Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

NATHALIA OEZAU GOMES

Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos baseados em papel para
monitoramento não invasivo de lactato em suor

São Carlos
2019

Nathalia Oezau Gomes

Desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos baseados em papel para
monitoramento não invasivo de lactato em suor

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de mestre em
Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora Prof^a Dr^a Livia Flório Sgobbi

São Carlos

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Sandra e Moises, a vó Mariana e ao meu irmão Mateus por sempre me apoiarem em tudo, incentivarem e não medirem esforços para me ajudar.

Ao Professor Dr. Sergio Machado e a minha orientadora Prof^a Dr^a Livia Flório pela oportunidade de fazer parte deste grupo e pelo apoio e todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os membros do GMEME que contribuíram para o desenvolvimento do meu projeto diretamente ou indiretamente. Também aos técnicos de laboratório Marcelo e João que sempre me deram todo o suporte para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao colega de grupo Dr. Paulo Raymundo primeiramente por toda paciência com minhas dúvidas sem fim, pelas discussões científicas, explicações e incentivo que tanto contribuíram para o meu aprendizado e desenvolvimento deste trabalho.

Aos todos os funcionários do IQSC em especial ao Dr. Marcio de Paulo que sempre foi muito solícito e paciente comigo na obtenção das imagens de microscopia.

Ao Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas do Instituto de Química de São Carlos, liderado pela Profa. Dra. Elisabete Frollini e ao técnico Luiz que executaram os ensaios de tração mecânica.

A Bionext[®] Produtos Biotecnológicos Ltda (Mogi Mirim – SP) que como cortesia nos forneceu as folhas de celulose bacterina.

Aos meus amigos João Antonio, Felipe, Matheus, Janaina e Paulo pela amizade, apoio e paciência durante estes dois anos “Não sei o que seria de mim sem vocês”.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil pelo auxílio financeiro (Bolsista CNPq Processo: 12430531/2017-0).

RESUMO

O lactato é um importante metabólito formado pelo metabolismo anaeróbico da glicose nos músculos, e tem se tornado um biomarcador importante no âmbito clínico e esportivo. Atualmente, existem biossensores eletroquímicos portáteis que são capazes de determinar os níveis de lactato no organismo em tempo real. No entanto, esses dispositivos são invasivos uma vez que requerem amostras de sangue. A dissertação visou desenvolver um biossensor eletroquímico descartável para detecção de lactato no suor. Para isto a fabricação do dispositivo foi feita utilizando a celulose bacteriana como substrato para obtenção de um dispositivo que seja resistente à deformação mecânica, especialmente quando molhado e, também, permeável ao suor. A impressão dos eletrodos neste substrato foi efetuada utilizando tinta condutora de carbono obtida comercialmente, através do processo de serigrafia. Com os dispositivos produzidos foram realizados experimentos de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, a fim de caracterizar o sensor desenvolvido. Adicionalmente, avaliou-se a influência do pré-tratamento eletroquímico no desempenho analítico do sensor fabricado. A partir da modificação da superfície eletródica com nanocubos de azul da prússia foi possível desenvolver um sensor eletroquímico para detecção de peróxido de hidrogênio. Que mostrou uma dependência linear da corrente catódica com a concentração de peróxido de hidrogênio descrita equação: $I_p = 0,1 + 4,30 [H_2O_2]$, com $r^2 = 0,999$ ($n = 3$). Com base nos dados, calculou-se um limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) de $4,42 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Para a configuração do biossensor eletroquímico a enzima lactato oxidase foi incorporada à superfície do papel pelo método de ligação covalente, o que propiciou uma liberação da área eletroativa, onde ocorre a eletro-redução do peróxido de hidrogênio proveniente da catálise enzimática. E isto possibilitou uma melhora significativa no desempenho do sensor desenvolvido quando comparado com outras estratégias de imobilização empregadas neste trabalho. Na qual se obteve uma região linear de 1-24,0 mmol L⁻¹ de lactato em suor sintético, obtendo-se LOD e LOQ de $1,31 \times 10^{-3}$ e $4,38 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. Tais parâmetros se mostraram adequados já que o suor pode apresentar níveis de aproximadamente 25 mmol L⁻¹ de lactato. De modo geral, o processo de fabricação dos eletrodos no substrato de celulose bacteriana por serigrafia apresentou uma boa reprodutibilidade. Sendo possível desenvolver uma plataforma eletroquímica para a detecção de lactato em amostras de suor sintético. O dispositivo desenvolvido apresentou uma boa durabilidade e resistência mecânica ao se executarem sucessivas medidas corroborando a

viabilidade deste substrato na produção de sensores vestíveis para a aplicação direta na pele e monitoramento dos níveis de lactato em tempo real.

ABSTRACT

Lactate is an important metabolite formed in the anaerobic metabolism of glucose in the muscles. It has become an important biomarker in the clinical and sport scenario. Currently, there are portable biosensors that are able to determine lactate levels in real time. However, these devices are invasive since they require blood samples. Herein, we aim to develop a disposable electrochemical biosensor for detection of lactate in sweat. For this purpose the fabrication of the device was made with bacterial cellulose substrate in order to be permeable to sweat and resistant to mechanical deformation, especially when wet. The fabrication of the electrodes was performed using a conductive ink of carbon commercially available through silk-screen technique. Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry were used to characterize the sensor. In addition was evaluated the influence of the electrochemical pre-treatment in the analytical performance of the electrodes. To develop an electrochemical sensor for the detection of hydrogen peroxide the screen printed electrode was modified with Prussian blue nanocubes. From optimized chronoamperometry parameters, a linear dependence of the cathodic current with the hydrogen peroxide concentration was obtained with the equation: $I_p = 0.1 + 4.30 [H_2O_2]$, with $r^2 = 0.999$ ($n = 3$). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were $4.42 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1.47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectively for hydrogen peroxide. For the configuration of the electrochemical biosensor the lactate oxidase enzyme was immobilized on the paper surface by the covalent bonding method with lead to a release of the electroactive area that was responsible to promote the electro-reduction of peroxide hydrogen coming the enzymatic catalysis. In addition this allowed for a significant improvement in the performance of the developed sensor when compared to other immobilization strategies employed in this work. Adopting this method was verified an increase that allowed a significant improvement in the performance of the developed sensor. In which a linear concentration range of $1\text{--}24.0 \text{ mmol L}^{-1}$ of lactate was obtained in the synthetic sweat, obtaining LOD and LOQ of $1.31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $4.38 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectively of lactate. Such parameters were adequate since sweat may have lactate levels of approximately 25 mmol L^{-1} . Finally, it was possible to develop an electrochemical platform using the bacterial cellulose substrate for the detection of lactate in samples of synthetic sweat. The developed device presented a good durability and resistance when performing electrochemical measurements assuring the feasibility of this substrate in the fabrication of wearable sensors for the direct application to skin and monitoring of lactate levels in real time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Dispositivo comercial para detecção de lactato, podendo se observar ao lado as tiras (eletrodos) utilizados para quantificação de lactato em amostras de sangue. E uma caixa contendo eletrodos disponíveis comercialmente.	2
Figura 2-A) Biossensor de tatuagem para detecção de lactato desenvolvido por Jia et al., (2013) ¹³ : (a) Ilustração esquemática dos três eletrodos "NE" para monitoramento eletroquímico de lactato sobre a epiderme. (b) Constituintes da modificação da superfície do eletrodo de trabalho. B) Biossensor para detecção de lactato no suor desenvolvido por Tur-garcía et al., (2017) ⁴ (a) Esquema do eletrodo de ouro/platina, (b) aplicação da enzima, (c) esquema e (d) fotografia da disposição final do sensor, demonstrando a flexibilidade.	4
Figura 3- Celulose bacteriana formada extracelularmente pela bactéria <i>Gluconacetobacter xylinum</i>	5
Figura 4- Representação da estrutura química da CB (C ₆ H ₁₀ O ₅) n.....	6
Figura 5- Esquema do processo envolvido no biossensoriamento eletroquímico do dispositivo desenvolvido neste trabalho.....	10
Figura 6- Ilustração do processo de serigrafia: (a) Alinhamento da tela e do substrato e deposição da tinta de carbono (b) impressão do eletrodo.....	15
Figura 7- (a) Fotografias dos eletrodos impressos na celulose bacteriana (b) fotografia do eletrodo impresso devidamente isolado, com fita de isolamento obtida comercialmente, indicado pelas setas ER (eletrodo de referência), ET (eletrodo de trabalho) e EA (eletrodo auxiliar).....	16
Figura 8- Montagem experimental do sistema contendo o eletrodo impresso acoplado ao potenciostato.....	17
Figura 9- Ilustração do circuito equivalente utilizado para análises dos resultados de EIE.....	18
Figura 10- (a) Superfície eletródica modificada com AP (b) incorporação da biomolécula e (c) posterior adição de glutaraldeído.....	20
Figura 11- Esquema do processo de imobilização enzimática na celulose oxidada (a) Modificação da superfície eletródica com AP (b) ativação da celulose oxidada com EDC-NHS com posterior imobilização da enzima.	21
Figura 12- Caracterização do Azul da Prússia: (a) Micrografia obtida por MET; (b) imagem de MET com uma maior amplificação; (c) Histograma de distribuição de tamanho de partículas obtidas por MET; (d) Difratoograma de Raio X e refinamento de Rietveld.	23

Figura 13- Micrografia (a) celulose bacteriana em uma magnificação de 50000x; (b) papel cromatográfico em uma magnificação de 5000x.....	26
Figura 14- Micrografias obtidas por MEV da (a) superfície do eletrodo de trabalho com amplificação de 500x; (b) superfície do eletrodo de trabalho com magnificação de 5000x; (c) interface entre a superfície do eletrodo contra eletrodo (indicado pelo número 1) e da celulose bacteriana (indicado pelo número 2).	27
Figura 15- Voltamogramas cíclicos em presença da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} para os eletrodos impressos (a) antes e (b) após serem submetidos ao pré-tratamento eletroquímico.....	28
Figura 16- Experimentos de voltametria cíclica em presença da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} para 4 eletrodos diferentes.....	30
Figura 17- Espectros de impedância eletroquímica obtidos para $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl para os eletrodos impressos. As medidas foram realizadas em potencial de circuito aberto (OCP), com um intervalo de frequência de 100kHz a 0,1Hz e amplitude de 10 mV, para a superfície do eletrodo (a) sem e (b) com pré-tratamento eletroquímico.	30
Figura 18- Imagens de MEV com amplificação de 10000x para a superfície do eletrodo de trabalho (a) antes e (b) após o pré-tratamento eletroquímico.....	32
Figura 19- Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de 2 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio em tampão BR (pH=6) para o eletrodo modificado com AP e na seta é indicado o potencial escolhido para a realização dos experimentos de cronoamperometria.	33
Figura 20- Curva analítica obtida por cronoamperometria, variando-se a concentração de H_2O_2 de $0,25$ a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, empregando eletrodos modificados com AP (a) sem e (b) com pré-tratamento eletroquímico.	34
Figura 21- Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de $1,0$ - $14,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio em tampão BR (pH=6) para (A) SPE; (B) SPE/Nafion e (C) SPE/Nafion/AP. E em (D) comparação entre as curvas analíticas obtidas para cada tipo de superfície no potencial de $-0,25 \text{ V}$	35
Figura 22- Espectros de impedância eletroquímica obtidos em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, em potencial de circuito aberto, com um intervalo de frequência de 100kHz a 0,1Hz e amplitude de 10mV. (A) gráficos de Nyquist para o o SPE, SPE/Nafion e SPE/Nafion/AP; (B) plote de Nyquist para o SPE/Nafion e SPE/Nafion/AP com o fitting do SPE/Nafion/AP inserido neste gráfico.	37

Figura 23 -Cronoamperogramas relacionados com o aumento da concentração de H_2O_2 de 0,25 a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e curva analítica relacionada com o aumento da concentração empregando eletrodo com AP.	38
Figura 24 -Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L^{-1} de glicose em tampão BR (pH=6) para o eletrodo SPE/Nafion/AP/GOx-glutaraldeído e a curva analítica obtida para esta superfície no potencial de -0,2V.....	40
Figura 25 -Esquema da detecção de peróxido de hidrogênio proveniente da catálise enzimática no biossensor eletroquímico desenvolvido. O elemento biológico imobilizado no papel catalisa oxidação de glicose gerando peróxido como um dos produtos e este é eletro-reduzido pelo AP imobilizado na superfície eletródica.....	42
Figura 26 – Voltametria cíclica em tampão BR (pH=6) com KCl (0,1 mol L^{-1}) para o SPE/Nafion/AP/GOx-glutaraldeído (imobilização na superfície eletródica) e SPE/Nafion/AP/GOx (imobilização no papel).	43
Figura 27 -Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L^{-1} de glicose em tampão BR (pH=6) para o eletrodo SPE/Nafion/AP/GOx (imobilização no papel sem nenhum tipo de tratamento prévio) e a curva analítica obtida para esta superfície no potencial de -0,2V na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L^{-1}	44
Figura 28 -Caracterização do papel funcionalizado com aldeído usando 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNP). (a) papel não tratado (b) papel funcionalizado com aldeído em presença da 4-dinitrofenilhidrazina (c) Esquema da reação química do 2,4-DNP com uma porção aldeído do papel funcionalizado.	46
Figura 29 -Imagens de MEV com amplificação de 50000x para a celulose bacteriana (a) não tratada e (b) tratada com meta-periodato de sódio.....	46
Figura 30 - Teste colorimétrico com o coomassie blue na (a) ausência e (b) presença de enzima imobilizada no papel.....	47
Figura 31 -Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L^{-1} de glicose em tampão BR (pH=6) para o eletrodo SPE/Nafion/AP/GOx (imobilização na celulose oxidada) e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração para esta superfície no potencial de -0,2V.	48
Figura 32 -Comparação entre as curvas analíticas obtidas para a imobilização da biomolécula na celulose não tratada e tratada na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L^{-1} de glicose em tampão BR (pH=6).	50

