência [42].	37
Figura 1.8. Representação esquemática de imunossensor. Fonte própria.	40
Figura 1.9. Representação esquemática da síntese do MIP, destacando diferentes abordagens de interações entre a molécula molde e o sítio de ligação no polímero: (a) Ligações não covalentes, por exemplo, ligação de hidrogênio entre molécula molde e o monômeros como ácido metacrílico, acrilamida, etc.; (b) interações covalentes; (c) interações semi-covalente; (D) interação eletrostática com um monômero carregado com carga oposta. Adaptada com permissão da referência [66].	41
Figura 1.10. Esquema representativo da síntese do MIP para reconhecimento da molécula do cortisol. Fonte própria.	43
Figura 3.1. Fabricação dos eletrodos descartáveis.	48
Figura 3.2. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MIP pela técnica <i>casting</i> .	50
Figura 3.3. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MIP pela técnica <i>spin coating</i> , utilizando PDMS.	52
Figura 4.1. A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 4,5 sem (—) e com a adição de 0,5 mmol L ⁻¹ de cortisol (—) para o primeiro ciclo e (—) para o terceiro ciclo, utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado. Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹ , sentido da varredura inicial de 0 a -1,5 V. B) Detalhe contendo somente voltamogramas em solução tampão (—) e após adição de 0,5 mmol L ⁻¹ de cortisol para o primeiro ciclo (—).	56

- Figura 4.2.** A) Voltamogramas de pulso diferencial, A) sem e B) com correção de linha base registrado em eletrodo de carbono vítreo na (—) ausência e na (—) presença de 0,2 mmol L⁻¹ cortisol em 0,1 mol L⁻¹ tampão acetato pH 4,5. Parâmetros: E_{step}= 6 mV (velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹), amplitude do pulso de 50 mV, faixa de potencial de -0,8 à -1,7 V. 57
- Figura 4.3.** A) Voltamogramas de pulso diferencial em eletrodo de carbono vítreo na presença de 0,2 mmol L⁻¹ cortisol em diferentes valores de pH. Os eletrólitos utilizados foram: 0,1 mol L⁻¹ ácido sulfúrico pH 1,0; 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 2,0; 0,1 mol L⁻¹ tampão acetato pH 4,5; 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 6,5; 0,1 mol L⁻¹ tampão amoniacal pH 9,0; e 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 12,0. Parâmetros: E_{step}= 6 mV (velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹), amplitude do pulso de 50 mV, faixa de potencial de -1 à -1,7 V. B) Gráfico de I_p vs.pH e E_p vs.pH (E_p = -0,059 pH - 0,970; R² 0,99). 58
- Figura 4.4.** Voltamogramas de onda quadrada registrados utilizando eletrodo de carbono vítreo em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (—), pH 4,5 contendo 20 µmol L⁻¹ de cortisol sem etapa de adsorção prévia (—) e com etapa prévia de adsorção (—). Parâmetros: E_{step} -8,33 mV, amplitude de -50 mV e frequência de 60 Hz; Etapa de adsorção: -1,1 V durante 120 s. 59
- Figura 4.5.** Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, para diferentes concentrações de cortisol: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Em destaque: Curva analítica I = -0,012 - 0,010 C_{Cort}; R²=0,99. 60
- Figura 4.6.** Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 para quantificação de cortisol em a) Otosporin® pelo método de adição de padrão e três adições consecutivas de cortisol b) 20 µmol L⁻¹, c) 40 µmol L⁻¹, d) 60 µmol L⁻¹, utilizando eletrodo de carbono, de -1,0 a -1,5 V: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica I = -0,269 - 0,011 C_{Cort}; R²=0,99. 61
- Figura 4.7.** Testes de reprodutibilidade das medidas de voltametria de onda quadrada de -1,0 a -1,5 V em eletrodo de carbono vítreo para A) 20 µmol L⁻¹ e B) 80 µmol L⁻¹ de cortisol em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. 62
- Figura 4.8.** A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução contendo 0,5 mmol L⁻¹ de cortisol em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 utilizando eletrodo de carbono vítreo

na ausência de O_2 (—), oxigênio proveniente do ar (—) e saturando o meio com O_2 (—). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} 63

Figura 4.9. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, para diferentes concentrações de cortisol utilizando eletrodo de carbono vítreo e retirando O_2 do meio pela saturação do meio com argônio: $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Em destaque: Curva de calibração $I = -0,355 - 0,009 C_{\text{Cort}}$; $R^2=0,97$ 63

Figura 4.10. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, para diferentes concentrações de cortisol utilizando eletrodo de carbono vítreo e saturando o meio de O_2 : $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva de calibração $I = -0,010 - 0,010 C_{\text{Cort}}$; $R^2=0,74.64$

Figura 4.11. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e polimento em alumina entre as medidas: $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. 64

Figura 4.12. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica por voltametria cíclica em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 entre as medidas: $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz..... 65

Figura 4.13. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica pelo método pulsado em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 entre as medidas: $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz..... 66

Figura 4.14. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica por voltametria cíclica em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de NaOH entre as medidas: $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz..... 66

Figura 4.15. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica por voltametria cíclica em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de Na_2CO_3 entre as medidas: $E_{\text{step}} = -8,33\text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. 67

Figura 4.16. A) Voltamogramas cíclicos registrados em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 ($E_{\text{step}} = 5\text{ mV}$ e 100 mV s^{-1}) contendo $0,5\text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol e de B) onda quadrada ($E_{\text{step}} = -8\text{ mV}$; Amplitude = -40 mV; Frequência = 25 Hz) contendo $20\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ de

cortisol em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, utilizando eletrodo de carbono vítreo (—) na ausência de CTAB, (—) presença de 3 mmol L^{-1} e de (—) $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB..... 68

Figura 4.17. Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio orgânico de DMSO e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamonio de -1,1 a -1,6 V para diferentes concentrações de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz..... 69

Figura 4.18. Voltamogramas cíclicos registrados em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de 0 a -1,6 V (—) na ausência e (—) na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro: $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ e velocidade de varredura 100 mV s^{-1} 69

Figura 4.19. Voltamogramas cíclicos registrado no processo de modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com $2 \mu\text{L}$ de dispersão de óxido de grafeno (OG) 1 mg mL^{-1} em meio de sulfato de sódio 50 mmol L^{-1} de 1,0 a -1,2 V: $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ e velocidade de varredura 50 mV s^{-1} e desoxigenação do eletrólito suporte com argônio. 70

Figura 4.20. Voltamogramas cíclicos registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de -0,3 a 0,7 V em a) eletrodo limpo e b) Eletrodo modificado com oxido de grafeno reduzido eletroquimicamente: $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ e velocidade de varredura 100 mVs^{-1} 71

Figura 4.21. Voltamogramas cíclicos registrados utilizando eletrodo de carbono vítreo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato pH 4,5 não modificado e modificado com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente em (b, c) e na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de hidrocortisona em (a, d). Em destaque: Voltamogramas cíclicos em eletro de carbono vítreo limpo. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} 72

Figura 4.22. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 com e sem $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} para quantificação de cortisol utilizando eletrodo de grafite suportados em plataforma de papel, de -0,5 a -1,5 V: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. 73

Figura 4.23. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. 74

Figura 4.24. Voltamogramas de onda quadrada normalizados pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 e K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mmol L ⁻¹ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: E _{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica I = 0,014 + 0,005 C _{Cort} ; R ² =0,97.	74
Figura 4.25. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 e K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mmol L ⁻¹ para quantificação de cortisol, retirando O ₂ pela saturação do meio com argônio e utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: Estep = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.	75
Figura 4.26. Voltamogramas de onda quadrada normalizados pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 e K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mmol L ⁻¹ para quantificação de cortisol, retirando O ₂ pela saturação do meio com argônio e utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: Estep = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica I = -0,017 + 0,005 CCort; R ² =0,95.	76
Figura 4.27. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 e K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mmol L ⁻¹ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite imobilizado em plataforma de papel, de -0,5 a -1,5 V: Estep = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.	77
Figura 4.28. Voltamogramas de onda quadrada normalizados pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,5 e K ₃ Fe(CN) ₆ 0,5 mmol L ⁻¹ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite imobilizado em plataforma de papel, de -0,5 a -1,5 V: E _{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica I = 0,0031 + 0,0008C _{Cort} ; R ² =0,99.	77
Figura 4.29. Espectros UV-Vis registrados do sobrenadante durante o processo de lavagem do a) MIP e b) NIP em DMSO.	80
Figura 4.30. Espectros UV-Vis registrados de uma solução contendo 100 µmol L ⁻¹ de cortisol em DMSO e após a adição do MIP e NIP à solução.	80
Figura 4.31. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V em solução contendo 60 µmol L ⁻¹ de cortisol, utilizando (—) eletrodo de carbono vítreo e (—) eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP após 15 min na mesma solução: E _{step} = -8 mV; Amplitude = -40 mV; Frequência = 25 Hz.	82

Figura 4.32. Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V em eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de A) MIP e B) MIP-cortisol com o decorrer do tempo em solução sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹ .	82
Figura 4.33. Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V em eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de A) NIP e B) NIP-cortisol com o decorrer do tempo em solução sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹ .	83
Figura 4.34. Comparação dos voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V em eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP, MIP-cortisol, NIP e NIP-cortisol após 10 min em solução sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹ .	84
Figura 4.35. A) Voltamogramas cíclicos e B) voltamogramas de pulso diferencial registrados após 20 min em 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP com sucessivas adições de cortisol ao meio. Velocidade de varredura na voltametria cíclica 100 mV s ⁻¹ e parâmetros da voltametria de pulso diferencial: E _{step} = 5mV e amplitude do pulso 50mV.	85
Figura 4.36. A) Voltamogramas cíclicos e B) voltamogramas de pulso diferencial registrados após 15 min em 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP deixando o eletrodo primeiramente em solução de cortisol durante quinze minutos. Velocidade de varredura na voltametria cíclica 100 mV s ⁻¹ e parâmetros da voltametria de pulso diferencial: E _{step} = 5mV e amplitude do pulso 50 mV.	85
Figura 4.37. A) Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ , de -0,3 a 0,7 V, utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com (A e B) 20 mg e com (C e D) 10 mg de MIP. Medidas realizadas com o passar do tempo do eletrodo modificado em solução sob agitação. Velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹ .	87
Figura 4.38. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 min sob agitação em solução 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com PDMS: velocidade de varredura 100 mV s ⁻¹ .	88
Figura 4.39. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 min sob agitação em solução 0,1 mol L ⁻¹ KCl e K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP pela técnica de "spin coating" com sucessivas adições de	

cortisol ao meio (velocidade de varredura 100 mV s^{-1}), e em **B)** a respectiva curva de corrente de pico em função das adições de cortisol..... 88

Figura 4.40. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 min sob agitação em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} de $-0,3$ a $0,7 \text{ V}$ utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP pela técnica de "*spin coating*" com sucessivas adições de cortisol ao meio após 5 dias de modificação em eletrodo já utilizado, e em **B)** a respectiva curva de corrente de pico em função das adições de cortisol..... 90

Figura 4.41. A) Voltamogramas cíclicos após 5 min sob agitação em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} de $-0,3$ a $0,7 \text{ V}$ utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com NIP pela técnica de "*spin coating*" com sucessivas adições de cortisol ao meio, e em **B)** a respectiva curva de corrente de pico em função das adições de cortisol. 91

Figura 4.42. Voltamogramas cíclicos registrados para o processo de A) modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo em solução contendo $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L^{-1} de $0,9$ a 0 V (10 ciclos). B) Voltamogramas ciclos registrados durante o processo de extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 25 ciclos de $-0,2$ a $0,8 \text{ V}$: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} 93

Figura 4.43. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de $-0,6$ a $0,8 \text{ V}$ para eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (Figura 4.42). Antes e após extração (que foi realizada duas vezes na mesma condição): Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} 93

Figura 4.44. Voltamogramas cíclicos registrados para o processo de A) modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo em solução contendo $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de pirrol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L^{-1} de $0,9$ a 0 V (10 ciclos). B) Voltamogramas ciclos registrados durante o processo de extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 25 ciclos de $-0,2$ a $0,8 \text{ V}$: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} 95

Figura 4.45. Voltamogramas cíclicos da extração do cortisol da matriz polimérica em A) 1 mol L^{-1} de KCl durante 25 ciclos de $-0,2$ a $0,8 \text{ V}$ e em B) 1 mol L^{-1} de KNO_3 durante 25 ciclos de $-0,2$ a $0,8 \text{ V}$: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} 96

Figura 4.46. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de $-0,6$ a $0,8 \text{ V}$ para eletrodo de carbono vítreo

(—) limpo e modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (Figura 4.44), (—) antes e após extração do cortisol em (—) 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4, (—) 1 mol L⁻¹ de KCl e (—) 1 mol L⁻¹ de KNO₃ utilizando voltametria cíclica: Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. 97

Figura 4.47. Voltamogramas cíclicos registrados durante a extração do cortisol da matriz polimérica em 0,1 mol L⁻¹ de perclorato de tetrabutilamonio em meio de DMSO, durante 25 ciclos de -0,2 a 0,8 V: Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹. 98

Figura 4.48. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 e K₃Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ de -0,6 a 0,8 V para eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (condições iguais da Figura 4.44), (—) antes e após extração do cortisol em (—) DMSO quimicamente durante 30 min sob agitação, (—) DMSO por voltametria cíclica e (—) em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 quimicamente durante 30 min sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. 98

Figura 4.49. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 e K₃Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ de -0,6 a 0,8 V para eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (condições iguais da Figura 4.44), (—) antes e (—) após extração química do cortisol em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 durante 30 min sob agitação e modificado com NIP nas mesmas condições (—) antes e (—) após simulação da extração química do cortisol em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 durante 30 min sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹. 99

Figura 4.50. A) Síntese do MIP utilizando eletropolimerização do pirrol em cristal piezelétrico de ouro para corrente e frequência versus potencial, em 0,08 mol L⁻¹ de pirrol, 0,1 mol L⁻¹ de KCl e 5 mmol L⁻¹ de cortisol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L⁻¹ de 0,9 a 0 V (5 ciclos). B) Extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 durante 12 ciclos de -0,2 a 0,8 V para corrente e frequência versus potencial: Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹. C) Gráfico de frequência versus tempo em tampão fosfato pH 7,4, do eletrodo modificado, para as adições de 10 µL de uma solução 5 mmol L⁻¹ de cortisol em etanol, representada pelas setas pretas, e adições de tampão de tampão + etanol representada pelas setas azuis. 101

Figura 4.51. A) Síntese do NIP utilizando eletropolimerização do pirrol em cristal piezelétrico de ouro para corrente e frequência versus potencial, em 0,08 mol L⁻¹ de pirrol, 0,1 mol L⁻¹ de KCl e 1,25 mL de etanol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L⁻¹

de 0,9 a 0 V (5 ciclos). B) Simulação da extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 durante 12 ciclos de -0,2 a 0,8 V para corrente e frequência versus potencial: Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹. C) Gráfico de frequência versus tempo em tampão fosfato pH 7,4, do eletrodo modificado, para as adições de 10 µL de uma solução 5 mmol L⁻¹ de cortisol em etanol, representada pelas setas pretas, e adições de tampão de tampão e etanol representada pelas setas azuis.. 102

LISTA DE TABELA

Tabela 4.1. Valores do desvio padrão, limite de detecção e quantificação para análise de hidrocortisona utilizando voltametria de onda quadrada.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A</i>	Área
<i>AC</i>	Corrente alternada
<i>ACTH</i>	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
<i>C</i>	Condutividade
<i>CC</i>	Corrente contínua
<i>C_{cort}</i>	Concentração de cortisol
<i>C_o</i>	Concentração das espécies eletroativas
<i>Cort</i>	Cortisol
<i>CRH</i>	<i>Corticotropin Rellasing Hormone</i>
<i>CTAB</i>	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>D_o</i>	Coeficiente de difusão
<i>DP_{Brando}</i>	Desvio padrão do branco
<i>Δ<i>f_{cort}</i></i>	Frequência após adições de cortisol
<i>E_{1/2}</i>	Potencial de meia altura
<i>E_{cell}</i>	Potencial da célula
<i>E_{cell}⁰</i>	Potencial padrão da célula
<i>E_f</i>	Potencial final
<i>E_i</i>	Potencial inicial
<i>E_{máx}</i>	Potencial máximo
<i>E_{mín}</i>	Potencial mínimo
<i>E_{step}</i>	Potencial de passo
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-Linked Immunono Sorbent Assay</i>
<i>E_p</i>	Potencial de pico
<i>EQCM</i>	<i>Electrochemical Quartz Crystal Microbalance</i>
<i>GC - MS</i>	Gas Chromatography/mass Spectrometry
<i>OG</i>	Óxido de Grafeno
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>HPLC - MS</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography/mass Spectrometry</i>
<i>i</i>	Corrente
<i>i_c</i>	Corrente de redução do cortisol

i_f	Corrente de redução do ferricianeto
I_{pa}	Corrente de pico de oxidação
I_{pc}	Corrente de pico de redução
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
MIP-Cortisol	MIP na presença de cortisol
NIP	<i>Non Imprinted Polymers</i>
NIP-Cortisol	NIP na presença de cortisol
PDMS	Polidimetilsiloxano
R	Resistência
S	Sensibilidade
TAc	Tampão Acetato
UV-Vis	Ultravioleta visível
v	Velocidade de varredura
$W_{1/2}$	Largura de meia altura
Z	Impedância
τ	Período

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	SENSORES QUÍMICOS.....	23
1.1.1	Sensores eletroquímicos	24
1.1.1.1	<i>Técnicas voltamétricas.....</i>	<i>28</i>
1.1.1.2	<i>Dispositivo baseado em papel.....</i>	<i>34</i>
1.2	HORMÔNIOS	35
1.2.1	Cortisol	36
1.2.2	Sensores para determinação e quantificação de cortisol	38
1.3	POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPS)	40
1.3.1	Sensores baseados em MIPS.....	41
1.3.1.1	<i>Sensores eletroquímicos baseados em MIPS.....</i>	<i>42</i>
1.3.2	Sensores baseados em MIPS para cortisol.....	42
2	OBJETIVOS.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1	PARTE 1 – AVALIAÇÃO DA ELETROATIVIDADE DO CORTISOL.....	43
3.1.1	Estudo inicial do comportamento eletroquímico cortisol	44
3.1.2	Estudo do comportamento eletroquímico em diferentes valores de pH 44	
3.1.3	Estudos analíticos	45
3.2	PARTE 2 – ELETRODOS DESCARTÁVEIS	47
3.3	PARTE 3 - POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPS)	49
3.3.1	MIPs quimicamente sintetizados.....	49
3.3.2	Testes realizados com os MIPs quimicamente sintetizados	50
3.3.2.1	<i>Capacidade de recombinação da molécula molde.....</i>	<i>50</i>
3.3.2.2	<i>Eletrodo modificado pela técnica de "casting" .....</i>	<i>50</i>
3.3.2.3	<i>Eletrodo modificado pela técnica de "spin coating".....</i>	<i>52</i>

3.3.3	MIPs eletroquimicamente sintetizados.....	53
3.3.3.1	<i>Testes eletroquímicos dos MIP.....</i>	<i>54</i>
3.3.3.2	<i>Testes dos MIP utilizando microbalança de quartzo.....</i>	<i>54</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1	PARTE 1 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO CORTISOL	55
4.1.1	Estudo do comportamento eletroquímico cortisol.....	55
4.1.2	Estudo do comportamento eletroquímico em diferentes valores de pH 56	
4.1.3	Estudos analíticos	58
4.2	PARTE 2 – ELETRODOS DESCARTÁVEIS	72
4.3	PARTE 3 - POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPs)	78
4.3.1	MIPs quimicamente sintetizados.....	79
4.3.2	Testes realizados com os MIPs quimicamente sintetizados	79
4.3.2.1	<i>Capacidade de recombinação da molécula molde.....</i>	<i>80</i>
4.3.2.2	<i>Eletrodo modificado pela técnica de "casting" .....</i>	<i>81</i>
4.3.2.3	<i>Eletrodo modificado pela técnica de "spin coating" .....</i>	<i>87</i>
4.3.3	MIPs eletroquimicamente sintetizados.....	91
4.3.3.1	<i>Testes eletroquímicos dos MIP.....</i>	<i>92</i>
4.3.3.2	<i>Testes dos MIP utilizando microbalança de quartzo.....</i>	<i>100</i>
5	CONCLUSÃO	103
6	PERSPECTIVAS	104
6.1	ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE CORTISOL: ...	104
6.2	ELETRODOS MODIFICADOS PARA DETECÇÃO DE CORTISOL:	105
7	REFERÊNCIAS	105
8	SÚMULA CURRICULAR	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 SENSORES QUÍMICOS

Sensores químicos são dispositivos capazes de transformar informação química de uma amostra de interesse em um sinal analítico mensurável [1-3]. Essas informações químicas podem ser devido a uma propriedade físico-química do sistema em questão, ou devido a uma reação química do analito [3].

