

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

JOÃO PAULO DE CAMPOS DA COSTA

Plataforma laboratorial portátil e biossensores eletroquímicos aplicados no  
imunodiagnóstico do vírus da hepatite C.

São Carlos

2018



JOÃO PAULO DE CAMPOS DA COSTA

Plataforma laboratorial portátil e biossensores eletroquímicos aplicados no imunodiagnóstico do vírus da hepatite C.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica.

Área de Concentração: Processamento de Sinais e Instrumentação

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Pereira do Carmo.

Trata-se da versão corrigida da dissertação. A versão original encontra disponível na EESC/USP que aloja o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Elétrica.

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

C837p Costa, João Paulo de Campos da  
Plataforma laboratorial portátil e biossensores eletroquímicos aplicados no imunodiagnóstico do vírus da hepatite C / João Paulo de Campos da Costa; orientador João Paulo Pereira do Carmo. São Carlos, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Área de Concentração em Processamento de Sinais e Instrumentação -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Diagnóstico precoce. 2. biossensores eletroquímicos. 3. plataforma laboratorial portátil. 4. hepatite C. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

## FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **JOÃO PAULO DE CAMPOS DA COSTA**.

Título da dissertação: "Plataforma laboratorial portátil e biossensores eletroquímicos aplicados no imunodiagnóstico do vírus da Hepatite C".

Data da defesa: 22/06/2018.

### Comissão Julgadora:

### Resultado:

Prof. Dr. **João Paulo Pereira do Carmo**  
**(Orientador)**  
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Profa. Dra. **Maria Aparecida Zaghete Bertochi**  
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP –  
Araraquara)

APROVADO

Dr. **Wagner Benício Bastos**  
(Pós-Doutorando/FAPESP)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica:  
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**



*Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Raquel por estarem sempre ao meu lado me incentivando e dando forças para a realização dos meus sonhos, pelo amor e carinho e o exemplo de vida a seguir. Aos meus irmãos, Mariana, Gabriel e Ana Carolina, pelo companheirismo, amor, carinho e amizade. À Danielle, por seu grande amor, carinho, compreensão, companheirismo e incentivo, por todos os momentos juntos, sempre acreditando e me encorajando a realizar meus sonhos.*





## AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar, me dar forças para superar as dificuldades, e conhecimento e sabedoria para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. João Paulo Pereira do Carmo, por confiar em mim e contribuir com seus conhecimentos na realização deste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Zaghete e ao Dr. Wagner Benício Bastos, por compartilharem seus conhecimentos e exporem suas críticas para o crescimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Inácio da Costa pelo suporte e conhecimento que contribuíram para o desenvolvimento do imunossensor.

Ao professor Dr. Elson Longo pelo incentivo à pesquisa, suporte e amizade que muito colaborou para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Achilles, Augusto, Rodrigo G, Fabricio e Mateus, Talita, pela amizade, apoio, alegria e solidariedade.

Aos professores do programa de pós-graduação em Engenharia Elétrica, pela formação.

A todos os laboratórios que disponibilizaram as facilidades para realização deste projeto: Grupo Metamaterials, do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade de São Carlos (EESC) – USP, o Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais – CDMF, UFSCar, o Instituto de Química de Araraquara (IQ) e o Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular – LICBM do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara.

A todos aqueles que me apoiaram e colaboraram para realização deste trabalho.

Por fim, agradeço à agência FAPESP pelo apoio financeiro.



*“O homem científico não almeja resultados imediatos. Ele não espera que suas ideias mais avançadas sejam rapidamente retomadas. Seu trabalho é como o de um agricultor para o futuro. Seu dever é estabelecer bases para aqueles que estão por vir e apontar o caminho a ser seguido.”*

*Nikola Tesla*

## RESUMO

Costa, J.P.C. **Plataforma laboratorial portátil e biossensores eletroquímicos aplicados no imunodiagnóstico do vírus da hepatite C**. 104p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A hepatite C é uma doença caracterizada pela inflamação do fígado, decorrente da infecção viral pelo VHC, e uma das maiores epidemias virais da humanidade. Atualmente o diagnóstico e tratamento da doença possui um elevado custo para o sistema público de saúde, sendo a principal causa de transplante de fígado em todo o mundo. Por este motivo, é incentivado o desenvolvimento de diagnósticos para a detecção nas fases iniciais da infecção, que possam auxiliar no tratamento e até mesmo na cura da doença. Os biossensores baseados em métodos eletroquímicos de detecção vem se destacando na área de diagnóstico devido às suas características de maior estabilidade e sensibilidade, e um baixo custo de fabricação e miniaturização. O presente trabalho relata o desenvolvimento de uma plataforma laboratorial portátil com biossensores eletroquímicos amperométricos. Aproveitando o conhecimento prévio de técnicas de fabricação (*silkscreen*, *sputtering* e placa de circuito impresso), otimizou-se o projeto e respectivo fabrico de biossensores específicos para aplicação nesta plataforma laboratorial. No âmbito do desenvolvimento deste projeto, o interesse foi definir os processos mais adequados à produção em larga escala de biossensores e validar a plataforma em comparação com equipamentos comerciais para a sua aplicação em um teste imunodiagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C. Os resultados obtidos mostraram que a técnica de placa de circuito impresso apresentou melhores vantagens em comparação com as técnicas de *sputtering* e *silkscreen* além de permitir uma fácil integração com a plataforma laboratorial portátil. A plataforma de laboratório portátil desenvolvida inclui uma unidade microcontrolada responsável pelo controle e transferência de dados das reações eletroquímicas, um módulo Bluetooth para transmissão de dados para dispositivos móveis e uma interface potenciostática. O sistema desenvolvido mostrou-se adequado para uso em testes eletroquímicos e aplicação no imunodiagnóstico da hepatite C.

Palavras chave: Diagnóstico precoce, biossensores eletroquímicos, plataforma laboratorial portátil, hepatite C.



## ABSTRACT

Costa, J.P.C. **Portable laboratory platform and electrochemical biosensors applied in the immunodiagnostic of hepatitis C virus**. 104p. Dissertation (Master in Engineering) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2018

Hepatitis C is a disease characterized by inflammation of the liver resulting from viral infection by HCV and one of the largest viral epidemics in mankind. Currently the diagnosis and treatment of the disease has a high cost for the public health system, being the main cause of liver transplantation worldwide. For this reason, it is encouraged the development of diagnostics for detection in the early stages of infection, which may aid in the treatment and even cure of the disease. Biosensors based on electrochemical detection methods have been prominent in the diagnostic area due to their characteristics of greater stability and sensitivity, and a low manufacturing and miniaturization cost. The present work reports the development of a portable laboratory platform with electrochemical amperometric biosensors. Taking advantage of the prior knowledge of manufacturing techniques (silkscreen, sputtering and printed circuit board), the design and respective manufacture of specific biosensors for application in this laboratory platform was optimized. In the development of this project, the interest was to define the most appropriate processes for the large-scale production of biosensors and to validate the platform in comparison with commercial equipment for its application in an immunodiagnostic test of the hepatitis C virus infection. The results obtained showed that the printed circuit board technique presented better advantages compared to the sputtering and silkscreen techniques in addition to allowing easy integration with the portable laboratory platform. The portable laboratory platform developed includes a microcontroller unit responsible for controlling and transferring electrochemical reactions data, a Bluetooth module for data transmission to mobile devices and a potentiostatic interface. The developed system proved to be suitable for use in electrochemical tests and immunodiagnostic application of hepatitis C.

Keywords: Early diagnosis, electrochemical biosensors, portable laboratory platform, hepatitis C



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição epidemiológica da infecção pelo vírus da hepatite C.....	28
Figura 2 - Evolução dos biossensores eletroquímicos amperométricos aplicados no diagnóstico do VHC em relação a outros tipos de doenças (publicações entre 2000 - 2016 Scopus).....	30
Figura 3 - Diagrama esquemático de um biossensor e o sistema de reconhecimento.....	33
Figura 4 - Classificação dos tipos de receptores bioquímicos utilizados no desenvolvimento de biossensores .....	33
Figura 5 - Classificação dos tipos de sistemas de transdução utilizados no desenvolvimento de biossensores. ....	35
Figura 6 - Representação de uma célula eletroquímica (a) de dois eletrodos; (b) de três eletrodos. ....	38
Figura 7 - Biossensores eletroquímicos mais utilizados para diagnóstico de doenças (publicações entre 2000 - 2016 Scopus).....	39
Figura 8 - Processo de voltametria cíclica (a) potencial em forma de onda triangular aplicado ao estudo eletroquímico (b) voltamograma cíclico de uma reação eletroquímica. ....	44
Figura 9 - Amplificador operacional: (a) Esquema elétrico de um amplificador operacional; Saturação da saída do amplificador operacional. ....	47
Figura 10 - Amplificador operacional operando no modo inversor. ....	47
Figura 11 - Amplificador operacional operando no modo não inversor. ....	49
Figura 12 - Amplificador operacional operando no modo seguidor de tensão. ....	49
Figura 13 - Amplificador operacional operando no modo conversor corrente-tensão. ....	50
Figura 14 - Esquema elétrico de um circuito potenciostático de uma célula eletroquímica constituída de três eletrodos (EA, ET e ER).....	51
Figura 15 - Células eletroquímicas (a) convencional de três eletrodos, (b) impressa contendo os três eletrodos EA, ET e ER. ....	51
Figura 16 - Processo de confecção de sensores pelo método de “screen-printing”. ....	52
Figura 17 - Processo de deposição por Sputtering .....	54
Figura 18 - Processo de fabricação de circuitos pela tecnologia de PCI.....	55
Figura 19 - Suporte de alumínio (a) projetado e (b) confeccionado para a conexão dos sensores eletroquímicos desenvolvidos .....	58



Figura 20 - Projeto e confecção dos sensores por Sputtering: (a) esboço do sensor projetado por software de desenho vetorial; (b) imagem real do sensor desenvolvido por Sputtering. ....	59
Figura 21 - Sistema de deposição física a vapor: (a) Sputtering Denton Vacuum, (b) Canhões magnetron Sputtering RF e DC. ....	60
Figura 22 - Diagrama referente ao processo de limpeza e deposição dos substratos por Sputtering dos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência. ....	60
Figura 23 - Deposição dos eletrodos por Sputtering: (a) eletrodos de trabalho e auxiliar (Au); (b) eletrodo de referência (Ag). ....	61
Figura 24 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol.L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> em 0,1 mol. L <sup>-1</sup> de PBS para os sensores desenvolvidos pela tecnologia de filmes finos – Sputtering (área do eletrodo de trabalho: 4mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 600 mV, potencial mínimo de - 200 mV e velocidade de varredura de 100 mV.s <sup>-1</sup> . ....	62
Figura 25 - Projeto e confecção dos sensores por PCI: (a) esboço do sensor PCI projetado por software ECAD; (b) imagem real do sensor desenvolvido por PCI. ....	63
Figura 26 - Diagrama referente ao processo de limpeza e deposição por Electroplating dos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência.....	64
Figura 27 - Modificação dos eletrodos por Electroplating: (a) Sistema de deposição por electroplating; (b) deposição dos eletrodos de referência, trabalho e auxiliar. ....	64
Figura 28 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol.L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> em 0,1 mol. L <sup>-1</sup> de PBS para os sensores desenvolvidos pela tecnologia de placa de circuito impresso – PCI (área do eletrodo de trabalho: 4mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 600 mV, potencial mínimo de -200 mV e velocidade de varredura de 100 mV.s <sup>-1</sup> . ....	65
Figura 29 - Sensores impressos comerciais: (a) Eletrodo impresso 220AT; Eletrodo impresso 250BT; (c) cabo de interface sensor/potenciostato. ....	66
Figura 30 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol.L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> em 0,1 mol. L <sup>-1</sup> de PBS para os sensores comerciais 250BT (área do eletrodo de trabalho: 4mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 600 mV, potencial mínimo de -200 mV e velocidade de varredura de 100 mV.s <sup>-1</sup> . ....	67
Figura 31 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol.L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> em 0,1 mol. L <sup>-1</sup> de PBS para os sensores comerciais 220AT (área do eletrodo de trabalho: 4mm).	

Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 600 mV, potencial mínimo de -200 mV e velocidade de varredura de 100 mV.s <sup>-1</sup> .	68
Figura 32 - Diagrama da plataforma do sistema de leitura.	70
Figura 33 - Diagrama esquemático do circuito eletrônico projetado para a plataforma laboratorial.	72
Figura 34 - Representação esquemática de uma (a) célula de referência (b) célula de referência conectado ao circuito de um potenciostato.	74
Figura 35 - Projeto ECAD da plataforma laboratorial portátil (a) camada superior (b) camada inferior .	76
Figura 36 - Placa eletrônica final desenvolvida para a plataforma laboratorial portátil.	77
Figura 37 - Tela do APP: (a) Tela inicial, (b) Tela principal com mensagem de ativação de conexão Bluetooth e (c) alerta pedindo permissão para ativar o Bluetooth.	78
Figura 38 - Telas da interface com o usuário: (a) Telas sem conexão Bluetooth estabelecida, (b) lista de dispositivos próximos e (c) tela com a conexão estabelecida.	79
Figura 39 -Telas de operação de medidas: (a) Definição do nome do ensaio ou medida eletroquímica, (b) configuração de parâmetros para a voltametria cíclica e (c) tela de plotagem em tempo real das medidas eletroquímicas.	80
Figura 40 - Compartilhamento dos resultados do ensaio eletroquímico (A) seleção do aplicativo de compartilhamento, (B) exemplo de compartilhamento via e-mail .	82
Figura 41 - Esquema de comunicação .	83
Figura 42 - Onda triangular gerada pelo DAC e lida pelo ADC pela interface microcontrolada (a) Potencial linear para a velocidade de varredura de 100mV/s (b) Aumento da área selecionada, demonstrando o ruído gerado pelo circuito eletrônico.	84
Figura 43 - Resultados experimentais e comparativos com equipamento comercial da calibração utilizando as células de referência com valores de resistência (a) 1KΩ (b) 10KΩ (c) 100KΩ e (d) 1MΩ .	85
Figura 44 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol. L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> em 0,1 mol. L <sup>-1</sup> de PBS para os sensores utilizados para calibração e validação da plataforma (área do eletrodo de trabalho: 3mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 500 mV, potencial mínimo de - 500 mV e velocidade de varredura de 100mV.s <sup>-1</sup> .	86

Figura 45 - Projeto de encapsulamento da plataforma utilizando desenho assistido por Computador (CAD) .....	87
Figura 46 - Protótipo final desenvolvido e impresso por impressão 3D .....	88
Figura 47 - Preparação do biossensor: (a) Funcionalização do sensor com cistamina, (b) ativação com glutaraldeído, (c) imobilização do antígeno da hepatite C, (d) captura do anticorpo do VHC (interação antígeno+anticorpo) .....	91
Figura 48 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol. L <sup>-1</sup> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> em 0,1 mol. L <sup>-1</sup> de PBS para os sensores utilizados como imunodiagnóstico da hepatite C (área do eletrodo de trabalho: 3mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 500 mV, potencial mínimo de -500 mV e velocidade de varredura de 100mV.s <sup>-1</sup> . .....	92
Figura 49 - Curva de bloqueio de transferência de elétrons no eletrodo de trabalho para as diferentes modificações realizadas no sensor. As barras representam as médias das correntes de cada modificação com respectivos desvios padrão. Todas as comparações apresentaram p<0,05.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização voltamétrica dos sensores desenvolvidos pela tecnologia de filmes finos – Sputtering. ....	62
Tabela 2 - Caracterização voltamétrica dos sensores desenvolvidos pela tecnologia de placa de circuito impresso – PCI. ....	65
Tabela 3 - Caracterização voltamétrica dos sensores comerciais 250BT.....	67
Tabela 4 - Caracterização voltamétrica dos sensores comerciais 220AT. ....	68
Tabela 5 - Custos de fabricação da plataforma laboratorial portátil.....	96



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
ADC	Analog to Digital Conversion
AFE	Analog Front-End
Ag	Antígeno
CAD	Computer Aided Design
CAN	Controller Area Network
CDMF	Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais
CI	Circuito Integrado
Cist	Cistamina
CVD	Chemical Vapour Deposition
DAC	Digital to Analog Conversion
DC	Direct Current
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
EA	Eletrodo Auxiliar
ECAD	Electrical Computer Aided Design
ELISA	Enzyme Linked Immunonosorbent Assay
EMI	Electromagnetic Interference
ER	Eletrodo de Referência
ET	Eletrodo de Trabalho
Glut	Glutaraldeído
I <sup>2</sup> C	Inter-Integrated Circuit
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LED	Light Emission Diode
LICBM	Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular
LIEC	Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica
MAC	Media Access Control
MIT	Massachusetts Institute of Technology
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCB	Printed Circuit Board
PCI	Placa de Circuito Impresso

PVD	Physical Vapour Deposition
QRCode	Quick Response Code
RAM	Random Access Memory
RF	Radio Frequency
RNA	RiboNucleic Acid
SAM	Self-Assembled Monolayer
SEM	Scanning Electron Microscope
SPI	Serial Peripheral Interface
TIA	Transimpedance Amplifier
UART	Universal Asynchronous Receiver/Transmitter
USB	Universal Serial Bus
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C

# Sumário

<b>CAPITULO 1</b> .....	<b>28</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>28</b>
1.1. Hepatite C e biossensores: perspectivas futuras .....	28
1.2. Motivação .....	29
1.3. Objetivo .....	31
1.4. Organização da dissertação.....	31
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>32</b>
<b>Biossensores: estado da arte</b> .....	<b>32</b>
2.1. Introdução .....	32
2.2. Biossensores: história e definição.....	32
2.3. Receptores bioquímicos .....	33
2.4 Transdutores.....	35
2.4.1. Térmicos.....	36
2.4.2. Piezoelétricos .....	36
2.4.3. Ópticos .....	36
2.4.4. Eletroquímicos .....	37
2.4.4.1. Condutimétricos .....	39
2.4.4.2. Impedimétricos .....	39
2.4.4.3. Potenciométricos .....	40
2.4.4.4. Amperométricos .....	40
<b>CAPITULO 3</b> .....	<b>43</b>
<b>Caracterização e tecnologias de fabricação de sensores eletroquímicos</b> .....	<b>43</b>
3.1. Introdução .....	43
3.2. Técnicas voltamétricas.....	43
3.2.1. Voltametria cíclica .....	43
3.2.2. Sonda redox de ferrocianeto de potássio.....	45
3.2.3. Eletrólito suporte .....	46
3.3. Potenciostato: descrição e funcionamento .....	46
3.4. Tecnologias para confecção de sensores .....	51
3.4.1. Tecnologia de filmes espessos: <i>Silkscreen</i> ou serigrafia.....	52
3.4.2. Tecnologia de filmes finos: <i>Sputtering</i> .....	53
3.4.3. Tecnologia de placa de circuito impresso (PCI) .....	54
3.4.3.1. Electroplating .....	55
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>57</b>
<b>Desenvolvimento e caracterização dos sensores eletroquímicos</b> .....	<b>57</b>



4.1. Introdução .....	57
4.2. Reagentes e soluções .....	57
4.3. Potenciostato .....	57
4.4. Análises e caracterizações eletroquímicas .....	57
4.5. Fabricação do suporte para conexão do sensor com o potenciostato .....	58
4.6. Fabricação dos sensores eletroquímicos .....	58
4.6.1. Tecnologia de filmes finos – <i>Sputtering</i> .....	59
4.6.1.1. Preparação do substrato e deposição por <i>Sputtering</i> .....	60
4.6.1.2 Caracterização voltamétrica dos sensores por <i>Sputtering</i> .....	61
4.6.2.1. Preparação do substrato e deposição por <i>Electroplating</i> .....	63
4.6.1.2. Caracterização voltamétrica dos sensores fabricados por <i>PCI</i> .....	64
4.6.3. Sensor impresso comercial como controle .....	65
4.6.3.1. Caracterização voltamétrica dos sensores comerciais .....	66
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>69</b>
<b>Desenvolvimento da plataforma laboratorial portátil .....</b>	<b>69</b>
5.1. Introdução .....	69
5.2 Visão geral da plataforma .....	69
5.2.1 Componentes utilizados para a instrumentação .....	70
5.2.2. Diagrama do circuito eletrônico .....	72
5.2.3. Desenvolvimento da célula de referência para calibração .....	73
5.3. Desenvolvimento de <i>softwares</i> dedicados para a plataforma .....	74
5.3.1. Arduino (IDE) .....	74
5.3.2. App inventor .....	75
5.4 Resultados experimentais e discussão .....	76
5.4.1. Elaboração da placa de aquisição e controle da plataforma laboratorial .....	76
5.4.2 Aplicativo e programa desenvolvido .....	77
5.4.2.1. Botões e comandos da interface .....	79
5.4.2.2. Comunicação entre o dispositivo móvel e a plataforma laboratorial .....	83
5.4.3. Calibração da plataforma laboratorial .....	83
5.4.4. Validação da plataforma laboratorial em ensaio eletroquímico .....	85
5.4.5. Prototipagem 3D do modulo da plataforma laboratorial .....	87
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>89</b>
<b>Aplicação da plataforma e sensores eletroquímicos como imunodiagnóstico da hepatite C .....</b>	<b>89</b>
6.1. Introdução .....	89
6.2. Método de imobilização do receptor bioquímico sobre a superfície do eletrodo de trabalho .....	89

6.2.1. Cistamina.....	90
6.2.2. Glutaraldeído.....	90
6.2.3. Antígenos e anticorpos.....	90
6.2.4. Preparo dos biossensores eletroquímicos.....	91
6.4. Ensaio voltamétrico do biossensor para diagnóstico da hepatite C.....	91
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>95</b>
<b>Conclusão e perspectiva do trabalho.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>



# CAPÍTULO 1

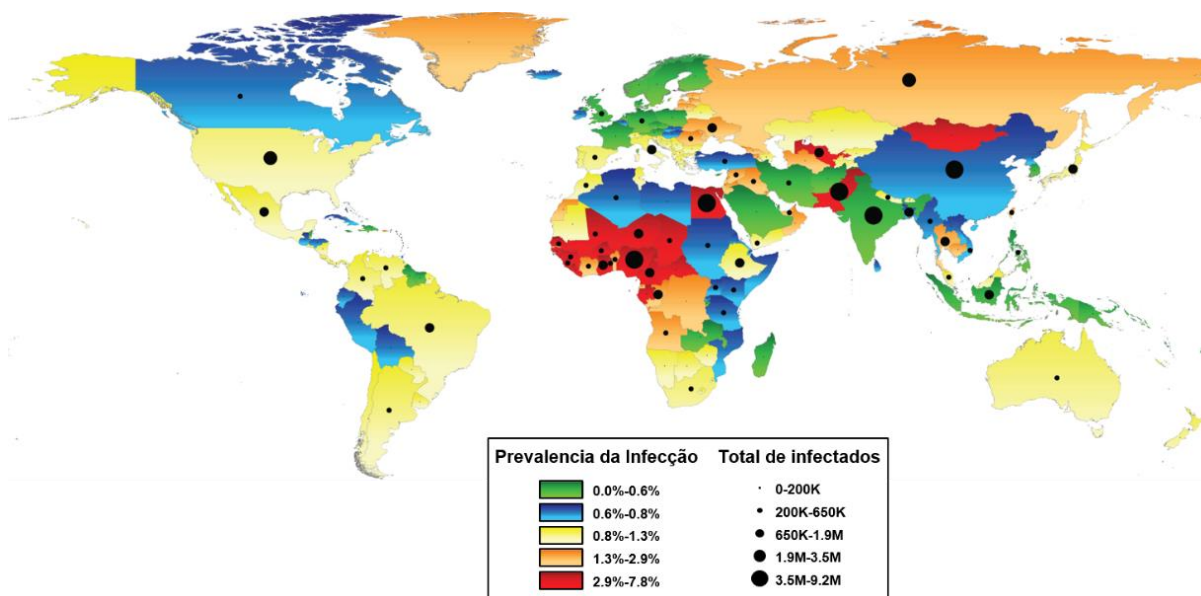
## Introdução

Este capítulo apresenta a relevância da pesquisa para o desenvolvimento do diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C, evidenciando os principais fatores causadores da doença e os diagnósticos utilizados atualmente.