Figura 33 -Curva analítica em presença de 1,0-30,0 mmol L ⁻¹ de glicose obtida em tampão BR (pH=6) no SPE/Nafion/AP sem a imobilização da glicose oxidase.....	51
Figura 34 -Medidas efetuadas em tampão BR (pH=6) por meio de experimentos de voltametria cíclica nos quais foram monitorados os valores de corrente de pico catódica, continuamente (15 ciclos de flexão).....	52
Figura 35 -Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L ⁻¹ de ácido láctico no suor sintético (pH=6) para o SPE e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração no potencial de -0,2V.....	53
Figura 36 -Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L ⁻¹ de ácido láctico no suor sintético (pH=6) para o SPE/Nafion/AP e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração para esta superfície no potencial de -0,2V.....	54
Figura 37 -Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L ⁻¹ de ácido láctico no suor sintético (pH=6) para o SPE/Nafion/AP/LOx e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração para o potencial de -0,2V.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Níveis de lactato presentes nos fluídos biológicos	3
Tabela 2- Comparação entre as principais propriedades da celulose bacteriana com a celulose vegetal.....	6
Tabela 3- Aplicações da celulose bacteriana em diversas áreas.....	7
Tabela 4- Informações obtidas nos testes de tração mecânica com os valores de desvio padrão	25
Tabela 5- Valores de ΔE_{pico} e corrente pico catódico e anódico referentes a Figura 15.....	29
Tabela 6- Parâmetros obtidos para os gráficos da Figura 17.....	31
Tabela 7- Parâmetros obtidos para os gráficos da Figura 22.....	37

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação química 1 -Processo enzimático de conversão do piruvato em lactato no metabolismo anaeróbico, envolvendo a enzima lactato desidrogenase (LDH) ^{1,2} .	1
Equação química 2 - Processo enzimático de conversão do lactato em piruvato promovido pela enzima lactato oxidase (LOx).	9
Equação química 3 -(a) Reação química envolvendo a conversão do AP (azul da prússia) em BP (branco da prússia). (b) Mecanismo envolvido na reação de eletro-redução do peróxido de hidrogênio	10
Equação química 4 - Reação de redução do peróxido de hidrogênio.	36
Equação química 5 -Processo enzimático de conversão da glicose em ácido glucônico envolvendo a glicose oxidase.	39

LISTA DE ABREVIACÕES

AP: azul da prússia

Rtc: Resistência de transferência de carga

OCP: Potencial de circuito aberto

LOx: lactato oxidase

PoCTs: Point of Care testing

CB: Celulose Bacteriana

EDC: Cloridrato de 1-(3dimetilaminopropil) -3-etilcarbodiimida

NHS: N-hidroxissuccinimida

DRX: Difração de Raios X

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

EIE: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

SPE: Eletrodo impresso não modificado

SPE/ Nafion: Eletrodo modificado apenas com Nafion

SPE/ Nafion/AP: Eletrodo modificado com AP disperso em Nafion

SPE/Nafion/AP/GOx-glutaraldeído : eletrodo modificado com AP (disperso em Nafion) com posterior imobilização de glicose oxidase e glutaraldeído.

SPE/Nafion/AP/GOx: eletrodo modificado com AP (disperso em Nafion) com a glicose oxidase imobilizada sob o papel

SPE/Nafion/AP/LOx : eletrodo modificado com AP (disperso em Nafion) com a lactato oxidase imobilizada sob o papel

2,4-DNP: 2,4-dinitrofenilhidrazina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Motivação	1
1.2	Celulose bacteriana (CB)	5
1.2.1	Funcionalização da celulose	7
1.3	Configuração do biossensor eletroquímico	8
2	OBJETIVOS GERAIS	11
3	INSTRUMENTAÇÃO	12
4	PARTE EXPERIMENTAL	12
4.1	Reagentes e soluções	12
4.2	Síntese e caracterização do Hexacianoferrato (II) de Ferro (III) (azul da prússia)	14
4.3	Caracterização da celulose bacteriana	14
4.3.1	Ensaio de Tração	14
4.4	Fabricação dos eletrodos impressos utilizando o processo de serigrafia	14
4.4.1	Caracterização morfológica dos eletrodos produzidos	16
4.5	Medidas eletroquímicas	16
4.5.1	Pré-tratamento da superfície dos eletrodos impressos na celulose bacteriana	17
4.5.2	Modificação da superfície eletródica	17
4.5.3	Caracterização eletroquímica	17
4.5.4	Deteção eletroquímica de peróxido de hidrogênio	18
4.6	Oxidação da celulose bacteriana com meta-periodato de sódio	18
4.6.1	Testes colorimétricos com 2,4-Dinitrofenilhidrazina para identificação de aldeídos	19
4.7	Configuração do biossensor eletroquímico	19
4.7.1	Imobilização da glicose oxidase na superfície eletródica	19
4.7.2	Imobilização da glicose oxidase e lactato oxidase na celulose bacteriana	20
4.7.2.1	Teste colorimétrico com <i>Coomassie blue</i>	21
4.7.3	Medidas eletroquímicas	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Caracterização dos nanocubos de azul da prússia	23
5.2	Caracterização mecânica da celulose bacteriana	24
5.3	Caracterização morfológica dos eletrodos impressos em substrato de celulose bacteriana	26

5.4 Investigação da influência do pré-tratamento eletroquímico na performance dos eletrodos impressos na celulose bacteriana.....	27
5.5 Desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido para detecção de peróxido de hidrogênio	35
5.6 Configuração do biossensor eletroquímico.....	39
5.6.1 Desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido para detecção de glicose	39
5.6.2 Desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido para detecção lactato em suor sintético	51
6 CONCLUSÃO.....	58
7 PERSPECTIVAS	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

O lactato é um dos mais significativos metabólitos envolvidos em diversos processos bioquímicos e sua determinação e quantificação são importantes na análise clínica e na medicina esportiva. Nos seres humanos, o lactato é produzido quando o organismo não é capaz de suprir a demanda energética existente, tornando-se necessário obter energia pelo metabolismo anaeróbico. A Equação química 1 mostra a reação envolvida na geração de lactato no organismo ¹.

Equação química 1-Processo enzimático de conversão do piruvato em lactato no metabolismo anaeróbico, envolvendo a enzima lactato desidrogenase (LDH) ^{1,2}.

Fonte: Autoria própria

Nos seres humanos, o lactato está presente em alguns fluídos biológicos, como o sangue, saliva, urina e suor ³. No entanto, quando os níveis de lactato em tais fluidos se apresentam em concentrações superiores ou abaixo dos níveis basais, pode ser uma forte evidência de alguma doença ou disfunção ³. Atualmente o lactato vem sendo utilizado como um dos biomarcadores mais significativos para avaliar a oxigenação dos tecidos e, portanto, de grande importância para diagnósticos clínicos ³, militares ⁴ e esportivos ⁵. Assim sendo, os níveis de lactato podem estar associados a algumas doenças como a fibrose cística, que é uma doença na qual se tem a redução dos níveis de oxigênio disponíveis, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e sepse (infecção generalizada) ⁶. Por outro lado, os níveis elevados de lactato também podem ser biomarcadores para a hipofixia no parto, ou seja, para verificação da insuficiência de oxigênio do feto ².

Além disso, o lactato desempenha um importante papel na medicina esportiva uma vez que por meio dos níveis de lactato presentes no sangue é possível fazer o monitoramento do desempenho físico dos atletas ⁷. Neste contexto, frequentemente tem sido veiculada pelas mídias notícias que mostram atletas, iniciando suas carreiras em idades cada vez mais precoces, o que faz com que estes sejam expostos a cargas físicas e atividades excessivas desde a infância. Então a probabilidade deste atleta sofrer traumas que acabam levando a uma interrupção

precoce de sua carreira é muito grande ⁷. Com isto se torna muito importante avaliar a intensidade e carga do exercício entre um treinamento e outro, e os níveis de lactato são uma ferramenta valiosa para desempenho desta função ⁷.

Convencionalmente, os métodos mais utilizados pelos laboratórios de análise para determinação de lactato nos fluídos biológicos são baseados em técnicas como cromatografia gasosa, ou cromatografia líquida acopladas ao espectrômetro de massas. Tais métodos demandam profissionais especializados, necessitam de instrumentação relativamente cara, além de exigirem um tempo muito longo de análise, acarretando em elevados custos ⁸.

Diante da necessidade de informação analítica rápida e de baixo custo, surgiram os testes Point of Care (*Point of care testing*, PoCTs) que fornecem análises de custo reduzido, rápidas, que são executadas junto ao paciente, independentemente do local em que estes se encontram, e sem a necessidade de mão de obra especializada ⁹. O exemplo mais bem-sucedido de teste PoCTs é o glicosímetro, no qual os pacientes com diabetes monitoram seus níveis de glicose em sua própria residência. Com estas análises, várias etapas envolvidas no diagnóstico clínico podem ser eliminadas, facilitando o início do tratamento ⁹.

Comercialmente, encontram-se disponíveis alguns biossensores eletroquímicos para o monitoramento de lactato (Figura 1), análogos ao glicosímetro, que são uma interessante alternativa aos métodos de análise considerados oficiais ¹⁰.

Figura 1-Dispositivo comercial para detecção de lactato, podendo se observar ao lado as tiras (eletrodos) utilizados para quantificação de lactato em amostras de sangue. E uma caixa contendo eletrodos disponíveis comercialmente.

Fonte: <http://www.roche.pt/corporate/index.cfm/diagnosticos/poc/autocontrole/acutrend-plus-autocontrole/>
Acessado: 28/02/2018

No entanto, os dispositivos existentes são baseados em métodos considerados invasivos para o paciente, onde o sangue é coletado perfurando-se o dedo ou a orelha. Mais especificamente no caso de atletas, o sangue do indivíduo é geralmente recolhido repetidamente em curtos intervalos de tempo enquanto o atleta realiza um treino; o que pode prejudicar a análise do seu desempenho. Além disso, estes métodos causam desconforto para o paciente,

podendo ocorrer contaminação devido às frequentes picadas na coleta de sangue ou propiciar infecções ¹¹.

Desta forma, a utilização de outros fluídos biológicos como saliva, urina e suor têm se mostrado uma alternativa promissora frente a tais métodos invasivos, uma vez que em tais fluidos biológicos estão presentes quantidades consideráveis de lactato. A Tabela 1 exibe os níveis de lactato presentes em diferentes fluídos biológicos.

Tabela 1-Níveis de lactato presentes nos fluídos biológicos

Fluído biológico	Concentração de lactato
Saliva ¹²	0,1–2,5 mmol L ⁻¹
Sangue ²	0,5 -2,0 mmol L ⁻¹
Ar exalado ²	13,5-22,0 μ mol L ⁻¹
Lágrima ^{2,}	1,0-5,0 mmol L ⁻¹
Suor ²	10,0- 25,0mmol L ⁻¹
Fluido intersticial ²	1,9-2,2 mmol L ⁻¹

Fonte: Autoria própria

Dentre estes biofluídos, o suor tem se mostrado mais vantajoso em relação aos demais, pois as amostras de suor são menos propensas a adulterações, podem ser armazenadas por períodos longos, são mais fáceis de se obter quando comparada com outros fluídos biológicos, especificamente o sangue. Diante de tais limitações, o desenvolvimento de novos dispositivos aderentes à pele (*wearable*) para realizar monitoramento contínuo dos níveis de lactato no suor tem despertado interesse na comunidade científica e médica.

Na literatura, destacam-se alguns trabalhos pioneiros sobre dispositivos aderentes à pele para monitoramento em tempo real dos níveis de lactato no suor. Jia et al., (2013)¹³ desenvolveram um biossensor, que pode ser aplicado como uma "tatuagem", a partir de técnicas de impressão por serigrafia. O eletrodo de trabalho e auxiliar de carbono, juntamente com os eletrodos de referência de tinta de Ag/AgCl foram impressos num substrato de papel (Figura 2A). O eletrodo de trabalho foi funcionalizado com nanotubo de carbono e tetratiafulvaleno. Posteriormente, a enzima lactato oxidase estabilizada por albumina foi imobilizada na superfície do eletrodo modificado por ligação intercruzada. A produção de lactato após o exercício foi medida, observando-se a dependência linear do sinal em relação à concentração de lactato no intervalo de 1 mM a 20 mM, sendo que os níveis de tal espécie do suor atingem

no máximo 25 mM. Outro dispositivo foi proposto por Tur-García et al., (2017) ⁴, também para detecção de lactato em suor para aplicação em pacientes com isquemia. A configuração do biossensor baseou-se na utilização de duas membranas porosas de policarbonato, contendo os eletrodos de referência/auxiliar feitos de filme de Au, e o eletrodo de trabalho de filme de Pt. Por fim, uma mistura contendo a enzima lactato oxidase, albumina e glutaraldeído foi utilizada para imobilização do componente biológico (Figura 2B). O sensor exibiu resposta linear no intervalo de 0-70 mM de lactato, com limite de detecção de 0,2 mM.

Figura 2-A) Biossensor de tatuagem para detecção de lactato desenvolvido por Jia et al., (2013) ¹³: (a) Ilustração esquemática dos três eletrodos "NE" para monitoramento eletroquímico de lactato sobre a epiderme. (b) Constituintes da modificação da superfície do eletrodo de trabalho. B) Biossensor para detecção de lactato no suor desenvolvido por Tur-garcía et al., (2017) ⁴ (a) Esquema do eletrodo de ouro/platina, (b) aplicação da enzima, (c) esquema e (d) fotografia da disposição final do sensor, demonstrando a flexibilidade.

Fonte: JIA, W. et al , 2013 ¹³ TUR-GARCÍA E. L. et al, 2017 ⁴.

Apesar dos avanços atrelados ao uso de dispositivos aderentes a pele, tal tecnologia ainda é muito recente, não havendo disponibilidade de dispositivos robustos no mercado. Ainda existem vários desafios que precisam ser solucionados para aplicação dos sensores químicos não-invasivos aderentes à pele. Fatores relacionados a questões que envolvem estabilidade em longo prazo e a sua biocompatibilidade são fundamentais ¹¹. Além disso, os sensores epidérmicos enfrentam deformações mecânicas durante os movimentos corporais normais, o que dificulta sua aplicação efetiva. A extensão de tais deformações aumenta quando o usuário realiza uma atividade física intensa. Deformação adicional e desafios ocorrem com sensores à base de têxteis, onde a lavagem dos têxteis exerce uma grande degradação mecânica, química e térmica. Esforços extensos devem ser direcionados no desenvolvimento de sensores que podem suportar tais tensões severas durante longos períodos ou uso rigoroso ¹³.