Esses dispositivos são compostos de duas unidades funcionais, o receptor e transdutor. No receptor o analito interage com o elemento de reconhecimento, interação essa que pode ser mais ou menos seletiva. Assim o elemento de reconhecimento pode ser formado por um material capaz de interagir com o analito, ou que contenha sítios de reconhecimento do mesmo. Já o transdutor, palavra derivada do latim "transducere", que significa "transferir ou traduzir", tem a função de transformar o sinal obtido como resposta em um sinal analítico mensurável [1, 3, 4].

Figura 1.1. Esquema geral dos principais componentes de um sensor químico.

Adaptada com permissão da referência [1].

Desse modo, os biossensores são uma subclasse dos sensores químicos, onde o elemento de reconhecimento contém um componente biológico responsável pelo reconhecimento molecular do analito de interesse, como por exemplo, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, entre outros, que são muito utilizados a fim de garantir especificidade ou alta seletividade [1].

Os tipos de transdutores podem ser químicos ou físicos, utilizados para monitorar as mudanças na composição química ou em propriedades físicas,

respectivamente, dos elementos de reconhecimento, ocasionadas pela interação com o analito [1]. E os tipos de sensores químicos podem ser classificados de acordo com a propriedade escolhida para obtenção do sinal, como por exemplo, sensores ópticos, térmicos, de massa ou eletroquímicos, nos quais utiliza-se diferentes tipos de transdutores[5].

Os sensores de massa por exemplo, utilizam transdutores baseados em efeitos mecânicos, como o conhecido por microbalança de cristal de quartzo, baseado em um cristal piezoelétrico vibratório, onde a frequência vibracional depende da massa e é portanto o sinal medido [1]. Um outro exemplo são os sensores eletroquímicos, que utilizam transdutores eletroquímicos baseados em medidas potenciométricas, para medidas de variação na diferença de potencial, amperométricas, para medidas de variação de corrente, condutimétricas para medidas de variação de condutividade elétrica e impedimétricas para medidas de impedância [1, 6]. Como nesse trabalho optou-se pelo desenvolvimento, preferencialmente, de sensores eletroquímicos, a sessão a seguir tratará deles com maior detalhe.

1.1.1 Sensores eletroquímicos

O uso dos sensores eletroquímicos tem crescido frente aos ópticos, térmicos e de massa, devido a sua simplicidade, baixo custo e detecção considerável e por isso tem sido aplicados comercialmente em diversas áreas importantes, como clínicas, industriais, ambientais e agrícolas [5].

Na eletroquímica, fatores importantes como transporte de íons e transferência eletrônica na interface eletrodo/solução, por exemplo, além de processos de transferência de carga em sistemas que envolvem sólidos iônicos, são relevantes para esses tipos de sensores, que podem, por sua vez, ser classificados basicamente em potenciométricos, condutométricos, impedimétricos e amperométricos [1].

Nos sensores potenciométricos um equilíbrio é estabelecido na interface do sensor, não há praticamente nenhum fluxo de corrente, e dessa maneira a diferença de potencial é medida entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência, que possui um potencial conhecido e constante, onde não há a necessidade da presença de um contra

eletrodo, utilizado normalmente para fechar o circuito elétrico em métodos dinâmicos ($i \neq 0$), sem que haja a passagem de corrente pelo eletrodo de referência, a fim de que esse não altere seu potencial constante mediante reações eletroquímicas [5].

Nesse caso, as mudanças de concentração do analito que ocorrem na interface formada entre o eletrodo indicador, que possui uma concentração constante dessa espécie, e a solução, geram uma variação na diferença de potencial medida inicialmente [5]. Os sensores potenciométricos íon seletivos, por exemplo, tem aplicações importantes como o eletrodo de vidro para medidas de pH, que começaram a ser comercializados em 1936, mas ainda hoje são muito utilizados. Nesses eletrodos, o elemento de detecção é uma membrana íon seletiva posta entre duas soluções eletrolíticas, onde uma delas contem o íon analito com concentração constante e a outra a amostra a ser analisada. A variação na concentração do íon analito em uma das soluções gera uma diferença de potencial entre os dois lados da membrana e pode ser relacionada com a atividade iônica em solução segundo a equação de Nerst (Eq. 1) [1]:

$$E_{cell} = E_{cell}^o - \frac{RT}{zF} \ln Q \quad \text{Eq. 1}$$

Onde E_{cell} é o potencial medido na célula, E_{cell}^o é o potencial padrão da célula, sendo uma contribuição constante de potencial, R é a constante universal dos gases, T temperatura, z valência do íon, F constante de Faraday, e Q a razão de atividade dos íons no ânodo e no cátodo [6-8].

Já nos sensores condutimétricos o que se mede é a variação da condutividade elétrica em soluções iônicas, que se altera na presença do analito e pode portanto ser relacionada as diferentes concentrações do mesmo. Além disso, esse tipo de sensores não são seletivos, no entanto, possuem vantagens como simplicidade e baixo custo, uma vez que nenhum eletrodo de referência é necessário nesse caso [5]. A condução de eletricidade nesses casos se dá pelo movimento de íons na solução, e o que é medida basicamente é a resistência, da onde a condutância é obtida pela equação 2, sendo R a resistência e C condutância [9]:

$$C = \frac{1}{R} \quad \text{Eq. 2}$$

As medidas são realizadas utilizando dois eletrodos inertes, normalmente de platina platinizado, uma vez que a eletrodeposição da platina sobre o eletrodo de platina

aumenta a área superficial, a uma distância fixa um do outro[9]. O aumento da área superficial do eletrodo proporciona um aumento da capacitância medida e portanto a diminuição das corrente faradaicas [9]. Além disso, as medidas são realizadas sob corrente alternada (AC), uma vez que a aplicação de corrente contínua (CC) leva a ocorrência de reações eletrolíticas no eletrodo, enquanto que a aplicação de corrente AC proporciona o carregamento e descarregamento da dupla camada elétrica, originando uma corrente não faradaica [5, 9].

Diferentemente, os sensores impedométricos utilizam da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica para obtenção de sinal de impedância [5]. Essa técnica funciona pela aplicação de potencial ou corrente por meio de excitação por sinal senoidal de baixa amplitude, que é sobreposto a um potencial (ou corrente) de fundo, também conhecido como potencial central [10]. Desse modo, a frequência com que se perturba esse sinal senoidal é variada continuamente, sendo isso importante a fim de estudar isoladamente fenômenos inerentes ao sistema que levem maior ou menor tempo para ocorrerem como resposta de um dado potencial aplicado [10]. Por conta de suas características essa técnica leva o nome de espectroscopia de impedância eletroquímica e é uma ferramenta importante para se obter informações superficiais e interfaciais [1, 5, 10].

Como o sinal aplicado de potencial é um sinal de excitação senoidal, como resposta obtêm-se também um sinal de corrente senoidal que difere do sinal de excitação em tempo (há uma mudança de fase), onde $U(t) / I(t)$ é definida como a impedância (Z), que representa a soma de todas as componentes no sistema que se opõe a passagem de corrente [10]. Esse, no entanto é um número complexo cujo a parte real é composta pela reatância ôhmica e a parte imaginária composta pela reatância capacitiva [10].

Desse modo, os sensores impedométricos medem na verdade as mudanças na camada dielétrica ou nas propriedades dielétricas na interface eletrodo/eletrólito, ocasionadas pela ancoragem de moléculas na superfície do eletrodo, que aumenta a impedância no sistema, como por exemplo no caso de biossensores utilizando de interações específicas entre o analito que se trata de um anticorpo que se ancora ao antígeno correspondente presente no eletrodo modificado [10, 11].

Os sensores amperométricos, são por fim aqueles cujo medidas de corrente são realizadas como resposta a aplicação de um potencial vs eletrodo de referência. Desse modo, para esses tipos de medidas, utiliza-se normalmente um sistema de três eletrodos, onde o potencial é aplicado vs eletrodo de referência, e o contra eletrodo de platina (um metal nobre a fim de que não de oxide ou reduza) para que o circuito elétrico seja fechado sem que a corrente passe pelo eletrodo de referência. Essas medidas podem ser realizadas de diversos modos, dentre os quais estão a cronoamperometria, onde a corrente é monitorada com o decorrer do tempo por intermédio da aplicação de um potencial constante de acordo com o potencial de redução ou oxidação do analito, ou ainda a voltametria, onde a corrente é monitorada de acordo com o potencial, por meio da aplicação de potencial variável [1, 6, 12].

Para eletrodos planares a equação mais utilizada na cronoamperometria é a equação de Cottrell (equação 3), onde i_t é a corrente observada, n é numero de elétrons envolvidos, F é a constante de Faraday, A é a área do eletrodo em cm^2 , C_0 é a concentração das espécies eletroativas em mol/cm^3 , D_0 é o coeficiente de difusão das espécies eletroativas em cm^2/s [6, 12].

$$i_t = \frac{nFAC_0D_0^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad \text{Eq. 3}$$

No entanto, devido a polarização do eletrodo, inicialmente há a formação da dupla camada elétrica, e portanto há no sistema a contribuição de uma corrente capacitiva além da corrente Faradaica advinda dos processos redox. Porém, essa corrente capacitiva decai muito mais rápido do que a corrente faradaica, que decai com $t^{-1/2}$ segundo a equação de Cottrell [12]. Assim, nos instantes iniciais da medida a corrente decai até atingir um valor estacionário, e então ao adicionar a espécie eletroativa a corrente responde aumentando ou decaindo devido aos processos faradaicos que ocorrem, onde o analito é consumido no eletrodo e o processo limitado pela difusão, atingindo um novo valor de corrente estacionário [12, 13]. Desse modo, a cada adição do analito há uma resposta de corrente, que pode ser correlacionada a concentração da espécie [13].

As medidas por voltametria podem ainda ser realizadas de diversas maneiras de acordo com o tipo de aplicação de potencial, podendo ele ser variado de forma linear ou

por diferentes tipos de aplicações de pulso. Essas diferentes técnicas voltamétricas serão melhor descritas a seguir.

1.1.1.1 Técnicas voltamétricas

O que define o tipo de técnica voltamétrica é a forma na qual o potencial é aplicado sobre o eletrodo de trabalho para posterior aquisição do sinal de corrente [12]. Os tipos mais comuns de aplicação de potencial estão apresentados na Figura 1.2 juntamente com o respectivo sinal de corrente obtido em cada caso, onde a forma de aquisição desse sinal de corrente vai repercutir na sensibilidade da técnica através da diminuição da corrente capacitiva [12, 14, 15].

Desse modo, cada técnica pode ser escolhida de acordo com o tipo de estudo a ser realizado, podendo ele ser exploratório ou não, e exigindo técnicas que permitam alcançar maiores ou menores velocidades, dependendo do sistema a ser analisado.

Voltametria de varredura linear

Na voltametria de varredura linear o potencial é aplicado linearmente com o tempo (Figura 1.2), onde a corrente de aquisição é a obtida diretamente após a aplicação do potencial [12]. No entanto, como visto anteriormente, tem-se a formação da dupla camada elétrica na interface eletrodo/eletrólito, que funciona como um capacitor, gerando uma corrente capacitiva não vinda dos processos faradaicos ocorridos no meio [15, 16]. Dessa maneira, nessa técnica o que obtém-se como resposta ao potencial aplicado é uma corrente total dada pela soma das contribuições da corrente capacitiva e da corrente faradaica gerada pelos processos redox, sendo o pico observado no sinal de corrente, proporcional a concentração do analito [12, 15]. Devido a isso, essa técnica, é pouco sensível, chegando a ordem de detecção de no máximo $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, embora a aplicação de potencial variando linearmente possibilite atingir altas velocidades de varredura, chegando até 1000 mV s^{-1} [15].

Figura 1.2. Diferentes tipos de voltametria.

Voltametria cíclica

A voltametria cíclica funciona quase da mesma maneira do que a voltametria de varredura linear, no entanto ao atingir um tempo t escolhido, onde o potencial atinge valor máximo, o sentido de varredura é invertido variando também linearmente até o potencial mínimo final escolhido, como observado na Figura 1.2 [12, 15]. Os parâmetros importantes nessa técnica são o potencial inicial (E_i), a direção de varredura inicial, a velocidade de varredura (v), potencial máximo ($E_{máx}$), potencial mínimo ($E_{mín}$) e o potencial final (potencial máximo (E_f))[12].

A medida começa normalmente em um potencial escolhido que ainda não seja suficiente para oxidação da espécie de interesse. Desse modo, ao variar esse potencial para o sentido mais positivo atingindo um valor suficiente para a oxidação do analito, a corrente passa a subir com o aumento do potencial [12, 14]. Nesse primeiro instante as espécies eletroativas vão sendo consumidas na superfície do eletrodo o que gera um gradiente de concentração. Assim, as espécies precisam se difundir do meio da solução de regiões cada vez mais distantes para a superfície do eletrodo para serem oxidadas ou reduzidas. No entanto, com o aumentar do potencial aplicado as espécies vão sendo rapidamente oxidadas e o fornecimento de espécies eletroativas por difusão passa a não ser mais suficiente para repor as espécies na interface eletrodo/solução [12, 14]. Desse modo, a corrente atinge um valor máximo e passa a decair, uma vez que o processo passa a ser controlado pela difusão e não mais pela transferência de carga entre o analito e o eletrodo [12, 14]. Também, o mesmo ocorre quando o potencial é varrido no sentido mais negativo, onde a redução ocorre.

Em um sistema reversível, um equilíbrio dinâmico entre as espécies oxidadas e reduzidas na interface do eletrodo vai sendo estabelecido, e a equação que descreve o sistema é a equação de Nernst dada pela equação 1 [14]. Nesse caso, quando inverte-se o sentido da varredura obtém-se um sinal de redução com um potencial de inversão um pouco deslocado se comparado ao potencial de oxidação, devido a parâmetros cinéticos inerentes ao sistema, e sendo o processo descrito pela equação de Nernst, esse deslocamento é de aproximadamente $\frac{59 \text{ mV}}{n}$ onde n é o número de elétrons envolvidos no processo, sendo a relação entre corrente de pico de oxidação (I_{pa}) e redução (I_{pc}) igual a 1 [12, 16].

Além disso, para processos reversíveis, a equação de Randles-Sevcik descreve o efeito da taxa de varredura na corrente de pico, e a corrente cresce linearmente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, como mostrado a seguir [12, 16]:

$$i_p = 0,4463nFAC(nFvD/RT)^{1/2} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde n número de elétrons, F Constante de Faraday, v velocidade de varredura em V s^{-1} , A a área do eletrodo em cm^2 , R a constante universal dos gases dada por $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T a temperatura em K, e D o coeficiente de difusão da espécie eletroativa

em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Já os sistemas irreversíveis não respeitam essas condições e não são descritos pela equação de Nernst [12, 14, 16].

Atualmente, o potencial aplicado na voltametria cíclica varia em forma de escada, sendo conhecida como "*staircase*". A vantagem é que a corrente é amostrada ao final de cada degrau devido ao aumento do potencial, o que permite uma medida com a menor contribuição da corrente capacitiva, que decai mais rapidamente com o t, como observado na Figura 1.3 [17].

Figura 1.3. Variação da corrente faradaica e corrente capacitiva com o tempo, em técnicas de pulso.

Por meio de todos esses parâmetros, embora a técnica não seja muito sensível assim como a voltametria de varredura linear, é uma técnica muito importante e utilizada para o estudo do sistema a fim de se observar quais os potenciais de redução e oxidação de determinada molécula, também estudar processos químicos de cinéticas mais lenta que podem anteceder ou proceder reações eletroquímicas, entre outros estudos exploratórios [12, 14].

Voltametria de pulso diferencial

Nessa técnica o potencial é aplicado em formato de pulsos, onde o potencial base cresce em formato de escada com incrementos iguais de potencial (E_{step}), como pode ser observado na Figura 1.4. A) [12, 14, 17]. Assim, a amostragem de corrente é realizada ao início e ao final do pulso, onde as duas correntes amostradas são subtraídas, e a corrente capacitiva passa a apresentar quase nenhuma contribuição na corrente final obtida, uma vez que ao final do pulso a corrente capacitiva sofreu um decaimento maior

se comparado a faradaica [12, 14, 17]. É por isso que esta é uma técnica altamente sensível, chegando a limites de detecção de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ [14].

O sinal obtido é então um pico de corrente de acordo com o potencial de oxidação ou redução apresentado pela molécula, e é proporcional a concentração da mesma no meio, onde os parâmetros importantes utilizados na técnica são apresentados na Figura 1.4. B) [12].

Figura 1.4. Sinal de excitação de potencial na voltametria de pulso diferencial e os respectivos A) pontos de amostragem de corrente e B) parâmetros importantes da técnica.

Assim as velocidades alcançadas nessa técnica não são muito elevadas, sendo entre $1 - 10 \text{ mV s}^{-1}$, onde E_p (potencial de pico) $\approx E_{1/2}$, sendo possível estimar portanto, a quantidade de elétrons envolvidas no processo de transferência de carga por meio da equação 4 [12]:

$$W_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde $W_{1/2}$ é a largura de meia altura do pico, F Constante de Faraday 96485 C mol^{-1} , n numero de elétrons envolvidos no processo, R a constante universal dos gases dada por $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T a temperatura em K.

Voltametria de onda quadrada

Nessa técnica, o sinal de excitação de potencial é dado na forma de uma onda quadrada, de amplitude E_p , sobreposta a uma escada de potencial, onde os incrementos

de potencial são constantes e dados por E_{step} (Figura 1.5.A)) [17]. Desse modo, como observado na Figura 1.5. B, o pulso é aplicado no sentido positivo de potencial, onde ao final do pulso faz-se a amostragem da corrente correspondente aos processos de oxidação, e também no sentido negativo de potencial, onde ao final do pulso é amostrada a corrente correspondente aos processos de redução [12, 15, 17].

Figura 1.5. Sinal de excitação de potencial na voltametria de onda quadrada, A) os parâmetros importantes da técnica B) e os respectivos pontos de amostragem de corrente.

Como a corrente é amostrada também duas vezes nesse caso, assim como para a voltametria de pulso diferencial, a corrente capacitiva é subtraída quase totalmente do valor final de corrente obtido, o que torna a técnica bastante sensível [15]. No entanto, obtêm-se duas componentes da corrente, uma direta correspondente a oxidação das espécies eletroativas, e a outra reversa correspondente a redução das espécies eletroativas, Figura 1.2 [17]. A subtração dessas duas correntes é correspondente a corrente final obtida, o que implica em algumas vantagens como um aumento considerável de sinal em sistemas reversíveis (Figura 1.2), além de permitir por exemplo a subtração de corrente correspondente a redução do O_2 sem a necessidade de degaseificar o sistema [12, 17].

Além dessas vantagens, cabe lembrar que o modo de excitação do potencial leva a alcançar velocidades da ordem de 1 V s^{-1} enquanto que por meio da voltametria de pulso diferencial velocidades de $1 - 10 \text{ mV s}^{-1}$ são alcançadas [12]. Isso proporciona vantagens como redução do bloqueio da superfície do eletrodo pelas espécies eletroativas além do menor consumo de espécies [12].

A voltametria de onda quadrada é muito popular também, por exemplo, no uso da voltametria de redissolução[15]. Do inglês *stripping*, a técnica consiste no pré acumulo do analito sobre o eletrodo que ocorre geralmente aplicando-se um determinado potencial sob tempo e transporte de massa controlados [17]. O acumulo pode ser realizado reduzindo o analito sobre o eletrodo e posteriormente a varredura anódica é feita, onde analisa-se o pico de oxidação do material acumulado sobre o eletrodo, sendo esse chamado de *stripping* anódico [15, 17]. Além disso, o inverso também é valido, onde o acumulo é realizado oxidando o material sobre o eletrodo e onde posteriormente a varredura catódica é feita, sendo esse por sua vez chamado de *stripping* catódico [15, 17]. Já em moléculas orgânicas, o uso da técnica pode se dar pelo acumulo realizado por meio da adsorção da molécula no eletrodo, podendo ser feita mediante aplicação ou não de potencial [15, 17]. Desse modo, essa técnica pode ser utilizada a fim de diminuir significativamente os limites de detecção nas eletroanálises [15].

1.1.1.2 Dispositivo baseado em papel

Para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, faz-se necessária a utilização de materiais condutores, dos quais são utilizados desde os metais como mercúrio, ouro, platina, cobre, etc. [16, 18], até materiais compostos de carbono, como carbono vítreo, grafite, grafeno [19, 20], entre outros, dependendo das aplicações e do analito de interesse[5]. Assim, algumas plataformas convencionais podem ser utilizadas e outras menos tradicionais, como o papel, tem despertado grande interesse e ganhado forças nos últimos anos [21].

Isso acontece porque o papel é composto basicamente por fibras celulósicas, o que confere a ele diversas propriedades importantes como o fácil transporte do analito através da ação capilar por entre as fibras do papel, alta porosidade, flexibilidade, hidrofiliçidade, além de apresentar compatibilidade com amostras biológicas, baixo custo e ser um material abundante, caracterizando-o em uma boa plataforma para o desenvolvimento de dispositivos simples e descartáveis [21-26]. São amplamente utilizados em análises colorimétricas, onde através de uma reação química do analito de interesse com uma substância química, um composto colorido é formado, no qual

eventualmente a intensidade da cor pode ser também relacionada a quantidade de analito presente na amostra [21, 27-30].