### 1.1. Hepatite C e biossensores: perspectivas futuras

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é um dos grandes problemas mundiais de saúde. Estima-se que 200 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras do VHC. A hepatite C é um dos tipos mais comuns de hepatite, caracterizada pelo estado inflamatório do fígado, decorrente da infecção viral, sendo umas das principais causas de transplante hepático em todo mundo. Diferentemente da hepatite B (VHB), não existe vacina preventiva para o VHC, e sua ocorrência leva a altas taxas de mortalidade. Os custos para a terapia antiviral são elevados, e a eficácia do tratamento é baixa [1–4]. A Figura 1 ilustra a distribuição epidemiológica mundial da infecção pelo vírus da hepatite C.

Figura 1 - Distribuição epidemiológica da infecção pelo vírus da hepatite C.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado das referências [5,6].

Atualmente, o diagnóstico da hepatite C é realizado por meio de exames sorológicos para detecção de anticorpos anti-VHC (ELISA e IMMUNOBLOT) e testes moleculares (VHC-RNA), além da biópsia hepática, exame realizado para determinar o grau do processo inflamatório, o estágio de fibrose, e se há presença de cirrose no tecido hepático.

Estes exames, embora sensíveis, demandam tempo, necessitam de equipamentos especiais, laboratórios com infraestrutura adequada, profissionais especializados e qualificados, e no caso da biópsia, trata-se de um exame invasivo e que pode trazer riscos e complicações ao paciente [3].

Com o avanço da tecnologia e o intuito de permitir a detecção e a prevenção de doenças, está sendo incentivado, nos últimos anos, o desenvolvimento de testes de diagnósticos mais precisos, de maior sensibilidade e especificidade, que tenham baixo custo, sejam simples, de fácil manuseio, e menos invasivos em relação aos exames atualmente utilizados [4].

Neste sentido, os biossensores tem sido alvo de grande destaque no aprimoramento de técnicas analíticas mais seletivas, sensíveis, de resposta rápida, possibilitando a construção de equipamentos miniaturizados, simples e portáteis, com aplicação em diversos campos.

A área médica detém grande parte do mercado dos biossensores [7], uma vez que estes são capazes de detectar sinais em tempo real de reações imunoquímicas, bioquímica ou biológica, com alta sensibilidade e especificidade, o que permite sua aplicação em diferentes condições diagnósticas e monitoramento terapêutico de doenças crônicas, como a hepatite C.

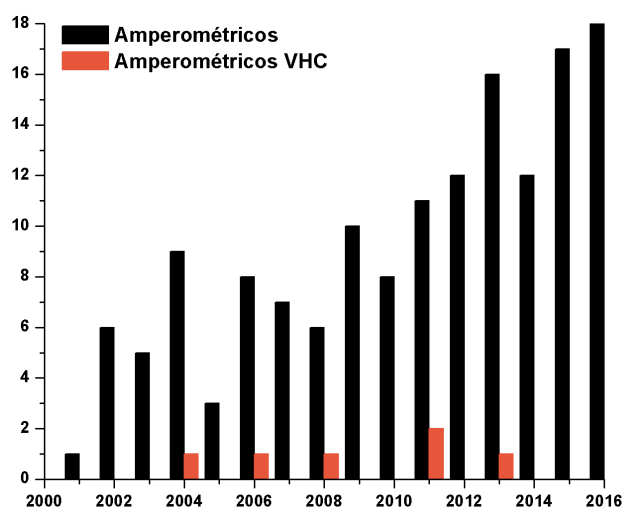
### **1.2. Motivação**

Nos últimos anos, a área de pesquisa em biossensores tem seu foco voltado para estudos e aplicações, visando contribuir para o desenvolvimento de plataformas portáteis de sensoriamento, onde diversas técnicas de fabricação de sensores (*silkscreen*, *sputtering* e placa de circuito impresso - PCI) e métodos de transdução (térmico, piezoelétricos, ópticos e eletroquímicos) do sinal gerado nas reações, têm sido relatados como uma solução para a simplificação dos métodos tradicionais de diagnósticos de doenças.

Dentre os métodos mais utilizados para o diagnóstico precoce de doenças, os biossensores eletroquímicos amperométricos vêm se destacando devido às suas características de maior estabilidade e sensibilidade, facilidade de fabricação e miniaturização e um baixo custo comparado com os demais métodos.

Apesar de ser uma tecnologia promissora e com grande impacto no desenvolvimento de diagnósticos de diversos tipos de doenças, os biossensores eletroquímicos amperométricos têm sido pouco explorados para o exame e detecção do VHC. A Figura 2 apresenta a evolução dos biossensores eletroquímicos amperométricos aplicados no diagnóstico do VHC em comparação com outros tipos de doenças durante o período de 2000 a 2016.

Figura 2 - Evolução dos biossensores eletroquímicos amperométricos aplicados no diagnóstico do VHC em relação a outros tipos de doenças (publicações entre 2000 - 2016 Scopus).



Fonte: Elaborado pelo autor

Nesta última década, pesquisadores mostraram aplicações relevantes no diagnóstico do VHC utilizando os biossensores eletroquímicos amperométricos em conjunto com a nanotecnologia para o aumento da sensibilidade de detecção [8–13]. Porém, grande parte dos produtos desenvolvidos ainda não se tornaram métodos comerciais para a substituição dos testes tradicionais. Isto ocorre devido às dificuldades relacionadas à reprodutibilidade e viabilidade dos métodos para produção em escala comercial, o que reflete na exatidão e precisão dos resultados; parâmetros estes, essenciais no diagnóstico clínico-laboratorial.

Neste contexto, dada a importância e a necessidade do desenvolvimento de testes diagnósticos com poder de detecção mais precoce para a infecção do vírus da hepatite C, este trabalho foi realizado em parceria com Instituto de Química de Araraquara (UNESP), o Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica (LIEC) do Centro de Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF) e o Laboratório de Imunologia Clínica e Biomolecular (LICBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Utilizou-se das competências científicas e tecnológicas existentes nestes laboratórios e, em associação com o Departamento de Engenharia Elétrica e Computação da Universidade de São Paulo (SEL-

EESC-USP), buscou-se o desenvolvimento de uma plataforma laboratorial portátil e biossensores eletroquímicos amperométricos que possam atender às especificações e condições necessárias para o imunodiagnóstico da hepatite C.

### **1.3. Objetivo**

Este trabalho propõe o desenvolvimento de uma plataforma laboratorial portátil com biossensores eletroquímicos amperométricos. A plataforma laboratorial possui uma conexão tipo *plug-and-play* com os biossensores e uma interface de comunicação com dispositivos móveis. Aproveitando o conhecimento prévio de técnicas de fabricação (nomeadamente, *silkscreen*, *sputtering* e placa de circuito impresso), otimizou-se o projeto e respectivo fabrico de biossensores específicos para aplicação nesta plataforma laboratorial. No âmbito do desenvolvimento deste projeto, o interesse foi definir os processos mais adequados à produção em larga escala de biossensores e validar a plataforma em comparação com equipamentos comerciais para a sua aplicação em um teste imunodiagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C.

### **1.4. Organização da dissertação**

Este primeiro capítulo consiste na contextualização sobre a importância do diagnóstico precoce do VHC e os principais métodos adotados atualmente para a sua determinação, além de fazer um resumo dos objetivos e motivações da dissertação. O capítulo 2 expõe o conceito associado no desenvolvimento de um biossensor, tal como os tipos e mecanismos de reconhecimento e transdução. O capítulo 3 apresenta o princípio das técnicas eletroquímicas utilizadas na análise e caracterização dos sensores, a descrição e funcionamento de um potenciostato, tal como a metodologia para a confecção de sensores. O capítulo 4 descreve os procedimentos experimentais empregados na fabricação dos sensores eletroquímicos e suas respectivas caracterizações. O capítulo 5 apresenta o desenvolvimento da plataforma laboratorial, componentes utilizados para a instrumentação, interface gráfica de comunicação entre a plataforma e dispositivos móveis, bem como a calibração e validação do sistema em ensaios eletroquímicos. O capítulo 6 descreve os procedimentos empregados na funcionalização dos sensores eletroquímicos amperométricos, análise e caracterização por voltametria cíclica utilizando a plataforma laboratorial desenvolvida para a aplicação como imunodiagnóstico do VHC. Por fim, o capítulo 7 consiste nas conclusões e perspectivas futuras do trabalho proposto.

# CAPÍTULO 2

## Biossensores: estado da arte

### 2.1. Introdução

Neste capítulo será apresentado a teoria dos biossensores, os tipos de receptores bioquímicos e transdutores, bem como o método de detecção que cada técnica apresenta para a investigação e diagnóstico.

### 2.2. Biossensores: história e definição

A tecnologia de biossensores teve início em 1962 a partir dos trabalhos de Clark e Lyons [14]. Estes autores descreveram o primeiro biossensor eletroquímico constituído pela enzima glicose oxidase imobilizada na superfície de um eletrodo de oxigênio. Verificaram que a diminuição da concentração de oxigênio era proporcional à concentração de glicose; este biossensor foi a base para o desenvolvimento dos diversos biossensores atuais [15].

Em 1967, Updike e Hicks [16], propuseram o termo “eletrodo de enzima”, no qual imobilizaram a glicose oxidase em um gel de poliacrilamida para medir a concentração de glicose em soluções biológicas e nos tecidos, *in vitro*. Tanto o eletrodo de Clark e Lyons quanto o eletrodo de Updike e Hicks foram baseados na técnica de amperometria, ou seja, a medida da corrente em resposta ao potencial aplicado.

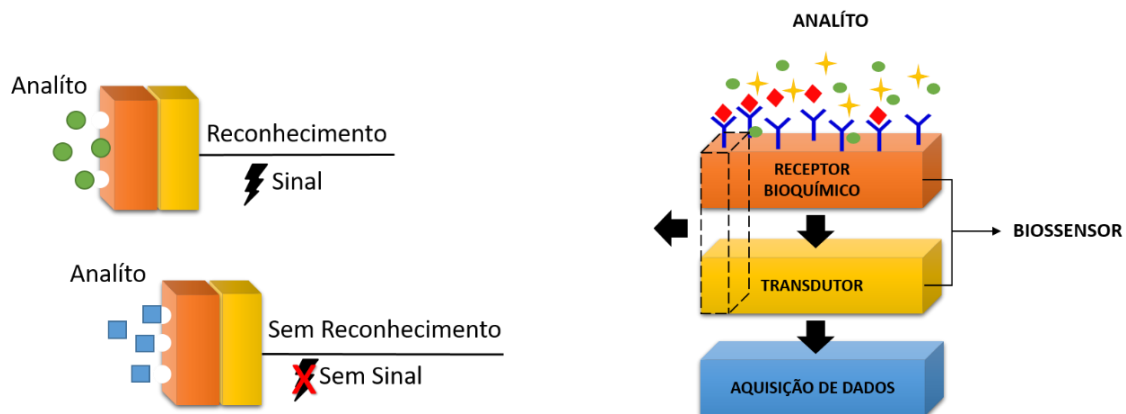
Guilbault e Montalvo [17], em 1969, descreveram o primeiro biossensor potenciométrico para determinação de uréia, constituído da enzima urease imobilizada em uma matriz de poliacrilamida, sobre um eletrodo de vidro, seletivo a íons amônio. A partir de 1970, vários autores comprovaram os conceitos de biossensores e sensores eletroquímicos, e diferentes técnicas de transdução foram desenvolvidas para melhorar a detecção do sinal gerado na reação bioquímica [18].

A definição de biossensor segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), sugere: "um dispositivo integrado capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa específica através de um elemento de reconhecimento biológico que está em contato direto com um elemento transdutor em conjunto com uma unidade de aquisição de dados, que tem como função filtrar, amplificar e analisar o sinal



gerado pela reação, enviando para um sistema de processamento e monitorização dos dados” [19]. A Figura 3 ilustra um dispositivo biossensor e o sistema de reconhecimento para transdução do sinal.

Figura 3 - Diagrama esquemático de um biossensor e o sistema de reconhecimento.

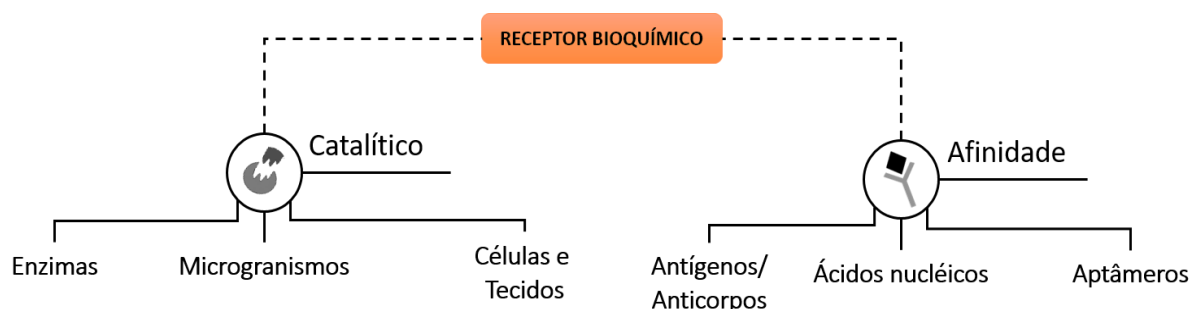


Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado da referência [20].

### 2.3. Receptores bioquímicos

Os receptores bioquímicos são os elementos biologicamente ativos que irão interagir com o analito de forma específica e reversível, alterando os parâmetros físico-químicos associados com as interações podendo produzir íons, elétrons, luz ou calor [21]. Os receptores bioquímicos podem ser divididos em dois grupos (Figura 4): (i) os catalíticos, que incluem as enzimas, microrganismos, células e tecidos; e, (ii) os de afinidade, baseados em ligações específicas e seletivas de biomoléculas como os anticorpos, ácidos nucleicos e os aptâmeros [22].

Figura 4 - Classificação dos tipos de receptores bioquímicos utilizados no desenvolvimento de biossensores.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos receptores baseados em enzimas, são utilizadas proteínas do tipo oxidase que são imobilizadas sobre o elemento transdutor. A vantagem do uso das enzimas como material biológico é que estas possuem atividade catalítica, o que aumenta a sensibilidade e alta especificidade com o analito de interesse [23]. O sinal gerado ocorre pela medida de catálise ou a inibição da enzima pelo analito [24]. As vantagens dos biossensores catalíticos é que possuem elevada especificidade e capacidade de detectar uma grande variedade de analitos, e maior disponibilidade comercial de enzimas com alto grau de pureza [25]. A desvantagem é que possuem instabilidade em relação às variações físico-químicas do meio ambiente, alto custo para extração, isolamento e purificação, e a atividade catalítica pode ser perdida ou reduzida após armazenamento em condições inadequadas ou decorrente do processo de imobilização sobre o transdutor [26].

Os biossensores que são baseados em microrganismos como receptores, possuem a capacidade de metabolizar vários tipos de compostos orgânicos, tanto por via anaeróbia como pela via aeróbia [23], resultando na produção de metabólitos como o amoníaco, o dióxido de carbono, ou ácidos, os quais podem ser detectados [27]. As vantagens que estes receptores oferecem, é o baixo custo, facilidade para serem manipulados quando comparados às enzimas; e uma maior capacidade de adaptação em condições diversas. As desvantagens estão relacionadas à sensibilidade de detecção devido a uma baixa seletividade [28].

Biossensores com base em células e tecidos, possuem o mesmo princípio de funcionamento que os enzimáticos, apresentando como vantagens uma maior atividade catalítica, estabilidade em relação às variações físico-químicas do meio ambiente, e um custo reduzido em comparação com as enzimas purificadas [23]. As desvantagens são em relação ao acoplamento ou imobilização no transdutor e a baixa seletividade, devido a quantidade de enzimas celulares [29]. Os baseados em tecidos oferecem vantagens em relação às células, como a facilidade para imobilização sobre o transdutor, possui maior atividade catalítica e estabilidade, baixo preço, mas também possuem desvantagens pela baixa seletividade e tempo de resposta mais lenta [30].

Os sensores que utilizam antígenos e/ou anticorpos como receptores, têm sido amplamente empregados no desenvolvimento de diagnósticos, e podem ser chamados de imunossensores, pois são baseados em reações imunológicas [23]. Este tipo de receptor é mais versátil do que os baseados em enzimas, pois possuem alta afinidade e se ligam fortemente e especificamente com o analito de interesse, o que lhe proporciona uma alta sensibilidade para a aplicação em diversas áreas, principalmente na área médica [31,32]. O princípio de

funcionamento dos imunossensores se dá pelo reconhecimento específico de anticorpos por antígenos, ou vice-versa, imobilizados sobre um transdutor, os quais podem produzir sinais mensuráveis para a determinação da concentração do analito de interesse [26].

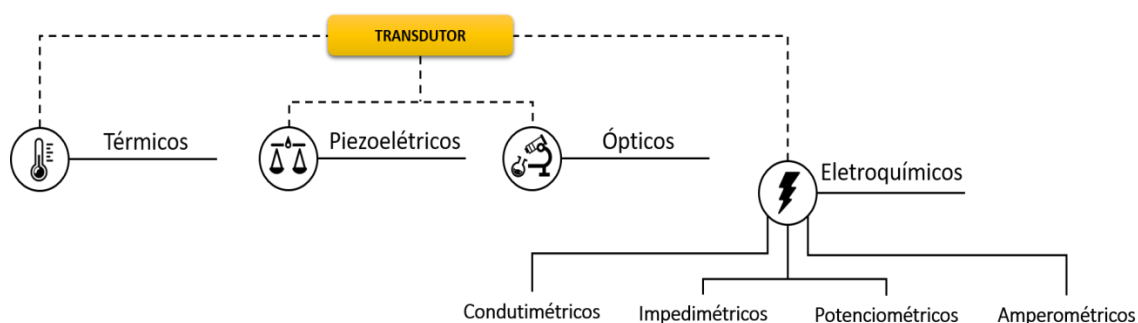
Os ácidos nucleicos utilizados para detecção, apresentam como propriedades as interações moleculares de DNA ou RNA, imobilizados sobre o transdutor [23]. O princípio de funcionamento baseia-se no pareamento de bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos (adenina e timina/ uracila ou citosina e guanina) presentes nas moléculas de DNA ou RNA. Os sensores desenvolvidos pela imobilização de ácidos nucleicos são geralmente conhecidos como genossensores, possuem uma alta afinidade e seletividade, e são superiores no quesito sensibilidade, em comparação com os antígenos e anticorpos dos imunossensores [33,34].

Os aptâmeros assim como os ácidos nucleicos, são oligonucleotídeos ou peptídeos que interagem com moléculas de forma específica e com elevada afinidade. Possuem diversas vantagens em comparação aos anticorpos, como maior estabilidade química, possuem estruturas simples, podem ser modificados e são facilmente sintetizados, o que os torna de baixo custo em comparação com os anticorpos, considerando-o como uma classe promissora para a aplicação em testes e diagnósticos de doenças imunológicas [35–37].

## 2.4 Transdutores

O transdutor é o elemento responsável por converter o sinal gerado pela interação da reação bioquímica, imunoquímica ou biológica, em um sinal elétrico que pode ser mensurado, quantificado e analisado. O transdutor adequado para as reações depende do tipo de interação ou reação que se deseja identificar, sendo classificados pelo tipo de sinal a ser convertido. Os principais sistemas de transdução podem ser térmicos, piezoelétricos, ópticos ou eletroquímicos, conforme ilustrado na Figura 5 [38].

Figura 5 - Classificação dos tipos de sistemas de transdução utilizados no desenvolvimento de biossensores.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### **2.4.1. Térmicos**

São dispositivos baseados em medidas de efeito de calor gerado em uma reação bioquímica, onde se relaciona a quantidade total da absorção ou liberação de calor com a concentração dos reagentes e as constantes de velocidade da reação [39]. A forma mais utilizada acopla as substâncias diretamente a termistores, os quais detectam o calor envolvido na reação.

Esta técnica possui a capacidade de análise das propriedades térmicas dos fluídos biológicos em tempo real. Porém, possui desvantagens como altos custos e complexidade para a miniaturização, além da baixa especificidade na análise, pois toda variação de entalpia ocorrida na reação de mistura ou pelo efeito da diluição e solvatação, podem ocasionar possíveis erros de análise [40,41].

### **2.4.2. Piezoelétricos**

São dispositivos baseados na alteração da frequência de oscilação de cristais de quartzo piezoelétricos, os quais são sensíveis a mudanças na massa, densidade ou viscosidade de amostras. Nestes biossensores, o receptor bioquímico é imobilizado em um cristal de quartzo, que ressoa na aplicação de um campo elétrico externo alternado. Ao realizar a ligação específica com o analito de interesse, ocorre alteração da frequência do cristal e, conseqüentemente, a concentração da massa pode ser detectada com alta sensibilidade [42].