Neste contexto, a celulose bacteriana, mostrada na Figura 3, pode se tornar um substrato adequado e promissor para confecção e desenvolvimento de novos dispositivos aderentes à

pele, pois este material apresenta propriedades físicas e mecânicas distintas, incluindo sua biocompatibilidade, resistência à tração mesmo quando molhado, elasticidade, capacidade de absorção de água e aderência à pele ¹⁴. Tais características tornam a celulose bacteriana o substrato ideal para a fabricação de dispositivos eletroquímicos impressos, o que pode resultar em dispositivos mais flexíveis e menos suscetíveis a deformações mecânicas, mesmo se molhados; principalmente quando comparados com outros tipos de celulose, como papel sulfite e o cromatográfico ^{15,16}.

Figura 3-Celulose bacteriana formada extracelularmente pela bactéria *Gluconacetobacter xylinum*.

Fonte: TORRES, F.G, et al., 2009 ¹⁷.

1.2 Celulose bacteriana (CB)

No século XIX, o químico britânico Adrian Brown observou a formação de um filme gelatinoso na superfície do vinagre sendo fermentado ¹⁸, sendo esse, o primeiro estudo que se tem registro na literatura da obtenção da celulose bacteriana ¹⁸. Quando os pesquisadores analisaram o filme formado eles verificaram que se tratava de celulose, sendo que a bactéria que havia produzido foi *Komagateeibacter Hansenii* ¹⁸. As bactérias do gênero *Komagateeibacter* são bactérias gram negativas comumente presentes em plantas e vegetais e, são capazes de produzir uma película de celulose na interface líquido-ar no meio de cultivo, como um mecanismo de proteção contra a radiação UV, porém outros microorganismos como *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Sarcina* e *Agrobacterium* também exibem a capacidade de sintetizar este biopolímero ^{19,20}.

De maneira geral, a celulose bacteriana (C₆H₁₀O₅)_n apresenta a mesma composição química da celulose de origem vegetal ou seja, ambas são formadas por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4) ^{21,22} (Figura 4). Além disso, a CB é produzida na forma pura, desprovida de lignina, hemicelulose, pectina ou qualquer outro composto presente na

polpa da planta, e não contém componentes de origem animal sendo facilmente purificada utilizando NaOH ^{14, 23}. Já a celulose de origem vegetal por não ser obtida na sua forma pura necessita passar por tratamentos químicos adicionais que empregam substâncias poluentes, tais como soda cáustica, o cloro gasoso, monóxido de carbono e dióxido de carbono para purificá-la ¹⁴.

Figura 4-Representação da estrutura química da CB (C₆H₁₀O₅) n.

Fonte: Autoria própria

A principal diferença entre estes tipos de celulose é sua morfologia, uma vez que a CB apresenta fibras nanométricas com um diâmetro de 20-100 nm, que conferem a este biopolímero propriedades mecânicas e físicas distintas quando equiparada à celulose de origem vegetal ¹⁴. Na Tabela 2 é apresentado uma comparação entre as propriedades da celulose de origem vegetal e bacteriana. No qual o módulo de Young é um parâmetro que fornece informações sobre a rigidez do material e sua resistência a deformação.

Tabela 2-Comparação entre as principais propriedades da celulose bacteriana com a celulose vegetal.

Propriedades	Celulose vegetal	Celulose bacteriana
Cristalinidade	56-65 %	65-79 %
Grau de polimerização	300-1700	800-10000
Largura das fibras	1,4- 4,0x10 ⁻² mm	70-80 nm
Módulo de Young*	5,5-12,6 GPa	15-30 GPa
Conteúdo de água	60 %	98,5 %

Fonte: PECORARO, É.,et al., 2009 ¹⁹.

Devido às suas propriedades distintas a celulose bacteriana tem sido empregada nas mais diversas aplicações como a indústria têxtil, papel, alimentos, produtos farmacêuticos, tratamento de resíduos, radiodifusão mineração e refinarias ¹⁴. Na área médica a CB tem sido utilizada como materiais para curativos, pele artificial, enxertos vasculares, vasos sanguíneos artificiais e implantes dentários ^{24,14}. Na Tabela 3 pode-se observar um resumo das aplicações da CB em diversas áreas

Tabela 3-Aplicações da celulose bacteriana em diversas áreas

Área	Aplicação
Cosméticos	Estabilizador de emulsões como cremes, tônicos, condicionadores, esmaltes.
Tratamento de água	Reciclagem de minerais e óleos
Setor alimentício	Celulose comestível (nata de coco)
Indústria de papel	Produção de papéis especiais
Medicina /biomédica	Pele artificial temporária para queimaduras e úlceras, componentes de implantes dentários; antimicrobiano curativo de feridas, nanofilme, administração de medicamentos, excipiente de drogas

Fonte: JOZALA, A. F. et al ., 2016 ¹⁴

1.2.1 Funcionalização da celulose

O processo de funcionalização da celulose com biomoléculas (anticorpos e enzimas) é uma interessante alternativa em eletroanálise, visto que permite um aumento na área eletroativa o que pode propiciar uma melhora significativa no desempenho do sensor eletroquímico desenvolvido ^{25,26}. Uma vez que esta já é amplamente empregada e bem consolidada em ensaios colorimétricos para confecção de biossensores ²⁷. A incorporação da biomolécula pode-se dar de diferentes maneiras como imobilização física ²⁸, acoplamento bioquímico ²⁸ e imobilização química ²⁸. Não existindo um método correto ou errado para a imobilização da biomolécula, é interessante buscar o mais adequado para cada tipo de sistema.

Um método que merece destaque é a imobilização química que é estável, uniforme e que evita a lixiviação da biomolécula quando equiparada aos demais processos, pois o elemento biológico é incorporado ao papel por meio de ligações covalentes ²⁷. No entanto uma importante limitação deste tipo de método é a pequena quantidade de ácidos carboxílicos disponíveis na

superfície das membranas de celulose para ocorrer a conjugação com a biomolécula ²⁷. Existem alguns métodos que promovem reações com as hidroxilas disponíveis nas membranas de celulose nos quais são empregados epícloridrina ²⁹, triazidas ³⁰ e carbonildiimidazol ³¹. Contudo, o emprego destes reagentes acaba por elevar o número de etapas tornando o processo laborioso.

Uma alternativa a tais métodos é realizar previamente uma etapa de oxidação da celulose com meta-periodato de sódio criando grupos aldeídos em sua superfície e assim permitindo a conjugação com biomoléculas ^{32,27}. Este reagente é responsável por promover a oxidação de dióis, e assim, convertendo a celulose a 2,4-dialdeído celulose. Após a etapa de oxidação a biomolécula pode ser imobilizada diretamente na celulose ou ser ativada com EDC (cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) / NHS (N-hidroxissuccinimida) com posterior incorporação da biomolécula e conversão a uma amida ³².

1.3 Configuração do biossensor eletroquímico

Diante disso, neste trabalho se almejou o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a detecção de lactato no suor, utilizando a celulose bacterina como substrato para a confecção dos eletrodos impressos. A fabricação destes dispositivos foi efetuada utilizando a técnica de serigrafia que é um processo amplamente empregado na confecção de eletrodos.

De maneira geral, um sensor ou/ biossensor eletroquímico é constituído por um sistema de reconhecimento e um transdutor que é responsável por converter o sinal da reação química em um sinal mensurável como por exemplo uma variação de: corrente, potencial e frequência ³³. Na configuração de um biossensor o sistema de reconhecimento utilizado pode ser um elemento biológico como por exemplo uma enzima, anticorpo, fragmento de DNA etc ³³. Na qual a principal vantagem de se incorporar um elemento biológico é a especificidade que tais compostos conferem ao dispositivo desenvolvido o que é muito importante na aplicação em amostras reais, como por exemplo o suor, que pode conter vários interferentes eletroativos.

Neste contexto a enzima lactato oxidase (LOx) foi imobilizada no dispositivo, já que esta é amplamente utilizada na confecção de biossensores enzimáticos para detecção de lactato ³⁴ uma vez que catalisa a oxidação do L-lactato em piruvato na presença de oxigênio dissolvido, formando peróxido de hidrogênio ^{35, 36, 37}. A Equação química 2 exemplifica a reação de catálise enzimática ².

Equação química 2- Processo enzimático de conversão do lactato em piruvato promovido pela enzima lactato oxidase (LOx).

Fonte: Autoria própria

O peróxido de hidrogênio gerado pela catálise enzimática é eletroquimicamente ativo e pode ser reduzido ou oxidado fornecendo uma resposta de corrente proporcional à concentração de L-lactato. No entanto, o peróxido de hidrogênio produzido por reação enzimática requer um alto potencial de oxidação/redução. Assim uma alternativa é a incorporação de nanomateriais à superfície eletrodica, pois estes podem apresentar efeito eletrocatalítico de modo a diminuir os altos potenciais de reação, também, aumentam a área eletroativa, a condutividade e podem contribuir para aumentar a sensibilidade do dispositivo desenvolvido ³³.

Dentre estes nanomateriais, os hexacianoferratos (II) de ferro (III), comumente denominado de azul da prússia (AP), tem se mostrado uma excelente alternativa para detecção do peróxido de hidrogênio produzido em reações enzimáticas ³⁸. Estas propriedades estão associadas a algumas características deste material, como a capacidade de diminuir o sobrepotencial e a promoção da eletro-redução de peróxido de hidrogênio ^{39,40,41}. Além disso, o AP apresenta seletividade para moléculas com tamanho reduzido, como por exemplo H₂O₂ e O₂, devido ao tamanho dos seus sítios intersticiais que possibilitam acomodar estas moléculas seletivamente ^{42, 43}. De acordo com a literatura, o mecanismo proposto para a conversão do AP (azul da prússia) a BP (branco da prússia) e a eletro-redução do peróxido de hidrogênio são descritos na Equação química 3, respectivamente.

Equação química 3-(a) Reação química envolvendo a conversão do AP (azul da prússia) em BP (branco da prússia). (b) Mecanismo envolvido na reação de eletro-redução do peróxido de hidrogênio

A Figura 5 ilustra o processo envolvido no biossensoriamento com o dispositivo desenvolvido neste trabalho. Neste, a lactato oxidase será imobilizada sobre a superfície do papel e esta é responsável por catalisar a reação de oxidação do lactato presente no suor gerando peróxido de hidrogênio e piruvato. Neste tipo de biossensor eletroquímico deve ser realizada a quantificação do peróxido de hidrogênio produzido na reação enzimática. Este será reduzido devido à presença do azul da prússia (representado pelo cubo azul) que apresenta a capacidade de promover a eletro-redução do peróxido de hidrogênio, facilitando a transferência eletrônica. E como representado pelo esquema é produzido um sinal ilustrado pelo voltamograma cíclico que é proporcional à concentração do analito de interesse presente na amostra.

Figura 5-Esquema do processo envolvido no biossensoriamento eletroquímico do dispositivo desenvolvido neste trabalho.

Fonte: Autoria própria

2 OBJETIVOS GERAIS

A dissertação teve como objetivo principal o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para detecção de lactato em suor. Portanto, o dispositivo foi confeccionado a partir da impressão por serigrafia utilizando tinta condutora de carbono e de Ag/AgCl em substrato de celulose bacteriana, com posterior modificação da superfície eletródica utilizando nanocubos de azul da prússia.

Os objetivos específicos:

- Caracterizou-se a celulose bacteriana comercial;
- Empregou-se a técnica de impressão por serigrafia com tinta de carbono;
- Modificou-se a superfície eletródica com azul da prússia e avaliar seu desempenho eletroquímico na detecção de peróxido de hidrogênio;
- Estudou-se e otimizou-se o desempenho eletroquímico do dispositivo confeccionado em celulose bacteriana;
- Imobilizamos a enzima lactato oxidase para detecção seletiva de lactato;
- Aplicamos o dispositivo para a detecção de lactato em amostras de suor sintético.

3 INSTRUMENTAÇÃO

Os ensaios de tração mecânica foram realizados com um Analisador Mecânico Dinâmico - DMA (Dynamic Mechanical Analyzer), modelo Q800 da TA Instruments (New Castle-DE, EUA). Os parâmetros experimentais empregados consistem em pré-carga de 0,01 N; rampa de força de 1 N min⁻¹ até a ruptura do material ou até atingir 18 N, com utilização de garra *Tension Film*.

As medidas de Difração de Raios-X (DRX) foram efetuadas utilizando o equipamento Bruker modelo D8 Advance (Billerica-MA, EUA) operando com uma fonte de Cu K α de $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$ (40kV, 40 mA). Os difratogramas foram obtidos no intervalo de 2θ de 10 a 100° com um incremento de 0,02° e tempo de acumulação 0,5 s.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram obtidas com um microscópio ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (model 7060), com feixe de elétrons de 20kV. As amostras foram recobertas com depósito de ouro sobre sua superfície.

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram obtidas por um microscópio modelo JEM2100 LaB6 200 kV marca JEOL (Tóquio, Japão). As amostras foram preparadas utilizando uma grade de cobre com 200 mesh com filme de formvar.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT30/Autolab (Eco Chemie, Holanda) acoplado a um microcomputador com um software GPES 4.9.007. As medidas de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foram efetuadas utilizando o software FRA.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e soluções

O ácido bórico, ácido fosfórico (85%) e ácido acético (99%) utilizados na preparação do tampão Britton-Robinson (BR) salino com concentração 0,04 mol L⁻¹ foram obtidos da Synth. O KCl que foi utilizado para a preparação do tampão foi obtido da Sigma Aldrich. O pH da solução tampão foi ajustado com solução de KOH 1 mol L⁻¹ obtido da Sigma Aldrich.