Esses dispositivos, sejam eles para detecção colorimétrica ou eletroquímica, podem ser fabricados utilizando diversos tipos de papel, como papel sulfite ou cromatográfico [21, 27], entre outros, onde normalmente a área reacional é delimitada por uma barreira hidrofóbica, que pode ser obtida por, barreiras poliméricas como polidimetilsiloxano, poliestireno, poliuretano [21] ou ainda impressão de cera [21, 31], e até mesmo cola escolar [32]. Já no caso de detecção eletroquímica, os eletrodos podem ser acoplados ao dispositivo de papel sendo pintado com tintas condutoras de prata, cobre e carbono, utilizando diversas técnicas, seja de impressão[33] ou mais sofisticadas como *sputtering*, *laser annealing*, fotolitografia, entre outras, além também da utilização de grafites como eletrodos [21].

As vantagens desse tipo de plataforma associada aos métodos de detecção eletroquímica são a facilitação na miniaturização dos dispositivos e obtenção de dispositivos portáteis e descartáveis que facilitam análises do tipo *point of care*, o que tem sido amplamente visado atualmente.

1.2 HORMÔNIOS

Hormônios no geral são substâncias químicas secretadas em células especializadas que se localizam tradicionalmente em glândulas do sistema endócrino, desempenhando, em sua maioria, funções de sinalização, que regulam importantes sistemas no organismo humano [34, 35]. São conhecidas três classificações químicas principais destas substâncias: peptídicos e proteicos, derivados de aminoácidos, e esteróides. Os esteróides ligados a proteínas chamadas carregadoras são responsáveis pela sinalização entre os tecidos por meio da corrente sanguínea. No núcleo celular se ligam às proteínas receptoras altamente específicas e fazem o papel de estimular modificações no metabolismo e expressão gênica [34].

É importante ressaltar que ao chegarem no núcleo das células esses tipos de hormônios se ligam com tal grau de especificidade as proteínas que mesmo em pequenas quantidades são capazes de estimular modificações no metabolismo [34].

Dentre os hormônios esteróides estão, por exemplo, a testosterona e o estradiol, que são hormônios sexuais, e a aldosterona e o cortisol que são hormônios produzidos na glândula adrenal, responsáveis por algumas regulações hormonais do metabolismo energético [34]. As respectivas estruturas químicas dessas moléculas estão representadas na Figura 1.6.

Figura 1.6. Estruturas químicas de hormônios esteróides.

1.2.1 Cortisol

O cortisol, também chamado hidrocortisona em sua forma sintética, é um importante biomarcador de alguns tipos de doenças, como por exemplo, a doença de Cushing, que tem o seu desenvolvimento atribuído ao excesso de cortisol, e a doença de Addison, que tem o seu desenvolvimento atribuído a baixa concentração de cortisol no sistema. Além disso, esse composto desempenha funções importantes na regulação de vários processos fisiológicos, como metabolismo de carboidratos, gorduras, e regulação da pressão arterial e dos níveis de glicose. O excesso desse hormônio, pode por exemplo, aumentar na corrente sanguínea os níveis de gordura, aminoácidos, e de glicose, e inibir também processos inflamatórios [34, 36, 37].

Por conta do seu caráter de sinalizador metabólico, o cortisol é associado a disfunções, como o stress, sendo conhecido como o "hormônio do stress" [36, 38, 39]. Essa ocorrência se deve a uma maior produção deste hormônio, em relação ao nível basal, quando o organismo é submetido a stress. Está rota ocorre do seguinte modo, o hipotálamo recebe a sinalização, disponibilizando o hormônio liberador de corticotrofina (*Corticotropin Releasing hormone*, ou CRH), o qual segue até as

glândulas pituitárias, onde o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH - *Adrenocorticotropic Hormone*) é liberado na corrente sanguínea sinalizando ao córtex adrenal, que responde a esse estímulo com a liberação de cortisol [36, 40] (Figura 1.7). Assim ativa respostas do corpo ante situações de emergência: aumenta níveis de gordura, aminoácidos, e de glicose, na corrente sanguínea e inibe processos inflamatórios proporcionando energia muscular [41].

Figura 1.7. Resposta do corpo ao estresse. Adaptado da referência [42].

Atualmente, devido à globalização, o excesso de trabalho e o ambiente competitivo no qual o ser humano está inserido, o stress psicológico intenso está cada vez mais associado a problemas de saúde tais como cardiorrespiratórios, depressão, entre outras doenças que tem se tornado motivo de séria preocupação para especialistas [40, 43]. Além disso, também níveis mais elevados de cortisol foram majoritariamente notados em pacientes HIV-positivos não tratados se comparado aos pacientes em tratamento. O que pode indicar certa correlação, apesar de não haver evidências claras desse efeito entre os níveis de cortisol e os estágios de infecção pelo HIV[44]. Desse modo, têm-se intensificado a busca por sensores químicos que quantifiquem o cortisol e

permitam estabelecer a correlação entre os níveis de stress e a concentração do hormônio no indivíduo [35, 36, 45-51].

É importante ressaltar que no decorrer do dia os níveis de cortisol se apresentam diferentes no corpo do ser humano, sendo os maiores registrados trinta minutos após acordar pela manhã e diminuindo progressivamente até o horário de dormir [36, 38]. Deste modo, um dos desafios tem sido o desenvolvimento de um sensor químico capaz de monitorar de uma forma simples e precisa os níveis do hormônio ao longo do dia, permitindo o mapeamento da concentração do cortisol e auxiliando na real compreensão da sua função nos problemas citados anteriormente. Adicionalmente, esses sensores também poderiam ajudar a identificar os horários de pico desta molécula em cada indivíduo para que então uma profilaxia possa ser planejada [35, 36].

1.2.2 Sensores para determinação e quantificação de cortisol

O cortisol pode ser determinado em diversos fluidos biológicos, tais como urina, sangue, fluido intersticial, suor, saliva e também no cabelo [35, 36, 43, 51]. Em alguns desses fluidos, como intersticial e saliva, o cortisol se encontra em baixas concentrações, diferentemente do sangue, o qual apresenta os níveis basais desse hormônio. Contudo, nessa matriz estão presentes apenas quantidades livres de cortisol, que por sua vez são efetivamente importantes para a determinação de anormalidades [36].

Desse modo, tem se utilizado métodos de alta eficiência e seletividade como Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS - *High Performance Liquid Chromatography/mass Spectrometry*), e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - *Gas Chromatography/mass Spectrometry*), para a detecção de baixas concentrações de hormônios em fluidos biológicos complexos, como por exemplo, no sangue [35].

No entanto, como visto anteriormente, atualmente as técnicas eletroquímicas tem se destacado devido ao fácil acesso, simplicidade, respostas rápidas, baixo custo, além da viabilidade para determinação de pequenas concentrações de espécies em matrizes

simples e complexas, possibilitando análises do tipo *point of care* e a miniaturização dos dispositivos [35, 36]. Assim, diversos trabalhos têm sido reportados na literatura com utilização de técnicas voltamétricas e por impedância para quantificação de cortisol nos mais variados tipos de amostras [45-48, 52].

Sun. et al., por exemplo, desenvolveram um sensor eletroquímico para determinação de cortisol em saliva utilizando eletrodo de ouro microfabricado e funcionalizado com anti-cortisol (anticorpo). O antígeno cortisol liga-se ao anticorpo e sucessivamente um segundo anticorpo funcionalizado com a enzima Fosfatase Alcalina liga-se a molécula de cortisol. Assim em solução de fosfato de p-nitrofenil, a enzima acoplada ao segundo anticorpo que se liga ao sistema gera o produto p-nitrofenol, que é detectado por voltametria cíclica, onde o limite de detecção de cortisol na saliva foi estimado como $0,27 \text{ ng mL}^{-1}$ [49].

Outro sensor foi desenvolvido por Arya et al. utilizando microeletrodos interdigitados modificados com anticorpo monoclonal específico para cortisol. Esses foram monitorados utilizando a técnica de impedância eletroquímica na faixa de $0,36 \text{ pg mL}^{-1} - 0,36 \text{ ng mL}^{-1}$ de cortisol em saliva [46]. Além disso, essa mesma técnica foi utilizada pelo mesmo grupo para detecção de cortisol em fluido intersticial, chegando a uma faixa de detecção de cortisol de $0,36 \text{ pg mL}^{-1} - 0,36 \text{ ng mL}^{-1}$, sendo a exatidão do método avaliada posteriormente pelo teste de "ELISA" (do inglês "*Enzyme-Linked ImmunonoSorbent Assay*") realizado nas mesmas amostras, mostrando assim, a viabilidade de trabalhar com fluidos corporais complexos, tais como saliva e fluido intersticial [45, 47].

Já Venugopal et al. utilizando a estrutura de eletrodo construído pelo grupo anterior funcionalizada por anticorpos monoclonais específico para cortisol propôs um sensor para detecção desse hormônio utilizando espectroscopia de impedância electroquímica em fluido intersticial que foi coletado diversas vezes ao longo do dia através de microporos feitos sobre a pele por meio de laser no infravermelho próximo. Dessa maneira foi proposto um método para contínua avaliação de cortisol em tempo real[52].

Também, devido ao aumento do uso de nanomateriais, Tlili et al. utilizando nanotubos de carbono como transdutor funcionalizados com um análogo ao cortisol e com o anti-cortisol monoclonal construíram um quimio-resistor que resultou nos

seguintes parâmetros analíticos para quantificação do cortisol: limite de detecção de 1 pg mL⁻¹ e sensibilidade de 14,9 ng mL⁻¹ [50]. Outros estudos utilizando nanomateriais também foram realizados a fim de aprimorar tais imunossensores [48, 53, 54].

A maioria dessas técnicas tem sido empregadas utilizando imunossensores, formados por um sistema antígeno-anticorpo altamente específico (Figura 1.8) [55] e embora, alguns estudos tenham aplicado sistemas de encapsulamento dos anticorpos para manter a integridade biológica dos mesmos e a bioestabilidade [56, 57], esses sistemas são ainda no geral caros e extremamente sensíveis a mudanças de temperatura, pH, entre outros fatores, o que pode inviabilizar o uso de tais dispositivos [36]. Por isso, tem-se buscado alternativas como a utilização de eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos (MIPs) [58-62].

Figura 1.8. Representação esquemática de imunossensor. Fonte própria.

1.3 POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPS)

Os polímeros molecularmente impressos (do inglês, *Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)*) são materiais sintéticos que tem atraído bastante atenção devido a capacidade de imitar o reconhecimento molecular por receptores naturais [63]. Isso se dá porque esses materiais são formados a partir da polimerização de monômeros funcionais na presença do analito de interesse, que age como molde ("template", do inglês). Esse sistema passa pela reticulação de polímeros orgânicos, onde ligações cruzadas são formadas proporcionando a obtenção de um polímero estável e robusto que pode ser utilizado em diversas condições. Por fim, após a síntese do polímero, o molde é removido e cavidades altamente específicas ao analito são criadas tornando o material altamente seletivo, como representado na Figura 1.9 [58, 64, 65].

Durante a síntese algumas abordagens podem ser utilizadas (Figura 1.9), como por exemplo, ligações covalente entre a molécula molde e o sítio de ligação no polímero, ligações não covalente, semi-covalentes e interações eletrostáticas [66]. Para isso alguns métodos de fabricação podem ser empregados, como químico ou eletroquímico dependendo do objetivo final [67].

Esses materiais podem ter uma grande variedade de aplicações uma vez que não possuem restrições de tamanho, caráter químico ou forma da molécula molde a ser utilizada [63], sendo utilizado em diferentes áreas [67].

Figura 1.9. Representação esquemática da síntese do MIP, destacando diferentes abordagens de interações entre a molécula molde e o sítio de ligação no polímero: (a) Ligações não covalentes, por exemplo, ligação de hidrogênio entre molécula molde e o monômeros como ácido metacrílico, acrilamida, etc.; (b) interações covalentes; (c) interações semi-covalente; (D) interação eletrostática com um monômero carregado com carga oposta. Adaptada com permissão da referência [66].

1.3.1 Sensores baseados em MIPs

Os sensores baseados em MIPs são dispositivos que possuem uma camada modificadora que mimetiza o sistema de reconhecimento antígeno-anticorpo do ser humano [58, 61, 68]. Esses compostos são estáveis, de baixo custo de fabricação,

preparados com facilidade e com a possibilidade de serem sintetizados no formato da molécula molde desejada, além de possibilitarem resultados similares ao ensaio ELISA, a sua aplicabilidade passa a ser muito interessante para o desenvolvimento de sensores químicos. Adicionalmente, esses materiais sintéticos mitigam uma das principais desvantagens da utilização de anticorpos/enzimas, que é a possibilidade de trabalhar em condições de pH e temperatura [58, 65] onde não se poderia trabalhar com essas biomoléculas. Além da possibilidade de se trabalhar em diferentes condições de trabalho, essa última característica proporcionada aos MIPs um controle não tão rigoroso das condições de armazenamento quando comparado às enzimas/anticorpos.

1.3.1.1 Sensores eletroquímicos baseados em MIPs

A utilização dos MIPs para a detecção eletroquímica de analitos se dá devido a medidas de sinais de redução ou oxidação seletivamente da própria molécula molde [69], ou ainda devido à diminuição do sinal eletroquímico, como por exemplo, a corrente resultante do processo de uma sonda redox ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) devido ao analito se ligar seletivamente ao polímero limitando o acesso da sonda redox à superfície do eletrodo [70, 71]. Adicionalmente, há outras maneiras de detecção sem a necessidade de sondas redox reportadas na literatura [72, 73]. Essas medidas estão baseadas na medição da massa do analito que se ligou na cavidade utilizando microbalança de cristal de quartzo, cujo cristal foi modificado com o polímero molecularmente impresso, ou na alteração da condutividade ou das medidas de impedância do filme.

1.3.2 Sensores baseados em MIPs para cortisol

Alguns trabalhos na literatura já reportaram o estudo sobre a seletividade dos MIPs para detecção de cortisol e outros esteróides [62, 74-76], em um deles Baggiani et al. mostraram que diferentes combinações entre monômeros funcionais, agentes de reticulação e solventes, podem gerar MIPs com diferente sensibilidade ao cortisol e a outros hormônios relacionados (corticosteroides), além de em alguns casos apresentar

baixa seletividade há hormônios esteróides não relacionados, como por exemplo, a progesterona e testosterona [62].

Recentemente, um estudo utilizando MIP eletroquimicamente fabricado de polipirrol em eletrodo impresso de carbono foi desenvolvido por Manickam et al. para quantificação do cortisol [77]. Contudo, o desenvolvimento de um dispositivo para o monitoramento prático dessa molécula ainda precisa ser desenvolvido.

Figura 1.10. Esquema representativo da síntese do MIP para reconhecimento da molécula do cortisol. Fonte própria.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é desenvolver sensores eletroquímicos visando ao monitoramento de cortisol sem a necessidade de se utilizar moléculas de bioreconhecimento, sendo uma primeira abordagem utilizar um sensor não modificado para detecção direta do cortisol e uma segunda abordagem utilizar superfícies eletródicas modificadas com polímeros molecularmente impressos visando um aumento da seletividade para posterior aplicação em fluidos biológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PARTE 1 – AVALIAÇÃO DA ELETROATIVIDADE DO CORTISOL

Essa primeira abordagem se inspirou em um artigo encontrado na literatura [78] onde os autores utilizaram eletrodos de carbono vítreo modificados com Pb para redução de testosterona empregando uma etapa de adsorção prévia controlada pela aplicação de um potencial elétrico. Para isso utilizou-se um potenciostato μ AutLab (da AutoLab Eco Chemie) com o software GPES disponibilizado pelo fabricante, uma cela eletroquímica de três eletrodos, sendo o eletrodo de referência de Ag/AgCl_(KCl 3M), o contra eletrodo de platina e o eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo (1mm de diâmetro). Além disso, para as medidas preparou-se soluções estoque de 5 mmol L⁻¹ de hidrocortisona (como é chamado o cortisol obtido sinteticamente) em etanol a partir do padrão adquirido da Sigma Aldrich, onde realizou-se o polimento do eletrodo de trabalho anteriormente a cada medida utilizando-se pano de polimento da Buehler (12" Microcloth PSA 10/PK) e suspensão de diamante de 0,1 e 1,0 μ m da MetaDi^{TM} Supreme.

3.1.1 Estudo inicial do comportamento eletroquímico cortisol

Inicialmente utilizou-se a técnica de voltametria cíclica a fim de estudar o sistema, onde os parâmetros empregados foram: tempo de equilíbrio de 5s, número de ciclos de 1 a 3, faixa de potencial de 0 V à -1,5 V, com E_{step} de 5mV e velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. Utilizou-se como eletrólito suporte tampão acetato 0,1mol L⁻¹ pH 4,5.

3.1.2 Estudo do comportamento eletroquímico em diferentes valores de pH

Verificada a viabilidade de monitoramento do cortisol, realizou-se estudos em diferentes valores de pH, onde utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial, a fim de verificar com maior sensibilidade o comportamento da variação do potencial frente a mudança de valor de pH do meio. Os parâmetros empregados foram: intervalo de tempo 0,2 s, com passo de potencial 6 mV (velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹), amplitude do pulso de 50 mV, faixa de potencial de -1 à -1,7 V.

Utilizou-se como eletrólito suporte soluções com diferentes valores de pH, são elas: ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ pH 1, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 2, tampão acetato

0,1 mol L⁻¹ pH 4,5, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5, tampão amoniacal 0,1 mol L⁻¹ pH 9, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 12.

3.1.3 Estudos analíticos

Após escolher o tampão acetato pH 4,5 para se trabalhar, utilizou-se a técnica de voltametria de onda quadrada para os estudos analíticos em eletrodo de carbono vítreo (1mm de diâmetro). Os parâmetros empregados durante os estudos foram: potencial de passo de -8,33 mV, amplitude de -50 mV e frequência de 60 Hz.

Dentro desses estudos, analisou-se o possível uso da etapa de pré adsorção da molécula no eletrodo de acordo com o artigo no qual foi inspirado esse trabalho [78], onde realizou-se medidas com e sem a etapa de adsorção aplicando -1,1 V durante 120 s. Definiu-se a não utilização da etapa de adsorção e construiu-se uma curva analítica por meio de adições sucessivas da solução estoque de cortisol 5 mmol L⁻¹ em solução tampão acetato pH 4,5. Posteriormente, fez-se um teste com uma amostra de um fármaco contendo hidrocortisona, a fim de quantificar a hidrocortisona no composto utilizando o método de adição de padrão.

No entanto, a irreprodutibilidade das medidas levou a realização de diversos testes como, por exemplo, com a inserção e a remoção de O₂ no sistema, onde borbulhou-se O₂ ou Ar na solução de eletrólito suporte durante 15 min anteriormente a realização de cada medida, a fim de saturar ou remover o oxigênio do meio, respectivamente. Também testou-se variação no método de limpeza do eletrodo, utilizando-se alumina 0,3µm da MicroPolish^{TM} para o polimento mecânico ou ainda ácido sulfúrico, hidróxido de sódio ou bicarbonato de sódio para limpeza eletroquímica.

Para a limpeza eletroquímica com ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ utilizou-se voltametria cíclica, 10 ciclos varrendo em uma faixa de potencial de -1,5 à 1,5 V, com passo de potencial de 5 mV e velocidade de varredura de 200 mV s⁻¹. Além desse método utilizou-se o método pulsado pela aplicação de dois extremos de potencial durante um determinado intervalo de tempo. Nesse último o número de passos de potencial utilizados foram 7, onde iniciando-se com -1,5 V os potenciais foram aplicados alternadamente, sendo o outro extremo de 1,3 V com duração de 30 s cada pulso e agitação mecânica do sistema. Já para a limpeza eletroquímica com hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ utilizou-se somente a voltametria cíclica varrendo 10 ciclos em uma

faixa de potencial de -1,5 à 1,0 V, com passo de potencial de 5 mV e velocidade de varredura de 200 mV s⁻¹. Por fim, para a realização do tratamento da superfície do eletrodo com carbonato de sódio também utilizou-se voltametria cíclica, onde fez-se 10 ciclos, varrendo numa faixa de potencial de -1,0 à 1,2 V com passo de potencial de 5 mV e velocidade de varredura de 200 mV s⁻¹.

Outro estudo realizado, a fim de garantir menor envenenamento do eletrodo e, portanto, maior reprodutibilidade das medidas, foi a utilização de surfactante no sistema. Desse modo, inspirado em um artigo sobre análise de testosterona em eletrodo de carbono vítreo (3 mm), utilizou-se CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) [79], que é um surfactante catiônico, em solução tampão acetato pH 4,5, nas concentrações de 3 mmol L⁻¹ (acima da concentração micelar crítica que é 0,87 mM) ou 0,7 mmol L⁻¹. Assim, utilizou-se voltametria de onda quadrada para realização desses testes, onde reproduziu-se os parâmetros do artigo, sendo o potencial de acúmulo 0 V e tempo de acúmulo 120 s, faixa de potencial de -0,9 à -1,6 V, amplitude de 40 mV, frequência de 25 Hz e passo de potencial de 8 mV.