Este sistema tem sido utilizado em diversas aplicações devido à possibilidade de automação, análise em tempo real, facilidade de operação, simplicidade e baixo custo. Apesar disso, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como a falta de especificidade e sensibilidade para a aplicação na área diagnóstica. Além disto, possui problemas de calibração e é sensível às interferências do ambiente, o que o torna com qualidade inferior quando comparado com os métodos ópticos e eletroquímicos [43,44].

### **2.4.3. Ópticos**

São dispositivos que transformam as mudanças dos fenômenos de absorção [45], luminescência [46], fluorescência [47], índice de refração [48], ressonância plasmônica de superfície [49], efeito fototérmico [50] e dispersão de luz [51] em um sinal elétrico. Essas mudanças são resultantes da interação do analito com o elemento receptor, as quais provocam alterações nas propriedades ópticas do sensor.

Os estudos para desenvolvimento de biossensores ópticos tem crescido ultimamente devido à sua versatilidade, baixa relação sinal-ruído, quantidade reduzida de reagentes para análise, resistente à interferência eletromagnética e possibilidade de sensoriamento remoto, que em conjunto com as técnicas de multiplexação de sinais, é possível realizar diversas medidas em um único dispositivo [52]. No entanto, esse método ainda possui um elevado custo de equipamentos e dispositivos para leitura e interpretação dos dados, apresentam interferências como a atenuação, perdas por dispersão e efeitos não-lineares, e são susceptíveis a danos físicos [53].

### **2.4.4. Eletroquímicos**

São dispositivos capazes de fornecer uma informação analítica semi-quantitativa ou quantitativa da interação eletroquímica entre um eletrodo e o analito de interesse. Estes sensores são baseados na transferência de elétrons na reação bioquímica, onde o sinal elétrico gerado é proporcional à concentração do analito. Este método de detecção é caracterizado por sua simplicidade, alta sensibilidade e especificidade, resposta rápida, baixo custo de instrumentação e fabricação, proporcionando viabilidade para produção em escala comercial, e permitindo ainda, sua miniaturização para aplicação em diagnósticos [54].

Este sistema utiliza uma célula eletroquímica, dispositivo onde ocorrem as reações de óxido-redução, ou seja, processos onde há a transferência de elétrons entre duas ou mais espécies químicas, sendo que o total de elétrons perdidos por uma espécie química (oxidação) deve ser igual ao total de elétrons ganhos por outra espécie (redução). As células eletroquímicas podem ser classificadas em galvânicas, onde ocorre a reação espontânea de óxido-redução, ou eletrolíticas, onde uma reação não-espontânea de óxido-redução é gerada a partir da aplicação de uma fonte externa de corrente (eletrolise), geralmente constituídas de dois ou três eletrodos [55].

A célula eletroquímica de dois eletrodos (Figura 6a), é constituída por um eletrodo de trabalho (ouro, platina, carbono vítreo, entre outros) com uma área superficial pequena, onde é realizado a investigação eletroquímica de interesse, e um eletrodo de referência, responsável por manter um potencial fixo e constante durante o experimento, o qual deve possuir uma área relativamente maior, com o intuito de que o potencial aplicado polarize somente o eletrodo de trabalho, ou seja, o eletrodo de menor área assumirá o potencial aplicado a ele [56].

Nos transdutores eletroquímicos, a densidade de corrente é inversamente proporcional à área do eletrodo. Por este motivo, a polarização ocorre no eletrodo que possui menor área, pois a densidade de corrente necessária para a polarização é menor, conforme equação 1.

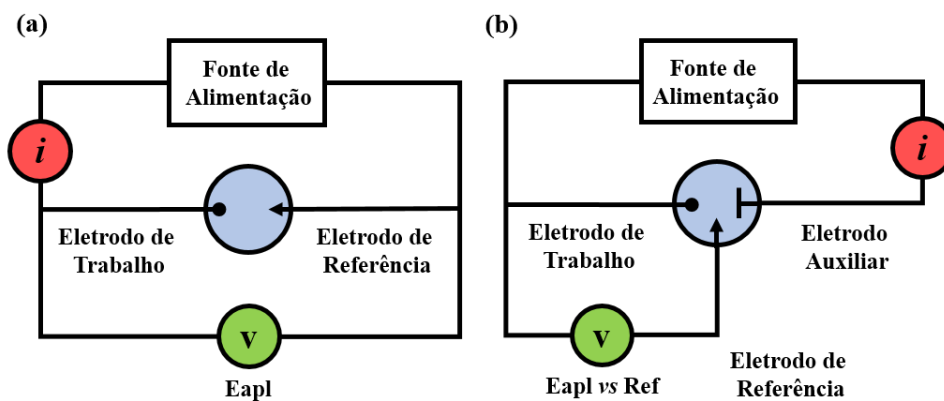
$$J = \frac{I}{A} \quad (1)$$

onde  $J$  é a densidade de corrente elétrica ou corrente por unidade de área ( $A/cm^2$ ),  $I$  é a corrente aplicada (A) e  $A$  é a área do eletrodo ( $cm^2$ ).

O arranjo da célula eletroquímica de dois eletrodos, conforme representado na Figura 6(a), produz erros de instabilidade, uma vez que a corrente de varredura circula através do eletrodo de referência não impedindo que o mesmo possa ser polarizado. Nas reações que utilizam concentrações iônicas na ordem de  $10^{-4} mol L^{-1}$ , a corrente tende a aumentar em consequência do acúmulo destes íons na superfície do eletrodo. Neste caso, a passagem de corrente pelo eletrodo de referência provoca distorções nas medidas eletroquímicas, devido à inconstância do potencial de referência, o que inviabiliza a utilização desta técnica [56].

Com o intuito de evitar tais problemas, foi desenvolvido a célula de três eletrodos (Figura 6b), constituída pelo eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar (também denominado de contra eletrodo); este último possui a função de manter o equilíbrio potencioestático da célula eletroquímica, constituído de materiais inertes como o ouro, platina e o carbono vítreo. Neste sistema, a corrente circula do eletrodo auxiliar (de maior área) para o eletrodo de trabalho, evitando a alteração do eletrodo de referência, o qual mantém seu potencial constante ao longo das medidas. Consequentemente, é possível o desenvolvimento da célula eletroquímica com o eletrodo de referência com dimensões menores [56].

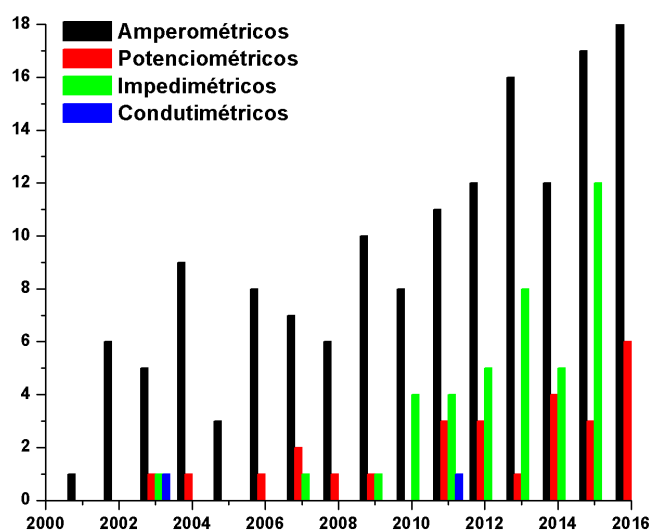
Figura 6 - Representação de uma célula eletroquímica (a) de dois eletrodos; (b) de três eletrodos.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado da referência [57].

Em relação aos métodos de transdução, os eletroquímicos possuem diversas vantagens comparados aos demais, onde vários métodos de detecção têm sido explorados com o objetivo de melhorar a sensibilidade, redução do tempo de análise e o baixo custo para implementação. Dessa forma, os transdutores eletroquímicos são divididos ainda em: condutimétricos, impedimétricos, potenciométricos e amperométricos, sendo estes dois últimos os mais estudados e aplicados no diagnóstico de doenças, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Biossensores eletroquímicos mais utilizados para diagnóstico de doenças (publicações entre 2000 - 2016 Scopus).



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.4.4.1. Condutimétricos

Os transdutores condutimétricos são baseados na medida da alteração de condutividade numa solução, decorrente da produção ou consumo de espécies iônicas, como a atividade metabólica de microrganismos e enzimas [58], ou da variação de condutância de um eletrodo pela imobilização de receptores bioquímicos em sua superfície [59]. As medições são realizadas utilizando uma corrente alternada, onde a condutividade é uma função linear da concentração das espécies iônica na solução. Esta técnica possui a capacidade de análises rápidas e com elevada sensibilidade, no entanto, não é específica para um determinado tipo iônico [60].

#### 2.4.4.2. Impedimétricos

Os transdutores impedimétricos se baseiam na variação da impedância de um eletrodo através da aplicação de uma corrente alternada de frequência variável, combinando as

propriedades resistivas e capacitivas do material de interesse. Esta técnica é sensível a uma ampla variedade de propriedades físicas e químicas, mas, como o registro do espectro de impedância é realizado em uma ampla região de frequências, esta técnica tem sido utilizada mais para caracterização das reações eletroquímicas que ocorrem na superfície do eletrodo, devido ao longo tempo para a realização da análise [61–63].

#### **2.4.4.3. Potenciométricos**

Os transdutores potenciométricos são baseados na determinação da diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência, proveniente do acúmulo de carga na superfície do eletrodo de trabalho, e fornecendo informações sobre a atividade iônica gerada na reação eletroquímica [64]. Neste sistema, enzimas são utilizadas como receptores bioquímicos, e a reação com o analito gera espécies químicas ou íons que podem ser detectados por um eletrodo de íons seletivo, como o eletrodo de pH. Esta técnica constitui em um método simples de medição, com elevada capacidade de detecção e baixo custo de fabricação, todavia, apresenta problemas com a estabilidade e o tempo de resposta [65,66].

#### **2.4.4.4. Amperométricos**

Os transdutores amperométricos medem o fluxo de corrente elétrica produzida por uma reação eletroquímica, resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície de um eletrodo, por meio da transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa [67].

A reação ocorre pela determinação do potencial constante entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. A corrente resultante da interação é lida entre o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho, utilizando-se um sistema de amplificação e aquisição de dados (potenciostato). A direção do fluxo dos elétrons pode ser controlada pelo potencial elétrico aplicado, onde em potenciais positivos uma reação de oxidação ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, e para potenciais negativos uma reação de redução. Esta corrente gerada durante o processo de óxido-redução é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas presentes na solução [68].

Dessa forma, o método amperométrico de detecção pode fornecer diversas vantagens, devido às suas características de maior estabilidade e elevada sensibilidade para a análise de espécies eletroativas presente em uma solução e, conseqüentemente, a aplicação em



diagnósticos clínicos mais precisos, além de possuir um baixo custo e facilidade de fabricação e miniaturização comparado com os demais métodos [69].



## CAPÍTULO 3

### **Caracterização e tecnologias de fabricação de sensores eletroquímicos**

#### **3.1. Introdução**

Este capítulo apresenta o conceito das técnicas voltamétricas utilizadas na análise e caracterização dos sensores eletroquímicos, a descrição de funcionamento de um potenciostato e as tecnologias utilizadas para a fabricação de sensores eletroquímicos.

#### **3.2. Técnicas voltamétricas**

O desenvolvimento das técnicas de voltametria se deu pela descoberta a partir da polarografia em 1922 por Jaroslav Heyrovsky [70], que consiste em uma técnica eletroanalítica baseada no processo de interação entre uma solução e a superfície de um eletrodo [71]

A voltametria é uma técnica de caracterização utilizada na análise de dados quantitativos e qualitativos envolvendo processos de óxido-redução de reações químicas, processos de adsorção e mecanismos de transferências de elétrons em superfícies modificadas [71]. As técnicas voltamétricas podem ser classificadas em: voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e a voltametria cíclica, sendo esta última a mais utilizada para os estudos eletroquímicos, pois permite uma rápida localização dos processos de óxido-redução [71].

##### **3.2.1. Voltametria cíclica**

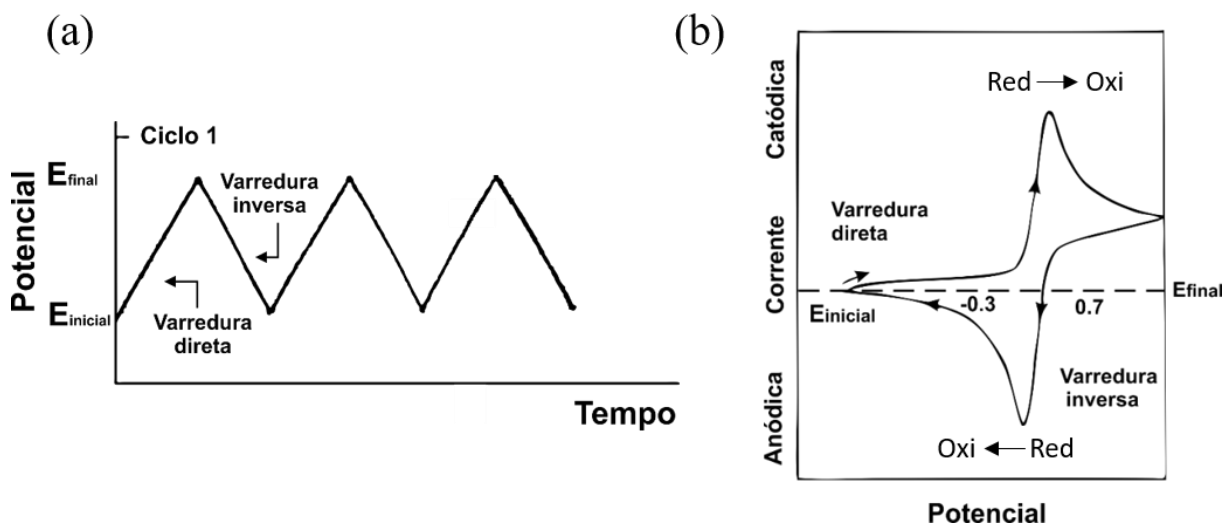
A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica amplamente empregada no estudo de reações de óxido-redução, na cinética e termodinâmica de transferência de elétrons das reações químicas. Esta técnica consiste em aplicar um potencial que varia em função do tempo na forma de uma onda triangular (Figura 8a) ao eletrodo de trabalho, promovendo as reações de oxidação e de redução das espécies eletroativas em solução, e, conseqüentemente,

a geração de uma corrente capacitiva, resultante do carregamento da dupla camada elétrica e a corrente faradáica resultante das reações eletroquímicas na superfície do eletrodo [71].

As informações do analito de interesse são obtidas a partir do registro da corrente elétrica resultante que surge no eletrodo de trabalho em função do potencial aplicado, denominado voltamograma (Figura 8b). A amplitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante o processo de óxido-redução (equação 2) pode estar relacionada com a quantidade de analito presente na interface eletrodo-solução [72].



Figura 8 - Processo de voltametria cíclica (a) potencial em forma de onda triangular aplicado ao estudo eletroquímico (b) voltamograma cíclico de uma reação eletroquímica.



Fonte: Figura adaptada da referência [74].

O sistema mais utilizado para a aplicação desta técnica é o de três eletrodos, e a medida é realizada pela determinação de um potencial inicial (ausência da reação de redução). Durante a medida, o potencial é varrido linearmente do negativo, onde ocorre uma reação de redução do analito, e uma corrente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) é gerada proporcional à concentração do analito. Para o potencial positivo, ocorre uma reação de oxidação do analito, e a corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ) é gerada simetricamente ao pico de redução [71].

A varredura no sentido de potenciais negativos é designada de varredura inversa, enquanto uma varredura no sentido oposto como varredura direta. E os parâmetros mais importantes para a voltametria cíclica são o potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), o potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ) e as correntes de pico catódica ( $I_{pc}$ ) e anódica ( $I_{pa}$ ) [73].

Nas reações de óxido-redução reversíveis ou *quasi*-reversíveis, a corrente resultante de pico anódico quanto a de pico catódico, devem apresentar a mesma magnitude, ou seja, a razão entre elas deve ser unitária, conforme equação 3.

$$\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| = 1 \quad (3)$$

A diferença entre os potenciais de picos catódico e anódico podem ser utilizados para determinar o número de elétrons transferidos ( $n$ ) durante a reação, expressos pela equação 4.

$$\Delta E = |E_{pa}| - |E_{pc}| = \frac{0.059}{n} V \quad (4)$$

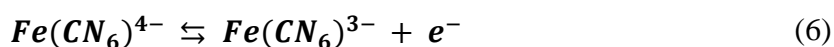
E as informações quantitativas envolvendo o comportamento da reação em estudo e o coeficiente de difusão podem ser obtidas pela equação 5 de *Randles-Sevcik* para  $T = 298^\circ K$  ( $25^\circ C$ )

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

onde  $I_p$  é a corrente de pico (A),  $n$  é o número de elétrons,  $A$  é área do eletrodo ( $cm^2$ ),  $C$  é a concentração do analito ( $mol/cm^3$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão ( $cm^2/s$ ),  $v$  é a velocidade de varredura (V/s) [74].

### 3.2.2. Sonda redox de ferrocianeto de potássio

A sonda redox de ferrocianeto de potássio é um sistema utilizado para os estudos eletroquímicos, pois através dele é possível determinar os potenciais de redução ( $E_{pc}$ ) e de oxidação ( $E_{pa}$ ) na superfície de eletrodos em conjunto com as técnicas voltamétricas. Este sistema é constituído pelo íon ferrocianeto,  $[Fe(CN)_6]^{4-}$ , que é o anión do ácido ferrocianídrico,  $K_4[Fe(CN)_6]$ , e a sua forma oxidada é o anión ferricianeto, um anión do ácido ferricianídrico,  $K_3[Fe(CN)_6]$  [75]. Dessa forma, uma reação de eletrólise numa solução contendo o íon ferrocianeto, tende a gerar o íon ferricianeto no ânodo do eletrodo e, conseqüentemente, a liberação de um elétron conforme equação 6.



O emprego da sonda redox de ferri/ferrocianeto de potássio ( $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ ) como sistema redox nas reações eletroquímicas, possui como finalidade indicar

uma possível inibição de corrente na superfície do eletrodo de trabalho, por esta solução apresentar características bem definidas dos picos de corrente anódico/catódico, no qual a sua alteração indica alguma modificação na interface eletrodo/solução, sendo um modelo importante para os estudos eletroquímicos devido a sua estabilidade [75,76].

### 3.2.3. Eletrólito suporte

Eletrólito é o nome dado a uma substância que, no momento em que dissolvida em um determinado solvente, produz uma condutividade elétrica maior que a apresentada pelo solvente [77]. Em sistemas eletroquímicos, o eletrólito de suporte é empregado numa concentração de 10 a 100 vezes maior que a concentração das espécies eletroativas (substâncias que irão se oxidar ou reduzir), de modo a simplificar a análise dos sistemas eletroquímicos [77].

A alta concentração do eletrólito de suporte numa célula eletroquímica possui como propósito reduzir a resistência, manter a força iônica e também a viscosidade constante da solução, de forma a auxiliar no transporte das espécies eletroativas para a superfície do eletrodo. Para a escolha do eletrólito de suporte, deve-se levar em conta a solubilidade, o grau de ionização bem como a capacidade de permanecer estável tanto quimicamente (não reagir com as espécies eletroativas existentes na solução), quanto eletroquimicamente, de forma a não oxidar e/ou reduzir na faixa do potencial aplicado na análise [78].

### 3.3. Potenciostato: descrição e funcionamento

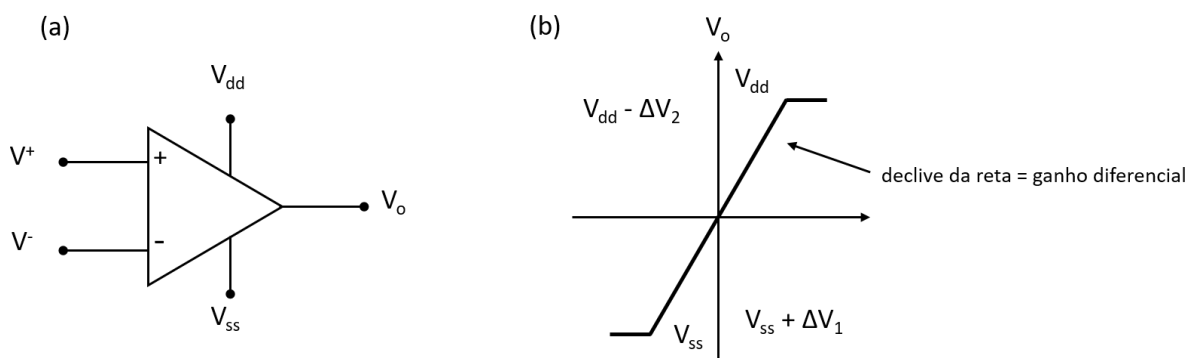
O potenciostato é um instrumento eletrônico empregado para os estudos analíticos e eletroquímicos o qual é designado para o controle da diferença de potencial de uma célula eletroquímica, entre o eletrodo de trabalho (ET), no qual há fluxo de corrente, e o eletrodo de referência (ER) no qual o fluxo de corrente deve ser mínimo ou inexistente. O potenciostato utiliza um sistema eletroquímico baseado em três eletrodos, o eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e o eletrodo auxiliar [79].

Os circuitos potenciostáticos são constituídos por amplificadores operacionais responsáveis pelo controle da tensão e leitura da corrente gerada na reação eletroquímica, que possuem três terminais de sinal e dois de alimentação [80].

Conforme ilustrado na Figura 9(a), os terminais de sinal incluem dois terminais de entrada, designados por entrada inversora  $V^-$  e entrada não inversora  $V^+$  e por uma saída  $V_o$ . Os terminais de alimentação ligam tipicamente a dois potenciais distintos, nomeadamente o potencial mais elevado  $V_{dd}$  e o potencial mais baixo  $V_{ss}$  [80].