Para a preparação do suor sintético o KCl (1 g L⁻¹), NaCl (7,5 g L⁻¹) e a uréia (1 g L⁻¹) foram solubilizados em tampão (BR). Todos os sais foram obtidos da empresa Sigma Aldrich.

Os reagentes utilizados na síntese do azul da prússia foram o tricloreto de ferro (FeCl_3) obtido da Synth, Hexacianoferrato de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) e poli(etilenoimina) (PEI, $M_w = 25000 \text{ g mol}^{-1}$) ambos da Sigma Aldrich. Para ajustar o pH das soluções de FeCl_3 e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ foi empregado HCl 37% (Dinâmica).

Soluções de 5 mmol L^{-1} de ferrocianeto e ferricianeto de potássio (Sigma-Aldrich) foram preparadas em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) sendo utilizadas para estudos do comportamento eletroquímico do eletrodo.

O peróxido de hidrogênio (29%) utilizado para a construção das curvas analíticas foi obtido da Synth. Todas as soluções de peróxido de hidrogênio foram preparadas em tampão BR pH 6,0 contendo (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

A lactato oxidase extraída de *Aerococcus viridans* (39U/mg de sólido) foi obtida da empresa Sigma- Aldrich. Onde uma unidade (U) será responsável por oxidar $1,0 \mu\text{mol}$ de L-lactato para piruvato e peróxido de hidrogênio por minuto em pH 6,5 a 37°C . A glicose oxidase extraída de *Aspergillus Ninger* (148400 U/mg de sólido) onde, uma unidade irá oxidar $1,0 \mu\text{mol}$ de glicose para D-gluconolactona e H_2O_2 por min a pH 5,1 a 35°C , foi obtida da Sigma-Aldrich. Sendo que ambas as enzimas foram solubilizadas em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH=7. Os sais para a preparação do tampão Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 também foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os reagentes cloridrato de 1-(3dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) foram obtidos da Sigma Aldrich.

O ácido láctico (85%) e a glicose utilizados nas detecções foram obtidos da Sigma-Aldrich. O meta-periodato de sódio utilizado na oxidação da celulose foi obtido da empresa Sigma-Aldrich.

Todos os reagentes empregados para o preparo das soluções apresentavam pureza analítica e foram utilizados sem nenhum tipo de purificação prévia. Todas as soluções foram preparadas com água purificada com resistividade $18,2 \text{ M } \Omega \cdot \text{cm}$ (Barnsted Nanopure System).

A tinta condutora de carbono utilizada para a impressão dos eletrodos foi obtida comercialmente da Henkel, marca LOCTITE® (EDAG 423SS E&C).

A caneta condutora de tinta de prata para confecção do eletrodo de referência foi obtida da Chemtronics®, modelo CW2200MTP.

A celulose bacteriana comercial foi obtida como cortesia da Bionext® Produtos Biotecnológicos Ltda (Mogi Mirim – SP).

4.2 Síntese e caracterização do Hexacianoferrato (II) de Ferro (III) (azul da prússia)

A síntese dos nanocubos de azul da prússia (AP) foi baseada no procedimento proposto por Cao et al.(2010) ⁴⁴, e consiste na adição de 10 mL de FeCl_3 (5 mmol L^{-1}) e 1 mL de solução de PEI 3% a 10 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol L^{-1}) sob agitação. Posteriormente, a temperatura da mistura reacional foi elevada a 100°C e mantida sob refluxo por 3h com agitação magnética. Uma mudança gradativa na coloração da solução de amarelo para azul foi observada nos 15 minutos iniciais da síntese. O produto foi centrifugado por um período de 10 min e consecutivamente lavado com água (3 vezes). Em seguida, este foi levado a estufa para secagem durante 12h ⁴⁴. A caracterização morfológica do material sintetizado foi obtida por meio das técnicas de Difração de Raios X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

4.3 Caracterização da celulose bacteriana

Para obtenção de informações sobre as propriedades mecânicas e morfológicas da celulose bacteriana foram efetuados ensaios de Tração Mecânica e MEV.

4.3.1 Ensaios de Tração

Os ensaios de tração mecânica foram efetuados no Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas do Instituto de Química de São Carlos, liderado pela Profa. Dra. Elisabete Frollini. Inicialmente o corpo de prova foi cortado nas dimensões apropriadas (3 cm x 3 mm), preso na garra do equipamento, ajustado (6 mm x 3 mm) e posteriormente foi aplicada uma tensão ao corpo de prova até sua ruptura. Os ensaios foram realizados utilizando a celulose bacteriana seca e também molhada em água pura. Para fins comparativos, os ensaios de tração mecânica foram conduzidos utilizando-se também o papel cromatográfico. No entanto, este foi realizado apenas com o papel cromatográfico seco, pois quando molhado este rasgava antes mesmo da realização do ensaio.

4.4 Fabricação dos eletrodos impressos utilizando o processo de serigrafia

A fabricação dos eletrodos impressos utilizando o processo de serigrafia foi toda efetuado no Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos (GMEME) no qual foram realizadas algumas adaptações para elaboração da confecção dos eletrodos impressos.

Primeiramente, foram fabricados eletrodos impressos em substrato de plástico, utilizando-se folhas de transparência a fim de otimizar o processo de fabricação antes de iniciá-lo em substrato de celulose bacteriana.

Para confecção dos eletrodos foi utilizado uma tela de monofilamento de poliéster (40 x 35 cm) de 77 fios por cm. Para transferência da tinta foi utilizado um rodo feito de poliuretano com dureza de 75 shores. Durante o processo de serigrafia, o substrato foi colocado sob a tela, sendo está fixada na mesa, e o rodo mantido com uma inclinação de aproximadamente 45° sendo que o processo foi repetido por duas vezes consecutivas. Primeiramente, a tinta de carbono é homogeneizada e depositada na parte acima do molde da tela de serigrafia, com o substrato devidamente alinhado e fixado, e posteriormente é efetuada a transferência da tinta. Na Figura 6 pode ser observado um esquema ilustrativo do processo de serigrafia.

Figura 6-Ilustração do processo de serigrafia: (a) Alinhamento da tela e do substrato e deposição da tinta de carbono (b) impressão do eletrodo.

Fonte: Autoria própria

Após o processo de impressão os eletrodos são levados a estufa a uma temperatura de 90 ° C por um período de 30 minutos para realização da cura térmica da tinta. Posteriormente, o eletrodo de referência foi feito com auxílio de uma caneta com tinta condutora de prata, com secagem a temperatura ambiente por aproximadamente 12 h.

Na Figura 7 pode ser observado uma fotografia dos eletrodos impressos na celulose bacteriana.

Figura 7- (a) Fotografias dos eletrodos impressos na celulose bacteriana (b) fotografia do eletrodo impresso devidamente isolado, com fita de isolamento obtida comercialmente, indicado pelas setas ER (eletrodo de referência), ET (eletrodo de trabalho) e EA (eletrodo auxiliar).

Fonte: Autoria própria

4.4.1 Caracterização morfológica dos eletrodos produzidos

Os eletrodos confeccionados utilizando substrato de celulose bacteriana foram caracterizados por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.5 Medidas eletroquímicas

Os eletrodos impressos confeccionados no presente projeto, possuem um eletrodo de trabalho com área geométrica de aproximadamente 7 mm^2 . Estes dispositivos foram conectados ao potenciostato utilizando um conector, como mostrado na Figura 8. As medidas eletroquímicas foram executadas em uma gota de solução sobre os eletrodos. O volume da solução utilizados para realização de todas as medidas eletroquímicas foi de $75 \text{ }\mu\text{L}$.

Figura 8-Montagem experimental do sistema contendo o eletrodo impresso acoplado ao potenciostato.

Fonte: Autoria própria

4.5.1 Pré-tratamento da superfície dos eletrodos impressos na celulose bacteriana

O pré-tratamento eletroquímico foi realizado, por meio de experimentos de voltametria cíclica, com os seguintes parâmetros: intervalo de potencial entre -2,5 V a 2,5 V; velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹; um ciclo de varredura, em solução de H₂SO₄ (0,5 mol L⁻¹)⁴⁵.

4.5.2 Modificação da superfície eletródica

Inicialmente foi preparada uma suspensão de azul da prússia, dispersando-se 2 mg deste material em 1 mL de solução 5 % m/v de Nafion[®] 117 em banho de ultrassom por 120 min. Posteriormente, 3 µL desta suspensão (2 mg mL⁻¹) foram gotejados sobre a superfície do eletrodo de trabalho, com tempo de secagem de 12 h.

4.5.3 Caracterização eletroquímica

As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas para comparar os eletrodos em que não foi realizado pré-tratamento eletroquímico, com aqueles em que foi realizado tal procedimento descrito na sessão anterior.

Os experimentos de voltametria cíclica utilizando [Fe(CN)₆]^{4-/3-} foram realizados em um intervalo de potencial de -0,7 a 1,0 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

As medidas de EIE na presença de [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹ foram feitas em potencial de circuito aberto, com intervalo de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, com amplitude de 10 mV.

Em relação ao eletrodo modificado com azul da prússia, foram utilizados os mesmos parâmetros para as medidas de EIE, mas em presença apenas de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), sendo que o circuito utilizado para o tratamento dos dados foi o de Randles Rs (CPE[RctZw]), representado na Figura 9. Os símbolos do circuito na Figura 9 são identificados como: R1 é a resistência da solução, R2 é a resistência à transferência de carga, CPE o elemento de fase constante, e W1 é o elemento de Warburg.

Figura 9-Ilustração do circuito equivalente utilizado para análises dos resultados de EIE.

Fonte: Autoria própria

4.5.4 Detecção eletroquímica de peróxido de hidrogênio

O desempenho eletroquímico do eletrodo impresso modificado com azul da prússia (AP) foi avaliado em relação à detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio. As medidas voltamétricas para detecção de peróxido de hidrogênio foram feitas empregando-se um intervalo de potencial de $-0,3 \text{ V}$ a $0,4 \text{ V}$, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Foram obtidas curvas analíticas para detecção de peróxido de hidrogênio no eletrodo impresso não modificado (SPE) contendo $3 \mu\text{L}$ de Nafion[®] 117 (SPE/Nafion); e para o eletrodo modificado com $3 \mu\text{L}$ de AP disperso em Nafion[®] 117 (SPE/Nafion/AP). As concentrações de peróxido de hidrogênio analisadas foram: $1,0$ a $14,0 \text{ mmol L}^{-1}$, com incremento de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Nos experimentos de cronoamperometria, o eletrodo modificado com AP foi polarizado em $-0,2\text{V}$ por um período de 30 s . O potencial aplicado foi pré-determinado por experimentos de voltametria cíclica. Estas medidas foram realizadas com soluções de concentrações de $0,25$; a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

4.6 Oxidação da celulose bacteriana com meta-periodato de sódio

O procedimento empregado na oxidação da celulose bacteriana foi adaptado a partir do método proposto por Morbioli (2015) ²⁷. Inicialmente uma solução de meta-periodato de sódio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) é adicionada a um recipiente retangular de vidro, e posteriormente as folhas de celulose bacteriana nas dimensões $15 \times 20 \text{ cm}$ foram mergulhadas nesta solução uma a uma. As

membranas foram deixadas em repouso por 30 min nesta solução na temperatura ambiente e na ausência de luz. Posteriormente as membranas oxidadas foram lavadas com água em abundância para remoção de resíduos do agente oxidante. As membranas foram deixadas secar a temperatura ambiente por aproximadamente 12 h.

Com as membranas oxidadas foram efetuadas medidas de MEV e um teste colorimétrico utilizando 2,4-Dinitrofenilhidrazina. Para impressão dos eletrodos na celulose oxidada foi efetuado o mesmo procedimento descrito no item 4.4 deste trabalho sem nenhuma modificação nesta etapa.

4.6.1 Testes colorimétricos com 2,4-Dinitrofenilhidrazina para identificação de aldeídos

Os testes colorimétricos para identificação de aldeídos foram feitos dissolvendo 300 mg de 2,4-Dinitrofenilhidrazina em 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. E então esta solução foi adicionada em uma mistura de água e etanol sob agitação. Para o teste, 3,0 μL desta solução foi adicionada a superfície da celulose que passou pelo processo de oxidação assim como àquela sem nenhum tipo de tratamento. Posteriormente o papel foi incubado por 1 min e na sequência lavado com 30 μL de água por 3 vezes. O papel foi deixado secar a temperatura ambiente por 5 min ⁴⁶.

4.7 Configuração do biossensor eletroquímico

4.7.1 Imobilização da glicose oxidase na superfície eletródica

A princípio, para a imobilização da enzima glicose oxidase, foi escolhido o método de ligação cruzada utilizando glutaraldeído ²⁸. Para isto, inicialmente a superfície eletródica foi modificada com 3 μL de AP como descrito no item 4.5.2, deixando o solvente evaporar por aproximadamente 2 h. Posteriormente o eletrodo de trabalho foi modificada com 6 μL de uma solução 20 mg mL^{-1} de glicose oxidase e levados à geladeira por aproximadamente 5 h a 4 °C. A seguir no eletrodo trabalho foi adicionado 6 μL de glutaraldeído 2,5 % (v/v) que agiu por 12 h. Posteriormente, o biossensor confeccionado foi lavado com solução tampão BR para remoção do glutaraldeído em excesso. Na Figura 10 é apresentado um esquema envolvido na imobilização.

Figura 10- (a) Superfície eletródica modificada com AP (b) incorporação da biomolécula e (c) posterior adição de glutaraldeído.

Fonte: Autoria própria

4.7.2 Imobilização da glicose oxidase e lactato oxidase na celulose bacteriana

Inicialmente os eletrodos impressos com a celulose (oxidada e sem oxidar) foram modificados com 3 μL de AP, aguardando-se aproximadamente 1 h para a evaporação do solvente da superfície eletródica. Subsequentemente ao papel foi aplicado 6 μL de EDC/NHS 10,0 mmol L^{-1} , deixando está agir por cerca de 45 min. Posteriormente ao papel ativado com EDC/NHS foram imobilizadas as enzimas. Para os experimentos conduzidos com a glicose oxidase foram aplicados 6 μL de uma solução 20 mg mL^{-1} . Já nos experimentos com a lactato oxidase foram utilizados 10 μL contendo 4 U de enzima, em ambas as condições os sensores produzidos foram levados a geladeira por 12 h. Finalmente, os sensores foram lavados com solução tampão BR para eliminação de enzima em excesso antes de serem efetuadas as medidas eletroquímicas. A Figura 11 é uma representação esquemática do procedimento envolvido na imobilização.