Após todas essas etapas ainda se notou uma grande irreprodutibilidade do sistema, o que inviabilizaria a utilização de tal método analítico para a quantificação do composto. Portanto, outras alternativas foram avaliadas, como a utilização de DMSO onde, para isso, utilizou-se o sal orgânico perclorato de tetrabutilamônio 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte no meio orgânico. Desse modo, realizou-se o teste por meio de medidas de voltametria de onda quadrada empregando os parâmetros já usados nos estudos analíticos iniciais. Também, um estudo em eletrodo de diamante dopado com boro foi realizado visando evitar uma grande adsorção do analito de interesse no eletrodo, visto que esta é uma propriedade inerente a esse eletrodo. Utilizou-se o filme de diamante dopado com boro na proporção de dopagem de 8000 ppm depositado a vapor químico em silício policristalino de área 8 x 8 mm², obtido da NeoCoat SA (La Chaux-de-Fonds, Switzerland). Um pré tratamento catódico foi empregado anteriormente ao teste, pela aplicação de -3 V no eletrodo durante 300 s, para a limpeza eletroquímica do eletrodo em meio de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹. Os parâmetros utilizados foram voltametria cíclica para o estudo inicial do sistema, a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, passo de potencial de 5 mV, em uma faixa de potencial de 0 à -1,6 V.

Por fim, uma última abordagem analisada foi a modificação do eletrodo de carbono vítreo com óxido de grafeno reduzido. Para isso, seguiu-se a modificação

segundo estudos previamente realizados pelo grupo de pesquisa e utilizando o óxido de grafeno (GO), em uma dispersão de 1 mg mL^{-1} , obtido por colaboração com uma aluna do grupo, sintetizado pelo método de Hummers adaptado [80]. Sobre a superfície do carbono vítreo, colocou-se $2\text{ }\mu\text{L}$ dessa dispersão, e realizou-se os a redução eletroquímica do material por meio da técnica de voltametria cíclica, após secagem durante 10 min em luz infravermelha. Os parâmetros utilizados para a redução foram varredura de $+1,0$ à $-1,2\text{ V}$, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} durante 10 ciclos em meio de $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de sulfato de sódio.

Após a obtenção do eletrodo modificado, realizou-se teste utilizando solução de ferricianeto de potássio $0,5\text{ mmol L}^{-1}$ em eletrólito suporte KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ como sonda redox, a fim de analisar-se o comportamento antes e após a modificação do eletrodo. Posteriormente, realizou-se medidas em solução tampão acetato pH 4,5 e após adição de cortisol, removendo o O_2 do sistema borbulhando Ar durante 15 min anteriormente cada medida, sendo esses os estudos iniciais dessa abordagem.

3.2 PARTE 2 – ELETRODOS DESCARTÁVEIS

Após estudos realizados em eletrodo de carbono vítreo, iniciou-se os testes em dispositivos descartáveis, onde escolheu-se o tampão acetato pH 4,5 e a técnica de voltametria de onda quadrada empregando os mesmos parâmetros utilizados no estudo anteriormente realizado: potencial de passo de $-8,33\text{ mV}$, amplitude de -50 mV e frequência de 60 Hz . Grafite foi selecionado como eletrodo de trabalho, por se tratar de um material também de carbono como o utilizado nos estudos anteriores, pela disponibilidade e baixo custo para serem empregados em plataformas descartáveis. Durante os ensaios experimentais, analisou-se não só o sinal de cortisol obtido por adições sucessivas de solução estoque de cortisol 5 mmol L^{-1} (preparada em DMSO) na presença e ausência do ferricianeto de potássio no meio, que permaneceu constante numa concentração de $0,5\text{ mmol L}^{-1}$, utilizando uma célula eletroquímica de 10 mL , eletrodo de platina como contra eletrodo e eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3\text{ M}$) como eletrodo de referência. Todos os eletrodos de minas de grafite utilizados foram de $0,7\text{ mm}$ da marca Pentel 2B (macio), onde foram polidos utilizando papel sulfite a fim de remover a cera protetora presente no material. Também nesses ensaios, a análise da degaseificação do sistema borbulhando argônio durante 10 min, foi realizada. Além da

normalização dos dados obtidos dividindo o sinal de corrente da voltametria de onda quadrada pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, a fim de diminuir os efeitos ocasionados pela diferença de área eletródica com a utilização de grafites de diferentes lotes.

Depois destes testes iniciais, medidas foram realizadas sob as mesmas condições imobilizando o eletrodo de trabalho sob plataformas de papel. Para isso, um padrão foi criado sobre o papel cromatográfico pela impressão de cera, a fim de garantir a formação de uma barreira hidrofóbica (Figura 3.1). Posteriormente, os eletrodos de referência são pintados sobre o papel utilizando cola de prata, e o papel é levado a estufa, onde permanece a 80 °C durante 30 min para que a cera passe de um lado ao outro do papel, hidrofobilizando ambos lados. As plataformas criadas foram então cortadas e os eletrodos de trabalho e contra eletrodos de minas de grafite, imobilizados sobre o *layout* utilizando fita adesiva (Figura 3.1).

Para as medidas eletroquímicas nesse caso, foram utilizadas as mesmas condições acima mencionadas na técnica de voltametria de onda quadrada, onde a quantidade de eletrólito utilizada foi de 200 μL (tampão acetato pH 4,5) contendo também no meio 0,5 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio. As adições de cortisol no meio foram realizadas por meio de uma solução estoque de 5 mmol L^{-1} preparada em DMSO.

Figura 3.1. Fabricação dos eletrodos descartáveis.

3.3 PARTE 3 - POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPS)

Em paralelo aos estudos apresentados anteriormente, estudou-se o desenvolvimento dos MIPS para a modificação do eletrodo de carbono vítreo de modo a garantir seletividade ao sistema mesmo. Além disso, devido ao envenenamento do eletrodo apresentado pelo cortisol, estudou-se sistemas que evitem a necessidade de utilização do uso do sinal de redução do cortisol para a quantificação, onde a quantificação poderia ser realizada de maneira indireta através a utilização de uma sonda redox, ou ainda outros métodos de análise, como a utilização da microbalança de quartzo para a quantificação do analito nos eletrodos modificados. Desse modo, iniciaram-se estudos para o desenvolvimento dos MIP.

3.3.1 MIPS quimicamente sintetizados

Inicialmente escolheu-se o método químico para a síntese dos polímeros. Desse modo, o MIP foi feito pela dissolução de 54 mg (54 mg mL^{-1}) de acrilamida (monômero) em $250 \mu\text{L}$ de solução de 10 mmol L^{-1} de cortisol preparada em etanol, seguida da adição de 6mg (6 mg mL^{-1}) de N, N'-metilenobisacrilamida como reticulante para um volume final de 1mL, onde ambos reagentes foram obtidos da Sigma Aldrich. Posteriormente, completou-se o volume para 1 mL e por fim, adicionou-se $20 \mu\text{L}$ de uma solução de persulfato de amônio 10% (m/v) e de N, N, N', tetrametiletilenodiamina 5% (v/v), borbulhou-se argônio durante 5 min[58]. A polimerização foi realizada a temperatura ambiente.

O NIP (polímero não molecularmente impresso) foi sintetizado como controle usando o mesmo procedimento na ausência do cortisol. Após a polimerização, MIP e NIP foram granulados separadamente utilizando uma peneira de poro de $50 \mu\text{m}$ lavados em DMSO (Dimetil Sulfóxido). Após isso, espectros UV-Vis foram obtidos da solução de DMSO com o intuito de observar a total remoção da molécula molde.

3.3.2 Testes realizados com os MIPs quimicamente sintetizados

3.3.2.1 Capacidade de recombinação da molécula molde

Após a obtenção do hidrogel, utilizando-se 100 mg do NIP e do MIP separadamente, verificou-se a capacidade de recombinação do cortisol em ambos os polímeros sintetizados, MIP e NIP. Para isso misturou-se esses materiais separadamente em soluções de cortisol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, preparada em DMSO, utilizando o vórtex (da Phoenix - AT56) durante 90 s. A mistura foi então centrifugada (da Quimis de 1000 - 10000 rpm) em velocidade 4000 rpm durante 5 min e posteriormente em velocidade de 8000 rpm durante 5 min, sendo o sobrenadante subsequentemente analisado por UV-Vis na região de 500 - 200 nm.

3.3.2.2 Eletrodo modificado pela técnica de "casting"

Para os testes desse material em eletrodos, inicialmente utilizou-se membranas celulósicas a fim de ancorar 20 mg do MIP em eletrodo de carbono vítreo, com o auxílio de um o-ring. Primeiramente realizou-se um teste para analisar a passagem de cortisol no sistema verificando-se para isso a chegada do mesmo a superfície eletródica por meio do sinal de redução em solução de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol em tampão acetato pH 4,5 (diluindo da solução estoque 5mmol L^{-1} de cortisol preparada em etanol), sob agitação durante 15 min.

Figura 3.2. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MIP pela técnica *casting*.

Posteriormente, modificando-se o eletrodo novamente, utilizou-se o ferricianeto de potássio como sonda redox avaliou-se voltametricamente a passagem dos íons ferricianeto por entre ambos polímeros, que chegando a superfície eletródica sofrem processo de redução. Para isso utilizou-se a técnica de voltametria cíclica em solução de ferricianeto de potássio $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,1\text{mol L}^{-1}$, onde os parâmetros utilizados foram velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , em uma faixa de potencial de -

0,2 à 0,7 V, varrendo três ciclos consecutivos. Realizou-se as medidas a cada cinco minutos, permanecendo o sistema sob agitação, a fim de avaliar o comportamento do sistema com o decorrer do tempo de imersão em solução de ferricianeto de potássio.

Posteriormente, realizou-se esse teste para o NIP, e para o NIP e o MIP recombinados com o cortisol (NIP-cortisol e MIP-cortisol). Para isso, obteve-se o MIP-cortisol e NIP-cortisol do teste realizado em UV-Vis para acompanhar a recombinação da molécula molde com os polímeros, onde descartou-se o sobrenadante e o material foi analisado, subsequentemente, no decorrer do tempo imerso em solução de ferricianeto de potássio 0,5 mmol L⁻¹ preparada em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Utilizando-se voltametria de pulso diferencial foram realizadas outras análises a fim de avaliar o comportamento dos perfis voltamétricos do ferricianeto de potássio após adições de cortisol, em solução, utilizando os eletrodos modificados. Para isso, no entanto, como a quantidade de ferricianeto difundida por entre o material polimérico até a superfície do carbono vítreo aumenta com o passar do tempo, houve a necessidade de modificar o eletrodo a cada medida realizada com o cortisol.

Assim, os parâmetros voltamétricos utilizados foram: intervalo de tempo 0,2 s, com passo de potencial 5 mV (velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹), amplitude do pulso de 50 mV, faixa de potencial de -0,2 à 0,7 V. Duas abordagens foram analisadas nesse caso, a primeira adicionando as alíquotas de cortisol (solução estoque de 5mmol L⁻¹) diretamente em solução de ferricianeto de potássio, sendo o eletrodo modificado com 20 mg de MIP e permanecendo durante 20 min nessa solução sob agitação anteriormente a obtenção do voltamograma. Já a segunda abordagem foi analisada permanecendo o eletrodo modificado com 20 mg de MIP primeiramente em solução de cortisol de determinada concentração, sob agitação durante 15 min, e depois colocando-se o mesmo em solução de ferricianeto durante mais 15 min sob agitação anteriormente a medida de voltametria de pulso diferencial. Vale ressaltar que o eletrodo foi modificado a cada medida, onde a limpeza do mesmo para isso foi feita em suspensão de diamante, como já relatado na primeira parte do trabalho, onde realizou-se cada experimento em diferente concentração de cortisol.

Devido a grande espessura do filme polimérico sobre o eletrodo obtido dessa maneira, utilizou-se voltametria cíclica para análise da modificação utilizando diferente

massa de MIP (10 mg), repetindo-se os experimentos com o passar do tempo em solução de ferricianeto de potássio realizado anteriormente.

3.3.2.3 Eletrodo modificado pela técnica de "spin coating"

A fim de melhorar as condições de reprodutibilidade, para que a espessura do filme formado sobre o eletrodo fosse menor, outra alternativa na maneira de modificar a superfície do eletrodo antes dos ensaios voltamétricos foi testada. Desse modo, utilizou-se Polidimetilsiloxano (PDMS) (Sylgard 170 silicone elastomer/ mistura 1:1 da parte A e parte B), que é um polímero permeável, para ancoragem do MIP (20 mg foi utilizado) sobre o eletrodo de carbono vítreo por meio da técnica de *spin coating*, o que possibilitou a obtenção de uma camada polimérica menos espessa e melhor aderida ao eletrodo (Figura 3.3).

Figura 3.3. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MIP pela técnica *spin coating*, utilizando PDMS.

Para isso, após a modificação do eletrodo, o mesmo foi colocado em luz infravermelha durante 10 min para secagem do filme. Posteriormente realizou-se ensaios voltamétricos em solução de ferricianeto de potássio, nas mesmas condições utilizadas no item anterior para esses testes, onde fez-se as adições de cortisol sucessivamente direto na solução de ferricianeto e o eletrodo foi modificado uma única vez durante todo o teste.

A cada medida realizada, adicionou-se uma alíquota da solução de cortisol estoque, permanecendo o eletrodo 10 min em solução de ferricianeto de potássio contendo cortisol sob agitação constante, seguida de medida utilizando a técnica de

voltametria cíclica. Ao final do teste, verificou-se a remoção do cortisol do eletrodo modificado realizada submergindo o eletrodo em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 5 min sob agitação constante. Estudos com MIP e NIP foram realizados.

3.3.3 MIPs eletroquimicamente sintetizados

Vale ressaltar que apesar de optar-se inicialmente pela fabricação dos hidrogéis, não só o método químico foi testado para a síntese dos MIPs, mas também a eletropolimerização, onde o pirrol foi utilizado como monômero. Visto que nesse caso uma das vantagens está na aderência do filme polimérico, característica essa inerente ao processo de eletropolimerização.

Nessa etapa do trabalho, fez-se alguns estudos utilizando o pirrol como monômero, experimento inspirado em um artigo da literatura onde se utiliza pirrol para síntese de MIP a base de cortisol [77]. Realizou-se a eletropolimerização sobre eletrodo de carbono vítreo. Previamente, um pré-tratamento na superfície do eletrodo foi realizado em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ utilizando voltametria cíclica varrendo em uma faixa de potencial de $-1,5$ à $1,5 \text{ V}$, a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Depois, lavou-se o eletrodo com água deionizada e secou-se à temperatura ambiente.

As eletropolimerizações foram realizadas utilizando voltametria cíclica varrendo em uma faixa de potencial de 0 à $0,9 \text{ V}$ a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} durante 10 ciclos em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH 7,4, contendo $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol (o valor foi variado durante os experimentos como mostrado nos resultados), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, e cortisol $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ou 5 mmol L^{-1} (quando partindo de uma solução estoque de 10 mmol L^{-1} feita em etanol). O NIP foi obtido da mesma forma que o MIP, no entanto no meio sem a presença da molécula de cortisol.

Após a obtenção do MIP, o cortisol foi removido através da super oxidação do polipirrol utilizando voltametria cíclica varrendo em uma faixa de potencial de $-0,2$ à $0,8 \text{ V}$ durante 25 ciclos em solução tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH 7,4. Além desse método, utilizado para a remoção testou-se substituir o tampão por eletrólitos salinos como KCl 1 mol L^{-1} ou KNO_3 1 mol L^{-1} , ou meio de DMSO, o qual o cortisol tem grande afinidade, utilizando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamonio como eletrólito, para a super oxidação do material nas condições de voltametria cíclica já citadas acima.

Também realizou-se alguns testes por extração química utilizando DMSO ou tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 7,4, os quais foram realizados por meio da imersão do eletrodo nessas soluções durante 30 min sob agitação constante.

3.3.3.1 Testes eletroquímicos dos MIP

Os materiais obtidos foram analisados pela técnica de voltametria cíclica, utilizando de ferricianeto de potássio 0,5 mmol L⁻¹, em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 7,4, como sonda redox. Os parâmetros utilizados durante as medidas foram velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹, em uma faixa de potencial de -0,6 à 0,7 V, varrendo três ciclos.

3.3.3.2 Testes dos MIP utilizando microbalança de quartzo

Uma das maiores dificuldades encontradas para esse processo de síntese dos MIPs é a remoção da molécula molde da matriz polimérica após o término do procedimento, uma vez que esses possuem no geral estruturas mais rígidas e menos estáveis do que os obtidos por síntese química. Além disso, esses polímeros são no geral eletroativos e, portanto, o acompanhamento da retirada da molécula molde por uma sonda redox pode não ser efetiva. Desse modo, nessa parte do trabalho, utilizou-se a microbalança de quartzo acoplada as medidas eletroquímicas a fim de avaliar a eletrodeposição, remoção do cortisol e o posterior reconhecimento do mesmo.

Essas medidas especificamente foram realizadas utilizando o potenciostato PGSTAT 128N que possui o módulo EQCM acoplado, realizadas por meio do software NOVA 1.11 disponibilizado pelo fabricante. Durante as medidas, uma célula eletroquímica especial foi empregada, onde utilizou-se um eletrodo de referência comercial de Ag/AgCl, um eletrodo de ouro como contra eletrodo e um cristal de piezoelétrico de ouro. Para isso, a síntese eletroquímica do polímero e remoção do cortisol da matriz polimérica foram realizadas nessa etapa iguais as mencionadas acima, utilizando como monômero o pirrol. No entanto, como o eletrodo de trabalho nesse caso

era de ouro somente as janelas de varredura de potencial e o número de ciclos realizados que tiveram uma pequena variação como observado nos resultados.

Por fim, os testes com adição de cortisol ao meio foram realizados verificando a variação de frequência em função do tempo a fim de analisar a capacidade de recombinação do cortisol na matriz polimérica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PARTE 1 – AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO CORTISOL

Inicialmente, estudos para verificar o comportamento eletroquímico do cortisol foram realizados com o intuito de se avaliar o melhor método eletroquímico visando à quantificação desse composto em superfícies de carbono vítreo não modificados. Essa primeira abordagem se inspirou em um artigo encontrado na literatura [78] onde os autores utilizam eletrodos de carbono vítreo modificados com Pb para redução de testosterona empregando uma etapa de adsorção prévia controlada pela aplicação de um potencial elétrico. Desse modo, e devido à similaridade estrutural da testosterona e do cortisol, iniciou-se estudo utilizando eletrodo de carbono vítreo, já que, a resposta eletroquímica de redução do cortisol foi muito similar com e sem a modificação com o Pb, como visto em estudos prévios realizados por um aluno do grupo de pesquisa.

4.1.1 Estudo do comportamento eletroquímico cortisol

Inicialmente investigou-se o comportamento eletroquímico do cortisol utilizando a técnica de voltametria cíclica e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo não modificado. Os voltamogramas cíclicos obtidos experimentalmente na presença de cortisol em tampão acetato pH 4,5 podem ser observados na Figura 4.1. Observa-se na Figura 4.1 um sinal de redução do cortisol em aproximadamente -1,30 V vs Ag/AgCl_(KCl 3 M). Nota-se também, que após três varreduras consecutivas, um decréscimo do valor da corrente de pico em -1,30 V, possivelmente devido à adsorção do cortisol ou de

subprodutos da sua redução na superfície eletródica, ocasionando o envenenamento/bloqueio da superfície do eletrodo de carbono vítreo. Dessa forma, verifica-se a necessidade do polimento e limpeza da superfície do eletrodo entre as medidas voltamétricas. Adicionalmente, por conta do sinal de redução estar localizado em uma região bastante negativa de potencial, ocorre também a evolução de H_2 devido a redução da água. Assim fica inerente a necessidade de processo de modificação da superfície do eletrodo com o intuito de garantir seletividade à detecção e quantificação do cortisol.

Figura 4.1. A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} , pH 4,5 sem (—) e com a adição de 0,5 mmol L^{-1} de cortisol (—) para o primeiro ciclo e (—) para o terceiro ciclo, utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado. Velocidade de varredura de 100 $mV s^{-1}$, sentido da varredura inicial de 0 a -1,5 V. B) Detalhe contendo somente voltamogramas em solução tampão (—) e após adição de 0,5 mmol L^{-1} de cortisol para o primeiro ciclo (—).

4.1.2 Estudo do comportamento eletroquímico em diferentes valores de pH

Estudos em diferentes valores de pH foram realizados utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial devido à maior detectabilidade da técnica eletroquímica e em virtude da baixa solubilidade do cortisol em solução aquosa (0,28 $mg mL^{-1}$ à 25°C [81]). Adicionalmente, essa técnica possibilita estimar a quantidade de elétrons envolvidas no processo de transferência de carga [12] utilizando baixas velocidades (1 - 10 $mV s^{-1}$) onde E_p (potencial de pico) $\approx E_{1/2}$.