Normalmente, o potencial  $V_{dd}$  é positivo e o  $V_{ss}$  negativo, ainda que em alguns amplificadores operacionais, o terminal  $V_{ss}$  é designado por *GND* (*ground*), por este conectar à terra. O sinal no terminal de saída é o resultado da amplificação por um ganho muito elevado ( $\sim 100\text{dB}$ ) da diferença de tensões de entrada  $V_d = V^- - V^+$ . Ainda que a amplitude do sinal diferencial de entrada  $V_d$  seja de baixa amplitude, a tensão no terminal de saída irá saturar em consequência do ganho ser muito elevado conforme Figura 9(b). Por este motivo, o amplificador não é utilizado em malha aberta e sim realimentado [80].

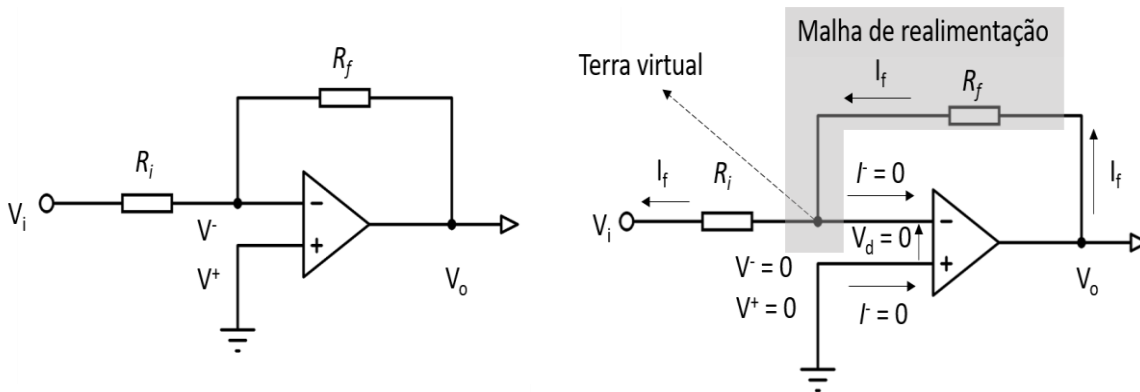
Figura 9 - Amplificador operacional: (a) Esquema elétrico de um amplificador operacional; (b) Saturação da saída do amplificador operacional.



Fonte: Figura adaptada da referência [80].

Em um potenciostato, os amplificadores normalmente são utilizados nos modos de operação inversor, não inversor, seguidor de tensão, e conversor corrente-tensão. A Figura 10 ilustra um dos métodos de operação dos amplificadores, conhecido como amplificador inversor, pelo motivo de seu sinal de saída ser defasado em  $180^\circ$  em relação à entrada.

Figura 10 - Amplificador operacional operando no modo inversor.



Fonte: Figura adaptada da referência [80].

Neste circuito, a malha de realimentação é implementada por duas resistências, o resistor de entrada  $R_i$  e o resistor de realimentação  $R_f$  (*feedback*). Assumindo que  $V^+ = V^-$  devido à realimentação negativa, o valor da entrada inversora pode ser considerado como um terra virtual, portanto  $V^- = 0V$ . Nesta situação a corrente na malha de realimentação é expressa conforme a equação 7 [80].

$$I_f = \frac{(V_o - V^-)}{R_f} = \frac{V_o}{R_f} \quad (7)$$

As correntes que entram no amplificador operacional neste modo de realimentação negativa são nulas ( $I^+ = I^- = 0A$ ), logo o valor de  $I_f$  pode ser expresso conforme a equação 8.

$$I_f = \frac{(V^- - V_i)}{R_i} = -\frac{V_i}{R_i} \quad (8)$$

Igualando a equação 7 com a equação 8 obtém-se o valor da tensão de saída  $V_o$ , expressa pela equação 9.

$$V_o = -\frac{R_f}{R_i} V_i \quad (9)$$

Na configuração não inversora, conforme ilustrado na Figura 11, o sinal de saída é o mesmo da entrada, ou seja, sem a inversão do sinal de entrada. A malha de realimentação é também implementada por duas resistências  $R_i$  e  $R_f$ . Considerando que o sinal da entrada inversora é igual ao da entrada não inversora, tem-se que  $V^- = V^+ = V_i$ , e a corrente na malha de realimentação pode ser expressa conforme equação 10 [80].

$$I_f = \frac{(V_o - V^-)}{R_f} = \frac{(V_o - V_i)}{R_f} \quad (10)$$

Como definido anteriormente, as correntes de entrada dos amplificadores operacionais são nulas ( $I^+ = I^- = 0A$ ), e o resultado de  $I_f$  pode ser deduzido conforme equação 11.

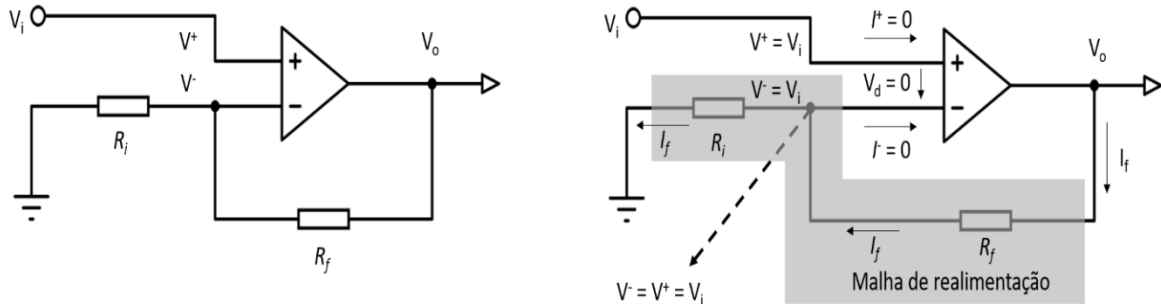
$$I_f = \frac{V^- - V_i}{R_i} = \frac{V_i - V_i}{R_i} \quad (11)$$

Igualando a equação 10 com a equação 11 obtém-se o valor da tensão de saída  $V_o$ , conforme expresso pela equação 12.



$$V_o = \left(1 + \frac{R_f}{R_i}\right) \cdot V_i \quad (12)$$

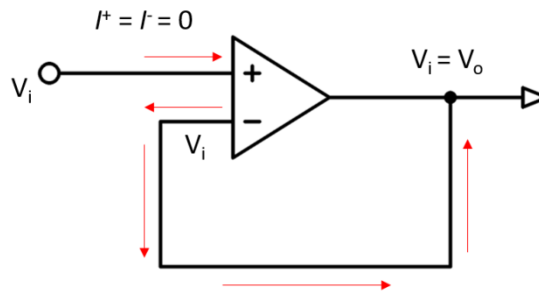
Figura 11 - Amplificador operacional operando no modo não inversor.



Fonte: Figura adaptada da referência [80].

Neste modo de operação, a resistência de entrada é muito elevada, pois a corrente de entrada é praticamente nula. Dessa forma, uma importante aplicação deste tipo de montagem (Figura 12), consiste em remover a resistência de entrada  $R_i$ , e ligar diretamente a saída  $V_o$  à entrada inversora ( $R_f = 0 \Omega$ ), designando este método como um seguidor unitário de tensão, pois a tensão de saída  $V_o$  é igual à entrada  $V_i$  [80].

Figura 12 - Amplificador operacional operando no modo seguidor de tensão.

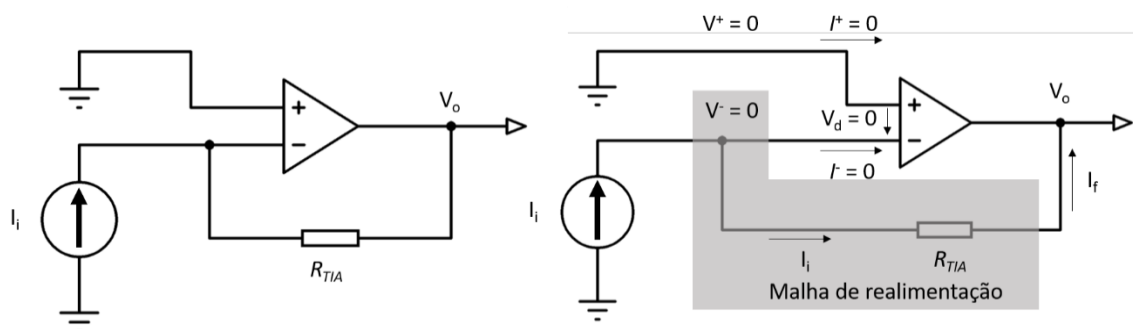


Fonte: Figura adaptada da referência [80].

Em um amplificador operacional operando no modo de conversor corrente-tensão, ou também denominado de amplificador de transimpedância, conforme ilustrado na Figura 13, é utilizado um resistor ( $R_{TIA}$ ) na malha de realimentação negativa, que atua quando a corrente na entrada inversora flui sobre ele. A tensão de saída  $V_o$  corresponde à corrente de entrada  $I_i$ , expresso pela equação 13 [80].

$$V_o = -R_{TIA} \cdot I_i \quad (13)$$

Figura 13 - Amplificador operacional operando no modo conversor corrente-tensão.



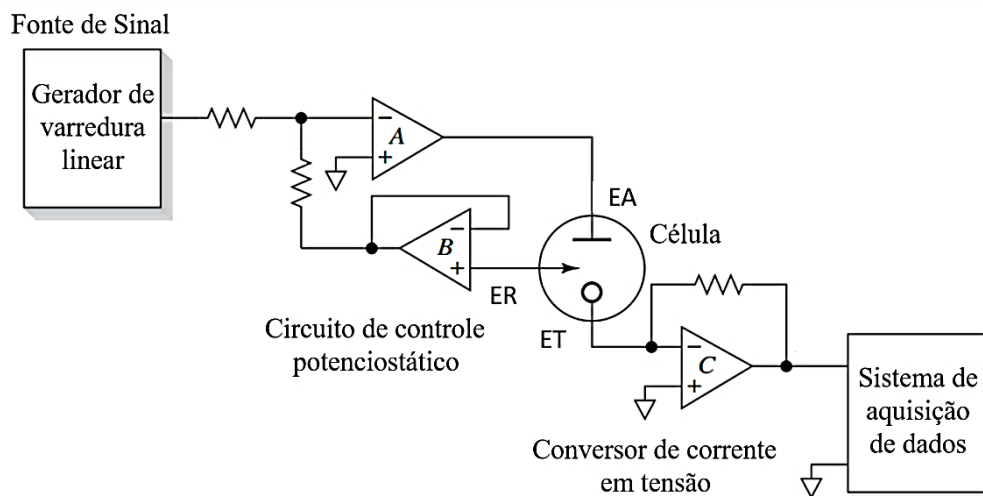
Fonte: Figura adaptada da referência [80].

O circuito de um potenciostato é apresentado na Figura 14, onde o eletrodo auxiliar é conectado a um amplificador operacional de controle (A) operando no modo inversor, o qual tem como função fornecer o fluxo de corrente na célula eletroquímica entre o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho, e manter a diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho em um valor definido pelo gerador de tensão de varredura [81].

O eletrodo de referência é conectado à entrada não inversora de alta impedância de um amplificador operacional (B) operando como seguidor unitário de tensão, de modo a evitar os erros e distúrbios no eletrodo de referência, uma vez que, neste modo de operação, o amplificador impede a passagem de corrente pelo eletrodo de referência não alterando assim o seu potencial. A saída do amplificador (B) é conectada ao amplificador (A) de forma a realimentar negativamente o circuito potenciostático [81].

A corrente resultante do potencial aplicado entre os eletrodos de referência e de trabalho é monitorada pelo amplificador operacional (C) que atua como um conversor de corrente tensão, onde a corrente gerada na reação é convertida proporcionalmente em um valor de tensão pelo resistor conectado na malha de realimentação, sendo possível adquirir este sinal por uma entrada analógica de um microcontrolador [81].

Figura 14 - Esquema elétrico de um circuito potenciostático de uma célula eletroquímica constituída de três eletrodos (EA, ET e ER).

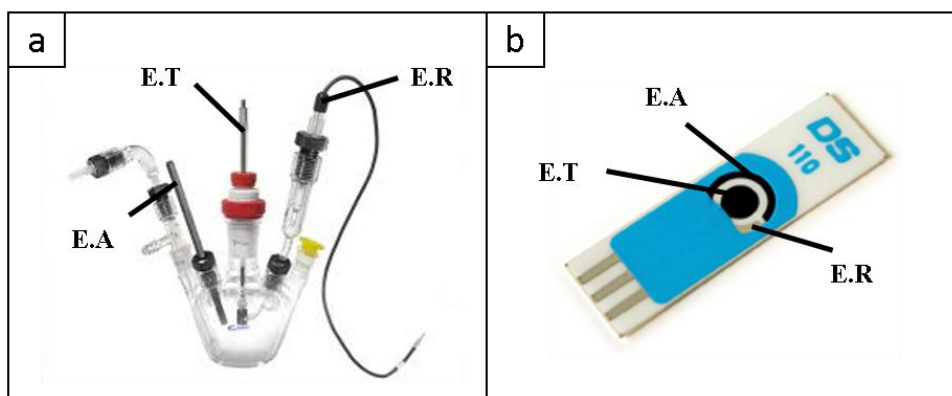


Fonte: Figura adaptada da referência [81].

### 3.4. Tecnologias para confecção de sensores

As tecnologias de filmes espessos, filmes finos e de placas de circuito impresso tem sido extensivamente utilizada com o objetivo de reduzir o tamanho das células eletroquímicas, integrando os eletrodos (trabalho, auxiliar e de referência) em um único sensor descartável (Figura 15). A vantagem dos sensores descartáveis é permitir ao dispositivo eletrônico de leitura ser usado em outras aplicações, nomeadamente em outros tipos de diagnósticos e/ou análises.

Figura 15 - Células eletroquímicas (a) convencional de três eletrodos, (b) impressa contendo os três eletrodos EA, ET e ER.



Fonte: Figura adaptada das referências [82,83].

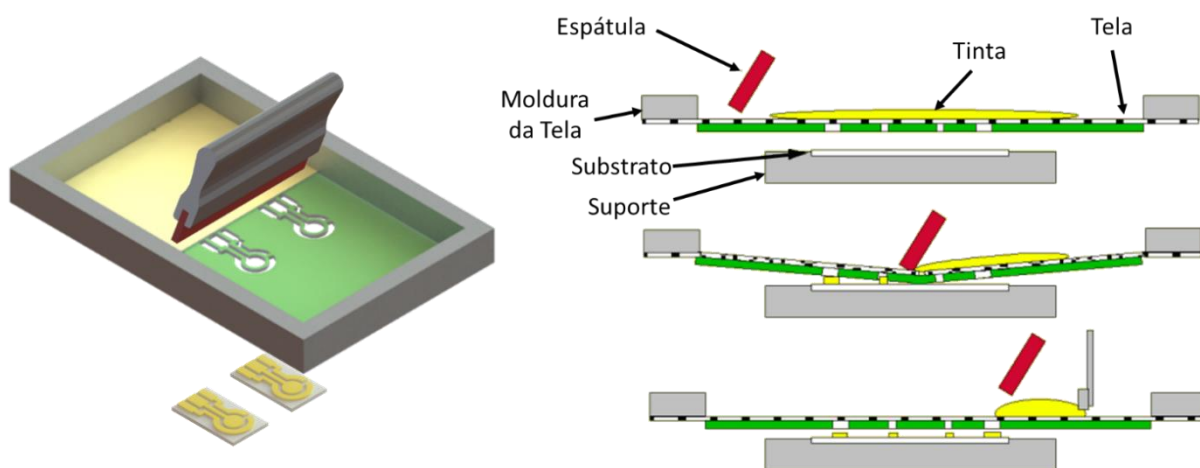
### 3.4.1. Tecnologia de filmes espessos: *Silkscreen* ou serigrafia

A tecnologia de filmes espessos consiste basicamente da deposição de camadas de tintas ou pastas condutoras na superfície de um substrato ou suporte isolante. É conhecida também como *screen-printed* ou serigrafia, onde a impressão e confecção dos sensores é realizada a partir de um molde ou tela em contato com o substrato, e a tinta é depositada por meio do padrão estabelecido no molde (Figura 16). As principais etapas para a confecção de sensores por meio desta técnica são a preparação ou seleção da tinta condutora, seleção da tela, impressão, secagem e cura [84].

Esta tecnologia de filmes espessos permite a produção de sensores robustos, de boa qualidade, além de miniaturização do sistema eletroquímico. As limitações desta técnica são referentes aos materiais utilizados para a confecção, como as propriedades e composição de tintas condutoras, e também ao processo de secagem e cura das mesmas [84,85].

Entre os principais fatores limitantes dessa técnica, destaca-se a necessidade do controle da viscosidade, da espessura das trilhas, a aderência suficiente para a fixação efetiva no substrato, a flexibilidade a fim de evitar rachaduras na superfície do eletrodo, e a resistência elétrica que deve ser a mais baixa possível. Além disto, complicados ciclos de cura podem influenciar na qualidade final do sensor, devido a evaporação de solventes presentes na composição das tintas condutoras [84].

Figura 16 - Processo de confecção de sensores pelo método de *screen-printing*.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado da referência [86].

### 3.4.2. Tecnologia de filmes finos: *Sputtering*

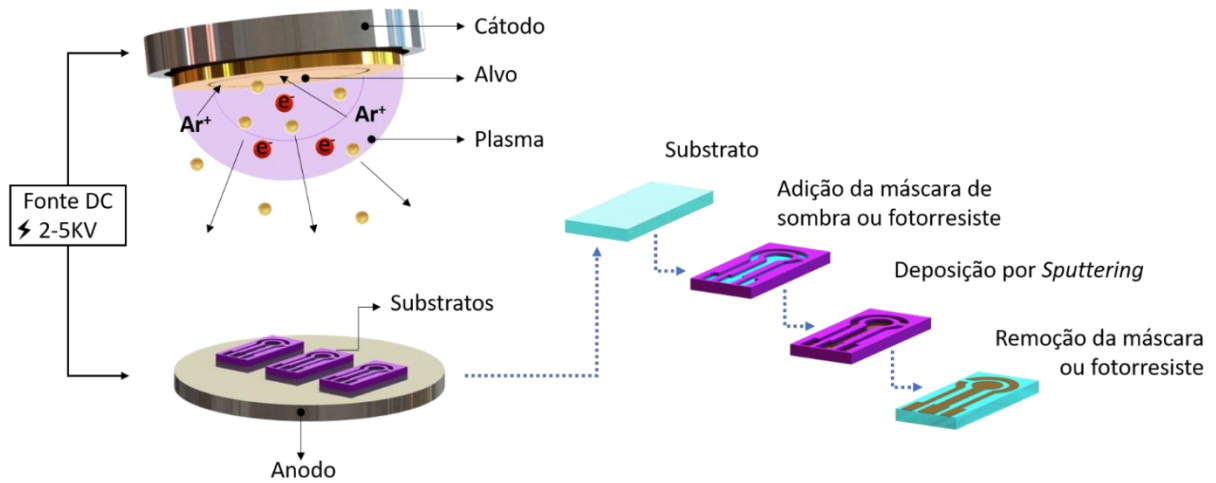
A tecnologia dos filmes finos (*thin-films*) consiste na deposição de materiais por meio de métodos físicos (*Physical Vapour Deposition* - PVD) ou químicos (*Chemical Vapour Deposition* - CVD), comumente utilizada nas indústrias de alta tecnologia para o desenvolvimento de circuitos e componentes eletrônicos, e para aplicações em diversos setores, como: telecomunicações, dispositivos ópticos e eletro-ópticos, revestimentos protetores, entre outros [85].

A deposição de filmes finos por *Sputtering* é um processo de deposição física de vapor, que consiste em depositar sobre um substrato, uma camada de átomos ejetados de um alvo por meio do bombardeamento das partículas (Figura 17). Neste procedimento, aplica-se uma descarga elétrica em uma atmosfera de argônio (por ser um gás inerte) com o intuito de reduzir a possibilidade de reação com outros íons, ocorrendo a geração de uma descarga luminescente pela ionização do gás, denominada plasma [85]. Os átomos de argônio ionizados são acelerados contra o alvo por meio da aplicação de um campo elétrico, fazendo com que os átomos do alvo sejam removidos e se depositem sobre o a superfície do substrato [85,87].

As vantagens da pulverização catódica como técnica de deposição, é que os filmes depositados possuem a mesma composição que o material de origem e as deposições dos filmes são uniformes e homogêneas. A reprodutibilidade dos filmes é controlada por parâmetros, como a temperatura do substrato, pressão de vácuo, pressão de argônio, diferença de potencial entre ânodo e cátodo, corrente no gás, tempo e distância de trabalho [88].

Essa técnica apresenta algumas desvantagens, tais como: o alto custo do equipamento utilizado, a necessidade de pureza elevada dos gases necessários para a deposição a fim de impedir que os filmes sejam impregnados por impurezas. Além disto, possui uma baixa taxa de deposição e possibilidade de degradação de alguns tipos de materiais causada pelo bombardeio de elétrons [89].

Figura 17 - Processo de deposição por Sputtering.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.4.3. Tecnologia de placa de circuito impresso (PCI)

A tecnologia de PCI (Placa de Circuito Impresso) ou também denominada de PCB, do inglês *Printed-Circuit Board*, foi patenteada pelo engenheiro austríaco chamado Paul Eisler em 1936 [90]. É uma das técnicas mais amplamente utilizadas para produção e fabricação de placas de circuitos eletrônicos e na construção de circuitos integrados, devido às vantagens de resolução, reprodutibilidade, baixo custo e capacidade de automação dos processos de fabricação [91].

As PCIs são constituídas basicamente por um substrato composto por diferentes materiais isolantes como: a fenolite, poliamida, poliéster, alumina, teflon e fibras de vidro, revestidos por uma fina camada condutora de cobre onde é impresso o circuito projetado por *software* ECAD (*Electrical Computer Aided Design*) e podem ser classificadas em placas de face simples, dupla face e multicamadas [92].