Figura 11-Esquema do processo de imobilização enzimática na celulose oxidada (a) Modificação da superfície eletródica com AP (b) ativação da celulose oxidada com EDC-NHS com posterior imobilização da enzima.

Fonte: Autoria própria

4.7.2.1 Teste colorimétrico com *Coomassie blue*

Para a preparação do *Coomassie blue* foram dissolvidos 165 mg do sólido em 5 mL de metanol e homogeneizados por aproximadamente 1 h. Para realização deste teste qualitativo foram cortados pedaços retangulares de celulose. Nos pedaços que serviram de brancos não foi adicionada a enzima. No ensaio contendo a enzima, inicialmente o papel foi ativado com EDC/NHS com posterior adição de glicose oxidase. A celulose na ausência e presença de enzima foi mantida sob constante agitação com *Coomassie blue* por 150 segundos. Subsequentemente as membranas foram lavadas com água em abundância e secas a temperatura ambiente

4.7.3 Medidas eletroquímicas

Todos os experimentos conduzidos com as enzimas foram efetuados na cela eletroquímica contendo 10 mL de solução sob agitação. O desempenho eletroquímico dos biossensores eletroquímicos produzidos foi avaliado com relação a detecção amperométrica de glicose e lactato. As medidas voltamétricas para detecção da glicose foram efetuadas empregando-se um intervalo de potencial entre - 0,3 V a 0,4 V e para lactato no intervalo de - 0,25 a 0,45 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. As concentrações analisadas foram: 1,0 a 30,0 mmol L⁻¹ de glicose e ácido láctico.

Para o cálculo dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foi utilizado o método proposto por Miller & Miller (2005) ⁴⁷. No qual o LOD é o menor sinal que pode ser discriminado do sinal do branco, foi efetuado utilizando a respectiva equação:

$$\mathbf{LOD} = y_B + 3S_B$$

No qual o LOD é dado pelo sinal do branco (y_B) mais três vezes o desvio padrão das medidas do branco ($3S_B$). Onde é mais adequado utilizar:

$$y_B = a \text{ (intercepto da reta)}$$

$$3S_B = 3S_{X/Y} \text{ (desvio padrão da regressão linear)}$$

Já a sensibilidade, ou seja, a tangente da reta foi calculada utilizando a respectiva equação:

$$b = \Sigma [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})] / \Sigma (x_i - \bar{x})^2$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos nanocubos de azul da prússia

Os nanocubos de azul da prússia sintetizados foram caracterizados pelas técnicas de MET e DRX, e estes resultados estão apresentados na Figura 12.

Figura 12- Caracterização do Azul da Prússia: (a) Micrografia obtida por MET; (b) imagem de MET com uma maior amplificação; (c) Histograma de distribuição de tamanho de partículas obtidas por MET; (d) Difratoograma de Raio X e refinamento de Rietveld.

Fonte: Autoria própria

Nas imagens de MET, pode-se observar a presença de nanocristais que apresentam a forma cúbica (Figura 12 a e 12 b), com arestas em torno de 72 nm (Figura 12 c) que foram estimados utilizando as micrografias obtidas por MET.

A partir do difratograma de Raio X e do refinamento de Rietveld, foi possível caracterizar estruturalmente o material sintetizado. Os picos de difração na Figura 12 d

correspondem a um material de estrutura cúbica de face centrada descrito pelo grupo espacial $fm3m$, o qual apresentou um tamanho médio de cristalito de 48,04 nm. Também foi possível propor uma estrutura que indica que o azul da prússia apresenta moléculas de água de hidratação (inserção Figura 12d), cuja posição foi determinada pelos mapas de Fourier obtidos da diferença entre difratograma experimental e o calculado. Confrontando os dados da microestrutura obtidos no refinamento com a distribuição média de partículas obtida pelo MET percebe-se que a maioria das partículas é formada pela combinação de aproximadamente dois cristalitos.

5.2 Caracterização mecânica da celulose bacteriana

A celulose bacteriana foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por ensaios de tração mecânica que forneceram informações sobre suas propriedades morfológicas e mecânicas. Os resultados obtidos confirmam sua potencialidade para confecção de eletrodos aderentes à pele como será discutido adiante. Para uma melhor visualização do quanto a celulose se mostra promissora para o desenvolvimento de um novo dispositivo vestível foram feitos alguns ensaios de tração mecânica em outros substratos de celulose comumente utilizados para fins comparativos.

Por meio dos resultados dos testes de tração mecânica foi possível obter alguns parâmetros que são fundamentais para avaliar as propriedades da celulose bacteriana e sua aplicação em dispositivos vestíveis. Um dos parâmetros é a tensão, que corresponde à força aplicada em determinada área para propiciar a ruptura do material; já a deformação sofrida pelo corpo de prova pode ser calculada em função do alongamento sofrido durante o ensaio, ou seja, é a variação entre o comprimento inicial e final. Um dos parâmetros mais importantes que pode ser obtido a partir das análises de Tração Mecânica é o módulo de Young que é dado pela razão entre a tensão aplicada e a deformação do material, dada pela Equação 1⁴⁸.

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\delta}{\varepsilon} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

δ = Tensão aplicada

ε = Deformação do material $\left(\varepsilon = \frac{L_f - L_i}{L_i} \right)$.

L_f : comprimento final

L_i : comprimento inicial

O módulo de Young está relacionado com a rigidez do material ou à resistência à deformação elástica. O módulo de Young tem origem na energia de ligação intramolecular do

material e divide os materiais em aproximadamente duas grandes classes: os flexíveis e os rígidos. Um material com um elevado valor do módulo de Young é um material rígido.

As informações obtidas nos ensaios de tração podem ser observadas na Tabela 4, em que a CB é a celulose bacteriana e PC é o papel cromatográfico:

Tabela 4- Informações obtidas nos testes de tração mecânica com os valores de desvio padrão do valor médio

Amostra	Tensão (MPa)	Deformação (%)	Módulo de Young (GPa)
CB/H ₂ O	44,7 ± 1,30	1,5 ± 0,2	3,6 ± 0,30
CB/Seca	96,7 ± 5,00	1,1 ± 0,03	9,9 ± 0,15
PC/Seco	15,0 ± 0,25	2,5 ± 0,15	1,0 ± 0,06

Fonte: Autoria própria

As propriedades mecânicas da celulose bacteriana quando comparada a de outros substratos, como o papel cromatográfico que tem sido utilizado na confecção de dispositivos eletroquímicos ²⁵, foram superiores, como pode ser evidenciado na Tabela 4. A celulose bacteriana apresenta uma porcentagem de deformação inferior ao papel cromatográfico (2,5%), mesmo quando molhada (1,5%). Além disso, seu módulo de Young é aproximadamente 10 vezes superior ao exibido pelo papel cromatográfico sob as mesmas condições, o que significa que a celulose bacteriana é mais rígida que o papel cromatográfico. O resultado que merece destaque é o módulo de Young da CB quando molhada, em que o material é 3 vezes menos rígido do que quando seco, ou seja, se torna mais elástico. Foi necessária uma tensão de 96,7 MPa para romper a CB seca, sendo que para romper a molhada cerca de metade da tensão foi necessária, enquanto que para romper o papel cromatográfico seco uma tensão 6 vezes menor foi suficiente. Não foi possível realizar os ensaios mecânicos com o papel cromatográfico molhado, pois este rasgava antes mesmo de ser submetido à tensão.

As propriedades mecânicas superiores da celulose bacteriana, estão associadas à formação de ligações de hidrogênio internas e externas, o que resulta em uma compactação de fibras resultando em um material flexível e que mesmo estando molhado seja mais resistente que o papel vegetal, não rasgando facilmente ¹⁵.

A natureza nanométrica de suas fibras e seu grau de compactação conferem a este material propriedades mecânicas distintas, como destacado na Tabela 4. Na Figura 13a, são apresentadas as imagens de MEV da celulose bacteriana, para verificação da morfologia deste

material. Percebe-se a presença de fibras com dimensões nanométricas, com diâmetro de aproximadamente de 100 nm, que se mostram bem compactadas. E para fins comparativos na Figura 13 b, pode-se observar uma micrografia do papel cromatográfico com um aumento de 5000 x, percebe-se que mesmo em uma amplificação inferior, já é possível visualizar a presença de fibras com dimensões superiores à da celulose bacteriana. Ao se visualizar as imagens da Figura 13 percebe-se que as propriedades mecânicas superiores, valores apresentados na Tabela 4, da celulose bacteriana quando comparada ao papel cromatográfico estão realmente associadas a natureza nanométricas de suas fibras.

Figura 13-Micrografia (a) celulose bacteriana em uma magnificação de 50000x; (b) papel cromatográfico em uma magnificação de 5000x.

Fonte: Autoria própria

5.3 Caracterização morfológica dos eletrodos impressos em substrato de celulose bacteriana

Por meio dos ensaios de tração mecânica, constatou-se a potencialidade da celulose bacteriana como substrato para confecção de dispositivos eletroquímicos. Assim, foi realizada a confecção dos eletrodos impressos utilizando a técnica de serigrafia. Na Figura 14, pode-se observar imagens de MEV de um eletrodo impresso, em que as Figuras 14 a e b compreendem uma região do eletrodo de trabalho (duas magnificações diferentes), e uma micrografia mostrando uma região da interface entre o contra eletrodo e o substrato de celulose bacteriana (Figura 14 c).

Figura 14-Micrografias obtidas por MEV da (a) superfície do eletrodo de trabalho com amplificação de 500x; (b) superfície do eletrodo de trabalho com magnificação de 5000x; (c) interface entre a superfície do eletrodo contra eletrodo (indicado pelo número 1) e da celulose bacteriana (indicado pelo número 2).

Fonte: Autoria própria

Na Figura 14 a, percebe-se que houve o recobrimento uniforme do substrato não sendo possível evidenciar regiões com ausência da tinta de carbono. Na Figura 14 b, onde é apresentado uma maior amplificação do eletrodo de trabalho, percebe-se a presença de estruturas gráficas dispostas de maneira não uniforme. E na Figura 14 c, é apresentado uma região entre o contra eletrodo, que foi recoberto com a tinta, e o substrato de celulose bacteriana indicando a diferença entre as duas superfícies.

5.4 Investigação da influência do pré-tratamento eletroquímico na performance dos eletrodos impressos na celulose bacteriana

Inicialmente, foi realizado um estudo visando avaliar o efeito do pré-tratamento eletroquímico na superfície dos eletrodos impressos, a fim de investigar a sua influência no desempenho do eletrodo produzido.

O pré-tratamento eletroquímico adotado utiliza experimentos de voltametria cíclica num intervalo de potenciais entre -2,5 V e 2,5V em uma solução de H_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), em um único ciclo de varredura ⁴⁵. Este pré-tratamento já havia sido empregado em outros eletrodos

descartáveis do grupo, sendo possível constatar que era eficaz. No entanto, como se trata de um outro tipo de tinta e outro substrato foi necessário averiguar seu efeito nas medidas eletroquímicas do sensor desenvolvido.

Para se obter tais informações, foram feitas medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica na presença da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ para o SPE na ausência e presença deste tipo de procedimento.

A Figura 15 apresenta os voltamogramas cíclicos de estado estacionário, obtidos para o eletrodo antes e após ser submetido ao tratamento eletroquímico, em uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, contendo 5,0 mmol L⁻¹ do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a 50 mV s⁻¹ e na Tabela 5 estão os respectivos valores de ΔE_{pico} e I_{pico} .

Figura 15- Voltamogramas cíclicos em presença da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em 0,1 mol L⁻¹ de KCl com velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹ para os eletrodos impressos (a) antes e (b) após serem submetidos ao pré-tratamento eletroquímico.

Fonte: Autoria própria

Tabela 5-Valores de ΔE_{pico} e corrente pico catódico e anódico referentes a Figura 15.

Eletrodo	$\Delta E_{\text{pico}}/\text{mV}$	$I_c/\mu\text{A}$	$I_a/\mu\text{A}$
Antes do pré- tratamento eletroquímico	693	-41,5	47,8
Após o pré-tratamento eletroquímico	300	-67,1	67,3

Fonte: Autoria própria

Nos voltamogramas cíclicos mostrados na Figura 15, observa-se um processo eletroquímico quasi-reversível, porém com os potenciais de pico anódico e catódico bastante separados um do outro, o que é condizente com a grande resistência ôhmica observada na superfície de eletrodos impressos. A partir destes resultados, observa-se uma diminuição na variação do potencial de pico do eletrodo quando submetido ao pré-tratamento eletroquímico. Além disso, percebe-se um aumento da corrente de pico dos voltamogramas, que pode ser atribuído à remoção de possíveis contaminantes originados da tinta utilizada no processo de impressão. Portanto, o pré-tratamento eletroquímico propicia uma diminuição da resistência da superfície ⁴⁹. Isto pode ser associado à introdução de grupos funcionais na superfície eletrodo como grupos carboxílicos ou carbonílicos que agem no sentido de melhorar a reversibilidade eletroquímica ou a remoção de contaminantes provenientes do processo de fabricação ⁴⁹.

Com objetivo de verificar se o pré-tratamento atuava de maneira igual em todos os dispositivos, foram efetuadas medidas com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em 4 eletrodos impressos diferentes. Na Figura 16 podem ser observados os respectivos experimentos de voltametria cíclica.

Figura 16- Experimentos de voltametria cíclica em presença da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} para 4 eletrodos diferentes.

Fonte: Autoria própria

Com estes experimentos foi possível calcular a variação dos potenciais de pico, anódicos e catódicos, sendo que foi observado uma variação de aproximadamente $\pm 8 \text{ mV}$ entre todas as medidas, mostrando que não houve uma influência significativa do método de preparo dos eletrodos nos valores de potenciais. Estes resultados estão de acordo com o que foi observado por Wang, et al.(1996) ⁴⁹ em que o pré-tratamento contribui para aumentar a reprodutibilidade da resposta de tais dispositivos.