Medidas com e sem a correção de linha base para cortisol em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 podem ser observadas na Figura 4.2, onde o voltamograma original obtido apresenta uma queda bruta do sinal de corrente nas regiões mais negativas, que se deve a redução da água nessa faixa de potencial, e uma leve queda nas regiões mais positivas dada devido a redução do oxigênio. Desse modo, por meio do voltamograma com correção da linha base realizada pelo software GPES disponibilizado pelo fabricante do potenciostato, foi possível calcular o valor de $W_{1/2}$ de 76 ± 7 mV, correspondente a um processo eletroquímico envolvendo 1,03 elétrons.

Figura 4.2. A) Voltamogramas de pulso diferencial, A) sem e B) com correção de linha base registrado em eletrodo de carbono vítreo na (—) ausência e na (—) presença de 0,2 mmol L⁻¹ cortisol em 0,1 mol L⁻¹ tampão acetato pH 4,5. Parâmetros: $E_{\text{step}} = 6$ mV (velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹), amplitude do pulso de 50 mV, faixa de potencial de -0,8 à -1,7 V.

O cortisol possui pKa de 12,6 [82] sendo difícil encontrá-lo em sua forma desprotonada. Os voltamogramas obtidos em soluções de eletrólito suporte de diferentes valores de pH são apresentados na Figura 4.3 A) onde nota-se que o processo de redução do cortisol é pH dependente. Posteriormente, com os dados obtidos dos voltamogramas em soluções de diferentes valores de pH, construiu-se uma curva de E_p (potencial de pico) em função do pH (Figura 4.3 B)).

Na Figura 4.3 B) observa-se que em meios mais ácidos o processo de redução do cortisol é facilitado, visto que os valores de potenciais de pico passam a ser menos negativos. Além disso, a regressão linear obtida para os valores de potencial é: $E_p = -0,059 \text{ pH} - 0,970$, e como o valor teórico obtido por meio da equação de Nernst

(Equação 1) é de $\frac{-0,059}{n}$ por unidade de pH [12] tem-se que o número de prótons e elétrons envolvidos no processo de redução é o mesmo.

Figura 4.3. A) Voltamogramas de pulso diferencial em eletrodo de carbono vítreo na presença de 0,2 mmol L⁻¹ cortisol em diferentes valores de pH. Os eletrólitos utilizados foram: 0,1 mol L⁻¹ ácido sulfúrico pH 1,0; 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 2,0; 0,1 mol L⁻¹ tampão acetato pH 4,5; 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 6,5; 0,1 mol L⁻¹ tampão amoniacal pH 9,0; e 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 12,0. Parâmetros: E_{step}= 6 mV (velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹), amplitude do pulso de 50 mV, faixa de potencial de -1 à -1,7 V. B) Gráfico de I_p vs.pH e E_p vs.pH (E_p = -0,059 pH - 0,970; R² 0,99).

Na literatura estudos eletroquímicos utilizando eletrodo gotejante de mercúrio são reportados para a redução do cortisol e o mecanismo envolve dois elétrons e dois prótons [83], onde supõe-se a redução da molécula ocorre na carbonila ligada ao anel. Dessa forma, nota-se que o processo de redução na superfície do eletrodo de carbono vítreo é bastante diferente do que ocorre na superfície do eletrodo de mercúrio pelos dados obtidos até o momento. Adicionalmente, na Figura 4.3 B), nota-se no gráfico de corrente de pico por pH que o maior valor de corrente de pico é observado em pH 4,5. Portanto, notou-se que o melhor valor de pH para a detecção do cortisol foi realmente em pH 4,5 e, assim, o tampão ácido acético/acetato foi utilizado nos demais estudos.

4.1.3 Estudos analíticos

Nessa etapa, diferentemente da etapa anterior, utilizou-se a voltametria de onda quadrada para os estudos analíticos, visto que essa é uma técnica muito utilizada para quantificação de compostos eletroativos em região negativas de potencial, uma vez que

permite a subtração de corrente correspondente a redução do O_2 sem a necessidade de sua remoção do sistema [12, 17].

Inicialmente, analisou-se o possível uso da etapa de pré adsorção do cortisol segundo artigo reportado na literatura [78], onde realizou-se medidas com e sem a etapa de adsorção aplicando -1,1 V durante 120s como mostrado na Figura 4.4. Notou-se então que a presença de uma etapa prévia de adsorção no sistema faz com que o sinal de corrente do processo de redução do cortisol caia consideravelmente, o que pode ser atribuído ao processo de envenenamento da superfície do eletrodo, como reportado anteriormente. Desse modo, nos estudos seguintes essa etapa não foi mais utilizada.

Figura 4.4. Voltamogramas de onda quadrada registrados utilizando eletrodo de carbono vítreo em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (—), pH 4,5 contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol sem etapa de adsorção prévia (—) e com etapa prévia de adsorção (—). Parâmetros: E_{step} -8,33 mV, amplitude de -50 mV e frequência de 60 Hz; Etapa de adsorção: -1,1 V durante 120 s.

Posteriormente, construiu-se uma curva analítica por meio de adições sucessivas da solução estoque de cortisol 5 mmol L^{-1} em solução tampão de ácido acético/acetato pH 4,5 utilizando o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, Figura 4.5. Uma faixa linear no intervalo de 10 a $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear igual a 0,99 foi observada.

Figura 4.5. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, para diferentes concentrações de cortisol: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Em destaque: Curva analítica I = -0,012 - 0,010 C_{Cort}; R²=0,99.

Desse modo, a sensibilidade obtida pela equação da reta foi de 0,010 A L mol⁻¹. Para o cálculo do limite de detecção (LD) utilizou-se a definição reportada na IUPAC [84], equação 5:

$$LD = \frac{3 \times DP_{Branco}}{S} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde, DP_{Branco} é o desvio padrão obtido entre as medidas realizadas na ausência do analito e S a sensibilidade. O limite de quantificação (LQ) foi obtido segundo a equação 6, onde obtém o menor valor possível de ser não só detectado, mas quantificado pelo método:

$$LD = \frac{10 \times DP_{Branco}}{S} \quad \text{Eq. 6}$$

Os valores calculados encontrados estão reportados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Valores do desvio padrão, limite de detecção e quantificação para análise de cortisol utilizando voltametria de onda quadrada.

Desvio Padrão para 10 medidas (A)	L.D. (μmol L ⁻¹)	L.Q. (μmol L ⁻¹)
3,9198 x 10 ⁻⁸	0,11	0,36

Observada a possibilidade de obtenção de um sinal de corrente dependente da concentração, realizou-se também um teste visando à quantificação do cortisol em uma amostra real do fármaco Otosporin® pelo método de adição de padrão (Figura 4.6).

Figura 4.6. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 para quantificação de cortisol em a) Otosporin® pelo método de adição de padrão e três adições consecutivas de cortisol b) 20 μmol L⁻¹, c) 40 μmol L⁻¹, d) 60 μmol L⁻¹, utilizando eletrodo de carbono, de -1,0 a -1,5 V: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica I = -0,269 - 0,011 C_{Cort}; R²=0,99.

Extrapolando a curva obtida, verificou-se um valor de 23 μmol L⁻¹ para concentração de cortisol no fármaco. Como a alíquota do composto foi diluída inicialmente com um fator de diluição de 5,52 vezes em tampão acetato pH 4,5, e posteriormente diluída novamente na célula eletroquímica com um fator de 250 vezes, o valor encontrado foi convertido em mg mL⁻¹ e corrigido pelos fatores de diluição, sendo o valor encontrado de 11, 59 mg mL⁻¹. O valor de cortisol apresentado no rótulo desse fármaco é de 10 mg mL⁻¹ que é concordante com o valor encontrado pelo método utilizado utilizando o teste t com 95 % confiança e 10 mg mL⁻¹ como o valor de referência.

Vale ressaltar que a sensibilidade observada na curva analítica apresentada na Figura 4.5 é bastante próxima a observada na análise da amostra pelo método de adição de padrão na Figura 4.6. Isso indica que a amostra do fármaco analisada não possui grande complexidade, não sendo estritamente necessária a utilização desse último método para eliminar efeitos de matriz.

Em seguida avaliou-se a reprodutibilidade das medidas utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, Figura 4.7. Duas concentrações, uma mais baixa e outra mais alta, ver Figura 4.7, foram testadas para avaliar esse parâmetro, porém em ambos casos observa-se que as medidas não são reprodutíveis, o que pode estar relacionado ao processo de limpeza da superfície do eletrodo entre as medidas, visto à grande adsorção da molécula. Ressalta-se que a curva de calibração na Figura 4.5 foi obtida após obtenção de vários registros voltamétricos para uma mesma concentração de cortisol, na tentativa de garantir a linearidade entre as medidas e uma limpeza adequada da superfície do eletrodo a partir do polimento mecânico em suspensão de diamante.

Figura 4.7. Testes de reprodutibilidade das medidas de voltametria de onda quadrada de -1,0 a -1,5 V em eletrodo de carbono vítreo para A) $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e B) $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5: Estep = $-8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV ; Frequência = 60 Hz .

Por conta da falta de reprodutibilidade no sistema, avaliou-se também a influência do O_2 no meio após a remoção e saturação do meio com esse gás, Figura 4.8. Nota-se na Figura 4.8 um processo em $-0,8 \text{ V}$ atribuído a redução do O_2 e o outro em $-1,3 \text{ V}$ atribuído a redução do cortisol. Observa-se que na ausência, na presença de oxigênio proveniente do ar, e saturando o meio com O_2 , o processo de redução do cortisol aparece inalterado considerando as diferentes linhas bases.

Figura 4.8. A) Voltamogramas cíclicos registrados em solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 utilizando eletrodo de carbono vítreo na ausência de O_2 (—), oxigênio proveniente do ar (—) e saturando o meio com O_2 (—). Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Figura 4.9. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, para diferentes concentrações de cortisol utilizando eletrodo de carbono vítreo e retirando O_2 do meio pela saturação do meio com argônio: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV ; Frequência = 60 Hz . Em destaque: Curva de calibração $I = -0,355 - 0,009 C_{\text{Cort}}$; $R^2=0,97$.

Figura 4.10. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V, para diferentes concentrações de cortisol utilizando eletrodo de carbono vítreo e saturando o meio de O₂: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva de calibração I = -0,010 - 0,010 C_{Cort}; R²=0,74.

Utilizando voltametria de onda quadrada, fez-se então curvas analíticas removendo e saturando o meio com O₂, como apresentado nas Figura 4.9 e Figura 4.10, respectivamente. Nessas curvas observa-se uma linearidade menor do que a verificada anteriormente para o sistema contendo oxigênio proveniente do ar atmosférico, Figura 4.5.

Figura 4.11. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para 20 μmol L⁻¹ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e polimento em alumina entre as medidas: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Estudo envolvendo material diferente para o polimento mecânico da superfície do eletrodo também foi utilizado a fim de melhorar a reprodutibilidade das medidas obtidas. Na Figura 4.11 observa-se os voltamogramas para uma mesma concentração de cortisol ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) polindo a superfície do eletrodo entre as medidas com a utilização de alumina ao em vez de suspensão de diamante. Notou-se nesse caso, que o problema de irreprodutibilidade não foi sanado pela mudança no procedimento de polimento para a limpeza do eletrodo, apontando a dificuldade de remoção do analito adsorvido na superfície eletródica.

Tratamentos eletroquímicos da superfície do eletrodo também foram realizados a fim de garantir a limpeza da superfície eletródica por meio da superoxidação e redução do material adsorvido na superfície do eletrodo. Inicialmente utilizou-se um meio contendo ácido sulfúrico e a aplicação de potenciais extremos entre as medidas voltamétricas Figura 4.12 e Figura 4.13.

Utilizando esse tratamento com ácido sulfúrico entre as medidas, nota-se não só a irreprodutibilidade dos sinais obtidos, mas também a queda do sinal progressivamente no decorrer das medidas realizadas, onde observa-se o envenenamento da superfície do eletrodo até a supressão total do sinal de redução do cortisol.

Figura 4.12. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica por voltametria cíclica em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 entre as medidas: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV ; Frequência = 60 Hz .

Figura 4.13. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para 20 μmol L⁻¹ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica pelo método pulsado em 0,1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ entre as medidas: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Posteriormente, alterou-se a composição da solução de limpeza de ácido sulfúrico para hidróxido de sódio na limpeza eletroquímica do eletrodo entre as medidas de redução do cortisol (Figura 4.14) utilizando voltametria cíclica.

Figura 4.14. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para 20 μmol L⁻¹ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica por voltametria cíclica em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH entre as medidas: E_{step} = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Observa-se na Figura 4.14 que não ocorre um envenenamento total da superfície do eletrodo a ponto de não se observar mais o sinal de redução como no caso anterior. No entanto, também não se verifica uma boa reprodutibilidade entre as medidas, mostrando que embora melhor do que a limpeza em ácido, esse tratamento também não é efetivo para a limpeza total da superfície do eletrodo entre as medidas realizadas.

Por fim, fez-se então um tratamento eletroquímico na superfície do eletrodo utilizando bicarbonado de sódio, Figura 4.15. Nota-se uma piora no sinal de redução do cortisol após o tratamento da superfície do eletrodo, onde não se observa mais um sinal de redução bem definido, o que evidencia a não eficácia do tratamento para limpeza da superfície nesse caso.

Figura 4.15. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V para 20 μmol L⁻¹ de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo e limpeza eletroquímica por voltametria cíclica em 0,1 mol L⁻¹ de Na₂CO₃ entre as medidas: Estep = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Devido a esse problema de reprodutibilidade, inspirou-se em um artigo sobre análise de testosterona em eletrodo de carbono vítreo (3 mm) utilizando CTAB [79], que é um surfactante catiônico, e apresentou resultados positivos, segundo o autor, para a testosterona que é uma molécula parecida com o cortisol. As concentrações de 3 mmol L⁻¹ e 0,7 mmol L⁻¹, que são respectivamente acima e abaixo da concentração micelar crítica que é 0,87 mmol L⁻¹, foram testadas.

Os experimentos foram realizados por meio das condições apresentadas no artigo [79], utilizando eletrodo de carbono vítreo de 3 mm de diâmetro e voltametria de onda quadrada em diferentes condições das utilizadas até aqui nesse trabalho. Os resultados podem ser observados na Figura 4.16 utilizando duas técnicas voltamétricas diferentes. Nota-se na Figura 4.16 que o sinal de redução do cortisol diminui com a adição do CTAB no sistema, mostrando que a presença de surfactante no meio não resolve o problema da grande adsorção do cortisol/subprodutos da redução na superfície eletródica.

Figura 4.16. A) Voltamogramas cíclicos registrados em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 ($E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ e 100 mV s^{-1}) contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol e de B) onda quadrada ($E_{\text{step}} = -8 \text{ mV}$; Amplitude = -40 mV ; Frequência = 25 Hz) contendo $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de $-1,0$ a $-1,5 \text{ V}$, utilizando eletrodo de carbono vítreo (—) na ausência de CTAB, (—) presença de 3 mmol L^{-1} e de (—) $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB.

Desse modo, os estudos utilizando eletrodo de carbono vítreo de 1mm e as condições já estudadas até aqui foram retomados e se testou a utilização de meio orgânico com DMSO, a fim de verificar se a adsorção da molécula no eletrodo era desfavorecida. O resultado obtido pode ser observado na Figura 4.17, onde não nota-se nenhum sinal de redução do cortisol. A ausência de um processo eletroquímico deve-se ao meio ser aprótico não disponibilizando assim próton para que o processo ocorra, como já discutido anteriormente.

Figura 4.17. Voltamogramas de onda quadrada registrados em meio orgânico de DMSO e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamonio de -1,1 a -1,6 V para diferentes concentrações de cortisol, utilizando eletrodo de carbono vítreo: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Outra alternativa para evitar o envenenamento do eletrodo e garantir então a reprodutibilidade do sistema, foi a utilização de um eletrodo de diamante dopado com boro, que tem como característica inerente ao material, uma menor adsorção dos compostos [85]. A

Figura 4.18 reporta a utilização desse material eletródico utilizando a técnica de voltametria cíclica como um estudo inicial do sistema.

Figura 4.18. Voltamogramas cíclicos registrados em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 de 0 a -1,6 V (—) na ausência e (—) na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro: $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ e velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Nota-se nesse caso, que nenhum processo de redução do cortisol foi observado nesse material, mostrando que a adsorção é primordial para que o processo de transferência de eletrônica aconteça.

Por fim, a modificação do eletrodo de carbono vítreo de (1 mm) com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente, foi avaliada, segundo colaboração com uma aluna de mestrado do grupo de pesquisa, a fim de verificar se esse material iria melhorar a ancoragem das moléculas de cortisol, e consequentemente, melhorar o sinal analítico.

Inicialmente, o óxido de grafeno foi reduzido sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo como observado na Figura 4.19, onde há a redução dos grupamentos oxigenados, e algumas ligações duplas são então reestabelecidas, tornando o material mais condutor do que o óxido de grafeno, que tem características isolantes [86].

Figura 4.19. Voltamogramas cíclicos registrado no processo de modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com 2 μL de dispersão de óxido de grafeno (OG) 1 mg mL^{-1} em meio de sulfato de sódio 50 mmol L^{-1} de 1,0 a -1,2 V: $E_{\text{step}} = 5\text{ mV}$ e velocidade de varredura 50 mV s^{-1} e desoxigenação do eletrólito suporte com argônio.

Figura 4.20. Voltamogramas cíclicos registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de $-0,3$ a $0,7 \text{ V}$ em a) eletrodo limpo e b) Eletrodo modificado com oxido de grafeno reduzido eletroquimicamente: Estep = 5 mV e velocidade de varredura 100 mVs^{-1} .

Posteriormente avaliou-se o comportamento da sonda redox ferricianeto de potássio no eletrodo limpo e modificado (Figura 4.20), onde observa-se um aumento da corrente capacitiva na superfície eletródica, mas não um aumento expressivo do sinal de corrente da oxidação do ferricianeto. No entanto, a partir desse gráfico não é possível considerar ou estimar quão grande foi o aumento de área ocasionado pela modificação do eletrodo, e o quanto esse aumento poderia influenciar no sinal de corrente.

Desse modo, utilizando o eletrodo modificado, realizou-se medidas do cortisol por meio da técnica de voltametria cíclica (Figura 4.21), como já estudado no início dessa dissertação para eletrodo de carbono vítreo não modificado. Observou-se, um aumento considerável de sinal de corrente, de aproximadamente dezesseis vezes, embora não tenha havido antecipação do processo de redução do cortisol.

Esse estudo mostra que esse material é promissor e deverá ser avaliado no futuro para o monitoramento desse composto. Além disso, estudos para estimar o aumento de área do eletrodo modificado são ainda necessários a fim de garantir que o sinal não aumenta demasiadamente somente pelo aumento de área do eletrodo devido à adição do nanomaterial.

Figura 4.21. Voltamogramas cíclicos registrados utilizando eletrodo de carbono vítreo 0,1 mol L⁻¹ tampão acetato pH 4,5 não modificado e modificado com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente em (b, c) e na presença de 0,5 mmol L⁻¹ de hidrocortisona em (a, d). Em destaque: Voltamogramas cíclicos em eletro de carbono vítreo limpo. Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

4.2 PARTE 2 – ELETRODOS DESCARTÁVEIS

Visando contornar a falta de reprodutibilidade do método reportado anteriormente, optou-se pela utilização de eletrodos descartáveis visando à quantificação do cortisol, e evitando assim a necessidade do polimento para renovação da superfície eletródica. Para isso, escolheu-se o grafite como eletrodo de trabalho, uma vez que o eletrodo de carbono vítreo havia sido utilizado na parte inicial desses estudos e que o grafite é um material acessível de carbono, fácil de ser encontrado e acoplado em plataformas de papel, visando fabricar dispositivos de baixo custo. Os primeiros testes foram realizados em uma célula eletroquímica, utilizando as mesmas condições empregadas nos estudos realizados em carbono vítreo. Contudo, ferricianeto de potássio foi adicionado ao meio com o intuito de normalizar a corrente eletródica pelo sinal da redução do ferricianeto de potássio ao se utilizar dispositivos diferentes entre as medidas realizadas.

Para isso, realizou-se um teste inicial com e sem a presença de ferricianeto de potássio a fim de analisar o comportamento do sinal de cortisol em ambos casos, Figura 4.22. Observa-se na Figura 4.22 que o sinal de redução do cortisol em -1,23V na presença do ferricianeto de potássio é maior do que na ausência da sonda redox utilizada. Vale destacar que o sinal de redução em 0,18 V deve-se ao processo eletroquímico do ferricianeto de potássio. O aumento de corrente na presença do ferricianeto de potássio provavelmente deve-se a regeneração de parte do produto gerado pela redução do cortisol, levando a um aumento na quantidade de moléculas de cortisol a serem reduzidas pela aplicação de potencial. Além disso, em aproximadamente -0,7 V observa-se um processo de redução que pode ser atribuído a redução do O_2 , como será verificado mais adiante.