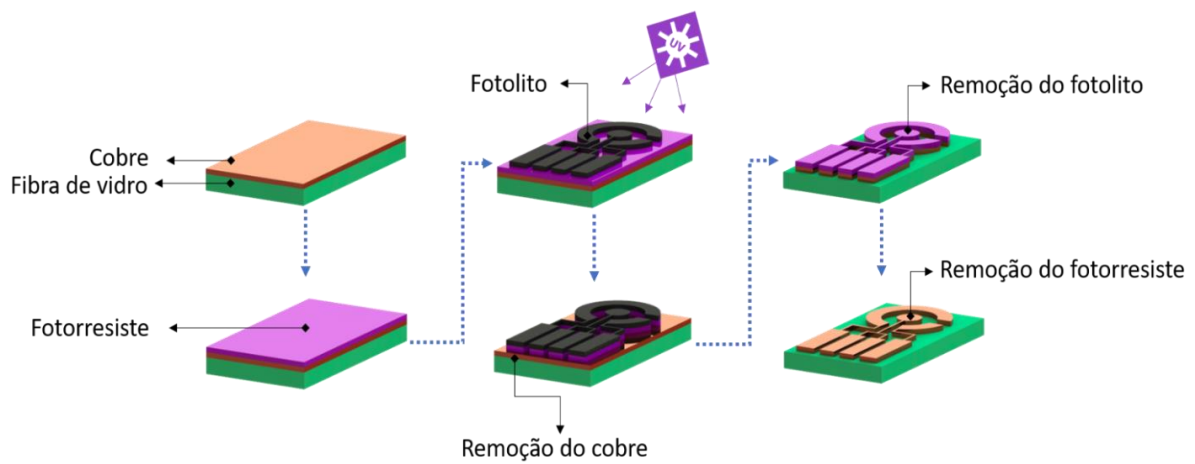
Os processos de fabricação das PCIs podem ser divididos em duas categorias: aditivos ou subtrativos. No processo aditivo ocorre a deposição do material condutor por processos de metalização ou galvanização sobre um substrato isolante, somente na área necessária para formar o circuito. Esta técnica é pouco utilizada, por se tratar de um processo industrial específico e complexo, por possuir menor capacidade de transporte de corrente elétrica e um elevado custo de produção, o que o torna inviável para produção em larga escala [93].

No processo subtrativo, ocorre a corrosão do material condutor sobre um substrato isolante, recorrendo a técnicas como a serigrafia, processo fotográfico ou térmico, onde as áreas indesejáveis do metal são removidas [93].

As etapas para a confecção de uma PCI pelo método subtrativo estão demonstradas na Figura 18, e consistem basicamente na deposição de um material fotossensível (fotorresiste ou *dry film*) na camada condutora do substrato.

O desenho (fotolito) com o respectivo circuito é adicionado sobre o material fotossensível, com o objetivo de proteger as áreas que não devem ser removidas. Uma radiação ultravioleta é aplicada sobre o fotorresiste e as áreas expostas tornam-se solúveis ou insolúveis dependendo do tipo do fotorresiste empregado (negativo ou positivo). A remoção do material metálico é realizada por meio de uma solução química, formando o circuito previamente projetado. Esta técnica é, portanto, a mais utilizada industrialmente na confecção de circuitos eletrônicos e produção em larga escala [93].

Figura 18 - Processo subtrativo de fabricação de circuitos pela tecnologia de PCI.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.4.3.1. *Electroplating*

A técnica de *electroplating*, também denominada de galvanoplastia ou eletrodeposição aplicada na confecção de placas de circuitos eletrônicos, consiste num processo eletrolítico de deposição ou revestimento de superfícies condutoras pela ação de uma corrente elétrica. O processo ocorre numa célula eletrolítica de dois eletrodos: o ânodo (carga positiva) e o cátodo (carga negativa), onde a superfície que se deseja depositar é imersa em uma solução condutora contendo os íons do metal desejado (cobre, níquel, ouro ou prata), conectada ao cátodo da fonte. Neste processo, a corrente elétrica transporta os elétrons do ânodo para o cátodo, fazendo com que os íons metálicos dissolvidos na solução migrem e se depositem na superfície condutora [94].

Para que o processo de eletrodeposição permita a qualidade e adesão das camadas metálicas, é fundamental o tratamento da superfície por meio de solventes ou soluções desengraxantes aquosas alcalinas, ou eletrolíticas compostas de tensoativos como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, fosfatos, silicatos e carbonatos [95].

A solução alcalina tem como função a remoção de sujeiras pesadas como graxa, óleo e gordura, enquanto a eletrolítica é responsável pela remoção fina de sujeiras e gorduras sobre a superfície condutora, através da redução das moléculas de água que provocam a formação do gás hidrogênio e do íon hidroxila, e possuem uma ação de limpeza sobre a superfície [95].

Antes da deposição do metal desejado, um último tratamento é realizado para remover óxidos e proporcionar uma excelente adesão. Nesta etapa é realizado um ataque químico utilizando soluções aquosas de ativação, geralmente compostas por ácidos sulfúrico, nítrico, clorídrico ou fosfórico [95].

No processo de eletrodeposição a espessura da camada metálica pode ser controlada pelo tempo de deposição e corrente aplicada expressa pela lei de Faraday, conforme equação 14 [93].

$$W = \frac{ItA}{nF} , \quad (14)$$

onde  $W$  é a massa do metal em gramas (g);  $I$  a corrente em ampere (A);  $t$  o tempo de deposição em segundos (s);  $A$  é o peso atômico do metal (g/M);  $n$  o número de elétrons envolvidos na redução de íons metálicos; e  $F$  a constante de Faraday (96,485 C / mol).



## CAPÍTULO 4

### Desenvolvimento e caracterização dos sensores eletroquímicos

#### 4.1. Introdução

Neste capítulo serão descritos os procedimentos, técnicas e materiais empregados na confecção dos sensores eletroquímicos amperométricos, suas respectivas caracterizações e análises eletroquímicas.

#### 4.2. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos estudos foram: Ferricianeto de potássio [ $K_3Fe(CN)_6$ ], Sigma Aldrich M.M.= 329,25 g.mol<sup>-1</sup>. Ferrocianeto de potássio [ $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ], Sigma Aldrich M.M.= 422,39 g. mol<sup>-1</sup>. Fosfato de potássio monobásico anidro ( $KH_2PO_4$ ), Sigma Aldrich M.M.= 136,09 g.mol<sup>-1</sup>. Fosfato de sódio dibásico heptahidratado ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ), Sigma Aldrich M.M.= 268,07 g.mol<sup>-1</sup>. Hidróxido de sódio (NaOH), Sigma Aldrich M.M.= 40,00 g.mol<sup>-1</sup>. As soluções de desengraxe, ativação, ouro e prata empregados no processo de *electroplating* foram obtidas da empresa MarchGold.

#### 4.3. Potenciostato

As medidas eletroquímicas de referência para análise e caracterização dos sensores, bem como os principais parâmetros para o desenvolvimento da plataforma de diagnóstico portátil, foram padronizadas utilizando um potenciostato/galvanostato comercial Autolab modelo PGSTAT 128N da Metrohm acoplado a um computador para análise e aquisição de dados, e *software* NOVA 1.10.

#### 4.4. Análises e caracterizações eletroquímicas

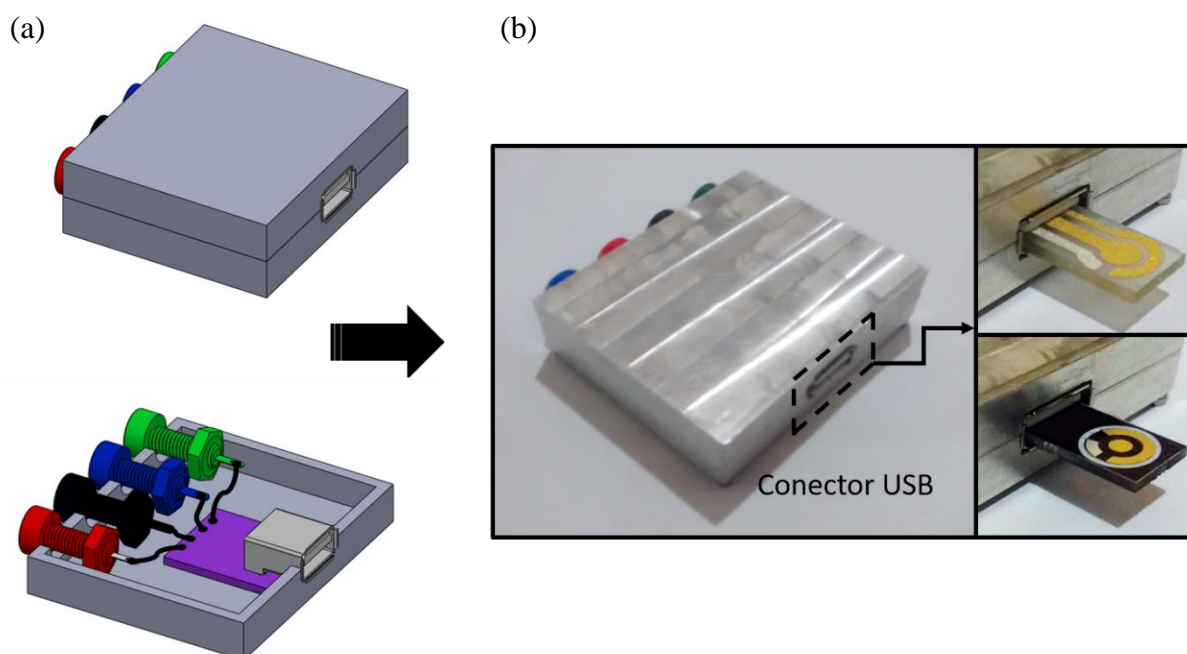
Para as análises de reprodutibilidade e estabilidade dos sensores, foram realizadas as caracterizações por voltametria cíclica, onde foram estabelecidas as mesmas condições e parâmetros, usando uma solução redox de ferrocianeto de potássio 10mmol.L<sup>-1</sup> em eletrólito

suporte de Tampão fosfato-salino (ou *Phosphate Buffered Saline* – PBS)  $100\text{mmol.L}^{-1}$  com pH de 7,4. O potencial aplicado para os estudos voltamétricos foi de  $-200\text{mV}$  a  $600\text{mV}$  com velocidade de varredura de  $100\text{mV/s}$  e 20 ciclos. As medidas foram realizadas para cada quatro sensores confeccionados pelas diferentes técnicas (*Silkscreen*, *Sputtering* e PCI).

#### 4.5. Fabricação do suporte para conexão do sensor com o potenciostato comercial

Para a realização das leituras das reações eletroquímicas por voltametria cíclica foi necessário o desenvolvimento e fabricação de um modelo específico de suporte em alumínio com conexão tipo USB, possibilitando a interligação dos sensores fabricados por *Sputtering* e PCI ao potenciostato comercial (Autolab), conforme Figura 19.

Figura 19 - Suporte de alumínio (a) projetado e (b) confeccionado para a conexão dos sensores eletroquímicos desenvolvidos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6. Fabricação dos sensores eletroquímicos

O sensor foi desenvolvido utilizando o ouro (Au) como material nos eletrodos de trabalho e auxiliar, uma vez que apresenta uma boa condutividade elétrica e possui a capacidade de ser inerte às reações de oxidação-redução presentes nos estudos eletroquímicos. O material utilizado para a construção do eletrodo de referência foi a prata (Ag).

#### 4.6.1. Tecnologia de filmes finos – *Sputtering*

Os sensores confeccionados por esta técnica foram projetados com o auxílio de *software* vetorial (*Corel Draw X7*) e de design 3D *SolidWorks 2016*, conforme ilustrado na Figura 20, onde foram confeccionadas máscaras de sombra impressa por tecnologia 3D para a deposição por *Sputtering*, conforme seção 3.4.2.

Figura 20 - Projeto e confecção dos sensores por *Sputtering*: (a) esboço do sensor projetado por *software* de desenho vetorial; (b) imagem real do sensor desenvolvido por *Sputtering*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os eletrodos foram depositados em um sistema de *Sputtering* fabricado pela Denton Vacuum, modelo DV-502A, constituído por uma câmara de evaporação de aço inoxidável com dimensões de 40x40x40cm<sup>3</sup>, uma fonte externa de corrente contínua (DC) Sorensen modelo DCS- 600-1.7E 1010 W, e uma fonte de rádio frequência modelo R601 acoplada a um casador de impedância MC2 da Kurt J. Lesker (Figura 21a). Possui dois canhões de magnetron *Sputtering* fabricados pela Kurt J. Lesker, modelo TORUS 2HV. Estes canhões podem ser utilizados em conjunto (Figura 21b), no caso da deposição de dois materiais ao mesmo tempo, ou separadamente, utilizando sistemas de descarga luminescente diferentes DC (*Direct Current*) ou RF (*Radio Frequency*). O suporte para a deposição dos eletrodos é constituído por aço inox, e possui um sistema de rotação de 0 a 60 rpm, utilizado para permitir uma deposição uniforme dos eletrodos.

Os alvos empregados para a deposição dos eletrodos foram: um alvo puro de ouro (Au) e outro de prata (Ag); ambos fabricados pela Heraeus Vectra do Brasil Ltda e gás argônio (Ar) utilizado para criação do plasma.

Figura 21 - Sistema de deposição física a vapor: (a) *Sputtering* Denton Vacuum, (b) Canhões magnetron *Sputtering* RF e DC.

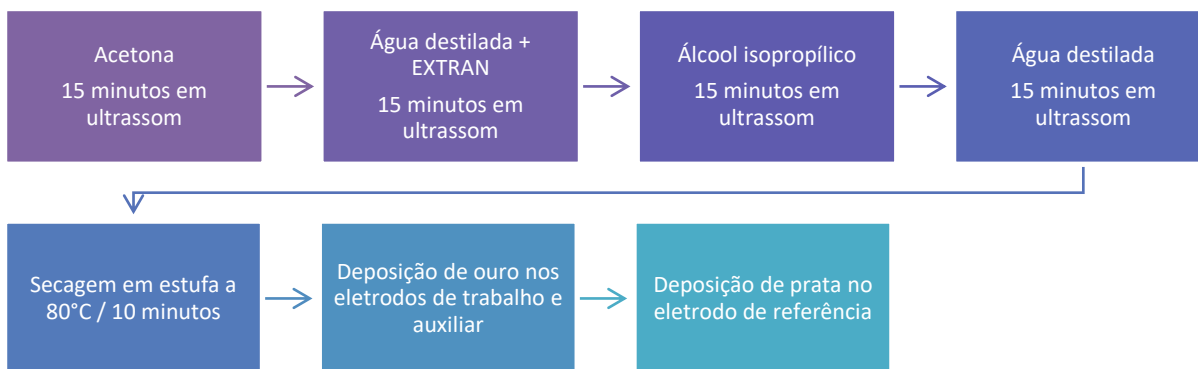


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6.1.1. Preparação do substrato e deposição por *Sputtering*

O substrato empregado para a confecção dos sensores por esta técnica foi um vidro comercial cortado nas dimensões de 25 x 11mm e espessura 2mm, com uma superfície jateada. A limpeza do substrato foi realizada a partir de solventes e agitação ultrassônica com intuito de manter a superfície limpa o suficiente e livre de contaminantes que possam interferir na adesão e qualidade dos filmes finos depositados conforme descrito na Figura 22.

Figura 22 - Diagrama referente ao processo de limpeza e deposição dos substratos por *Sputtering* dos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência.

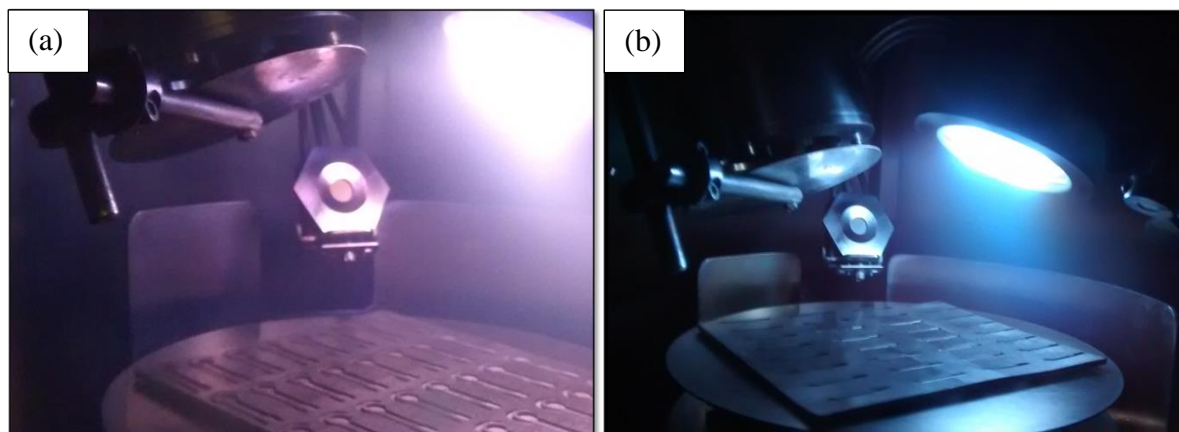


Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o processo de limpeza, os substratos foram colocados na câmara e deu-se início ao processo de vácuo para obtenção da pressão de base do sistema  $\approx 4 \times 10^{-6}$  mbar. Atingindo a pressão de base, o gás argônio foi injetado na câmara através de uma válvula de doseamento até estabilização da pressão de trabalho, em  $10^{-4}$  mbar. Com a fonte de corrente contínua DC

regulada na potência necessária foi dado início ao processo de deposição dos eletrodos de trabalho e auxiliar (Figura 23a) e do eletrodo de referência (Figura 23b).

Figura 23 - Deposição dos eletrodos por *Sputtering*: (a) eletrodos de trabalho e auxiliar (Au); (b) eletrodo de referência (Ag).

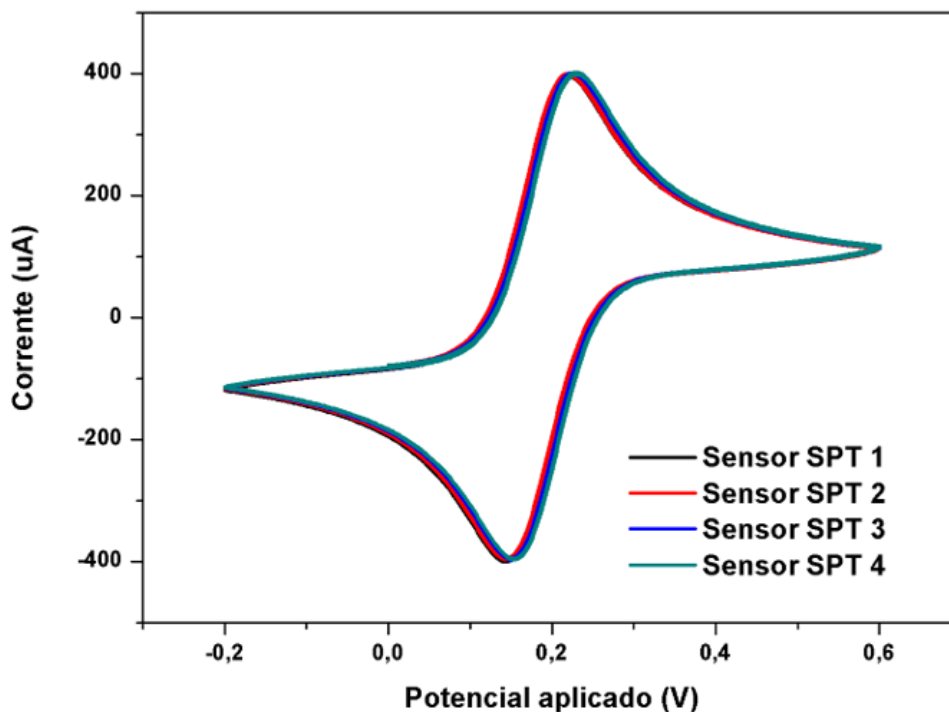


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6.1.2 Caracterização voltamétrica dos sensores por *Sputtering*

Os sensores fabricados pela metodologia de filmes finos (*Sputtering*), apresentaram excelentes reprodutibilidades conforme demonstrado nos voltamogramas da Figura 24 e Tabela 1, onde os picos catódicos e anódicos, para cada sensor produzido, ficaram mais próximo ao valor ideal de 59 mV, fator este que pode ser evidenciado na Tabela 1, o que os caracteriza como sensores eletroquímicos reversíveis ou quasi-reversíveis. Esta técnica apresentou excelente qualidade no desenvolvimento de sensores, porém como método para produção em larga escala, ainda possui custos elevados para a aplicação em diagnósticos. Entretanto, uma vez que está sendo incentivado o uso e aplicação de nanotecnologias, como o crescimento de nanoestruturas que possam aumentar a sensibilidade e limite de detecção, este sistema apresenta como um método viável na área de pesquisa e desenvolvimento[96].

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos em solução de  $5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  em  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$  de PBS para os sensores desenvolvidos pela tecnologia de filmes finos – *Sputtering* (área do eletrodo de trabalho:  $4 \text{ mm}^2$ ). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de  $600 \text{ mV}$ , potencial mínimo de  $-200 \text{ mV}$  e velocidade de varredura de  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1 - Caracterização voltamétrica dos sensores desenvolvidos pela tecnologia de filmes finos – *Sputtering*.

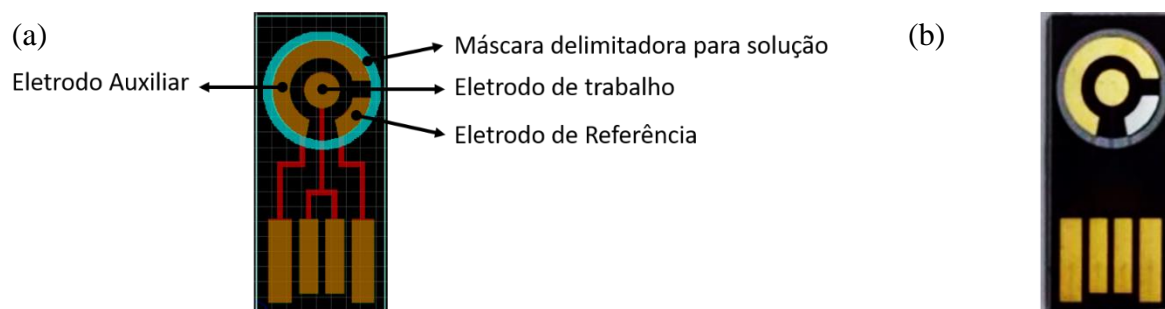
	<b><math>I_{pa}/\mu\text{A}</math></b>	<b><math>I_{pc}/\mu\text{A}</math></b>	<b><math>E_{pa}/\text{V}</math></b>	<b><math>E_{pc}/\text{V}</math></b>	<b><math> I_{pa}/I_{pc} </math></b>	<b><math>E_{pa}-E_{pc}/\text{V}</math></b>
<b>SPT 1</b>	-398,743	399,231	0,222	0,144	1,001	0,078
<b>SPT 2</b>	-394,165	400,146	0,220	0,144	1,015	0,076
<b>SPT 3</b>	-394,562	401,306	0,225	0,149	1,017	0,076
<b>SPT 4</b>	-394,409	402,618	0,227	0,154	1,021	0,073

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6.2. Tecnologia de placas de circuito impresso – PCI

Os sensores confeccionados por esta técnica foram projetados utilizando as ferramentas de design 3D – *SolidWorks* 2016 e *software* ECAD (*Electrical Computer Aided Design*) – *Proteus 8 Professional*, conforme ilustrado na Figura 25.