Para corroborar com os resultados obtidos na voltametria cíclica, foram efetuados experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica. Na Figura 17 são apresentados os gráficos de Nyquist para os eletrodos contendo 5 mmol L^{-1} do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$.

Figura 17- Espectros de impedância eletroquímica obtidos para $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl para os eletrodos impressos. As medidas foram realizadas em potencial de circuito aberto (OCP), com um intervalo de frequência de 100 kHz a $0,1 \text{ Hz}$ e amplitude de 10 mV , para a superfície do eletrodo (a) sem e (b) com pré-tratamento eletroquímico.

Fonte: Autoria própria

Com os respectivos resultados foi possível fazer a simulação utilizando o circuito de Randles $R_s [(CPE[R_{ct}Z_w])$ com o software *free Eletrochemistry-Zview 2*. Os parâmetros obtidos por meio deste ajuste podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6-Parâmetros obtidos para os gráficos da Figura 17.

Superfície	OCP/ V	R _{tc} / Ω
Eletrodo sem tratamento	0,218	24141
Eletrodo com tratamento	0,219	2339

A partir dos gráficos de Nyquist e dos dados da Tabela 6, pode-se observar uma diminuição considerável do semicírculo após o pré-tratamento eletroquímico, ou seja, percebe-se uma diminuição na resistência à transferência de carga e na capacitância da superfície na qual foi efetuado o tratamento eletroquímico (2339 Ω) quando comparado ao eletrodo sem nenhum tipo de tratamento (24141 Ω).

Na figura 18 são apresentadas as imagens de MEV da superfície do eletrodo de trabalho na ausência de tratamento eletroquímico e após realização do procedimento.

Figura 18-Imagens de MEV com amplificação de 10000x para a superfície do eletrodo de trabalho (a) antes e (b) após o pré-tratamento eletroquímico.

Fonte: Autoria própria

Por meio das imagens de MEV percebe-se que não houve nenhuma alteração aparente na morfologia do eletrodo de trabalho, pois não é possível visualizar nenhuma diferença entre as imagens a e b. Logo estes resultados preliminares indicam que o pré-tratamento eletroquímico funcionalizou a superfície do carbono, propiciando uma melhora na cinética de transferência eletrônica. No entanto, são necessárias caracterizações adicionais que sejam capazes de evidenciar o aparecimento de grupos funcionais na superfície do eletrodo de carbono.

Com a finalidade de se obter informações sobre o efeito do pré-tratamento eletroquímico na quantificação do peróxido de hidrogênio, os eletrodos pré-tratados ou não foram modificados com o AP, conforme discutido no item 4.5.2 da metodologia experimental. Subsequentemente foram construídas curvas analíticas para ambos os eletrodos obtidos. Para isto, inicialmente realizou-se ensaios de voltametria cíclica nos eletrodos acima, em uma solução de tampão BR (pH =6) contendo 2 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio a 50 mV s^{-1} . A Figura 19, mostra estes voltamogramas coletados no 1 ciclo de varredura. Dos voltamogramas apresentados na Figura 19 observa-se que o peróxido de hidrogênio é reduzido em solução aquosa, em uma região de potenciais negativos iniciando-se em $-0,05 \text{ V}$, apresentando um corrente limite de difusão bem definida, a partir de $-0,1 \text{ V}$.

Figura 19- Voltamogramas cíclicos na (a) ausência e (b) presença de 2 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão BR (pH=6) para o eletrodo modificado com AP e na seta é indicado o potencial escolhido para a realização dos experimentos de cronoamperometria.

Fonte: Autoria própria

Posteriormente foram efetuados experimentos de cronoamperometria, no mesmo eletrólito usado na voltametria, aplicando-se -0,2V por 30s e coletando-se a corrente limite de difusão no tempo de 30 s, para cada concentração.

Na Figura 20, pode-se observar a relação entre a I_{ld} e a concentração para valores entre 0,25 a $10,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em uma solução de tampão BR (pH=6) para o eletrodo submetido às duas condições descritas anteriormente.

Figura 20-Curva analítica obtida por cronoamperometria, variando-se a concentração de H_2O_2 de $0,25$ a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, empregando eletrodos modificados com AP (a) sem e (b) com pré-tratamento eletroquímico.

Fonte: Autoria própria

Estes resultados podem ser descritos pelas seguintes equações da reta:

Eletrodo sem tratamento: $-I_{\text{ld}} = 3,14 \times 10^{-7} + 0,00321 C_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ mol L}^{-1}, r=0,999$

Eletrodo com tratamento: $-I_{\text{ld}} = 3,15 \times 10^{-7} + 0,00457 C_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ mol L}^{-1}, r=0,999$

Por meio, dos resultados obtidos percebe-se uma diferença considerável (40%) na inclinação da curva analítica para o eletrodo em que foi executado o pré-tratamento eletroquímico, ou seja, estes resultados mostram que a realização deste procedimento afeta o coeficiente angular das curvas analíticas e, portanto, o desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido.

Os resultados apresentados indicam que empregar o pré-tratamento eletroquímico modifica a superfície do eletrodo de trabalho promovendo uma melhora no desempenho do dispositivo confeccionado. Diante destes resultados preliminares o respectivo pré-tratamento

eletroquímico foi empregado antes da imobilização do azul da prússia para todas as medidas eletroquímicas.

5.5 Desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido para detecção de peróxido de hidrogênio

Inicialmente, foram realizados experimentos de voltametria cíclica na ausência e na presença 1,0–14,0 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio no eletrodo sem nenhuma modificação (SPE), a fim de se investigar seu desempenho eletroquímico para detecção do analito de interesse. Posteriormente foram efetuadas as mesmas medidas eletroquímicas para o eletrodo modificado com Nafion (SPE/Nafion) e AP disperso em Nafion (SPE/ Nafion /AP). Sendo que o AP foi disperso em Nafion (5%) para evitar a lixiviação dos nanocubos de azul da prússia da superfície eletródica.

Na Figura 21 podem ser observados experimentos de voltametria cíclica para (a) SPE (b) SPE/Nafion e (c) SPE/ Nafion /AP (d) comparação das curvas analíticas para esta faixa de concentração.

Figura 21-Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1,0-14,0 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio em tampão BR (pH=6) para (A) SPE; (B) SPE/Nafion e (C) SPE/Nafion/AP. E em (D) comparação entre as curvas analíticas obtidas para cada tipo de superfície no potencial de -0,25V.

Fonte: Autoria Própria

A partir dos resultados apresentados da Figura 21 a, percebe-se que não houve um aumento considerável da magnitude da corrente conforme se aumentava a concentração de peróxido de hidrogênio para esta região de potencial com o SPE. Com estes experimentos foi possível observar que o SPE não apresenta atividade na detecção do analito de interesse; sendo necessário modificar a superfície eletródica para melhorar seu desempenho eletroquímico. Deste modo, o AP mostrou-se uma alternativa interessante para modificação da superfície eletródica e detecção do peróxido de hidrogênio (proveniente de uma reação enzimática).

Através da Figura 21 b percebe-se que o SPE/ Nafion assim como o SPE não exibe uma boa sensibilidade para detecção de peróxido de hidrogênio. No entanto, ao se observar a Figura 21 c, onde são apresentados os mesmos experimentos para SPE/ Nafion/AP, percebe-se o aparecimento de uma corrente difusional referente ao processo de eletro-redução do peróxido de hidrogênio que pode descrito pela Equação química 4:

Equação Química 4- Reação de redução do peróxido de hidrogênio.

Fonte: Autoria Própria

Posteriormente, ao se comparar as curvas analíticas (Figura 20 d) é evidenciado que ao se modificar o eletrodo com o AP se obtêm uma faixa linear de 1,0 a 7,0 mmol L⁻¹, que pode ser descrita pela respectiva equação:

$$-I_{\text{ld}} = 5,60 \times 10^{-6} + 0,0060 C_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ mol L}^{-1} \quad r = 0,997$$

Portanto o AP confere uma maior sensibilidade para o sensor eletroquímico desenvolvido quando comparado ao SPE não modificado. Diante dos resultados preliminares utilizando a voltametria cíclica, a modificação da superfície eletródica com AP mostrou-se eficiente para detecção de H₂O₂.

Para corroborar com os resultados obtidos pelos experimentos de voltametria cíclica e com as curvas analíticas foram efetuadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Na Figura 22 são apresentados os gráficos de Nyquist para estas superfícies em presença de KCl (0,1 mol L⁻¹).

Figura 22-Espectros de impedância eletroquímica obtidos em 0,1 mol L⁻¹ de KCl, em potencial de circuito aberto, com um intervalo de frequência de 100kHz a 0,1Hz e amplitude de 10mV. (A) gráficos de Nyquist para o o SPE, SPE/Nafion e SPE/Nafion/AP; (B) plote de Nyquist para o SPE/Nafion e SPE/Nafion/AP com o fitting do SPE/Nafion/AP inserido neste gráfico.

Fonte: Autoria própria

Os parâmetros obtidos por meio deste ajuste podem ser observados na Tabela 7. Por meio destes resultados percebe-se uma diminuição considerável nos valores de R_{tc} , quando se compara o SPE, SPE/Nafion com o SPE/Nafion /AP. O que comprova que ao se incorporar o nanomaterial este facilita a transferência eletrônica conferindo um aumento da sensibilidade ao sensor eletroquímico desenvolvido.

Tabela 7-Parâmetros obtidos para os gráficos da Figura 22.

Superfície	OCP/ V	R_{tc} / Ω
SPE	0,174	$7,78 \times 10^6$
SPE/Nafion	0,373	183800
SPE/Nafion /AP	0,192	62

Fonte: Autoria Própria

Como anteriormente, na continuidade dos experimentos foram efetuadas medidas de cronoamperometria para construção das curvas analíticas. Com isto foram otimizadas as condições experimentais para realização dos experimentos de cronoamperometria, tais como o potencial utilizado para a polarização do eletrodo e o tempo de aquisição da corrente limite de difusão. Desta forma, os melhores parâmetros encontrados foram: potencial aplicado de -0,2 V e tempo de coleta de 30 s.

Na Figura 23, pode-se observar a relação entre a corrente limite de difusão e a concentração de peróxido de hidrogênio variando entre $0,25$ a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e na inserção do gráfico estão os registros de i vs tempo obtidos a partir das medidas de cronoamperometria.

Figura 23-Cronoamperogramas relacionados com o aumento da concentração de H_2O_2 de $0,25$ a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e curva analítica relacionada com o aumento da concentração empregando eletrodo com AP.

Fonte: Autoria própria

Ao se observar a curva analítica da Figura 23, percebe-se que o eletrodo modificado com AP, também exibe uma relação linear para a região de $0,25$ a $10,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de H_2O_2 . Portanto, é apresentado um aumento na magnitude da corrente conforme se aumenta a concentração do analito, que pode ser representado pela equação:

$$-I_{ld} = 4,48 \times 10^{-7} + 0,0045 C_{H_2O_2} \text{ mol L}^{-1} \text{ r} = 0,999, n = 3$$

Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram $4,42 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados mostram que o azul da prússia apresenta a capacidade de promover a eletro-redução do peróxido de hidrogênio, se mostrando uma alternativa promissora para detecção do peróxido de hidrogênio proveniente de uma reação de catálise enzimática.

5.6 Configuração do biossensor eletroquímico

5.6.1 Desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido para detecção de glicose

Inicialmente com o objetivo de verificar a resposta eletroquímica do sensor desenvolvido para detecção do peróxido de hidrogênio proveniente da catálise enzimática foram conduzidos experimentos com a glicose oxidase. Esta é uma enzima mais robusta e estável que a lactato oxidase, então os experimentos para otimização dos parâmetros foram efetuados com esta enzima. A glicose oxidase é responsável por catalisar a reação descrita na Equação química 5, no qual também é feita a detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio:

Equação Química 5-Processo enzimático de conversão da glicose em ácido glucônico envolvendo a glicose oxidase.

Fonte: Autoria Própria

O procedimento utilizado para a imobilização do elemento biológico é fundamental na construção do biossensor, pois pode afetar o desempenho eletroquímico do mesmo. Isto ocorre, pois enzimas são sensíveis a pequenas variações de pH, temperatura e força iônica, e quando imobilizadas adequadamente seus sítios ativos podem ser preservados fazendo com que estas

apresentem uma melhor eficiência catalítica ²⁸. Então na projeção do biossensor e para sua melhor performance é muito importante escolher o método de imobilização enzimática mais adequado. Existem vários métodos de imobilização, como: adsorção, encapsulamento, ligação cruzada e ligação covalente ²⁸. Aqui inicialmente foi utilizado o método de ligações covalentes cruzadas entre os resíduos de aminoácidos da enzima com o glutaraldeído ²⁸.

O eletrodo de trabalho contendo o AP foi modificado com 6 μL de uma solução 20 mg mL^{-1} de glicose oxidase e levado a geladeira por aproximadamente 5h. Subsequentemente ao eletrodo trabalho foi adicionado 6 μL de glutaraldeído 2,5% (v/v) que agiu por 12 h. Preliminarmente, as medidas eletroquímicas o biossensor para detecção de glicose (SPE/Nafion/AP/GOx-glutaraldeído) foi lavado com solução tampão para eliminar o glutaraldeído em excesso.

Na Figura 24 podem-se observar medidas de voltametria cíclica conduzidas em tampão BR, na presença e na ausência de 1,0-30,0 mmol L^{-1} de glicose e o gráfico de corrente vs concentração de glicose.

Figura 24- Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L^{-1} de glicose em tampão BR (pH=6) para o eletrodo SPE/Nafion/AP/GOx-glutaraldeído e a curva analítica obtida para esta superfície no potencial de -0,2V.