Figura 4.22. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 com e sem $K_3Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} para quantificação de cortisol utilizando eletrodo de grafite suportados em plataforma de papel, de -0,5 a -1,5 V: Estep = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Após o teste, obteve-se uma curva analítica por meio de adições sucessivas da solução estoque de cortisol 5 mmol L^{-1} , Figura 4.23. A partir dos voltamogramas reportados na Figura 4.23, os dados foram normalizados onde a corrente de redução i_c é dividida pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio i_f , como visto na Figura 4.24.

Figura 4.23. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Figura 4.24. Voltamogramas de onda quadrada normalizados pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica $I = 0,014 + 0,005 C_{\text{Cort}}$; $R^2=0,97$.

Uma faixa linear variando de 10 a 70 μmol L^{-1} com coeficiente de correlação linear igual a 0,97 foi observada. Nota-se também que a normalização do sinal pode minimizar os efeitos de adsorção que poderiam ser observados por meio das adições sucessivas de cortisol no meio, a fim de não precisar utilizar um novo grafite a cada

adição durante a construção da curva analítica, além de proporcionar uma correção da área eletródica quando houver a utilização de dispositivos fabricados em dias diferentes.

Vale destacar também que sensibilidade obtida pela equação da reta foi de $0,005 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$, onde após reproduzir mais vezes o procedimento, em diferentes eletrodos de grafite, obteve-se um valor de coeficiente angular médio (relacionado a sensibilidade) de $0,0055 \pm 0,0006 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$. Nesse caso, nota-se que o valor do desvio padrão é baixo o que nos aponta ser esse um sistema promissor acerca da obtenção de reprodutibilidade entre as medidas.

Posteriormente, medidas retirando O_2 pela saturação do meio com argônio foram também realizadas, e estão apresentadas nas Figura 4.25. Nesse caso, nota-se que o processo em $-0,7 \text{ V}$, não desaparece mostrando não ser referente a redução do O_2 , e sim, a alguma impureza inerente ao material utilizado. Também através desse gráfico pode-se ver o comportamento da corrente com as adições sucessivas de cortisol, que podem ser melhor observadas após a normalização dos dados e construção da curva analítica, como apresentado em Figura 4.26. Uma faixa linear entre 10 e $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ foi observada com coeficiente de correlação linear igual a $0,95$ que é menor do que o obtido para o sistema sem a desgaseificação, indicando a não necessidade da remoção do O_2 do meio neste caso.

Figura 4.25. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para quantificação de cortisol, retirando O_2 pela saturação do meio com argônio e utilizando eletrodo de grafite, de $-0,5$ a $-1,5 \text{ V}$: Estep = $-8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV ; Frequência = 60 Hz .

Figura 4.26. Voltamogramas de onda quadrada normalizados pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, registrados em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,5 e K₃Fe(CN)₆ 0,5 mmol L⁻¹ para quantificação de cortisol, retirando O₂ pela saturação do meio com argônio e utilizando eletrodo de grafite, de -0,5 a -1,5 V: Estep = -8,33 mV; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica $I = -0,017 + 0,005 \text{ CCort}$; $R^2=0,95$.

Após a obtenção dos dados em eletrodo de grafite utilizando uma célula eletroquímica, testes utilizando a plataforma de papel, sob as mesmas condições, foram realizados. Nesses testes, os eletrodos foram imobilizados sob o papel, sendo o contra eletrodo também de grafite e o eletrodo de tinta de prata. Desse modo voltamogramas de onda quadrada foram obtidos com as sucessivas adições de cortisol no meio contendo ferricianeto de potássio, como observado na Figura 4.27. Nesse sistema o pico de redução do cortisol é observado em -1,45 V, ou seja, com um deslocamento no sentido mais negativo de potencial, provavelmente devido à mudança o eletrodo de referência. Além disso, também o processo de redução do ferricianeto encontra se deslocado, sendo observado em aproximadamente 0,01 V.

Assim, através dos voltamogramas observados na Figura 4.27 normalizou-se os dados obtidos, como já mostrado anteriormente, onde construiu-se uma curva analítica, Figura 4.28.

Figura 4.27. Voltamogramas de onda quadrada registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite imobilizado em plataforma de papel, de -0,5 a -1,5 V: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz.

Figura 4.28. Voltamogramas de onda quadrada normalizados pela corrente de pico de redução do ferricianeto de potássio, registrados em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para quantificação de cortisol, utilizando eletrodo de grafite imobilizado em plataforma de papel, de -0,5 a -1,5 V: $E_{\text{step}} = -8,33 \text{ mV}$; Amplitude = -50 mV; Frequência = 60 Hz. Inset: Curva analítica $I = 0,0031 + 0,0008C_{\text{Cort}}$; $R^2=0,99$.

Uma faixa linear entre 10 e 100 μmol L^{-1} com coeficiente de correlação linear igual a 0,99 foi observada na Figura 4.28. Além disso, a partir da equação da reta a

sensibilidade obtida é de $0,0008 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$, sendo que realizando esses experimentos mais de uma vez o valor médio de coeficiente angular obtido (relacionado a sensibilidade) foi de $0,0008 \pm 0,00005 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$, apresentando também esse um baixo desvio padrão, demonstrando que essa abordagem é bastante promissora para a detecção e quantificação do cortisol eliminando o problema de falta de reprodutibilidade devido à grande adsorção do analito na superfície do eletrodo.

Vale destacar também que esse são dispositivos de baixo custo, cujo a faixa linear observada se deu na mesma faixa de concentração àquela comparada ao método desenvolvido utilizando eletrodo de carbono vítreo. Contudo, uma otimização do sistema ainda é necessária, o que poderia proporcionar detecções em faixas ainda mais baixas, despertando assim, um maior interesse da utilização desses dispositivos descartáveis nesse trabalho. Ainda assim, essa faixa de concentração é elevada se comparado aos trabalhos apresentados na literatura para quantificação do cortisol em amostras biológicas, que chegam a faixa de nmol L^{-1} [36], no entanto nenhum trabalho é apresentado utilizando eletrodos simples e não modificados como os aqui apresentados, os quais podem ser aprimorados de acordo com a aplicação.

4.3 PARTE 3 - POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESSOS (MIPs)

Paralelo aos estudos sobre o comportamento eletroquímico do cortisol utilizando eletrodo de carbono vítreo e superfícies gráficas, iniciaram-se os estudos sobre a modificação eletroquímica da superfície do eletrodo com polímeros molecularmente impressos visando alcançar uma maior seletividade para a detecção dessa molécula. Nessa etapa dois caminhos podem ser traçados: 1) detecção direta do cortisol após seleção do cortisol pela cavidade do polímero e 2) detecção indireta do cortisol utilizando sonda redox.

A primeira abordagem parece ser mais complicada devido à necessidade de renovação da superfície como mostrado na parte 1 e devido ao potencial de redução bastante negativo apresentado pelo cortisol podendo ocasionar em algumas interferências. Na literatura [77] o uso de uma sonda redox a fim de monitorar a entrada e saída do cortisol das cavidades de reconhecimento visando à quantificação indireta

pela supressão do sinal exibido pela sonda utilizada é uma das abordagens mais empregadas para monitorar espécies não eletroativas ou que necessitem de altos potenciais de redução ou oxidação. Outros métodos de análise, utilizando microbalança de quartzo e espectroscopia de impedância eletroquímica para a quantificação do analito nos eletrodos modificados também podem ser utilizados. Desse modo, inicialmente os estudos foram conduzidos usando um sensor eletroquímico como transdutor e diferentes estratégias de preparação do MIP visando a quantificação indireta de cortisol.

4.3.1 MIPs quimicamente sintetizados

Inicialmente escolheu-se o método químico para a síntese dos polímeros, uma vez que materiais do tipo hidrogéis, já haviam sido utilizados por uma aluna de doutorado do grupo de pesquisa, que são quimicamente estáveis para utilização em eletrodos modificados [87]. Além disso, esses materiais são biocompatíveis, o que é importante visando ao desenvolvimento de sensores do tipo *wearable* para aplicação no monitoramento do cortisol.

4.3.2 Testes realizados com os MIPs quimicamente sintetizados

Primeiramente preparou-se o MIP e o NIP (polímero não impresso) e lavou-se com DMSO a fim de remover o cortisol do material para a criação das cavidades no polímero sintetizado. Esse procedimento foi acompanhado pela obtenção de espectros UV-Vis do sobrenadante após cada lavagem, como apresentado na Figura 4.29. Pode-se observar na Figura 4.29 A) que durante a lavagem do MIP a banda em 270 nm referente a transição $n \rightarrow \pi^*$ [88] na molécula de cortisol vai diminuindo com o decorrer do procedimento, apontando que uma menor quantidade de cortisol está sendo extraída do material a cada lavagem, até que não se observa mais a absorção responsável pelo cortisol em solução de DMSO, isto é, todo o cortisol foi removido. Já no NIP o mesmo não ocorre, onde a banda referente ao cortisol não é observada, o que já era esperado visto que a molécula molde não é utilizado na síntese desse material, sendo esse o material de controle para comparação.

Figura 4.29. Espectros UV-Vis registrados do sobrenadante durante o processo de lavagem do a) MIP e b) NIP em DMSO.

Vale ressaltar também que a banda negativa observada nos espectros está inerente ao uso de cubetas diferentes em um espectrofotômetro de duplo feixe, sendo portanto artefato da medida.

4.3.2.1 Capacidade de recombinação da molécula molde

Após remoção da molécula molde, testou-se a capacidade de recombinação do cortisol com o material desenvolvido, a fim de verificar a sua afinidade com o polímero desenvolvido. Esse teste foi realizado utilizando medidas espectrofotométricas. Na Figura 4.30 estão apresentados os espectros UV-Vis retirados após contato do MIP e do NIP com solução contendo cortisol.

Nota-se na Figura 4.30 que a solução de cortisol após entrar em contato com o MIP diminui a intensidade do sinal referente à absorção do cortisol, mostrando que o MIP retém o cortisol, enquanto que o NIP retém uma quantidade muito menor dessa molécula devido às interações não específicas.

Figura 4.30. Espectros UV-Vis registrados de uma solução contendo $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cortisol em DMSO e após a adição do MIP e NIP à solução.

4.3.2.2 Eletrodo modificado pela técnica de "casting"

Verificada a possibilidade de recombinação do cortisol com a cavidade do material polimérico preparado foi realizada a imobilização do mesmo sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, utilizando uma membrana celulósica e um o-ring para a ancoragem de 20 mg de MIP ou NIP. Desse modo, primeiramente verificou-se a capacidade do cortisol de passar a camada modificadora e atingir a superfície eletródica utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada em tampão acetato contendo cortisol antes e após a modificação da superfície do eletrodo com o MIP. O eletrodo modificado foi deixado em solução contendo cortisol durante 15 min sobre agitação antes da obtenção do voltamograma (Figura 4.31).

Observa-se na Figura 4.31 que ocorre o transporte do cortisol pela camada do hidrogel e membrana celulósica chegando até a superfície do eletrodo, onde ocorre a redução do mesmo. Contudo, visando evitar a necessidade da renovação frequente da superfície, iniciaram-se testes utilizando ferricianeto de potássio para avaliar a recombinação do cortisol no material pela supressão de sinal do ferricianeto após a recombinação do cortisol com a cavidade.

Figura 4.31. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 de -1,0 a -1,5 V em solução contendo 60 μmol L⁻¹ de cortisol, utilizando (—) eletrodo de carbono vítreo e (—) eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP após 15 min na mesma solução: E_{step} = -8 mV; Amplitude = -40 mV; Frequência = 25 Hz.

Desse modo, utilizando o ferricianeto de potássio como sonda redox avaliou-se voltametricamente a passagem dos íons ferricianeto através da camada modificadora. Esses testes foram realizados com o passar do tempo do eletrodo modificado em solução de ferricianeto de potássio para ambos casos, tanto MIP quanto NIP, ou os polímeros após serem submetidos a uma solução contendo cortisol (MIP-Cortisol e NIP-Cortisol), como apresentado na Figura 4.32 e Figura 4.33.

Figura 4.32. Voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V em eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de A) MIP e B) MIP-cortisol com o decorrer do tempo em solução sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

Figura 4.33. Voltamogramas cíclicos registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} de $-0,3$ a $0,7 \text{ V}$ em eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de A) NIP e B) NIP-cortisol com o decorrer do tempo em solução sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Nas Figura 4.32 e Figura 4.33 observa-se que no MIP a sonda redox atinge a superfície eletródica mais rapidamente do que nos demais casos, indicando que os polímeros não impressos, aqueles submetidos a uma solução contendo cortisol são menos porosos, dificultando a chegada da sonda à superfície do eletrodo. Ao avaliar comparativamente os polímeros (MIP, MIP-Cortisol, NIP e NIP-Cortisol) para o tempo de dez minutos em solução de ferricianeto de potássio, notou-se dessa maneira que há uma supressão maior do sinal da sonda redox no NIP e em ambos os polímeros após o preenchimento das cavidades com o cortisol em comparação ao MIP, como apresentado na Figura 4.34. Na Figura 4.34 pode-se observar que somente o MIP apresenta o final da sonda redox e que após a recombinação com o cortisol o sinal da sonda redox é suprimido, indicando assim, a possibilidade de detecção indireta usando esse sistema.

Figura 4.34. Comparação dos voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V em eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP, MIP-cortisol, NIP e NIP-cortisol após 10 min em solução sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

Os demais testes foram realizados para a recombinação do cortisol com a matriz polimérica do MIP adicionando alíquotas de cortisol diretamente à uma solução contendo a sonda redox de ferricianeto de potássio (Figura 4.35) ou também mantendo o eletrodo em solução de cortisol para posteriormente realizar das medidas em solução de ferricianeto de potássio (Figura 4.36). No entanto, devido à quantidade de material polimérico sobre o eletrodo, e consequentemente uma grande espessura do filme, notou-se que a difusão dos íons ferricianeto por entre o polímero é lenta e portanto, foi necessário manter o eletrodo modificado em solução de ferricianeto de potássio durante 15 minutos previamente as medidas voltamétricas. Esse protocolo foi necessário com o intuito de que a sonda se difunda até a superfície eletródica e os processos de oxidação e redução da mesma pudessem ser observados.

Essas medidas foram realizadas utilizando voltametria cíclica e também de pulso diferencial, que é uma técnica mais sensível, onde avaliou-se nessa última o processo de oxidação do ferrocianeto de potássio. Desse modo, para o procedimento de adição de cortisol no meio, Figura 4.34, nota-se que a supressão de sinal da sonda redox não se dá de modo linear com o aumento das concentrações de cortisol no meio.

Figura 4.35. A) Voltamogramas cíclicos e B) voltamogramas de pulso diferencial registrados após 20 min em 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP com sucessivas adições de cortisol ao meio. Velocidade de varredura na voltametria cíclica 100 mV s⁻¹ e parâmetros da voltametria de pulso diferencial: E_{step} = 5mV e amplitude do pulso 50mV.

Figura 4.36. A) Voltamogramas cíclicos e B) voltamogramas de pulso diferencial registrados após 15 min em 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com 20 mg de MIP deixando o eletrodo primeiramente em solução de cortisol durante quinze minutos. Velocidade de varredura na voltametria cíclica 100 mV s⁻¹ e parâmetros da voltametria de pulso diferencial: E_{step} = 5mV e amplitude do pulso 50 mV.

Além disso, para o experimento realizado deixando o eletrodo primeiramente em solução de cortisol durante quinze minutos, Figura 4.35, e posteriormente na solução da sonda redox, nota-se a supressão do sinal de ferricianeto para diferentes concentrações

de cortisol, no entanto, assim como para o caso anterior, esse comportamento também não se dá de forma linear com o aumento da concentração do cortisol.

Isso pode ter acontecido não só porque o cortisol não se liga as cavidades específicas do polímero ocasionando um bloqueio da passagem dos íons ferricianeto até a superfície eletródica, mas também pela falta de reprodutibilidade na ancoragem do material polimérico sobre o eletrodo, uma vez que a cada modificação o filme pode apresentar diferentes espessuras entre membrana celulósica e a superfície eletródica, visto que o procedimento é feito manualmente, onde a passagem da sonda redox pode ser mais ou menos efetiva com a variação da espessura.

Assim, testes para averiguar a reprodutibilidade de imobilização do MIP sobre a superfície do eletrodo foram efetuados, onde ancorou-se 20 mg de MIP no eletrodo, e avaliou-se os voltamogramas cíclicos em solução de ferricianeto de potássio com o decorrer do tempo do eletrodo modificado em solução, como já visto anteriormente (Figura 4.32). Além disso, diferentes quantidades de MIP (10 mg) foram também analisada para a imobilização sobre o eletrodo, onde ambos experimentos foram realizados em duplicata como apresentado na Figura 4.37.

Nota-se na Figura 4.37 a partir dos voltamogramas registrados, com diferentes eletrodos fabricados utilizando o mesmo protocolo, que não há uma reprodutibilidade relacionada com o processo de imobilização do MIP, tanto para 10 mg quanto para 20 mg. Dessa forma, o procedimento utilizado para a imobilização dos hidrogéis não é efetivo, uma vez que ao fixar o MIP ou o NIP com a membrana sob o eletrodo de forma manual, a camada polimérica sobre o eletrodo pode ficar com diferentes espessuras, causando assim uma grande irreprodutibilidade dos dados extraídos do sistema estudado.

Figura 4.37. A) Voltamogramas cíclicos registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} , de $-0,3$ a $0,7 \text{ V}$, utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com (A e B) 20 mg e com (C e D) 10 mg de MIP. Medidas realizadas com o passar do tempo do eletrodo modificado em solução sob agitação. Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

4.3.2.3 Eletrodo modificado pela técnica de "spin coating"

Notada a dificuldade da obtenção de filmes finos sobre a superfície do eletrodo, outros métodos de modificação com os hidrogéis poderiam ser testados. Desse modo, utilizou-se polidimetilsiloxano (PDMS), que é um polímero permeável, para ancoragem do MIP sobre o eletrodo de carbono vítreo por meio da técnica de *spin coating*, o que possibilitou a obtenção de uma camada polimérica menos espessa e melhor aderida à superfície do eletrodo, podendo proporcionar melhor difusão do ferricianeto de potássio

(sonda redox) pelo material até a superfície do carbono vítreo durante os testes voltamétricos, assim como do cortisol.

Para isso, inicialmente, modificou-se o eletrodo utilizando somente o PDMS, onde observou-se por meio da técnica de voltametria cíclica, em solução de ferricianeto de potássio, que o eletrodo modificado com PDMS não apresentou contato elétrico pela dificuldade de passagem do eletrólito para a superfície do carbono vítreo (Figura 4.38).

Figura 4.38. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 min sob agitação em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} de $-0,3$ a $0,7 \text{ V}$ utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com PDMS: velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Após a modificação do eletrodo com o MIP fabricado quimicamente, nota-se que a passagem do eletrólito é eficaz no meio e o contato elétrico é garantido. Dessa forma, testes foram realizados por meio da técnica de voltametria cíclica, e observou-se a supressão do sinal do ferricianeto de potássio com as respectivas adições de cortisol em solução de ferricianeto (Figura 4.39).

Figura 4.39. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 min sob agitação em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP pela técnica de "spin coating" com sucessivas adições de cortisol ao meio (velocidade de varredura 100 mV s⁻¹), e em B) a respectiva curva de corrente de pico em função das adições de cortisol.

Nota-se na Figura 4.39 que ocorre a diminuição da corrente de pico do processo eletroquímico da sonda redox demonstrando assim a possibilidade da recombinação do analito com as cavidades impressas no polímero. Após a realização das medidas, o eletrodo modificado foi colocado em solução de KCl, sob agitação constante durante cinco minutos, e ao ser inserido novamente em solução de ferricianeto de potássio notou-se a volta do comportamento voltamétrico da sonda redox ao estado inicial. Esse resultado pode indicar o desligamento do cortisol das cavidades após o teste e possibilidade de reutilizar o mesmo eletrodo para medidas consecutivas.

Por fim, o eletrodo modificado foi colocado em tampão fosfato pH 7,4 após teste inicial, onde permaneceu durante cinco dias. Posteriormente, foi testado novamente em solução de ferricianeto de potássio para adições sucessivas de cortisol, Figura 4.40. Nesses voltamogramas observou-se também a supressão do sinal do ferricianeto de potássio com as respectivas adições de cortisol, como no primeiro teste realizado com esse eletrodo. No entanto, o sinal observado foi menor nesse caso do que no dia em que o eletrodo foi modificado. Além disso, nota-se um pequeno distanciamento dos picos de oxidação e redução da sonda com as adições de cortisol, o que poderia indicar que mais cavidades no MIP são atingidas bloqueando mais a passagem dos íons ferricianeto para a superfície eletródica. Isso poderia tornar, de certo modo, a superfície mais resistiva, originando o distanciamento entre os picos de oxidação e redução.

Figura 4.40. A) Voltamogramas cíclicos registrados após 5 min sob agitação em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP pela técnica de "spin coating" com sucessivas adições de cortisol ao meio após 5 dias de modificação em eletrodo já utilizado, e em B) a respectiva curva de corrente de pico em função das adições de cortisol.