Figura 25 - Projeto e confecção dos sensores por PCI: (a) esboço do sensor PCI projetado por *software* ECAD; (b) imagem real do sensor desenvolvido por PCI.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As superfícies dos eletrodos foram modificadas utilizando um sistema de *electroplating* fabricado pela March Gold, modelo GOLD 1000 PLUS, constituído por cubas eletrolíticas com capacidade de até 1 L de solução, uma fonte retificadora de 20A com ajuste externo de tensão (0 a 17V) e ajuste automático de corrente, onde foi realizado os processos de desengraxe, ativação e deposição do ouro e da prata.

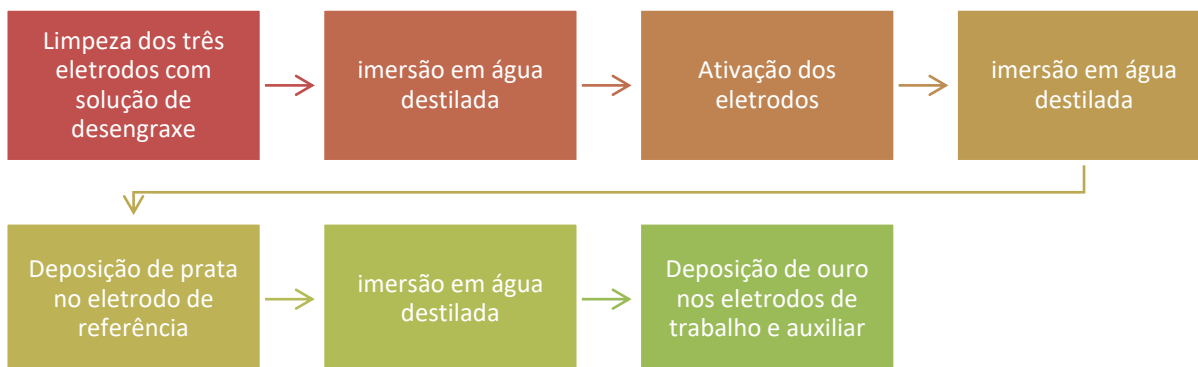
##### 4.6.2.1. Preparação do substrato e deposição por *Electroplating*

O substrato empregado para a deposição dos eletrodos foi a fibra de vidro (FR-4) nas dimensões de 25 x 11mm e espessura de 1,6mm revestida por uma fina camada de cobre de 1oz de espessura (34,8  $\mu\text{m}$ ). Os sensores foram fabricados pelo processo subtrativo conforme seção 3.4.3 e a superfície condutora de cobre foi revestida pelo processo de *electroplating*, conforme seção 3.4.3.1. Os eletrodos de trabalho e eletrodo auxiliar foram modificados com ouro e o eletrodo de referência por prata.

O processo de limpeza e deposição dos eletrodos confeccionados por esta técnica estão demonstrados nas Figuras 26 e 27, respectivamente.



Figura 26 - Diagrama referente ao processo de limpeza e deposição por *Electroplating* dos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 27 - Modificação dos eletrodos por *Electroplating*: (a) Sistema de deposição por *electroplating*; (b) deposição dos eletrodos de referência, trabalho e auxiliar.



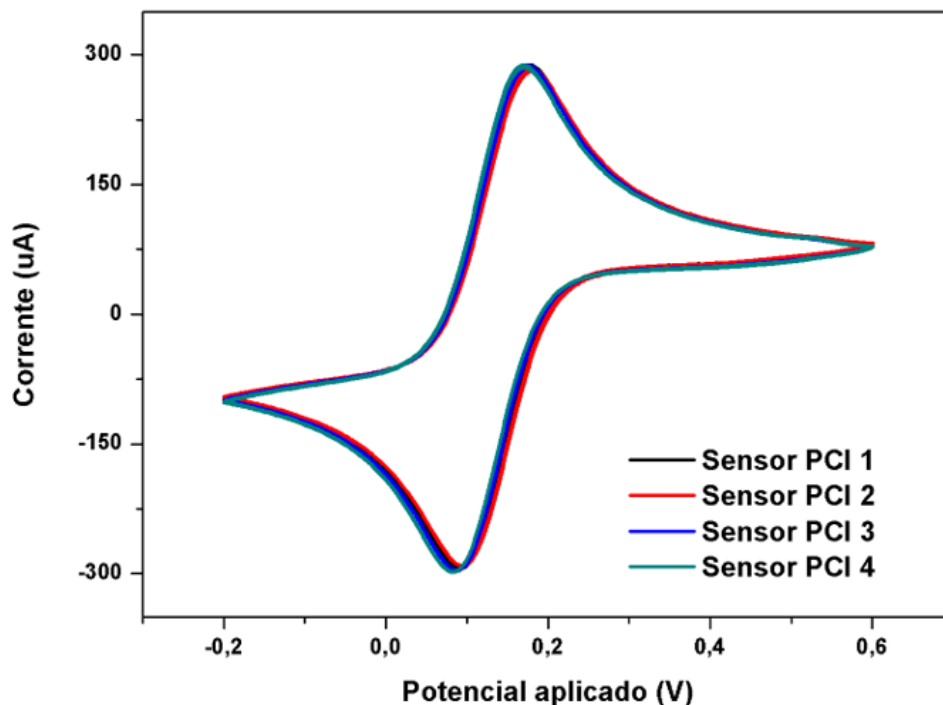
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6.1.2. Caracterização voltamétrica dos sensores fabricados por PCI

Os sensores desenvolvidos pela técnica de placa de circuito impresso apresentaram assim como os sensores fabricados por *Sputtering*, uma boa reprodutibilidade e estabilidade dos picos catódicos e anódicos durante os ciclos realizados no estudo eletroquímico, conforme Figura 28. Os valores de reversibilidade dos processos de óxido-redução mostraram próximos ao valor ideal de 59 mV, característica esta que pode ser visualizada na Tabela 2. Por ser um método de baixo custo de fabricação, as placas de circuito impresso modificadas por *electroplating*, mostraram-se como uma técnica promissora para a fabricação em larga escala, podendo garantir um melhor benefício para o desenvolvimento de diagnóstico de baixo custo.



Figura 28 - Voltamogramas cíclicos em solução de  $5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe(CN)}_6$  em  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de PBS para os sensores desenvolvidos pela tecnologia de placa de circuito impresso – PCI (área do eletrodo de trabalho:  $4 \text{ mm}^2$ ). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de  $600 \text{ mV}$ , potencial mínimo de  $-200 \text{ mV}$  e velocidade de varredura de  $100 \text{ mV.s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Caracterização voltamétrica dos sensores desenvolvidos pela tecnologia de placa de circuito impresso – PCI.

	$I_{pa}/\mu\text{A}$	$I_{pc}/\mu\text{A}$	$E_{pa}/\text{V}$	$E_{pc}/\text{V}$	$ I_{pa}/I_{pc} $	$E_{pa}-E_{pc}/\text{V}$
<b>PCI 1</b>	-293,304	288,788	0,176	0,090	0,985	0,085
<b>PCI 2</b>	-290,405	285,339	0,178	0,093	0,983	0,085
<b>PCI 3</b>	-290,405	285,339	0,178	0,093	0,983	0,085
<b>PCI 4</b>	-295,532	288,330	0,173	0,088	0,976	0,085

Fonte: Elaborado pelo autor.

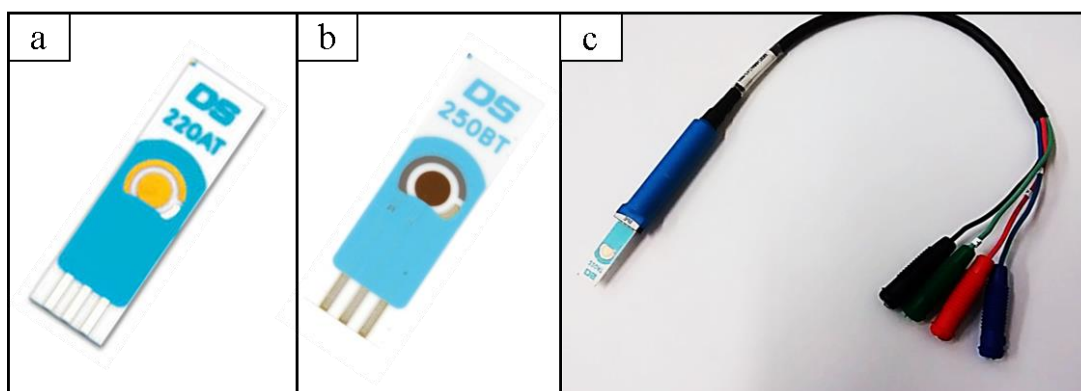
#### 4.6.3. Sensor impresso comercial como controle

Sensores comerciais da marca DROPSSENS confeccionados pela técnica de *Silkscreen*, foram empregados para o estudo de reprodutibilidade e estabilidade de modo a ser um comparativo com os sensores desenvolvidos. Dois tipos de sensores fabricados por essa

tecnologia (250BT e 220AT) foram aplicados para o estudo; um composto por eletrodos de trabalho e auxiliar de ouro, eletrodo de referência de prata e cura das tintas em alta temperatura (Figura 29a); e o outro é constituído de eletrodo de trabalho de ouro, eletrodo auxiliar de platina, eletrodo de referência de prata e cura das tintas em baixa temperatura (Figura 29b).

O substrato utilizado nestes sensores é de alumina com dimensão de 33x10mm e espessura de 0,5mm. Para promover a conexão destes sensores com o potenciostato foi utilizado um cabo CAC (Figura 29c) também proveniente da empresa DROPSSENS.

Figura 29 - Sensores impressos comerciais: (a) Eletrodo impresso 220AT; Eletrodo impresso 250BT; (c) cabo de interface sensor/potenciostato.



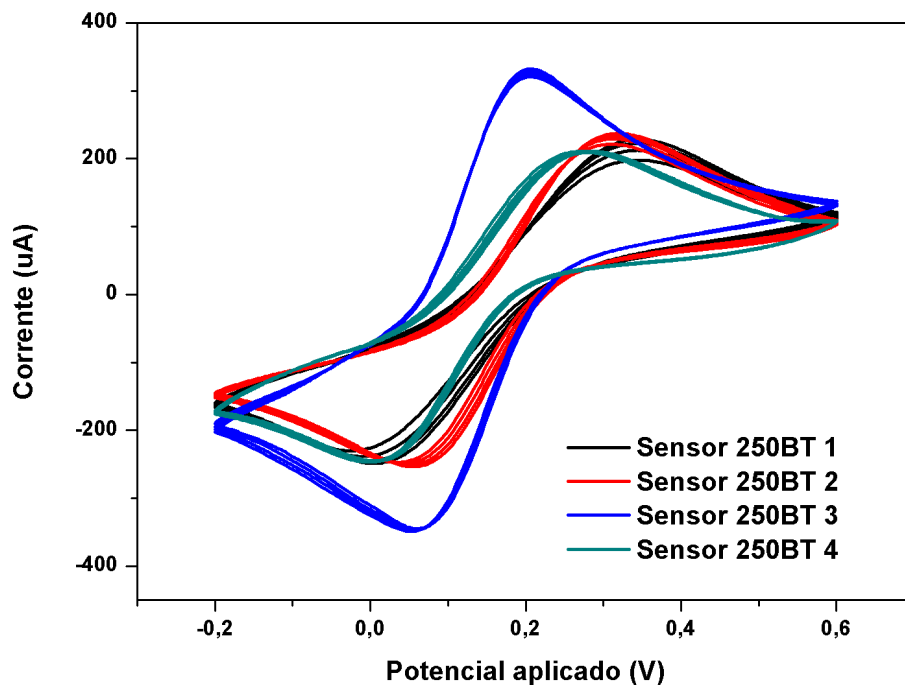
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6.3.1. Caracterização voltamétrica dos sensores comerciais

Para o uso de ambos sensores comerciais (250BT e 220AT) foi necessário submetê-los a uma prévia limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho utilizando uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $5\text{mmol.L}^{-1}$ , pois sem esse tratamento não é possível obter voltamogramas coerentes, devido às impurezas presentes na superfície destes eletrodos.

Conforme resultados voltamétricos (Figura 30) obtidos para o sensor comercial de baixa temperatura de cura (Sensor 250BT), estes apresentaram uma grande variabilidade nos picos catódico e anódicos, bem como o potencial de reversibilidade que pode ser observado na Tabela 3. Um total de 20 ciclos de varredura de potencial foi realizado para cada sensor. Neste caso, observa-se que a reprodutibilidade entre os quatro sensores fornecidos pelo mesmo fabricante foi muito baixa, o que inviabiliza sua aplicação em sistemas diagnósticos que exigem elevada precisão e exatidão analíticas.

Figura 30 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol.L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> em 0,1 mol. L<sup>-1</sup> de PBS para os sensores comerciais 250BT (área do eletrodo de trabalho: 4mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 600 mV, potencial mínimo de -200 mV e velocidade de varredura de 100 mV.s<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Caracterização voltamétrica dos sensores comerciais 250BT.

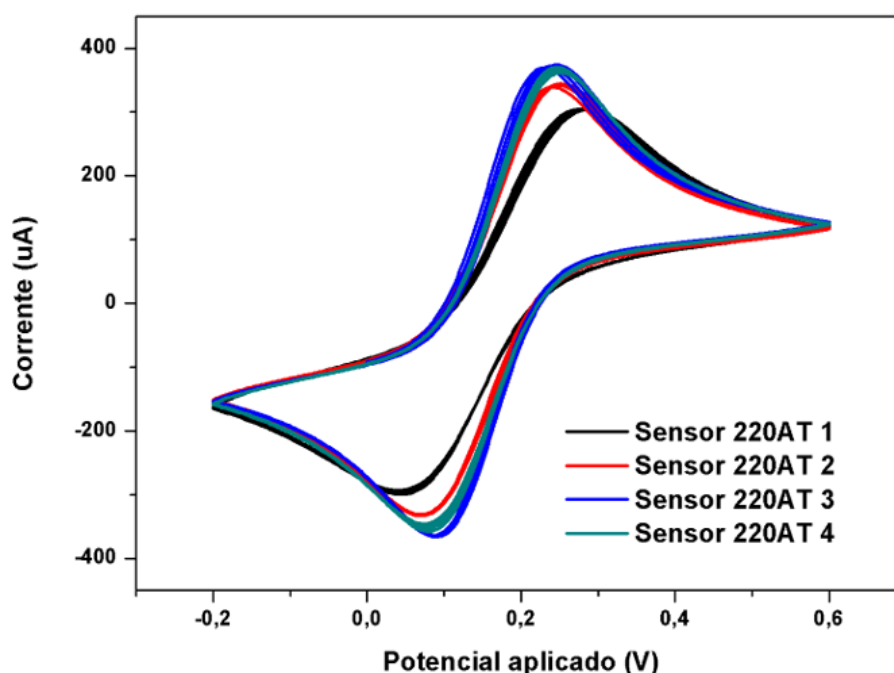
	<b>I<sub>pa</sub>/µA</b>	<b>I<sub>pc</sub>/µA</b>	<b>E<sub>pa</sub>/V</b>	<b>E<sub>pc</sub>/V</b>	<b> I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> </b>	<b>E<sub>pa</sub>-E<sub>pc</sub>/V</b>
<b>250BT 1</b>	-248,932	228,058	0,344	0,007	0,916	0,337
<b>250BT 2</b>	-253,632	237,152	0,320	0,054	0,935	0,266
<b>250BT 3</b>	-345,032	332,092	0,208	0,061	0,962	0,146
<b>250BT 4</b>	-246,979	210,876	0,273	0,002	0,854	0,271

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os sensores comerciais produzidos com alta temperatura de cura (Sensor220AT), Figura 30 e Tabela 4, apresentaram melhor qualidade em relação à reprodutibilidade dos picos catódicos e anódicos entre os 4 sensores, quando comparados aos sensores de baixa cura (Figura 30). Embora os picos de redução e oxidação tenham melhor reprodução, ainda são observadas variações importantes que poderiam comprometer os resultados analíticos em testes que exijam maior acurácia, como é o caso dos testes diagnósticos.

Em ambos sensores comerciais, observam-se uma diferença de potencial entre os picos catódicos e anódicos ( $\Delta E_p$ ) superior a 200mV, apresentando por consequência uma irreversibilidade das reações de óxido-redução. Este é um aspecto de relevância na caracterização dos sensores eletroquímicos, sendo a reversibilidade um importante parâmetro de qualidade, onde o valor ideal da  $\Delta E_p$  deve estar mais próximo a 59mV (ver equação 4).

Figura 31 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol.L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> em 0,1 mol. L<sup>-1</sup> de PBS para os sensores comerciais 220AT (área do eletrodo de trabalho: 4mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 600 mV, potencial mínimo de -200 mV e velocidade de varredura de 100 mV.s<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Caracterização voltamétrica dos sensores comerciais 220AT.

	<b>I<sub>pa</sub>/µA</b>	<b>I<sub>pc</sub>/µA</b>	<b>E<sub>pa</sub>/V</b>	<b>E<sub>pc</sub>/V</b>	<b> I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> </b>	<b>E<sub>pa</sub>-E<sub>pc</sub>/V</b>
<b>220AT 1</b>	-295,654	307,861	0,283	0,044	1,041	0,239
<b>220AT 2</b>	-330,780	339,081	0,242	0,071	1,025	0,171
<b>220AT 3</b>	-363,953	369,659	0,229	0,085	1,016	0,144
<b>220AT 4</b>	-356,262	375,977	0,249	0,083	1,055	0,166

Fonte: Elaborado pelo autor.

# CAPÍTULO 5

## Desenvolvimento da plataforma laboratorial portátil

### 5.1. Introdução

Neste capítulo serão descritos os procedimentos e materiais empregados no desenvolvimento da plataforma laboratorial, os componentes utilizados para a instrumentação, interface gráfica de comunicação entre a plataforma e dispositivos móveis, bem como a calibração e validação do sistema em ensaios eletroquímicos.

### 5.2 Visão geral da plataforma

O desenvolvimento da plataforma portátil de leitura eletroquímica tem como pressuposto o *design* de *hardware* e *software* que permita realizar as medidas nas mesmas condições do potenciostato. A plataforma desenvolvida deverá também atender as necessidades de aplicação em diagnósticos imunoquímicos, permitindo a redução do custo e do tempo de análise empregados nos diagnósticos atuais para VHC, sendo este sistema de leitura projetado com alimentação por bateria recarregável e hábil na transmissão e recepção dos dados para dispositivos móveis (Figura 32).

A interface gráfica do usuário para dispositivos móveis deve ser simples e de fácil manuseio e operação para ser aplicada em diagnóstico, bem como oferecer a capacidade de enviar os resultados do teste por meio de um *link* de comunicação para o profissional, que será encarregado por examinar os resultados do diagnóstico e oferecer um plano de tratamento correto.

Os principais componentes utilizados para implementação do sistema foram: um microcontrolador de alta performance com entradas e saídas analógicas/digitais de 12 bits de resolução; uma unidade de potência, constituída de uma bateria recarregável e um sistema de controle de carregamento da bateria; uma unidade potenciostática desenvolvida, um módulo de transmissão de dados sem fio via *Bluetooth* e, um sistema de armazenamento de dados por microSD, componentes estes que serão descritos na seção 5.2.1.

Figura 32 - Diagrama da plataforma do sistema de leitura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.1 Componentes utilizados para a instrumentação

Para o desenvolvimento do sistema de controle e aquisição dos dados das reações eletroquímicas, foi utilizado uma plataforma de prototipagem eletrônica de *hardware* livre Teensy 3.1, constituído de um microcontrolador MK20DX256 projetado com um microprocessador ARM Cortex-M4 de 32 bits, e frequência de trabalho de até 96MHz [97].

O Teensy 3.1 requer uma tensão de alimentação de 3.3V a 5V, possui diversas interfaces de controle e transmissão de dados UART, I<sup>2</sup>C, SPI e CAN, ideal para comunicações com equipamentos e módulos de desenvolvimento. Possui 21 entradas analógicas (ADC) de 12 bits de resolução e uma saída analógica (DAC) de 12 bits de resolução, 64Kb de memória RAM e 256 Kb de memória Flash [97].

Este tipo de plataforma oferece diversas vantagens em comparação com os existentes no mercado, devido ao seu baixo custo e capacidade de integrar ao sistema de programação *Processing* utilizado atualmente para a programação do microcontrolador Arduino (ArduinoIDE), além de possuir um tamanho pequeno, que facilita sua aplicação em sistemas portáteis, características estas que visam o objetivo deste trabalho.

Para o controle potencioestático e monitoramento da corrente gerada nas reações eletroquímicas, foi utilizado o amplificador de precisão e baixo ruído. Este circuito integrado apresenta tensão *offset* muito baixa, bem como baixa tensão de entrada e ruído de corrente. A tensão de operação suportada em fonte simples para este CI é de 1,8V a 5V, ou com fonte de alimentação dupla  $\pm 0,9V$  a  $\pm 2,5V$ , possui um ganho unitário estável, baixa distorção e ruído.

A transmissão e a recepção dos dados, sem fio, empregadas nesse projeto, consiste em um módulo *Bluetooth* HC-05 constituído por 4 pinos: o VCC e o GND para alimentação do circuito (3,3V – 6V) e os pinos RX e TX, para comunicação com o microcontrolador via porta serial. A escolha desse tipo de comunicação foi determinada pelo fato de se apresentar como uma forma simples e de baixo custo para a transmissão e recepção dos dados remotamente, além de ser uma tecnologia aplicada em diversos dispositivos móveis como os *smartphones* e *notebooks* [98].

O dispositivo responsável pelo carregamento da bateria empregado neste trabalho recorre a um circuito integrado TP4056, que consiste em um carregador linear de tensão/corrente constante para baterias de lítio, ideal para a aplicação em sistemas portáteis. O TP4056 requer tensões de trabalho entre 4,5V e 5,5V, o que o torna viável para conexão do tipo USB, além de ser protegido com um *feedback* térmico que regula a corrente de carga durante os períodos de alto consumo de energia [99].