Fonte: Autoria Própria

A partir dos resultados apresentados na Figura 24 pode se observar que no eletrodo modificado com enzima e glutaraldeído houve uma perda substancial de área eletroativa que pode ser evidenciada pela diminuição da corrente de pico catódica e anódica do AP. A partir destes resultados também é possível observar um pequeno acréscimo de corrente que tem início no potencial de 0,05 V que pode ser atribuído à eletro-redução do peróxido de hidrogênio proveniente da reação de catálise enzimática. Com estes resultados pode se observar uma região linear de 10,0 – 30,0 mmol L⁻¹ onde pode ser ajustada a seguinte equação da reta:

$$-I_{ia} = 4,48 \times 10^{-7} + 2,30 \times 10^{-5} C_{\text{glicose}} \text{ mol L}^{-1} \text{ com } r = 0,996, n = 3$$

A partir destes resultados percebe-se que o biossensor eletroquímico produzido não apresentava um bom desempenho e reprodutibilidade para a detecção do analito de interesse. Diante de tais resultados foi necessário buscar outras alternativas para imobilização enzimática como: diminuição da quantidade de glutaraldeído, diminuição da porcentagem do mesmo, imobilização utilizando membranas como Nafion 0,25 % e 0,1 % . Contudo, estas alternativas não se mostraram promissoras não promovendo uma melhora significativa no desempenho do sensor.

Diante disso, optou-se por priorizar métodos baseados em ligação covalente entre a enzima e os grupos oxigenados presentes no papel, pois tal metodologia resultaria em uma ligação irreversível o que pode conferir uma maior estabilidade ao elemento biológico imobilizado no papel e liberar a área eletroativa para ocorrer a eletro-redução do peróxido de hidrogênio promovendo uma melhora no desempenho do sensor eletroquímico desenvolvido. Assim sendo foram utilizadas ligações covalentes com carbodiimidas ²⁸ um método amplamente utilizado na configuração de biossensores.

Para isto a celulose foi ativada com 6 μL de EDC/NHS (10 mmol L^{-1}) deixando a mesma agir por 45 min e posteriormente gotejou-se 6 μL de glicose oxidase 20 mg mL^{-1} no papel. Na Figura 25 é apresentado um esquema do biossensoriamento eletroquímico envolvido neste processo de imobilização.

Figura 25-Esquema da detecção de peróxido de hidrogênio proveniente da catálise enzimática no biossensor eletroquímico desenvolvido. O elemento biológico imobilizado no papel catalisa oxidação de glicose gerando peróxido como um dos produtos e este é eletro-reduzido pelo AP imobilizado na superfície eletródica.

Fonte: Autoria própria

A Figura 26 apresenta um experimento de voltametria cíclica, onde foi efetuada a imobilização enzimática na superfície eletródica e no papel. Através deste experimento percebe-se a perda da área eletroativa, evidenciada pela diminuição da área do pico catódico e anódico do AP, propiciada pelo bloqueio da superfície devido a imobilização enzimática na superfície do eletrodo de trabalho.

Figura 26– Voltametria cíclica em tampão BR (pH=6) com KCl (0,1 mol L⁻¹) para o SPE/Nafion/AP/GOx-glutaraldeído (imobilização na superfície eletródica) e SPE/Nafion/AP/GOx (imobilização no papel).

Fonte: Autoria Própria

Na Figura 27 são apresentados experimentos de voltametria cíclica e a curva analítica para a enzima imobilizada no papel, com estes resultados percebe-se que não houve uma melhora significativa no desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido ao se adotar esta estratégia de imobilização.

Figura 27- Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L⁻¹ de glicose em tampão BR (pH=6) para o eletrodo SPE/Nafion/AP/GOx (imobilização no papel sem nenhum tipo de tratamento prévio) e a curva analítica obtida para esta superfície no potencial de -0,2V na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L⁻¹.

Fonte: Autoria Própria

Como já se tem conhecimento as membranas de celulose, devido a suas interações intra-intermoleculares apresentam uma quantidade muito pequena de grupos funcionais disponíveis, para a conjugação de biomoléculas. O que pode ter sido um fator importante para não se ter uma imobilização eficiente da biomolécula no papel. Não propiciando uma melhora significativa nos resultados apresentados na Figura 27.

Diante disso, é muito importante adotar estratégias que promovam a formação de tais grupos para a posterior conjugação com biomoléculas. Dentre as existentes, a oxidação da celulose a 2,3-dialdeído celulose utilizando meta-periodato de sódio é uma interessante alternativa, pois após este processo a enzima pode ser imobilizada diretamente no papel com posterior redução a amina secundária ou ser modificada com EDC/NHS sofrendo uma posterior reação de transesterificação com a enzima.

Com isto foi realizado o processo de oxidação da celulose bacteriana utilizando o meta-periodato de sódio descrito no item 4.6. Com o objetivo de verificar se o processo de oxidação foi eficiente foi efetuado um teste qualitativo para identificação de aldeídos utilizando a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNP). Na Figura 28 pode ser observado este teste colorimétrico do papel (a) não tratado; (b) celulose oxidada em presença de 2,4-dinitrofenilhidrazina. No qual no papel funcionalizado foi evidenciado uma coloração amarelo intensa, que indica a formação de 2,4-dinitrofenilhidrazona, e o papel não tratado permanece com um amarelo fraco. E na Figura 28 (c) observa-se a reação química envolvida neste teste.

Figura 28-Caracterização do papel funcionalizado com aldeído usando 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNP). (a) papel não tratado (b) papel funcionalizado com aldeído em presença da 4-dinitrofenilhidrazina (c) Esquema da reação química do 2,4-DNP com uma porção aldeído do papel funcionalizado.

Fonte: Autoria própria

Com a finalidade de averiguar se o processo oxidativo não havia alterado a morfologia das fibras foram obtidas imagens de MEV para a celulose bacteriana não tratada e tratada com meta-periodato de sódio. Na Figura 29 percebe-se que este processo foi brando não alterando a morfologia das fibras nanométricas da celulose ou propiciando o aparecimento de defeitos.

Figura 29-Imagens de MEV com amplificação de 50000x para a celulose bacteriana (a) não tratada e (b) tratada com meta-periodato de sódio.

Fonte: Autoria Própria

Mediante a estes resultados percebe-se que o processo de oxidação foi satisfatório promovendo a formação de aldeídos na superfície que podem ser utilizados para incorporação da biomolécula.

A fim de verificar se a enzima permanecia ligada nas membranas de celulose oxidada foi efetuado um teste qualitativo utilizando o *Coomassie blue*. Este método se baseia na interação do *Coomassie* com resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos presentes em proteínas. O *Coomassie* ao se ligar estes resíduos de aminoácidos adquire uma forma mais estável, que absorve fortemente em 595 nm ⁵⁰. Assim sendo, foram efetuados testes colorimétricos na ausência e presença de enzima imobilizada na superfície do papel (Figura 30).

Figura 30- Teste colorimétrico com o *coomassie bue* na (a) ausência e (b) presença de enzima imobilizada no papel.

Fonte: Autoria Própria

A partir da Figura 30 (b) percebe-se uma região com uma coloração azul mais intenso em presença do *Coomassie blue* na área em que foi gotejada a enzima. Tal fenômeno não foi observado na Figura 30 (a) na ausência da proteína. O que indica que mesmo após sucessivas lavagens a glicose oxidase permanece ligada na superfície da membrana. Logo, a imobilização enzimática na membrana de celulose bacteriana se mostrou satisfatória, sendo possível dar continuidade a confecção dos dispositivos eletroquímicos.

Diante de tais resultados, foi feita a fabricação dos dispositivos eletroquímicos como descrito no item 4.4 com posterior modificação da superfície eletródica com AP descrito no item 4.5.2. Para a imobilização da enzima no papel, foram aplicados 6 μL de EDC/NHS a 10 mmol L^{-1} sobre sua superfície, deixando a mesma agir por 45 min, com posterior imobilização de 6 μL (20 mg mL^{-1}) de glicose oxidase.

Na Figura 31 podem ser observados os experimentos de voltametria cíclica com a imobilização enzimática na celulose tratada em presença de 1,0-30 mmol L^{-1} ; além da curva analítica.

Figura 31- Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L^{-1} de glicose em tampão BR (pH=6) para o eletrodo SPE/Nafion/AP/GOx (imobilização na celulose oxidada) e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração para esta superfície no potencial de -0,2V.

Fonte: Autoria Própria

Por meio dos resultados da Figura 31, pode-se observar uma melhora significativa na repetibilidade e desempenho do sensor eletroquímico desenvolvido com relação às demais condições o que indica que a imobilização da biomolécula foi eficiente. O sensor eletroquímico apresentou uma região linear de 1,0-30,0 mmol L⁻¹ que pode ser ajustada a respectiva equação da reta:

$$-I_{id} = 4,67 \times 10^{-8} + 9,60 \times 10^{-5} C_{glicose} \text{ mol L}^{-1} \text{ com } r = 0,999, n = 3$$

Com os resultados obtidos foi possível calcular os limites de detecção e de quantificação para o biossensor produzido. Os valores encontrados foram $9,28 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,09 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. Na Figura 32 é apresentada a comparação entre as curvas analíticas da celulose oxidada e não oxidada estes resultados mostram uma melhora significativa na performance sensor eletroquímico desenvolvido.

Figura 32- Comparação entre as curvas analíticas obtidas para a imobilização da biomolécula na celulose não tratada e tratada na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L⁻¹ de glicose em tampão BR (pH=6).

Fonte: Autoria Própria

A Figura 33 apresenta a curva analítica para a faixa de concentração de glicose de 1,0 – 30,0 mmol L⁻¹ para o eletrodo modificado com AP na ausência da glicose oxidase. A partir destes resultados percebe-se que o eletrodo modificado apenas com AP não exibe qualquer resposta eletroquímica para a detecção de glicose. Este resultado confirma que o aumento da corrente catódica observada nos voltamogramas cíclicos, onde foi efetuada imobilização enzimática são referentes à eletro-redução do peróxido de hidrogênio oriundo da catálise enzimática.

Figura 33-Curva analítica em presença de 1,0-30,0 mmol L⁻¹ de glicose obtida em tampão BR (pH=6) no SPE/Nafion/AP sem a imobilização da glicose oxidase.

Fonte: Autoria própria

A imobilização direta da glicose oxidase na superfície da celulose oxidada se mostrou eficiente produzindo uma melhora significativa na reprodutibilidade e no desempenho do sensor eletroquímico para a detecção de glicose. Assim sendo, foi adotada este método e parâmetros experimentais para a imobilização da lactato oxidase para dar continuidade ao respectivo trabalho.

5.6.2 Desempenho eletroquímico do sensor desenvolvido para detecção lactato em suor sintético

Com o objetivo de verificar se o eletrodo impresso modificado com AP apresentava uma boa durabilidade e resistência, quando submetido a deformações por movimentos contínuos, sem lixiviação do nanomaterial ou danificação do dispositivo, foram efetuados testes de flexão. Como o biossensor para lactato deve ser usado para o monitoramento no suor em tempo real, tal dispositivo será sujeito a deformações constantes devido à realização de atividades físicas. Para o desenvolvimento deste teste foram efetuados 15 ciclos de flexão, exibido na Figura 34, aplicando uma força constante com posterior monitoramento da corrente catódica de redução

do AP, por meio de experimentos de voltametria cíclica em tampão BR pH=6. Na Figura 34 podem ser observados os resultados do respectivo experimento.

Figura 34-Medidas efetuadas em tampão BR (pH=6) por meio de experimentos de voltametria cíclica nos quais foram monitorados os valores de corrente de pico catódica, continuamente (15 ciclos de flexão).

Fonte: Autoria própria

A partir da Figura 34 percebe-se que o eletrodo modificado com AP apresentou uma boa estabilidade e durabilidade com relação a movimentos contínuos não sendo observadas mudanças significativas no i_{pc} ao se realizar mais de 100 ciclos de flexão. O que indica que o sensor desenvolvido apresenta uma boa resistência e viabilidade para aplicação sobre a pele.

Dando continuidade a este trabalho, para o desenvolvimento do biossensor eletroquímico para detecção de lactato foram empregados os eletrodos confeccionados com a celulose oxidada (com meta-periodato de sódio) e efetuada a imobilização enzimática seguindo o procedimento descrito no item 4.7.2 Todos os experimentos conduzidos com ácido láctico foram realizados com suor sintético preparado de acordo com Campos et, al., (2018) ⁵¹.

Inicialmente, foram realizados experimentos de voltametria cíclica na ausência e na presença 1,0–30,0 mmol L⁻¹ de ácido láctico no eletrodo sem nenhuma modificação (SPE), com o objetivo de investigar seu desempenho eletroquímico na detecção do analito de interesse. Na Figura 35 pode-se observar os experimentos de voltametria cíclica para o SPE e a curva analítica para esta faixa de concentração.

Figura 35- Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1-30,0 mmol L⁻¹ de ácido láctico no suor sintético (pH=6) para o SPE e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração no potencial de -0,2V.

Fonte: Autoria Própria

Por meio dos resultados apresentados da Figura 35, é possível observar que não houve um aumento da magnitude da corrente conforme se aumentava a concentração de ácido láctico para esta região de potencial com o SPE. A partir destes experimentos percebe-se que o eletrodo sem modificação não é eficiente para detecção do analito de interesse.

Posteriormente foram efetuados experimentos de voltametria cíclica em presença e na ausência de 1,0-30,0 mmol L⁻¹ de ácido láctico para o eletrodo modificado com AP com objetivo de verificar se o eletrodo modificado com o nanomaterial exibia alguma resposta eletroquímica para a detecção do analito de interesse. Na Figura 36 podem ser observados os respectivos experimentos.

Figura 36-Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L⁻¹ de ácido láctico no suor sintético (pH=6) para o SPE/Nafion/AP e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração no potencial de -0,2V.

Fonte: Autoria própria

A partir da Figura 36 percebe-se que o SPE/Nafion/AP não exibe qualquer aumento na magnitude da corrente quando se aumenta a concentração de ácido láctico. Ou seja, o eletrodo modificado com AP também não é eficiente para detecção do lactato em amostras de suor. Sendo necessário incorporar o elemento biológico para desenvolver o biossensor eletroquímico.