No entanto, como a solução estoque de cortisol utilizada para as adições foi preparada em DMSO. Iniciou-se primeiramente o teste com a adição de uma quantidade de DMSO equivalente à da primeira adição de cortisol, em destaque como um ponto vermelho da curva de *i* versus concentração de cortisol na Figura 4.40, onde nota-se que a própria adição do solvente leva a uma queda do sinal de corrente, podendo ocasionar uma falsa resposta.

Testes também foram realizados com NIP, para controle, como observado na Figura 4.41, onde nota-se que o próprio NIP apresenta uma resposta de diminuição da corrente de pico da sonda redox de ferricianeto de potássio frente as sucessivas adições de cortisol, visto que a adição de DMSO inicial, representada em vermelho na Figura 4.41. B, também ocasiona a diminuição de corrente.

Figura 4.41. A) Voltamogramas cíclicos após 5 min sob agitação em solução 0,1 mol L⁻¹ KCl e K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ de -0,3 a 0,7 V utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com NIP pela técnica de "spin coating" com sucessivas adições de cortisol ao meio, e em B) a respectiva curva de corrente de pico em função das adições de cortisol.

Desse modo, verificou-se que embora procurando um método reprodutível para a imobilização do material e modificação do eletrodo, esse não se apresentou eficaz, uma vez que, a mistura entre o PDMS e o MIP ou NIP levaram a obtenção de resposta frente as adições de cortisol tanto no caso do MIP quanto do polímero não impresso, o NIP. Esse fato pode estar sendo ocasionado pela própria adição de DMSO ao meio e não pela presença do cortisol como se esperava observar. Assim, fica evidente a necessidade da investigação de outras maneiras de modificação do eletrodo, ou ainda, a possibilidade do material obtido ser utilizado para uma etapa de pré-tratamento da amostra.

4.3.3 MIPs eletroquimicamente sintetizados

Frente a todos os estudos aqui apresentados, vale ressaltar que apesar de optar-se inicialmente pela fabricação dos hidrogéis, não só o método químico foi testado para a síntese dos MIPs, mas também a eletropolimerização utilizando monômeros como: pirrol, anilina, fenilenodiamina. Uma característica bastante interessante desse processo de fabricação está relacionada à aderência do filme polimérico, característica essa inerente ao processo de eletropolimerização e da obtenção de filmes finos sobre a superfície do eletrodo.

4.3.3.1 Testes eletroquímicos dos MIP

Uma das maiores dificuldades desse processo encontra-se na remoção da molécula molde da matriz polimérica após a síntese do MIP, uma vez que esses possuem em geral estruturas mais rígidas e menos estáveis do que os obtidos por síntese química. Além disso, o acompanhamento da remoção do cortisol para os MIPs obtidos dessa maneira também é difícil de ser avaliada, visto que o polímero nesse caso, é também eletroativo, o que dificulta a utilização da sonda redox se comparado aos polímeros molecularmente impressos fabricados quimicamente. Também, vale ressaltar, que devido ao processo de redução do cortisol se apresentar em potencial bastante negativo, torna-se inviável a utilização desse sinal para o acompanhamento da extração da molécula molde após fabricação eletroquímica do polímero molecularmente impresso.

Um dos testes iniciais que mostrou potencial para o desenvolvimento do MIP foi o teste com o pirrol, baseado em um trabalho da literatura para o desenvolvimento de um MIP para cortisol [77]. Para isso, inicialmente utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo, no qual fez-se o tratamento da superfície com ácido sulfúrico. Posteriormente modificou-se o eletrodo com $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, que é a quantidade utilizada no artigo [77] para fazer o MIP em meio de solução tampão e cortisol, como mostrado na Figura 4.42 A. Para a remoção da molécula molde após a eletropolimerização do MIP, utilizou-se as orientações do artigo [77], que envolve a varredura de potencial utilizando voltametria cíclica, a fim de garantir uma superoxidação do material durante vinte e cinco ciclos (Figura 4.42 B), proporcionando a contração e expansão do polímero, o que pode ocasionar a remoção da molécula molde das cavidades.

Figura 4.42. Voltamogramas cíclicos registrados para o processo de A) modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo em solução contendo $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L^{-1} de 0,9 a 0 V (10 ciclos). B) Voltamogramas ciclos registrados durante o processo de extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 25 ciclos de -0,2 a 0,8 V: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Por fim, para o teste do material anterior, e posteriormente a modificação do eletrodo e remoção do cortisol, uma solução de ferricianeto de potássio foi utilizada como apresentado na Figura 4.43.

Figura 4.43. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de -0,6 a 0,8 V para eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (Figura 4.42). Antes e após extração (que foi realizada duas vezes na mesma condição): Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Foi possível se observar na Figura 4.43 que o eletrodo limpo apresenta picos bem definidos relacionado a redução e oxidação dessa sonda redox utilizada. Já após a modificação do eletrodo, com o polipirrol que é um filme condutor, os sinais referentes a oxidação e redução da sonda redox aumentam juntamente com o aumento da corrente capacitiva, como já esperado. A cinética de transporte de elétrons se torna maior devido à permeabilidade dos íons ferricianeto nos poros do filme, que entram no filme facilmente devido interações eletrostáticas, uma vez que os íons ferri e ferrocianeto possuem carga negativa e o polímero possui carga positiva [77].

No entanto, ao tentar promover a extração do cortisol da matriz polimérica, nota-se que um aumento do sinal de redução e oxidação da sonda redox não foi observado como esperado e reportado pelo artigo [77]. Desse modo, realizou-se o processo para extração mais uma vez, onde o sinal de ferricianeto observado posteriormente continuou o mesmo. Isso pode ter acontecido porque com a promoção de varredura de potencial por voltametria cíclica em solução tampão o polímero pode sofrer eletromodulação estrutural, podendo assim ficar menos poroso, o que dificulta em massa a entrada e saída de íons e principalmente moléculas [89].

Uma alternativa a esse estudo foi reduzir a quantidade de pirrol utilizado para a eletropolimerização do filme a $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$, uma vez que grandes quantidades desse monômero podem ocasionar o desenvolvimento de um filme muito espesso, dificultando a remoção da molécula molde das cavidades. Os gráficos obtidos da eletropolimerização e do processo de extração do cortisol para esse caso podem ser observados na Figura 4.44.

Nesse caso, como a quantidade de pirrol é bem menor no meio de eletropolimerização se comparado ao primeiro, é possível observar mais claramente que durante o processo de modificação o sinal de corrente decresce com o aumento do número de ciclos. Esse efeito pode ser ocasionado pela concentração muito baixa de pirrol no meio, onde a oxidação do monômero na matriz não pode contribuir substancialmente com o aumento da corrente total, visto que a concentração, temperatura e potencial são fatores importantes para atingir uma taxa de reação bem definida, onde a corrente cresce com a eletropolimerização do material [90].

Figura 4.44. Voltamogramas cíclicos registrados para o processo de A) modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo em solução contendo $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de pirrol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cortisol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L^{-1} de 0,9 a 0 V (10 ciclos). B) Voltamogramas ciclos registrados durante o processo de extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 25 ciclos de -0,2 a 0,8 V: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

No entanto, após o teste do eletrodo em solução de ferricianeto de potássio, nota-se que houve a modificação devido ao bloqueio da superfície eletródica, embora essa quantidade de material depositado não tenha sido alta suficiente para garantir grande condutividade ao material como acontece no primeiro caso, cujo sinais de corrente são muito maiores após a modificação do eletrodo.

Posteriormente a eletropolimerização, a extração do cortisol foi realizada da mesma forma do que no primeiro caso, onde o perfil obtido para os voltamogramas também foi diferente, devido provavelmente ao distinto material obtido, e o sinal de corrente cai com o passar dos ciclos uma vez que durante a superoxidação do material grupos oxigenados como os carboxílicos, por exemplo, são introduzidos na parte mais externa da matriz polimérica, tornando o material menos condutor [77], como também observado no primeiro caso para o polímero contendo um filme mais espesso de polipirrol.

Assim, observando os resultados obtidos nessa etapa em ferricianeto de potássio (Figura 4.46), nota-se que o eletrodo contendo MIP, anteriormente a remoção do cortisol, não apresenta aumento expressivo do sinal de corrente como no primeiro caso. Esse fato pode estar relacionado com a baixa quantidade de monômero utilizada e

provável baixa espessura do filme. Após a tentativa de extração do cortisol da matriz polimérica, o sinal referente aos processos de oxidação e redução da sonda redox observados inicialmente já não aparecem, mostrando a dificuldade da passagem dos íons ferricianeto pela matriz polimérica, ocasionada provavelmente a eletromodulação estrutural do polímero sobre o eletrodo após aplicação de potencial[89]. Levando isso em consideração, tentou-se remover o cortisol da matriz polimérica utilizando outros eletrólitos suportes, uma vez que na literatura foi reportado o uso de uma solução fortemente salina para a remoção de fenacetina das cavidades de um MIP desenvolvido utilizando como base o pirrol [91]. Desse modo tentou-se realizar a extração do cortisol da matriz polimérica pela segunda vez pela técnica de voltametria cíclica utilizando 1 mol L⁻¹ de KCl e posteriormente utilizando 1 mol L⁻¹ de KNO₃ como apresentado na Figura 4.45, onde não se verificou uma grande mudança nos voltamogramas durante os procedimentos.

Figura 4.45. Voltamogramas cíclicos da extração do cortisol da matriz polimérica em A) 1 mol L⁻¹ de KCl durante 25 ciclos de -0,2 a 0,8 V e em B) 1 mol L⁻¹ de KNO₃ durante 25 ciclos de -0,2 a 0,8 V: Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹.

Além disso, após cada um dos procedimentos, realizou-se medida em solução de ferricianeto de potássio novamente (Figura 4.46), a fim de verificar a remoção da molécula molde por meio da facilitação da passagem dos íons ferricianeto pelo polímero onde se observaria um aumento de sinal referente a oxidação e redução dessa sonda redox. No entanto isso não foi verificado para nenhuma das duas tentativas de extração.

Figura 4.46. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 e K₃Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ de -0,6 a 0,8 V para eletrodo de carbono vítreo (—) limpo e modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (Figura 4.44), (—) antes e após extração do cortisol em (—) 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4, (—) 1 mol L⁻¹ de KCl e (—) 1 mol L⁻¹ de KNO₃ utilizando voltametria cíclica: Velocidade de varredura 100 mV s⁻¹.

Desse modo, modificando o eletrodo mais uma vez segundo o último procedimento utilizado, onde houve uma diminuição na quantidade de pirrol (12,5 mmol L⁻¹), tentou-se outros tipos de extração do cortisol como em DMSO durante 30 min sob agitação sem aplicação de potencial, DMSO por voltametria cíclica (Figura 4.47) e também em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 30 min sob agitação sem aplicação de potencial.

Dessa extração eletroquímica em DMSO, nota-se uma queda na corrente, como esperado segundo os estudos anteriores. Assim, para todos os testes o perfil do ferricianeto foi verificado, como apresentado na Figura 4.48, onde nenhum sinal referente a sonda redox é notado como espera-se observar pela extração da molécula molde, onde a entrada dos íons ferricianeto na matriz polimérica deveria ser facilitada e portanto o sinal referente ao processo de oxidação e redução da sonda redox deveria ser observado no caso de uma extração eficiente.

Figura 4.47. Voltamogramas cíclicos registrados durante a extração do cortisol da matriz polimérica em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de perclorato de tetrabutilamonio em meio de DMSO, durante 25 ciclos de $-0,2$ a $0,8 \text{ V}$: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Figura 4.48. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de $-0,6$ a $0,8 \text{ V}$ para eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (condições iguais da Figura 4.44), (—) antes e após extração do cortisol em (—) DMSO quimicamente durante 30 min sob agitação, (—) DMSO por voltametria cíclica e (—) em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 quimicamente durante 30 min sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

Adicionalmente, avaliou-se o desenvolvimento de NIP em $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de pirrol visando à comparação com o MIP obtido. Nesse caso, a etapa de extração foi simulada em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 30 min sob agitação. Após a modificação do eletrodo, e a simulação da extração do cortisol, as medidas em solução de ferricianeto foram realizadas e podem ser observadas na Figura 4.49. Esses voltamogramas estão apresentados comparando o MIP e o NIP onde após a síntese do MIP o voltamograma ainda apresenta algum sinal da oxidação e redução da sonda redox.

Figura 4.49. Comparação dos voltamogramas cíclicos obtidos em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} de -0,6 a 0,8 V para eletrodo de carbono vítreo modificado com MIP eletroquimicamente sintetizados com pirrol (condições iguais da Figura 4.44), (—) antes e (—) após extração química do cortisol em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 30 min sob agitação e modificado com NIP nas mesmas condições (—) antes e (—) após simulação da extração química do cortisol em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 30 min sob agitação: Velocidade de varredura 100 mV s^{-1} .

No entanto para o NIP o mesmo não acontece, mostrando que esse material desde o início já se apresenta menos poroso dificultando a passagem dos íons ferricianeto até o eletrodo de carbono vítreo. No entanto, para ambos casos, após realização do procedimento de extração, nenhuma corrente relacionada ao processo eletroquímico do ferricianeto é observado, como já reportado nos dados obtidos

anteriormente. Novamente uma possível explicação seria devido à provável eletromodulação estrutural do polimérico[89].

Visto a dificuldade na extração da molécula molde após a fabricação do MIP, uma outra abordagem para essa avaliação da extração e capacidade de recombinação da molécula molde na matriz polimérica foi avaliada, como pode-se observar a seguir.

4.3.3.2 Testes dos MIP utilizando microbalança de quartzo

Os testes com a micro balança de quartzo foram realizados utilizando cristais piezoelétrico de ouro, que são os mais comumente utilizados. Para isso empregou-se o mesmo procedimento realizado nos eletrodos impressos de carbono, contendo 0,08 mol L⁻¹ de pirrol em solução diminuindo a janela de potencial devido aos processos de oxidação e redução do ouro no eletrodo. Anteriormente aos estudos realizados, e após os estudos, a superfície de ouro foi tratada com H₂SO₄. Etapa adicional após a eletropolimerização também foi realizada utilizando cinco ciclos, uma vez que um número maior de ciclos acarreta na não vibração do cristal de quartzo, devido a massa de filme depositado sobre a superfície eletródica. Desse modo, para a remoção do cortisol 12 ciclos foram utilizados antes da recombinação do cortisol com a matriz polimérica e valores de frequência em Hz foram medidos em função do tempo. Os resultados podem ser observados na Figura 4.50 para o MIP e na Figura 4.51 para o NIP.

Figura 4.50. A) Síntese do MIP utilizando eletropolimerização do pirrol em cristal piezelétrico de ouro para corrente e frequência versus potencial, em $0,08 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl e 5 mmol L^{-1} de cortisol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L^{-1} de 0,9 a 0 V (5 ciclos). B) Extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4 durante 12 ciclos de -0,2 a 0,8 V para corrente e frequência versus potencial: Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . C) Gráfico de frequência versus tempo em tampão fosfato pH 7,4, do eletrodo modificado, para as adições de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução 5 mmol L^{-1} de cortisol em etanol, representada pelas setas pretas, e adições de tampão de tampão + etanol representada pelas setas azuis.

Figura 4.51. A) Síntese do NIP utilizando eletropolimerização do pirrol em cristal piezelétrico de ouro para corrente e frequência versus potencial, em 0,08 mol L⁻¹ de pirrol, 0,1 mol L⁻¹ de KCl e 1,25 mL de etanol em tampão fosfato pH 7,4 10 mmol L⁻¹ de 0,9 a 0 V (5 ciclos). B) Simulação da extração do cortisol da matriz polimérica em 10 mmol L⁻¹ tampão fosfato pH 7,4 durante 12 ciclos de -0,2 a 0,8 V para corrente e frequência versus potencial: Velocidade de varredura 50 mV s⁻¹. C) Gráfico de frequência versus tempo em tampão fosfato pH 7,4, do eletrodo modificado, para as adições de 10 µL de uma solução 5 mmol L⁻¹ de cortisol em etanol, representada pelas setas pretas, e adições de tampão de tampão e etanol representada pelas setas azuis.

Durante a eletropolimerização, Figuras 4.50 e 4.51, o aumento da corrente com o aumento do número de ciclos devido ao recobrimento da superfície do eletrodo com a formação do polímero. Com relação à frequência de oscilação do cristal, observa-se a diminuição da frequência, aumento de massa, com o aumento do número de ciclos. A relação frequência e massa é dada por $\Delta f = -k\Delta m$ (equação de Sauerbrey) no caso de polímeros rígidos [92]. No entanto, apesar de não se saber sobre a rigidez do material, assumiu-se a correlação acima citada. Na etapa de extração do cortisol os

voltamogramas tanto do MIP quanto do NIP apresentam uma queda no sinal de corrente, como esperado, porém para o MIP a frequência aumenta a cada ciclo, mostrando a possível extração do cortisol e/ou a lixiviação do filme polimérico. O mesmo não é observado para o NIP, onde a frequência permanece constante em função do potencial e número de ciclos, dando indícios que o comportamento observado no MIP se dá pela extração do cortisol da matriz polimérica.

Por fim, os testes desses filmes poliméricos foram realizados pelas medidas de frequência em função do tempo, onde sucessivas adições de cortisol poderiam ocasionar uma queda no sinal de frequência, indicando a recombinação do cortisol na matriz polimérica no caso do MIP. Esse efeito é observado na Figura 4.50 B, onde a queda do sinal de frequência a cada adição de cortisol é observada pelo Δf_{Cort} e ao adicionar-se somente solução tampão no meio a queda do sinal é muito pequena se comparada a resposta após esperar o mesmo tempo para a estabilização do sinal de frequência, mostrando que essa pode ser uma abordagem promissora para quantificação do cortisol.

Em contrapartida, para o NIP o comportamento da frequência frente a adição de cortisol é diferente, nota-se que o sinal de frequência aumenta a cada adição, indicando a perda de massa, no entanto mais estudos ainda estão sendo realizados para maior compreensão do sistema NIP.

5 CONCLUSÃO

Como conclusão desse trabalho, notou-se que o cortisol apresentou um processo de redução em $-1,30\text{V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl } 3 \text{ M})}$ em eletrodo de carbono vítreo, sendo esse processo pH dependente, onde observou-se o envolvimento de um elétron e um próton na reação. Após estudos iniciais foi também possível se obter uma curva analítica em meio de tampão ácido acético/acetato apresentando uma faixa linear entre 10 e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear igual a $0,99$ e sensibilidade de $0,010 \text{ A L mol}^{-1}$, sendo o L.D. de $0,11 \mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, através desse método foi possível detecção de cortisol em uma amostra real do fármaco Otosporin®. Porém esse sinal se mostrou muito irreprodutível após um grande número de medidas o que inviabilizaria a detecção do cortisol utilizando um único eletrodo. Desse modo, para contornar esse problema estudos foram realizados utilizando plataformas descartáveis utilizando grafite como

eletrodo de trabalho. Essas análises apontaram uma faixa linear entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com coeficiente de correlação linear igual a 0,99, onde a sensibilidade observada foi de $0,0008 \pm 0,00005 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$, notando-se um desvio padrão é muito pequeno, sendo os resultados bastante promissores em relação a reprodutibilidade do sistema e o baixo custo dos dispositivos, que apresentaram faixa linear similar ao método empregando eletrodo de carbono vítreo, podendo ser essa ainda melhorada.

Além disso, visando obter-se uma certa seletividade para a detecção do cortisol estudos foram iniciados para a obtenção de polímeros molecularmente impressos, a fim de modificar o eletrodo química e eletroquimicamente objetivando a detecção indireta do cortisol. Para os MIPs quimicamente sintetizados os resultados apontam que há grande dificuldade na imobilização desse tipo de polímero (hidrogel) fabricado sobre o eletrodo, onde ambas técnicas testadas não se mostraram eficazes. No entanto esse material apresentou seletividade ao cortisol e poderia ser utilizado no pré tratamento de amostras para detecção direta utilizando por exemplo os dispositivos descartáveis testados neste trabalho. Já os MIPs eletroquimicamente sintetizados, demonstraram grande dificuldade para o estudo da capacidade de recombinação da molécula molde na matriz polimérica, onde a abordagem da utilização da microbalança de quartzo se mostrou eficiente e promissora para sanar esse problema. Desse modo essas duas abordagens para construção dos eletrodos modificados e não modificados se mostraram promissoras para a detecção do cortisol e ainda precisam ser melhor estudadas e desenvolvidas, visto que esse foi um trabalho exploratório inicial.

6 PERSPECTIVAS

6.1 ELETRODOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DE CORTISOL:

- Otimização do sistema;
- Estudos analíticos do cortisol utilizando os eletrodos descartáveis;

6.2 ELETRODOS MODIFICADOS PARA DETECÇÃO DE CORTISOL:

- Estudo do sistema em eletrodo de carbono utilizando microbalança de cristal de quartzo para os MIPs eletroquimicamente sintetizados;
- Caracterização do material sintetizado;
- Estudos analíticos do cortisol utilizando os eletrodos modificados.