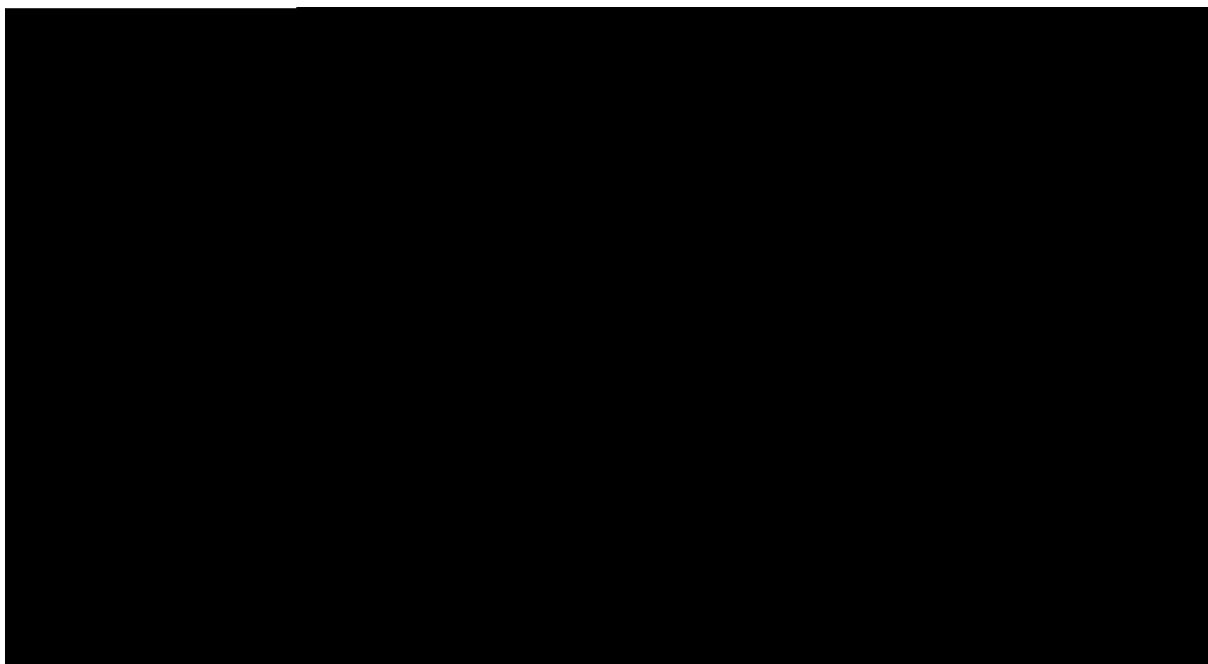
A tensão de carregamento do TP4056 é limitada a 4,2V, e a corrente de carga emitida por este dispositivo é programável através do ajuste do valor de um resistor externo ( $R_{PROG}$ ), variando de um valor mínimo de 130 mA a um máximo de 1A. O carregamento da bateria é encerrado automaticamente quando a corrente de carga cai para um décimo do valor programado, onde LED's de status indicam a situação do carregamento [99].

De modo a permitir o armazenamento interno das curvas geradas durante a reação eletroquímica, para os ensaios utilizando os sensores desenvolvidos, foi utilizado cartões de memória microSD que possuem capacidade de armazenamento de Gigabytes (Gb) e podem ser facilmente conectados ao *hardware* microcontrolado através do protocolo de interface serial (SPI – *Serial Peripheral Interface*), além dos dados poderem ser facilmente transferidos para um computador, para futuras análises e caracterizações das medidas obtidas.

### 5.2.2. Diagrama do circuito eletrônico

Na Figura 33 é apresentado o diagrama esquemático dos componentes que constituem a placa de aquisição da plataforma laboratorial. Neste diagrama é representado o microcontrolador, responsável pelo controle e aquisição dos dados da reação eletroquímica, o módulo potenciostático constituído pelos amplificadores, e o módulo *Bluetooth* para transmissão e recepção dos dados.

Figura 33 - Diagrama esquemático do circuito eletrônico projetado para a plataforma laboratorial.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme ilustrado no diagrama da Figura 33, um potencial na forma de onda triangular foi aplicado pelo microcontrolador na saída digital analógica (DAC) de 12bits. Ao passar pelo amplificador operacional  $A_1$ , configurado como modo inversor, é realizado um *offset* sem amplificação da tensão do DAC de 0 a 3V, para -1.5V a +1.5V. O potencial de *offset* passa para o amplificador operacional  $A_2$ , que opera no modo inversor. Este amplificador é conectado ao contra eletrodo (CE) ou eletrodo auxiliar que é responsável pelo controle da diferença de potencial da célula eletroquímica.

O amplificador operacional  $A_3$  opera como seguidor unitário de tensão ou buffer de corrente conectado a entrada inversora do amplificador  $A_2$ , atuando como potencial de referência para o sistema eletroquímico, onde o eletrodo de referência é conectado em sua entrada não inversora de elevada impedância.



O resultado da corrente gerada na célula eletroquímica é convertido para tensão através do amplificador operacional  $A_4$ , que opera no modo de transimpedância ou conversor corrente-tensão. Nesta configuração, a corrente elétrica drenada pelo eletrodo auxiliar chega ao eletrodo de trabalho, sendo convertida em uma tensão proporcional, a partir de um determinado resistor de precisão. Foram inclusos resistores de ganho selecionáveis no amplificador de transimpedância representado no circuito pelos resistores R7 a R10, com o intuito de obter a escala de corrente de 1 mA, 100  $\mu$ A, 10  $\mu$ A, 1  $\mu$ A que a plataforma irá operar.

De acordo com o resistor selecionado, um determinado valor de ganho do amplificador de transimpedância é estabelecido. O potencial convertido é então disponibilizado para o amplificador  $A_5$ , que opera no modo inversor. Este amplificador tem como objetivo converter o potencial previamente invertido pelo amplificador  $A_2$  para que seja disponibilizado ao sistema de medidas.

Este sinal é enviado para o amplificador operacional  $A_6$  que opera no modo somador de tensão, onde os potenciais de -1.5V a +1.5V são convertidos para 0 a 3V e disponibilizados na entrada analógica do microcontrolador (ADC), que converte o sinal analógico para digital. Os dados obtidos da medida eletroquímica são armazenados no cartão de memória e plotados em tempo real na tela do dispositivo móvel.

### 5.2.3. Desenvolvimento da célula de referência para calibração

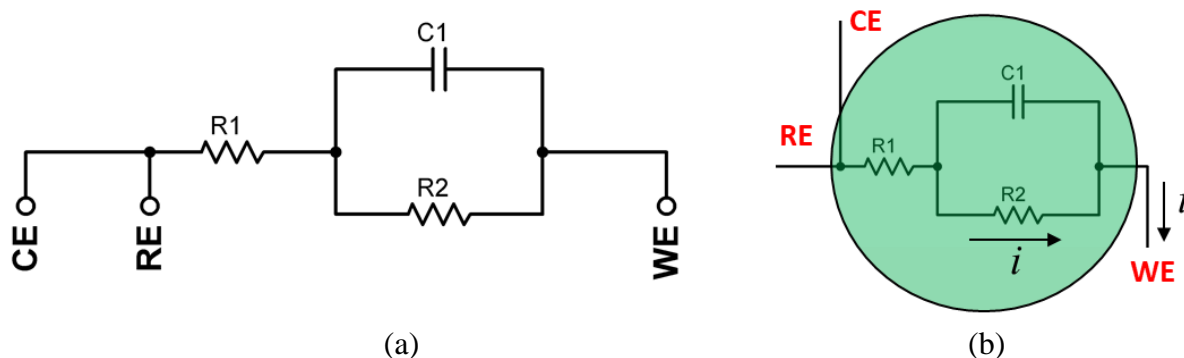
Para realizar os testes de calibração da plataforma, foi desenvolvido uma célula eletroquímica de referência, *Dummy cell*, com o propósito de simular as condições do ensaio eletroquímico, avaliar o nível de ruído, precisão e estabilidade da plataforma laboratorial.

Em sistemas eletroquímicos uma célula de referência é geralmente constituída de um resistor R1 de 100 $\Omega$  conectado nas extremidades dos eletrodos de referência e contra eletrodo, e um resistor de 1k $\Omega$  em paralelo com um capacitor (utilizado para minimizar a oscilação da fonte de entrada e filtrar sinais de alta frequência) conectado em suas extremidades o eletrodo de trabalho representado na Figura 34 (a) e (b)[100].

Os valores definidos pelas resistências da *dummy cell* devem ser proporcionais à corrente que flui para o eletrodo de trabalho. Ou seja, assumindo uma tensão de entrada de 1V e R2 igual à 1K $\Omega$ , a corrente que flui sobre o resistor deve ser de aproximadamente 1mA conforme lei de Ohm, onde  $E=iR$ . Nesta configuração, o potenciostato pode ser utilizado para configurar e calibrar uma tensão através do resistor enquanto monitora a corrente que passa

por ele por meio do amplificador de transimpedância. Para a calibração da plataforma em níveis de corrente baixa, onde os níveis de ruído são mais frequentes, foram confeccionados quatro tipos de *dummy cell*, constituídas pelos resistores de 1K, 10K, 100K e 1M, que devem fornecer uma corrente proporcional de 1mA, 100uA, 10uA e 1uA, respectivamente.

Figura 34 - Representação esquemática de uma (a) célula de referência (b) célula de referência conectada ao circuito de um potenciostato.



Fonte: Elaborado pelo autor

### 5.3. Desenvolvimento de *softwares* dedicados para a plataforma

*Softwares* foram desenvolvidos em linguagem C para o controle e aquisição de dados da plataforma desenvolvida, e, para a transmissão e recepção de dados via *Bluetooth* para dispositivos móveis foi utilizado a plataforma de desenvolvimento de aplicativos AppInventor, onde a programação é realizada através de blocos funcionais. As subseções a seguir descrevem os *softwares* utilizados para a programação do microcontrolador e desenvolvimento do aplicativo Android.

#### 5.3.1. Arduino (IDE)

A plataforma de desenvolvimento Arduino IDE (*Integrated Development Environment*), é um *software open-source*, baseado em Java, e utilizado para a programação de dispositivos Arduino. O ambiente IDE foi originado a partir das linguagens de programação *Processing* e *Wiring* (derivados de C e C++). Neste ambiente de programação os códigos e/ou algoritmos são inseridos em uma janela editor de códigos, que possui funcionalidades como indentação automática, parênteses correspondentes e realce da sintaxe[101,102].

Os programas escritos utilizando o Arduino IDE são chamados de esboços (*sketchs*) e requerem duas funções de básica instrução: o *setup* (), utilizado para inicializar as variáveis e

definir as constantes, pinos de entrada e saída do sistema; e o *loop* (), onde o usuário define um bloco de comandos a ser executado pelo sistema. Após verificado, o programa pode ser compilado para o *hardware* Arduino através do programa *avrdude* que converte o código executável em um arquivo de texto em codificação hexadecimal[101].

### 5.3.2. App inventor

O App Inventor é uma plataforma *open-source* para o desenvolvimento e criação de aplicativos para sistemas Android desenvolvida pela Google e atualmente mantida pelo MIT (*Massachusetts Institute of Technology*). Este *software* possui uma interface gráfica de programação que é acessada a partir de um navegador *Web*, e permite que usuários sem ou com pouca experiência com programação em linguagem Java possa desenvolver aplicações para dispositivos móveis[103,104].

O desenvolvimento de aplicativos nessa plataforma é composto por duas seções: a aba *Designer* e a aba *Blocks*. A janela *Designer*, é a tela inicial do projeto, na qual é criada a interface do aplicativo, com a seleção de componentes e ajustes de suas propriedades. A janela *Blocks* é a área da ferramenta na qual são associadas ações para cada componente adicionado na aba *Designer*[104].

Desenvolvido a aplicação, o usuário pode verificar o seu funcionamento por meio de um emulador disponível no próprio programa, ou realizar a comunicação com o dispositivo móvel através do aplicativo MIT AICompanion, e pareá-lo, através de um código de segurança ou QRCode. Uma vez estabelecida a comunicação, é possível alterar o aplicativo criado via *web*, o qual será modificado em tempo real no celular, otimizando os processos de testes[105].

O aplicativo pode ser transferido para o dispositivo móvel através da aba *Build* na tela inicial de desenvolvimento, onde um QRCode é gerado e através de um leitor de códigos, o aplicativo pode ser baixado e instalado. Outro modo de transferir o aplicativo para o dispositivo móvel é gerar um arquivo com extensão *.apk* que pode ser baixado e transferido via USB[105].

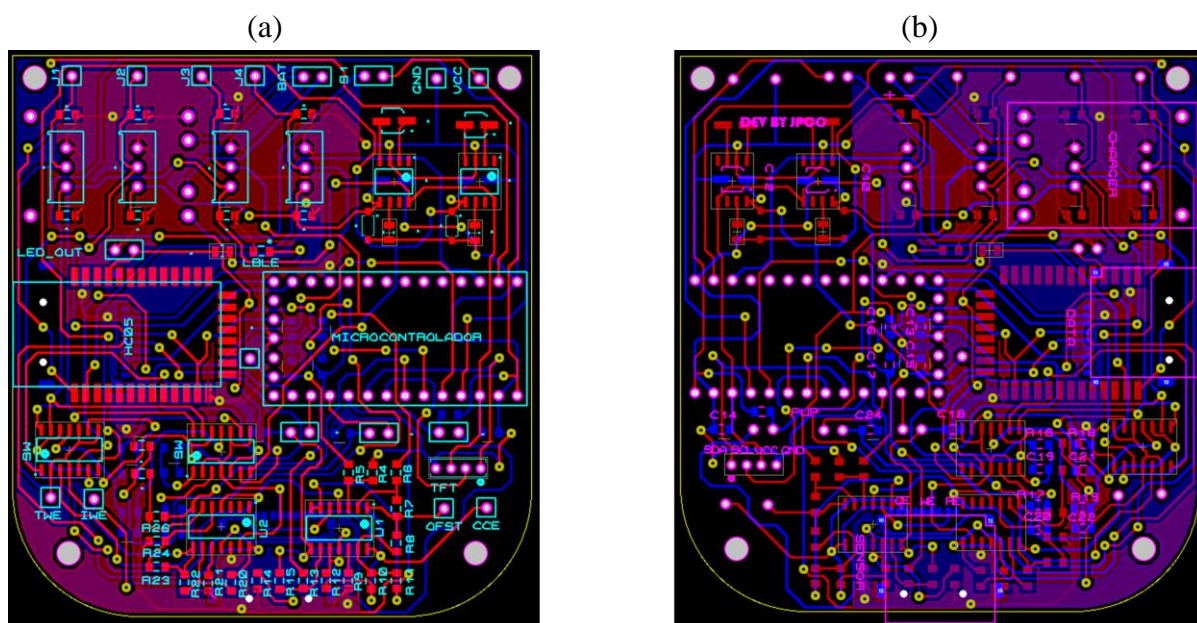
## 5.4 Resultados experimentais e discussão

### 5.4.1. Elaboração da placa de aquisição e controle da plataforma laboratorial

O circuito eletrônico da plataforma laboratorial foi projetado através de *software* ECAD, e fabricado pelo processo subtrativo. O substrato utilizado foi a fibra de vidro (FR-4) de dupla camada nas dimensões de 7,0 x 7,5cm e espessura de 1,6mm, revestida por uma fina camada de cobre de 1oz de espessura (34,8  $\mu$ m).

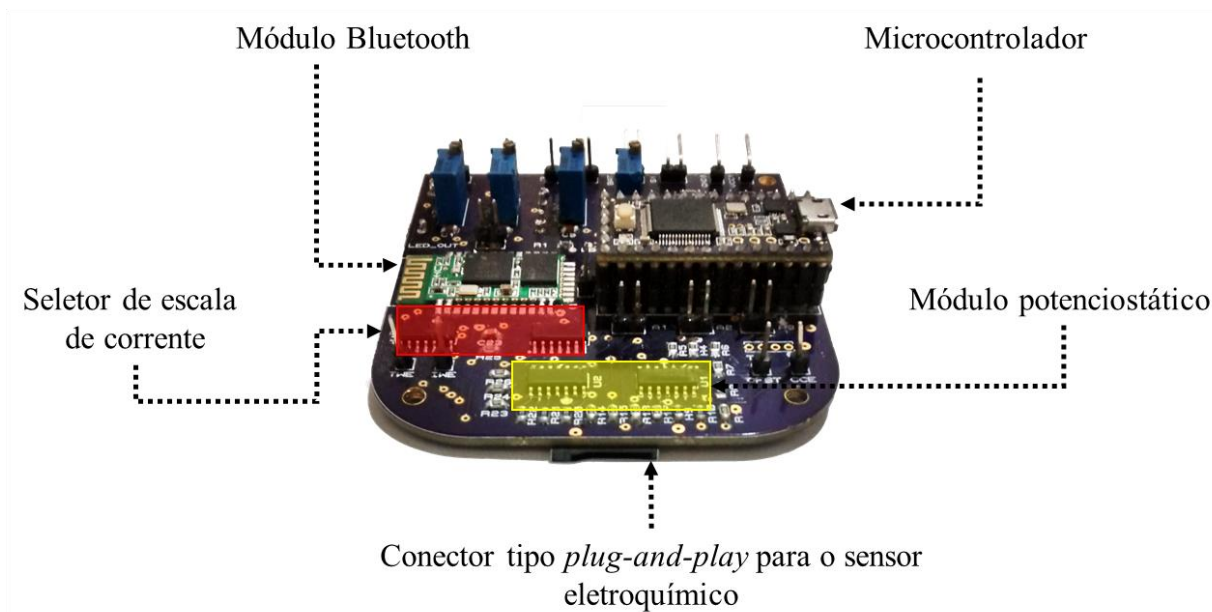
Nas Figuras 35(a) e (b) são apresentados o projeto da placa de aquisição elaborado por *software* ECAD e a Figura 36 a placa eletrônica final desenvolvida. Os componentes passivos (resistores e capacitores) empregados no sistema possuem uma precisão de entre 0,5 a 1,0 % o que permite uma boa precisão no resultado dos ensaios eletroquímicos. A seleção da escala de corrente do amplificador de transimpedância representado pelas chaves SEL na Figura 33 é realizado manualmente via chave seletora, porém na versão final da plataforma foi utilizado um *chip* seletor de resistências programado via *software*.

Figura 35 - Projeto ECAD da plataforma laboratorial portátil (a) camada superior (b) camada inferior.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 - Placa eletrônica final desenvolvida para a plataforma laboratorial portátil.

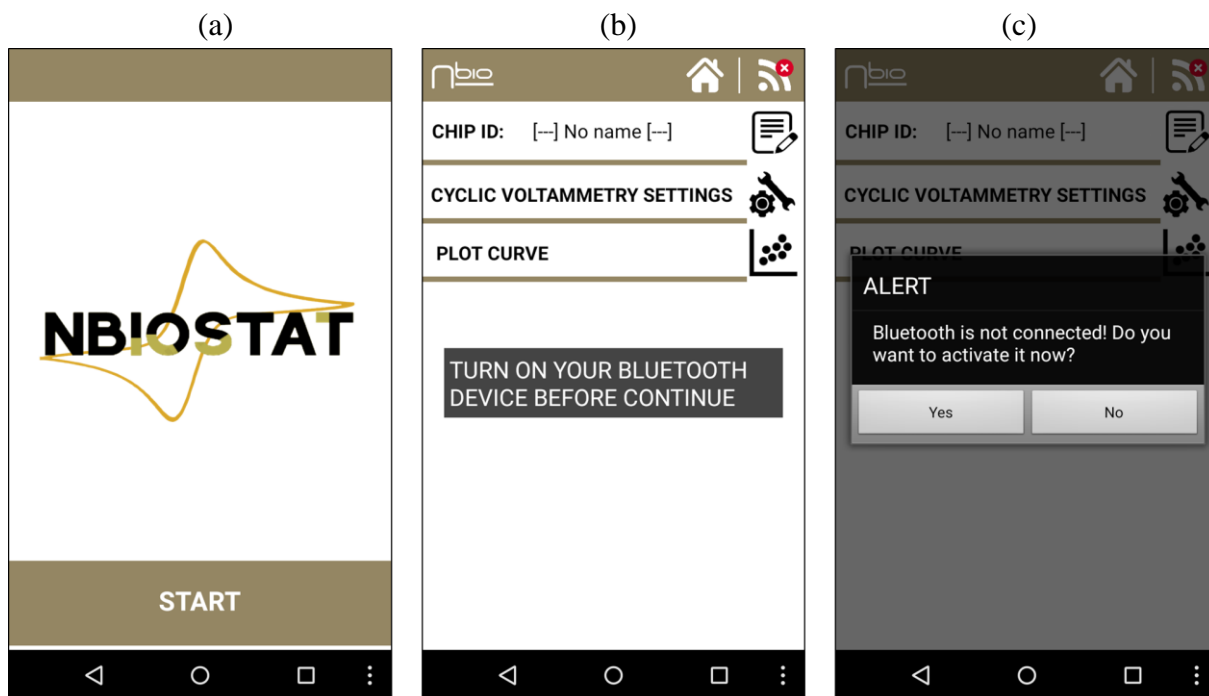


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.4.2 Aplicativo e programa desenvolvido

O aplicativo desenvolvido possui uma tela inicial (*Home*) composta pelo logotipo do sistema e um botão de inicialização (*Start*) que permite entrar na tela principal das medidas de voltametria cíclica. Esta tela, por sua vez, contém os comandos de controle e campos para a inserção dos parâmetros configurados nas medidas. Ao iniciar a tela principal, há uma verificação da conexão de comunicação *Bluetooth* com a plataforma laboratorial. Se necessário é, então, informado ao usuário a ativar a conexão *Bluetooth* para dar prosseguimento as medidas. Se o *status* do *Bluetooth* estiver ativado, o aplicativo continuará na tela principal aguardando a conexão entre o dispositivo Android e a plataforma laboratorial. Caso contrário, o usuário será solicitado a conceder a permissão ao aplicativo para ativar o *Bluetooth*. Este procedimento está ilustrado na Figura 37.