Assim sendo, o eletrodo foi modificado com o AP e, a seguir, na superfície do papel foram gotejados 6 μL de EDC/NHS 10 mmol L^{-1} , que foi deixado em repouso por um período de 45 min. Na próxima etapa, 10 μL de lactato oxidase (4 U) foram gotejados nesta superfície e o biossensor foi armazenado na geladeira por 12h. Na Figura 37 podem ser observados experimentos de voltametria cíclica em presença e na ausência de 1-30,0 mmol L^{-1} de ácido láctico em suor sintético, e a curva analítica para esta faixa de concentração .

Figura 37-Voltamogramas cíclicos na ausência e presença de 1,0-30,0 mmol L⁻¹ de ácido láctico no suor sintético (pH=6) para o SPE/Nafion/AP/LOx e a curva analítica obtida neste intervalo de concentração para o potencial de -0,2V.

Fonte: Autoria própria

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 37 mostram um aumento na magnitude de corrente ao se aumentar a concentração indicando uma relação linear entre sinal analítico e a concentração de ácido láctico. Esta resposta, entretando, é condicionada à presença da enzima na superfície do eletrodo, não sendo evidenciada nas demais condições (Figuras 35 e 36). Tais resultados podem ser descritos pela respectiva equação da reta:

$$-I_{ld} = 2,60 \times 10^{-6} + 4,1 \times 10^{-5} C_{\text{lactato}} \text{ mol L}^{-1} \text{ com } r = 0,999, n=3$$

A partir desta relação linear, obtém-se os limites de detecção e de quantificação como sendo $1,31 \times 10^{-3}$ e $4,38 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. Além disso, o sensor desenvolvido apresentou uma região linear entre 1,0 e 24,0 mmol L⁻¹. Tais parâmetros analíticos se mostraram adequados para a aplicação do biossensor produzido, pois no suor como mencionado neste trabalho apresenta uma concentração elevada de lactato podendo atingir 25,0 mmol L⁻¹. Assim, considera-se que o biossensor desenvolvido neste trabalho pode ser apropriado para aplicação direta na pele e monitoramento da concentração de lactato produzido no suor durante o exercício físico.

6 CONCLUSÃO

Os ensaios preliminares conduzidos com a celulose bacteriana mostraram que este material é promissor para fabricação de dispositivos eletroquímicos vestíveis, devido sua elevada resistência mecânica quando comparado ao papel cromatográfico. A rigidez superior apresentada pela celulose bacteriana quando molhada mostrou ser um fator de destaque em relação aos demais tipos de papéis, o que poderá conferir maior robustez ao sistema.

A impressão dos eletrodos na celulose bacteriana se mostrou adequada e favorável para futuras aplicações em sensoriamento. O pré-tratamento eletroquímico realizado demonstrou influenciar o desempenho eletroquímico do dispositivo, sendo fundamental para garantir maior sensibilidade ao sistema.

Além disso foi possível, desenvolver um sensor eletroquímico para detecção de peróxido de hidrogênio a partir da incorporação de nanocubos de azul da Prússia na superfície eletródica. O sensor eletroquímico desenvolvido apresentou LOD e LOQ $4,42 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Mostrando-se viável para a detecção de peróxido de hidrogênio proveniente da catálise enzimática.

A configuração do biossensor eletroquímico para detecção de glicose foi efetuada a partir da imobilização da enzima na superfície do papel. Ao adotar esta estratégia de imobilização foi observada uma melhora significativa no desempenho analítico do sensor eletroquímico desenvolvido. Sendo possível obter LOD e LOQ $9,28 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,09 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.

Finalmente o biossensor eletroquímico para o monitoramento de lactato apresentou LOD e LOQ de $1,31 \times 10^{-3}$ e $4,38 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Mostrando-se viável para a detecção de lactato em amostras de suor em uma região de 1,0- 24,0 mmol L⁻¹.

De maneira geral o dispositivo eletroquímico desenvolvido no substrato de celulose bacteriana, apresentou uma boa resistência à deformação, durabilidade e estabilidade ao serem efetuadas as medidas eletroquímicas, sendo possível desenvolver um sensor eletroquímico para a detecção de peróxido, com posterior incorporação do elemento biológico e desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a detecção de glicose e lactato.

7 PERSPECTIVAS

As etapas futuras se baseiam:

- Estratégias para melhorar o desempenho analítico do sensor baseado em celulose para que o mesmo possa vir a ser aplicado em amostras reais de suor;
- Análise de interferentes dado que o suor apresenta muitos interferentes eletroativos que podem ser um problema para a detecção eletroquímica;
- Otimizar parâmetros experimentais para realizar a detecção eletroquímica diretamente na pele;
- Aplicação da celulose bacteriana diretamente na pele para o monitoramento de espécies de interesse biológico como lactato, glicose e etc.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 563p.

2 ALAM, F.; ROYCHOUDHURY, S.; JALAL, A. H.; et al. Lactate biosensing: The emerging point-of-care and personal health monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 818–829, 2018.

3 KONDOH, Y.; KAWASE, M.; OHMORI, S. D-Lactate concentrations in blood, urine and sweat before and after exercise. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 65, p. 88–93, 1992.

4 TUR-GARCÍA, Eva L. et al. Novel flexible enzyme laminate-based sensor for analysis of lactate in sweat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 242, p. 502-510, 2017.

5 GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. Blood lactate during exercise: Time course of training adaptation in humans. **International Journal of Sports Medicine**, v. 9, n. 4, p. 284–288, 1988.

6 ZARYANOV, N. V.; NIKITINA, V. N.; KARPOVA, E. V.; KARYAKINA, E. E.; KARYAKIN, A. A. Nonenzymatic sensor for lactate detection in human sweat. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 21, p. 11198–11202, 2017.

7 SILVA, C. C.; GOLDBERG, T. B. L.; CAPELA, R. C.; et al. Respostas agudas pós-exercício dos níveis de lactato sanguíneo e creatinofosfoquinase de atletas adolescentes. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 6, p. 381–386, 2007.

8 BIAGI, S.; GHIMENTI, S.; ONOR, M.; BRAMANTI, E. Simultaneous determination of lactate and pyruvate in human sweat using reversed-phase high-performance liquid chromatography: A noninvasive approach. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 11, p. 1408–1415, 2012.

9 SHAW, J. L. V. Practical challenges related to point of care testing. **Practical Laboratory Medicine**, v. 4, p. 22–29, 2016.

- 10 BONAVENTURA, J. M.; SHARPE, K.; KNIGHT, E.; et al. Reliability and accuracy of six hand-held blood lactate analysers. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 14, n. 1, p. 203–214, 2014.
- 11 ONOR, M.; GUFONI, S.; LOMONACO, T.; et al. Potentiometric sensor for non invasive lactate determination in human sweat. **Analytica Chimica Acta**, v. 989, p. 80–87, 2017.
- 12 PETROPOULOS, K.; PIERMARINI, S.; BERNARDINI, S.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Development of a disposable biosensor for lactate monitoring in saliva. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 237, p. 8–15, 2016.
- 13 JIA, W.; BANDODKAR, A. J.; VALDÉS-RAMÍREZ, G.; et al. Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 14, p. 6553–6560, 2013.
- 14 JOZALA, A. F.; DE LENCASTRE-NOVAES, L. C.; LOPES, A. M.; et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2063–2072, 2016.
- 15 MACHADO, R. T. A.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; et al. Komagataeibacter rhaeticus as an alternative bacteria for cellulose production. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 841–849, 2016.
- 16 SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.
- 17 TORRES, F. G.; TRONCOSO, O. P.; LOPEZ, D.; GRANDE, C.; GOMEZ, C. M. Reversible stress softening and stress recovery of cellulose networks. **Soft Matter**, v. 5, n. 21, p. 4185, 2009.
- 18 BROWN, J. XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, v. 127, p. 1 - 3088, 1925
- 19 PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose from glucanacetobacter xylinus: Preparation, properties and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 369–383, 2008.

20 DONINI, Í. A. N.; DE SALVI, D. T. B.; FUKUMOTO, F. K.; et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

21 LIMA, Lais R. et al. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Química Nova**, v.38, p. 1140-1147, 2015.

22 KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, p. 3358–3393, 2005.

23 RUAN, C.; ZHU, Y.; ZHOU, X.; et al. Effect of cellulose crystallinity on bacterial cellulose assembly. **Cellulose**, v. 23, p. 3417–3427, 2016.

24 ABITBOL, T.; RIVKIN, A.; CAO, Y.; et al. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 39, p. 76–88, 2016.

25 CAO, L.; FANG, C.; ZENG, R.; et al. Paper-b microfluidic devices for electrochemical immunofiltration analysis of human chorionic gonadotropinase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 87–94, 2017.

26 SCALA-BENUZZI, M. L.; RABA, J.; SOLER-ILLIA, G. J. A. A.; SCHNEIDER, R. J.; MESSINA, G. A. Novel Electrochemical Paper-Based Immunocapture Assay for the Quantitative Determination of Ethinylestradiol in Water Samples. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 4104–4111, 2018.

27 MORBIOLI, Giorgio Gianini. **Funcionalização de celulose para ensaios bioanalíticos em dispositivos microfluídicos baseados em papel (μPADs)**. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

28 SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

29 BARROSO, T.; TEMTEM, M.; HUSSAIN, A.; AGUIAR-RICARDO, A.; ROQUE, A. C. A. Preparation and characterization of a cellulose affinity membrane for human immunoglobulin G (IgG) purification. **Journal of Membrane Science**, v. 348, n. 1–2, p.

224–230, 2010.

30 HOU, A.; ZHOU, M.; WANG, X. Preparation and characterization of durable antibacterial cellulose biomaterials modified with triazine derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 328–332, 2009.

31 STÖLLNER, D.; SCHELLER, F. W.; WARSINKE, A. Activation of cellulose membranes with 1,1'-carbonyldiimidazole or 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate as a basis for the development of immunosensors. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 2, p. 157–165, 2002.

32 VARMA, A. J.; KULKARNI, M. P. Oxidation of cellulose under controlled conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 77, n. 1, p. 25–27, 2002.

33 FILHO, O. F.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química nova**, 1992. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_\(6\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_(6).pdf)>.92).

34 HERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, N.; GARCÍA-CRUZ, L.; MONTIEL, V.; et al. Electrochemical lactate biosensor based upon chitosan/carbon nanotubes modified screen-printed graphite electrodes for the determination of lactate in embryonic cell cultures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 1168–1174, 2016. Elsevier B.V.

35 LAMAS-ARDISANA, P. J.; LOAIZA, O. A.; AÑORGA, L.; et al. Disposable amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilised on platinum nanoparticle-decorated carbon nanofiber and poly(diallyldimethylammonium chloride) films. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 345–351, 2014.

36 LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. A biosensor based on immobilization of lactate oxidase in a PB-CTAB film for FIA determination of lactate in beer samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 637–642, 2008.

37 REVENGA-PARRA, M.; MARTÍNEZ-PERINÁN, E.; MORENO, B.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. Rapid taurine and lactate biomarkers determination with disposable electrochemical detectors. **Electrochimica Acta**, v. 240, p. 506–513, 2017.

38 ZHAI, J.; ZHAI, Y.; WEN, D.; DONG, S. Prussian blue/multiwalled carbon nanotube hybrids: Synthesis, assembly and electrochemical behavior. **Electroanalysis**, v. 21, n. 20, p.

2207–2212, 2009.

39 ATTOS, I. L. D. M.; ORTON, L. G.; UZGAS, T. R.; et al. Sensor for Hydrogen Peroxide Based on Prussian Blue Modified Electrode : Improvement of the Operational Stability. **Analytical Sciences**, v. 16, n. August, p. 795–798, 2000.

40 LI, Y.; LIU, X.; ZENG, X.; et al. Nonenzymatic hydrogen peroxide sensor based on a Prussian Blue-modified carbon ionic liquid electrode. **Microchimica Acta**, v. 165, n. 3–4, p. 393–398, 2009.

41 PCHELINTSEV, N. A.; VAKUROV, A.; MILLNER, P. A. Simultaneous deposition of Prussian Blue and creation of an electrostatic surface for rapid biosensor construction. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 138, n. 2, p. 461–466, 2009.

42 LOWINSOHN, D. **Desenvolvimento de um sensor para análise de lactato em amostras alimentares e biológicas**. Tese (doutorado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

43 ZHANG, Y.; SUN, X.; ZHU, L.; SHEN, H.; JIA, N. Electrochemical sensing based on graphene oxide/Prussian blue hybrid film modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 3, p. 1239–1245, 2011.

44 CAO, L.; LIU, Y.; ZHANG, B.; LU, L. In situ controllable growth of Prussian blue nanocubes on reduced graphene oxide: Facile synthesis and their application as enhanced nanoelectrocatalyst for H₂O₂ reduction. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 8, p. 2339–2346, 2010.

45 Screen-Printed Electrode Information. Document # DRP 10036. Grove City, 2016. Disponível em :<<https://www.pireneresarch.com/shop/documentation-index/>>. Acesso em :05 mar. 2018.

46 CHEN, S.; WAN, Q.; BADU-TAWIAH, A. K. Mass Spectrometry for Paper-Based Immunoassays: Toward On-Demand Diagnosis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 20, p. 6356–6359, 2016.

47 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Chemometrics for Analytical Chemistry**. 50. ed. Pearson, 2005.

48 PERKINELMER INC. Dynamic Mechanical Analysis (DMA) - A Beginner's Guide. **Introduction to DMA**, p. 1–23, 2008.

49 WANG, J., PEDRERO, M. & SAKSLUND, H. Electrochemical activation of screen-printed carbon strips. **Analyst**, v.121, p.345–350, 1996 .

50 LUND, L.; RASMUSSEN, H. H. Inguinal herniotomies. Results of 888 herniotomies done by various surgical methods. **Ugeskrift for Laeger**, v. 149, n. 9, p. 787–793, 1987.

51 CAMPOS, A. M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; MENDONÇA, C. D.; et al. Size Control of Carbon Spherical Shells for Sensitive Detection of Paracetamol in Sweat, Saliva, and Urine. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 2, p. 654–661, 2018.