7 REFERÊNCIAS

1. Bănică, F.-G., *What are Chemical Sensors?*, in *Chemical Sensors and Biosensors*. 2012, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-20.
2. Hulanicki, A., S. Głab, and F. Ingman, *Chemical sensors definitions and classification* Pure and Applied Chemistry, 1991. **63**: p. 1247.
3. Fan, Z.H., *Chemical Sensors and Microfluidics*. Journal of Biosensors & Bioelectronics, 2013. **4**(1): p. 1-2.
4. Lowinsohn, D. and M. Bertotti, *Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos*. Química Nova, 2006. **29**: p. 1318-1325.
5. Stradiotto, N.R., H. Yamanaka, and M.V.B. Zandoni, *Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2003. **14**: p. 159-173.
6. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. Sensors (Basel, Switzerland), 2008. **8**(3): p. 1400-1458.
7. Bobacka, J., A. Ivaska, and A. Lewenstam, *Potentiometric Ion Sensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 329-351.
8. Bakker, E. and K. Chumbimuni-Torres, *Modern directions for potentiometric sensors*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2008. **19**: p. 621-629.
9. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Princípios de Análise Instrumental*. 6ª edição ed. 2009, Porto Alegre: Editora Bookman.
10. Prodromidis, M.I., *Impedimetric biosensors and immunosensors*. Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry, 2007. **8**: p. 69-71.

11. Bahadır, E.B. and M.K. Sezgintürk, *A Review on Impedimetric Biosensors*. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2016. **44**: p. 248-262.
12. Brett, A.M.O. and C.M.A. Brett, *Eletroquímica Pincípios, métodos e aplicações*. 1993, New York: Oxford University Press.
13. Stetter, J.R. and J. Li, *Amperometric Gas Sensors A Review*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 352-366.
14. Gupta, V.K., et al., *Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review*. Analytical Biochemistry, 2011. **408**(2): p. 179-196.
15. Scholz, F., *Voltammetric techniques of analysis: the essentials*. ChemTexts, 2015. **1**(4): p. 17.
16. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2^a ed. ed. 2001, New York: John Wiley & Sons, INC.
17. Souza, D.d., S.A.S. Machado, and L.A. Avaca, *Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos*. Química Nova, 2003. **26**: p. 81-89.
18. Bakker, E. and M. Telting-Diaz, *Electrochemical Sensors*. Analytical Chemistry, 2002. **74**: p. 2781-2800.
19. Zhang, W., et al., *Recent development of carbon electrode materials and their bioanalytical and environmental applications*. Chemical Society Reviews, 2016. **45**(3): p. 715-752.
20. KATO, D. and O. NIWA, *Carbon-based electrode materials for DNA electroanalysis*. Analytical Sciences, 2013. **29**: p. 385 - 392.
21. Nery, E.W. and L.T. Kubota, *Sensing approaches on paper-based devices: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(24): p. 7573-7595.
22. Cate, D.M., et al., *Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(1): p. 19-41.
23. Chen, Y.-H., Z.-K. Kuo, and C.-M. Cheng, *Paper – a potential platform in pharmaceutical development*. Trends in Biotechnology, 2015. **33**(1): p. 4-9.
24. Liana, D.D., et al., *Recent Advances in Paper-Based Sensors*. Sensors, 2012. **12**(9): p. 11505.
25. Martinez, A.W., et al., *Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(1): p. 3-10.
26. Nie, Z., et al., *Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices*. Lab Chip, 2010. **10**: p. 477-483.

27. de Araujo, W.R. and T.R.L.C. Paixao, *Fabrication of disposable electrochemical devices using silver ink and office paper*. Analyst, 2014. **139**(11): p. 2742-2747.
28. Salles, M.O., et al., *Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach*. Analytical Methods, 2014. **6**(7): p. 2047-2052.
29. Silva, T.G., et al., *Simple and Sensitive Paper-Based Device Coupling Electrochemical Sample Pretreatment and Colorimetric Detection*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(10): p. 5145-5151.
30. Yakoh, A., et al., *Simple and selective paper-based colorimetric sensor for determination of chloride ion in environmental samples using label-free silver nanoprisms*. Talanta, 2018. **178**: p. 134-140.
31. Núñez-Bajo, E., et al., *Integration of gold-sputtered electrofluidic paper on wire-included analytical platforms for glucose biosensing*. Biosensors and Bioelectronics, 2017. **91**: p. 824-832.
32. Cardoso, T.M.G., et al., *Versatile fabrication of paper-based microfluidic devices with high chemical resistance using scholar glue and magnetic masks*. Analytica Chimica Acta, 2017. **974**: p. 63-68.
33. Araujo, W.R.d., *Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e colorimétricos para aplicações em amostras de interesse forense*, in Instituto de Química. 2016, Universidade de São Paulo: São Paulo. p. 212.
34. Nelson, D.L., A.L. Lehninger, and M.M. Cox, *Principles of biochemistry* 5th Edition ed, ed. W.H. Freeman. Vol. Volume 1. 2008, New York.
35. Bahadır, E.B. and M.K. Sezgintürk, *Electrochemical biosensors for hormone analyses*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **68**: p. 62-71.
36. Kaushik, A., et al., *Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **53**: p. 499-512.
37. Janicki-Deverts, D., et al., *Basal salivary cortisol secretion and susceptibility to upper respiratory infection*. Brain, Behavior, and Immunity, 2016. **53**: p. 255-261.
38. Zimmerman, U., T. Loew, and L. Wildt, *"Stress hormones" and bungee-jumping*. The Lancet, 1992. **340**(8816): p. 428.
39. Schedlowski, M., et al., *Acute psychological stress increases plasma levels of cortisol, prolactin and TSH*. Life Sciences, 1992. **50**(17): p. 1201-1205.

40. Djuric, Z., et al., *Biomarkers of Psychological Stress in Health Disparities Research*. The Open Biomarkers Journal 2008(1): p. 7-19.
41. Marieb, E.N. and K. Hoehn, *Human Anatomy and Physiology*. 2010, São Francisco: Benjamin Cummings.
42. *O estresse aumenta o cortisol, engorda e causa doenças*. 2018 [cited 2018 07/03/2018]; Available from: <http://www.medicinamitoseverdades.com.br/blog/o-estresse-aumenta-o-cortisol-engorda-e-causa-doencas>.
43. Staufenbiel, S.M., et al., *Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: A systematic review*. Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(8): p. 1220-1235.
44. Kaushik, A., et al., *Electrochemical sensing method for point-of-care cortisol detection in human immunodeficiency virus-infected patients*. International Journal of Nanomedicine, 2015. **10**: p. 677-685.
45. Arya, S.K., et al., *Antibody modified gold micro array electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol in saliva and ISF*. Procedia Engineering, 2010. **5**: p. 804-807.
46. Arya, S.K., et al., *Antibody functionalized interdigitated μ -electrode (ID μ E) based impedimetric cortisol biosensor*. Analyst, 2010. **135**(8): p. 1941-1946.
47. Arya, S.K., et al., *Dithiobis(succinimidyl propionate) modified gold microarray electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **25**(10): p. 2296-2301.
48. Arya, S.K., A. Dey, and S. Bhansali, *Polyaniline protected gold nanoparticles based mediator and label free electrochemical cortisol biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **28**(1): p. 166-173.
49. Sun, K., N. Ramgir, and S. Bhansali, *An immunoelectrochemical sensor for salivary cortisol measurement*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2008. **133**(2): p. 533-537.
50. Tlili, C., et al., *Label-free, chemiresistor immunosensor for stress biomarker cortisol in saliva*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(11): p. 4382-4386.
51. Turpeinen, U. and E. Hämäläinen, *Determination of cortisol in serum, saliva and urine*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **27**(6): p. 795-801.

52. Venugopal, M., et al., *A realtime and continuous assessment of cortisol in ISF using electrochemical impedance spectroscopy*. Sensors and Actuators A: Physical, 2011. **172**(1): p. 154-160.
53. Moreno-Guzman, M., et al., *Disposable immunosensor for cortisol using functionalized magnetic particles*. Analyst, 2010. **135**(8): p. 1926-1933.
54. Phani Kiran Vabbinaa, et al., *Electrochemical cortisol immunosensors based on sonochemically synthesized zinc oxide 1D nanorods and 2D nanoflakes*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **63**: p. 124-130.
55. Lippa, P.B., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2001. **314**(1–2): p. 1-26.
56. Chantasirichot, S. and K. Ishihara, *Electrospun phospholipid polymer substrate for enhanced performance in immunoassay system*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **38**(1): p. 209-214.
57. Goldman, E.R., et al., *Thermostable Llama Single Domain Antibodies for Detection of Botulinum A Neurotoxin Complex*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(22): p. 8583-8591.
58. Bueno, L., et al., *MIP-based electrochemical protein profiling*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **204**: p. 88-95.
59. Cormack, P.A.G. and A.Z. Elorza, *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation*. Journal of Chromatography B, 2004. **804**(1): p. 173-182.
60. Kotova, K., et al., *MIP sensors on the way to biotech applications: Targeting selectivity*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. **189**: p. 199-202.
61. Kryscio, D.R. and N.A. Peppas, *Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(2): p. 461-473.
62. Baggiani, C., et al., *Molecularly imprinted polymers for corticosteroids: Analysis of binding selectivity*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **26**(2): p. 590-595.
63. Farré, M.I. and D. Barceló, *Chapter 16 - Sensor, biosensors and MIP based sensors A2 - Picó, Yolanda*, in *Food Toxicants Analysis*. 2007, Elsevier: Amsterdam. p. 599-636.
64. Erdőssy, J., et al., *Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016.

65. Mahony, J.O., et al., *Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry*. Analytica Chimica Acta, 2005. **534**(1): p. 31-39.
66. Mayes, A.G. and M.J. Whitcombe, *Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005. **57**(12): p. 1742-1778.
67. Tiwari, A. and L. Uzun, *Advanced Molecularly Imprinting Materials*. 2016, Beverly: Scrivener Publishing LLC.
68. Uzun, L. and A.P.F. Turner, *Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential*. Biosensors and Bioelectronics, 2016. **76**: p. 131-144.
69. Salles, M.O., W.R. Araujo, and T.R.L.C. Paixão, *Development of a Molecularly Imprinted Modified Electrode to Evaluate Phenacetin Based on the Preconcentration of Acetaminophen*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2016. **27**: p. 54-61.
70. Li, H., et al., *An amperometric sensor for the determination of benzophenone in food packaging materials based on the electropolymerized molecularly imprinted poly-o-phenylenediamine film*. Talanta, 2012. **99**: p. 811-815.
71. Liu, Y., Q.-J. Song, and L. Wang, *Development and characterization of an amperometric sensor for triclosan detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer*. Microchemical Journal, 2009. **91**(2): p. 222-226.
72. Lin, T.-Y., C.-H. Hu, and T.-C. Chou, *Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2004. **20**(1): p. 75-81.
73. Songjun Li, et al., *Conductometric and impedimetric sensors based on MIPs*, in *Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications*, Elsevier, Editor. 2012: Amsterdam.
74. Baggiani, C., et al., *Chromatographic characterization of a molecular imprinted polymer binding cortisol*. Talanta, 2000. **51**(1): p. 71-75.
75. Ramstrom, O., L. Ye, and K. Mosbach, *Screening of a combinatorial steroid library using molecularly imprinted polymers*. Analytical Communications, 1998. **35**(1): p. 9-11.
76. Ramström, O., L. Ye, and K. Mosbach, *Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting*. Chemistry & Biology, 1996. **3**(6): p. 471-477.

77. Manickam, P., et al., *A Reusable Electrochemical Biosensor for Monitoring of Small Molecules (Cortisol) Using Molecularly Imprinted Polymers*. Journal of The Electrochemical Society, 2017. **164**: p. B54-B59.
78. Tyszczuk, K., *Application of an in situ plated lead film electrode to the analysis of testosterone by adsorptive stripping voltammetry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**: p. 1951–1956.
79. Levent, A., et al., *Sensitive voltammetric determination of testosterone in pharmaceuticals and human urine using a glassy carbon electrode in the presence of cationic surfactant*. Electrochimica Acta, 2014. **128**: p. 54-60.
80. Hummers, W.S. and R.E. Offeman, *Preparation of Graphitic Oxide*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(6): p. 1339-1339.
81. Connors, K.A., G.L. Amidon, and L. Kennon, in *Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists*, J.W.a. Sons, Editor. 1986: Nova Iorque.
82. Marvin, *Marvin Sketch 16.8.8*, ChemAxon, Editor. 2016: Cambridge, Massachusetts.
83. Smajdor, J., et al., *New high sensitive hydrocortisone determination by means of adsorptive stripping voltammetry on renewable mercury film silver based electrode*. Electrochimica Acta, 2015. **182**: p. 67-72.
84. Mocak, J., et al., *A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 1997. **69**: p. 297-328.
85. Selva, T.M.G., et al., *Study of Electrochemical Oxidation and Quantification of the Pesticide Pirimicarb Using a Boron-Doped Diamond Electrode*. Electrochimica Acta, 2017. **246**: p. 588-596.
86. Justino, C.I.L., et al., *Graphene based sensors and biosensors*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017. **91**: p. 53-66.
87. Bueno, L., *Estudo e fabricação de dispositivos inteligentes (línguas e narizes eletrônicos) visando à discriminação de contaminação em alimentos*, in *Instituto de química* 2016, Universidade de São Paulo: São Paulo. p. 156.
88. Skoog, D.A., et al., in *Fundamentals of analytical chemistry*, ed., Editor. 1998, Thomson Learning: California USA.

89. Choong, C.-L. and W.I. Milne, *Dynamic modulation of detection window in conducting polymer based biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. **25**(10): p. 2384-2388.
90. Zhou, M. and J. Heinze, *Electropolymerization of pyrrole and electrochemical study of polypyrrole: 1. Evidence for structural diversity of polypyrrole*. Electrochimica Acta, 1999. **44**(11): p. 1733-1748.
91. Maiara O. Salles, William R. Araujo, and T.R.L.C. Paixão, *Development of a Molecularly Imprinted Modified Electrode to Evaluate Phenacetin Based on the Preconcentration of Acetaminophen*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2016. **27**(1): p. 54-61.
92. O'Sullivan, C.K. and G.G. Guilbault, *Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications*. Biosensors and Bioelectronics, 1999. **14**(8): p. 663-670.

8 SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Letícia Francine Mendes

Local de data de nascimento: Votorantim, 13/12/1992.

EDUCAÇÃO

Ensino Fundamental: Centro Educacional SESI 023, Votorantim, 2004.

Ensino Médio: Organização Sorocabana de Ensino (OSE-COC), Sorocaba, 2008.

Ensino Superior: Graduação em Licenciatura em Química, Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba, Sorocaba, 2011.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 - Scientific writing in English (Carga horária: 15h), Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, UFSCAR, Brasil.

2015 - Espectrometria de fotoluminescência molecular (Carga horária: 6h), Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil.

2013 - Química Orgânica da III Semana de Química (Carga horária: 4h), Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, UFSCAR, Brasil.

2012 - Cromatografia (Carga horária: 4h), Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, UFSCAR, Brasil.

2011 - Ensinar e Aprender Química (Carga horária: 8h), Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, UFSCAR, Brasil.

2011 - Química Forense (Carga horária: 8h), Universidade Federal de São Carlos, Campus Sorocaba, UFSCAR, Brasil.

2008 - Técnico em Informática, Organização Sorocabana de Ensino, OSE, Brasil.

Formação Complementar (PAE - Programa de Aperfeiçoamento do ensino)

QFL0238 - Química Analítica Instrumental, 2016

QFL 1111 – Química Analítica I, 2016

OCUPAÇÃO

Bolsista de mestrado, FAPESP (2016/07416-6), 2017 - 2018

PUBLICAÇÕES (Artigos científicos e resumos em congressos)

Artigos científicos

1. MENDES, LETÍCIA F.; MORAES, ARIANA S. ; SANTOS, JANAINA S. ; LEITE, FÁBIO L. ; TRIVINHO-STRIXINO, FRANCISCO . Investigation of roughness and specular quality of commercial aluminum (6061 alloy) for fabrication of nanoporous anodic alumina films. Surface & Coatings Technology, v. 310, p. 199-206, 2017.

2. Garcia, U. M. ; Mendes, L. F. ; Santos, J. S. ; Trivinho-Strixino, F. . Comparison and construction of Mild and Hard Anodisation reactors for porous alumina synthesis. Química Nova (Online), v. 1, p. 1-5, 2015.

Resumos publicados em anais de congressos

1. Mendes, L. F.; W. R. Araujo ; T. R. L. C. Paixão . Evaluation of Molecularly Imprinted Polymer (MIP) for cortisol recognition. In: I Encontro de Eletroquímica e Eletroanalítica IQ-USP, 2017, São Paulo. I Encontro de Eletroquímica e Eletroanalítica IQ-USP.

2. Mendes, L. F.; W. R. Araujo ; T. R. L. C. Paixão . Development of molecularly imprinted polymer (MIP) modified electrode for cortisol recognition. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal. XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017.

3. Mendes, L. F.; Moraes, A. S. ; Santos, J. S. ; Leite, F. L. ; Trivinho-Strixino, F. . Study of electropolishing parameters on aluminum samples and its effect after Porous Alumina (PA) preparation. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2015, Uberlândia. Livro de Resumos do XX SIBEE, 2015, 2015. v. único.

4. Mendes, L. F.; Ferreira, M. ; Trivinho-Strixino, F. . Monitoring the growth kinetics of self-assembled PEI/GOx films over porous anodic alumina. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia. Anais da 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015. v. único.

5. Mendes, L. F.; Ferreira, M. ; Trivinho-Strixino, F. . PEI/GOx LbL film growth over Porous Alumina (PA) followed by fluorescence spectroscopy. In: 2015 MRS Spring Meeting, 2015, San Francisco. Abstracts of 2015 MRS Spreing Meeting, 2015. v. único.
6. Mendes, L. F.; Moraes, A. S. ; Santos, J. S. ; Leite, F. L. ; Trivinho-Strixino, F. . Investigation of electropolishing parameters on Al substrate and after Porous Anodic Alumina (PAA) synthesis. In: III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2015, Sorocaba. Livro de resumo do III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2015.
7. Garcia, U. M. ; Mendes, L. F. ; Trivinho-Strixino, F. . Comparação dos métodos de anodização suave e dura em alumínio para obtenção da Alumina Anódica Porosa (AAP). In: III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2015, Sorocaba. Livro de resumos do III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2015.
8. Mendes, L. F.; Trivinho-Strixino, F. . Investigação das variáveis experimentais no eletropolimento do alumínio e seu efeito após o preparo da alumina anódica porosa. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. Anais da 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014. v. único.
9. Oliveira, J.J. ; Mendes, L. F. ; Trivinho-Strixino, F. . PHOTOLUMINESCENCE AND DIFFUSE REFLECTANCE SPECTRUM OF POROUS ALUMINA (PA) ANODIZED IN OXALIC ACID AND PHOSPHORIC ACID MIXTURES. In: 4ª Reunião Anual POSMAT, 2014, Sorocaba. Anais da 4ª Reunião Anual POSMAT, 2014. v. único.
10. Mendes, L. F.; Ferreira, M. ; Trivinho-Strixino, F. . CRESCIMENTO DE FILME LBL DE PEI/GOX SOBRE A ALUMINA ANODICA POROSA (AAP) OBSERVADO

A PARTIR DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. In: 22º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2014, São Carlos. Livro de resumo do 22º Congresso de Iniciação Científica, 2014.

11. Rodrigues, A. ; Mendes, L. F. ; Trivinho-Strixino, F. . ANÁLISE DOS PARAMETROS DE ELETROPOLIMENTO NA FORMAÇÃO DA ALUMINA ANÓDICA POROSA. In: 22º Congresso de Iniciação Científica, 2014, São Carlos. Livro de resumos do 22º Congresso de Iniciação Científica, 2014.

12. Ferro, L. M. M. ; Mendes, L. F. ; Trivinho-Strixino, F. . PAH/NiTsPc LBL FILM GROWTH OVER POROUS ALUMINA (PA) FOLLOWED BY DIFFUSE REFLECTANCE SPECTROSCOPY. In: 4ª Reunião Anual POSMAT, 2014, Sorocaba. Anais da 4ª Reunião Anual POSMAT, 2014. v. único.

13. Mendes, L. F.; Trivinho-Strixino, F. . Study of experimental parameters on aluminum electropolishing using atomic force microscopy. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão. XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013. v. único.

14. Mendes, L. F.; Leite, F. L. ; Trivinho-Strixino, F. . Study of experimental parameters on aluminum electropolishing using reflectance spectroscopy. In: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013, Campos do Jordão. Anais do XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2013. v. único.

15. Mendes, L. F.; Trivinho-Strixino, F. . Investigação dos parâmetros de eletropolimento de amostras de alumínio e seu efeito após o preparo da alumina anódica porosa. In: I Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2013, Sorocaba. Livro de resumo do I Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2013.

16. Mendes, L. F.; Trivinho-Strixino, F. . Study of experimental parameters on aluminum electropolishing using diffuse reflectance spectroscopy. In: XI Brazilian MRS Meeting, 2012, Florianópolis. Astracts from XI Brazilian MRS Meeting, 2012. v. único.