Figura 37 - Tela do APP: (a) Tela inicial, (b) Tela principal com mensagem de ativação de conexão Bluetooth e (c) alerta pedindo permissão para ativar o *Bluetooth*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 38(a) ilustra a tela principal sem conexão *Bluetooth* onde é exibido um botão com a imagem de conexão ausente no canto superior direito (círculo vermelho tracejado). Através deste botão, o dispositivo Android exibe uma lista de nomes e endereços MAC dos dispositivos móveis mais próximos disponíveis para a conexão. O usuário então seleciona o dispositivo apropriado para se conectar. Na Figura 38(b) é apresentado um exemplo do identificador da plataforma laboratorial desenvolvida que tem como endereço “20:16:12:27:68:29 NBIO”. Após a escolha adequada, o aplicativo exibe uma mensagem de confirmação, e o ícone de conexão no canto superior direito, altera para a cor verde, indicando que a conexão foi estabelecida como ilustra a Figura 38(c).

Figura 38 - Telas da interface com o usuário: (a) Telas sem conexão *Bluetooth* estabelecida, (b) lista de dispositivos próximos e (c) tela com a conexão estabelecida.

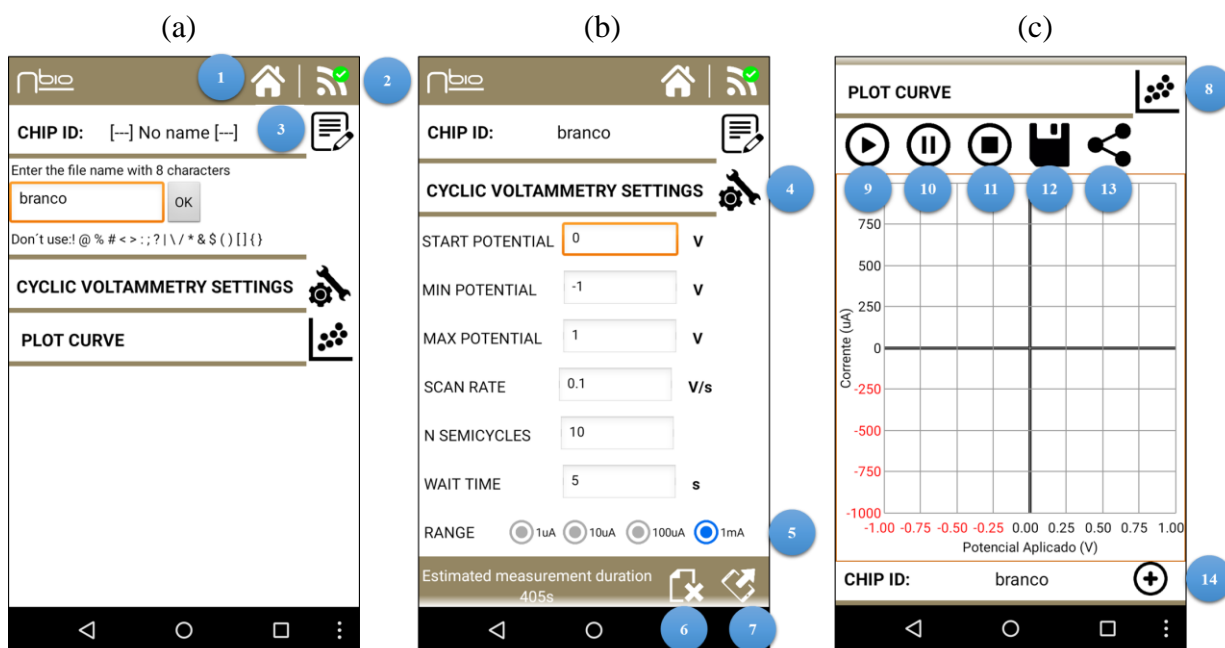


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.4.2.1. Botões e comandos da interface

A tela principal do aplicativo é composta de campos para a entrada do nome do arquivo de armazenamento das medidas, os parâmetros definidos para o ensaio eletroquímico e botões para acionar as operações e funções do sistema. Os parâmetros mais relevantes neste sistema são: as tensões inicial, mínima e máxima, faixa de corrente obtida na medida, números de ciclos e taxa de varredura, além dos comandos para plotagem e salvamentos dos dados (Figura 39).

Figura 39 -Telas de operação de medidas: (a) Definição do nome do ensaio ou medida eletroquímica, (b) configuração de parâmetros para a voltametria cíclica e (c) tela de plotagem em tempo real das medidas eletroquímicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma breve descrição das funções realizadas pelos botões da interface desenvolvida para atender as necessidades essenciais nas medidas de voltametria cíclica:

- **Botão *Home* (nº1):** Retorna a tela inicial do aplicativo limpando os parâmetros e desativando a conexão *Bluetooth*. É utilizado quando ocorre algum erro inesperado no aplicativo ou na plataforma laboratorial.
- **Botão *Bluetooth connection* (nº2):** Estabelece e mantém a conexão *Bluetooth* entre o Android e a plataforma laboratorial, listar os dispositivos pareados e ativar ou desativar a conexão.
- **Botão *Chip ID editor* (nº3):** Define ou edita o nome do arquivo de armazenamento das medidas no ensaio eletroquímico. O máximo de caracteres neste campo são 8 e não é permitido a entrada de caracteres especiais como: “%”, “:”, “/”, “\”, etc.
- **Botão *Cyclic voltammetry settings* (nº4):** Ativa os parâmetros para o ensaio eletroquímico através de um *long click* sobre a figura ferramentas. Os campos de entrada são: potenciais



inicial, mínimo e máximo, velocidade de varredura, número de ciclos e tempo de espera. Somente valores numéricos dentro dos limites do sistema são permitidos, de modo que o usuário não possa inserir valores fora da faixa estabelecida. A Tabela 5 lista os intervalos de ajuste de varredura permitidos.

Tabela 5 - Faixa de valores permitidas nos parâmetros.

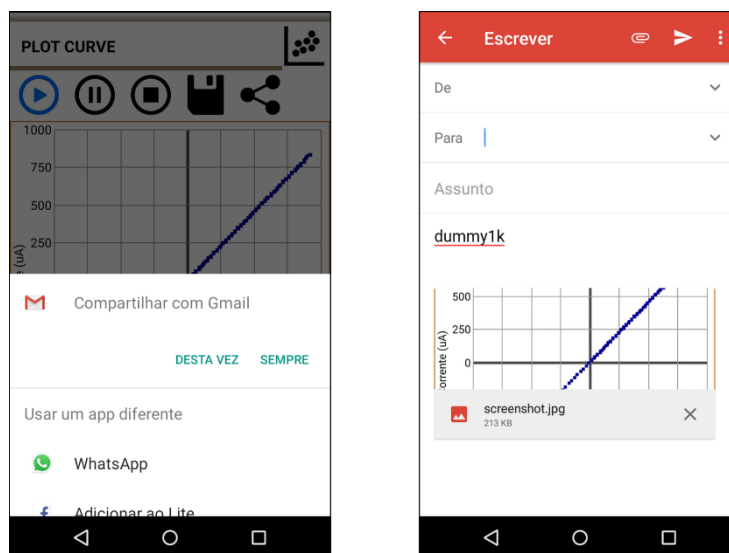
<b>Parâmetros Voltametria Cíclica</b>	<b>Unidade</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
<i>START POTENTIAL</i>	V	-1,5	1,5
<i>MIN POTENTIAL</i>	V	-1,5	1,5
<i>MAX POTENTIAL</i>	V	-1,5	1,5
<i>SCAN RATE</i>	mV.s <sup>-1</sup>	0,01	1000
<i>N SEMICYCLES</i>	-	1	4000
<i>WAIT TIME</i>	s	1	6000

Fonte: Elaborado pelo autor.

- **Botão *Current range* (nº5):** Define a faixa de corrente necessária para um ensaio eletroquímico específico através dos resistores de ganho selecionáveis. Além disso, a definição do ganho automaticamente ajusta a área de plotagem. Os ganhos podem ser de 1 mA, 100 µA, 10 µA e 1 µA.
- **Botão *Clear parameters* (nº6):** Limpa os parâmetros definidos pelo usuário na tela de configuração.
- **Botão *Send settings* (nº7):** Envia para a plataforma laboratorial os parâmetros definidos e a faixa de corrente para o ensaio eletroquímico. Ao enviar os parâmetros para a plataforma via *Bluetooth*, automaticamente é estipulado o tempo da medida em segundos.
- **Botão *Plot curve* (nº8):** Ativa a visualização em tempo real do ensaio eletroquímico através de um *long click* sobre a figura gráfico. Nesta opção, o usuário possui botões de comando para iniciar, pausar, interromper e salvar os dados do ensaio eletroquímico.
- **Botão *Start measurement* (nº9):** Executa a medida segundo os parâmetros previamente definido pelo usuário.

- **Botão *Pause measurement* (nº10):** Pausa a medição durante a varredura, mas não limpa os dados da medida. Para continuar basta clicar no botão ***Start measurement*** novamente.
- **Botão *Stop measurement* (nº11):** Interrompe a medida, mas os dados são salvos automaticamente no cartão de memória, evitando a perda de dados do ensaio realizado.
- **Botão *Save data* (nº12):** Salva a medida no cartão de memória em um arquivo no formato texto (.txt). Neste arquivo, contém o registro de tempo, os parâmetros definidos, tensão aplicada e corrente obtida, bem como o nome do ensaio.
- **Botão *Share data* (nº13):** Compartilha os resultados obtidos durante a medida via *Bluetooth*, aplicativos de mensagens, redes sociais e e-mail. A Figura 39 ilustra o compartilhamento do dado obtido durante a medida, onde é enviada a foto (*screenshot*) do experimento realizado, bem como os dados brutos para futuras análises.

Figura 40 - Compartilhamento dos resultados do ensaio eletroquímico (A) seleção do aplicativo de compartilhamento, (B) exemplo de compartilhamento via e-mail.



Fonte: Elaborado pelo autor.

- **Botão *Add new curve* (nº14):** Adiciona um novo experimento com os parâmetros anteriores definidos pelo usuário.

#### 5.4.2.2. Comunicação entre o dispositivo móvel e a plataforma laboratorial

A comunicação entre o dispositivo móvel e a plataforma laboratorial é realizada via conexão *Bluetooth* padrão entre dispositivos Android. Deste modo, quando o dispositivo Android com o aplicativo se conecta a plataforma laboratorial pela primeira vez, o usuário será solicitado a emparelhar os dois dispositivos. O emparelhamento permite que o dispositivo Android se lembre da conexão.

Assim, quando a conexão via *Bluetooth* é estabelecida, o sistema ativa o protocolo bidirecional de comunicação entre o dispositivo móvel com Android e a plataforma laboratorial. Neste momento, o aplicativo está pronto para dar prosseguimento as configurações do ensaio voltamétrico. A Figura 41 ilustra o diagrama da comunicação no sistema de medidas.

Figura 41 - Esquema de comunicação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.4.3. Calibração da plataforma laboratorial

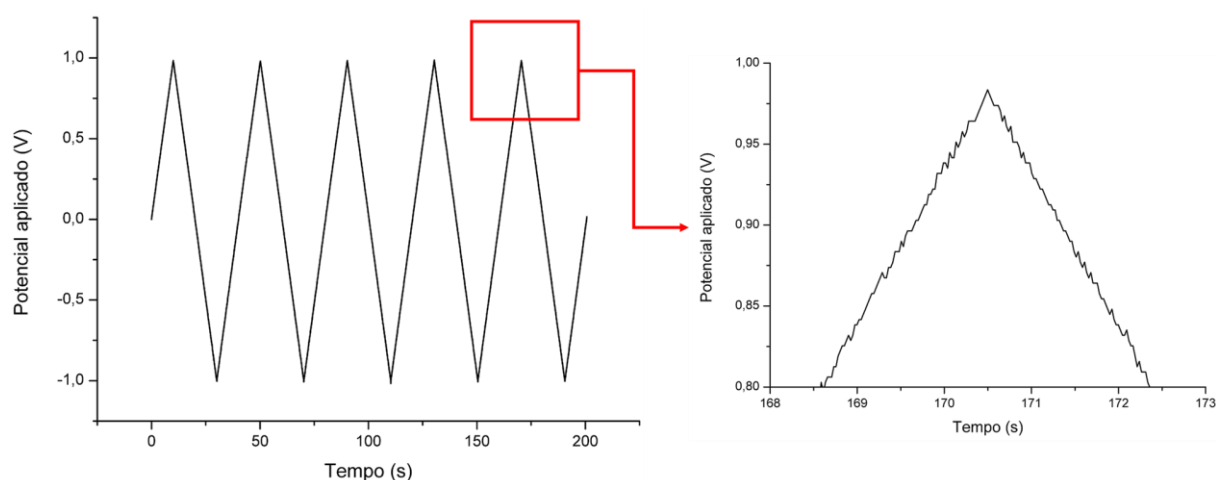
A calibração da plataforma foi necessária para se ter segurança dos valores de tensão aplicados e a corrente obtida no sistema, de modo a verificar se os valores previamente definidos pelo usuário no aplicativo são os valores reais na célula eletroquímica.

Em uma primeira etapa, foi verificado a forma de onda gerada na saída do DAC e lida pelo ADC em função do tempo, e se a velocidade de varredura respeita os valores configurados pelo usuário na interface do dispositivo móvel. Os parâmetros definidos para a análise foram:

- Potencial inicial de 0V;
- Potencial mínimo de -1V;
- Potencial máximo de 1V;
- Velocidade de varredura de 100 mV/s,
- 10 semiciclos;
- Tempo de espera de 5s.

A Figura 42 apresenta os resultados obtidos durante a análise, demonstrando que a variação do potencial é linear e os potenciais desejados foram atingidos (Figura 42a), apesar de apresentar um pouco de ruído demonstrado na amplificação do detalhe representado na Figura 42b. O cálculo do tempo do ensaio voltamétrico foi de 205s, que foi comprovado através dos dados obtidos durante o ensaio evidenciado na Figura 42a. Dessa forma, a velocidade de varredura foi respeitada conforme parâmetro previamente configurado.

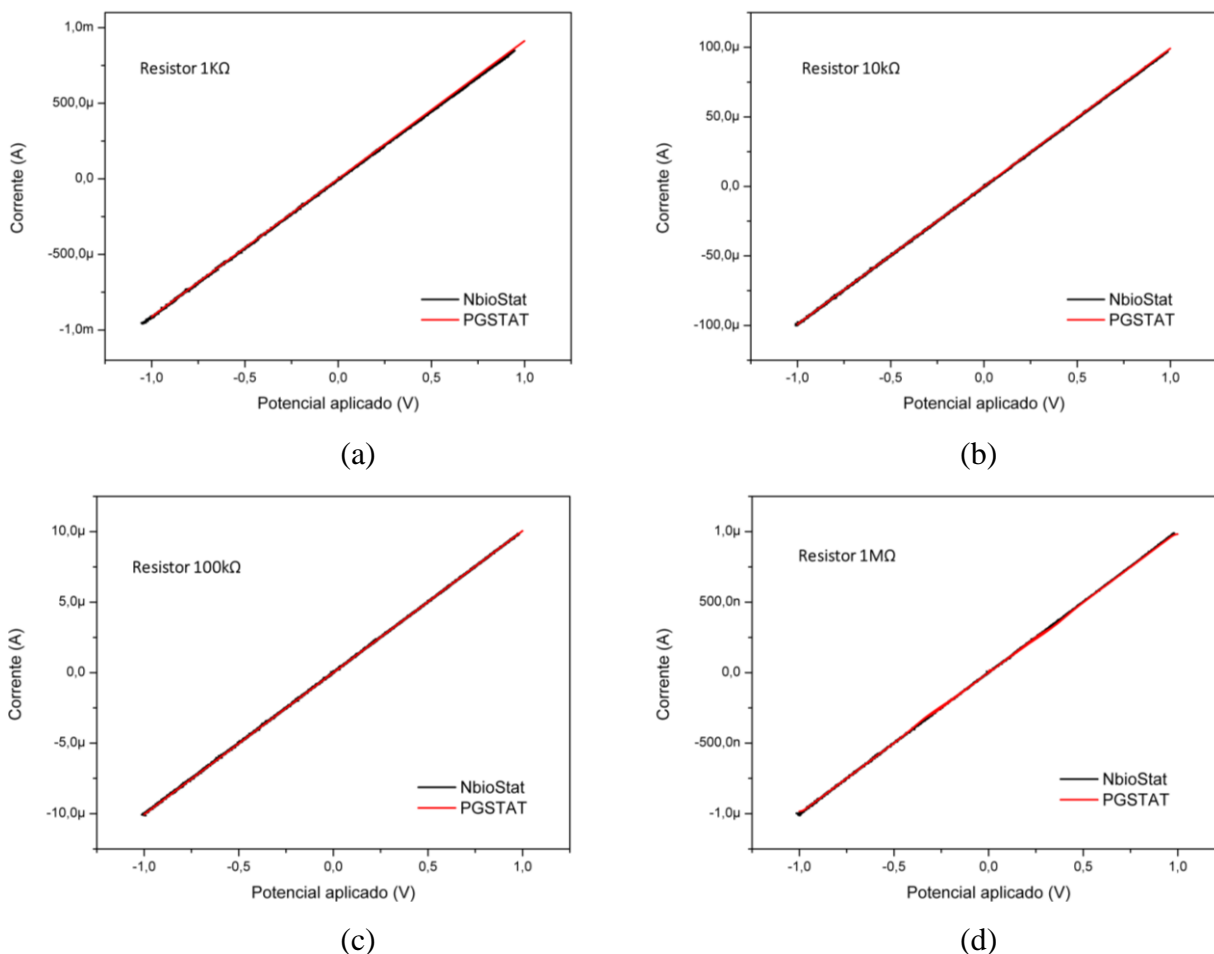
Figura 42 - Onda triangular gerada pelo DAC e lida pelo ADC pela interface microcontrolada (a) Potencial linear para a velocidade de varredura de 100mV/s (b) Aumento da área selecionada, demonstrando o ruído obtido pelo circuito eletrônico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A segunda etapa de calibração da medida de tensão e corrente consistiu em utilizar as células de referência *Dummy cell* desenvolvidas em um potenciostato comercial AUTOLAB modelo PGSTAT128N e na plataforma laboratorial. Os testes de calibração foram realizados aplicando um potencial DC entre -1V a 1V, com velocidade de varredura de 100mV/s e 10 semiciclos. Foram utilizados os quatro tipos de resistores de 1k, 10k, 100k e 1M que definem a resolução de corrente suportada pela plataforma. Os resultados da calibração e comparação com a *dummy cell* no potenciostato comercial e na plataforma desenvolvida são exibidos na Figura 43.

Figura 43 - Resultados experimentais e comparativos com equipamento comercial da calibração utilizando as células de referência com valores de resistência (a) 1KΩ (b) 10KΩ (c) 100KΩ e (d) 1MΩ



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme resultados obtidos, a plataforma apresentou uma correlação linear de  $r^2 = 0,99995$  entre o potencial aplicado e a corrente que circula nos resistores da célula de referência, onde para cada resistor selecionado, uma corrente monitorada pelo amplificador de transimpedância foi convertida em uma tensão proporcional. Foi possível verificar que os resultados altamente significantes, comprovando que os conversores corrente-tensão estão operando corretamente, e o circuito projetado apresentou resultados compatíveis ao de um equipamento comercial, fornecendo medidas com valores confiáveis.

#### 5.4.4. Validação da plataforma laboratorial em ensaio eletroquímico

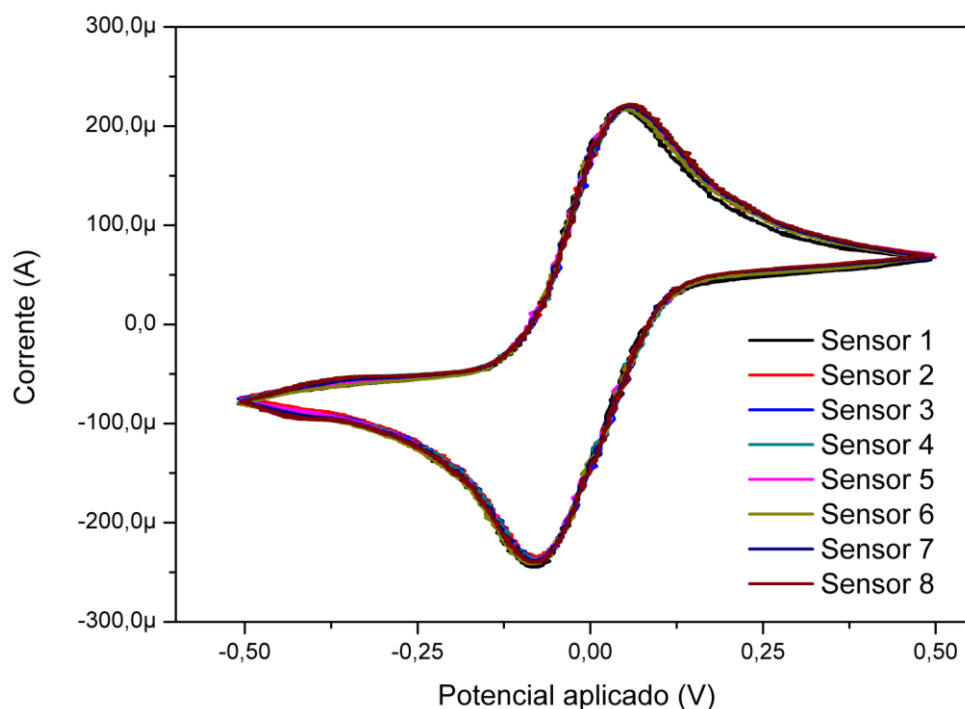
O desempenho da plataforma desenvolvida foi verificado através da realização de um ensaio eletroquímico utilizando a sonda redox de ferricianeto de potássio na concentração de 5mM com os seguintes parâmetros definidos na interface do dispositivo móvel: potencial

inicial de 0V; potencial mínimo de -500mV; potencial máximo de 500 mV; velocidade de varredura de 100 mV/s, 20 semiciclos e tempo de espera de 5s.

Para garantir a qualidade, estabilidade e reprodutibilidade da plataforma, bem como dos sensores eletroquímicos, foram realizados os testes de voltametria cíclica em oito sensores (n=8). Os dados obtidos nos ensaios eletroquímicos foram plotados em tempo real pelo aplicativo e também salvos no cartão de memória.

A Figura 44 representa os resultados obtidos durante o ensaio de validação da plataforma, onde é possível verificar que a tendência geral entre as voltametrias dos sensores é a mesma, demonstrando reprodutibilidade do sistema desenvolvido. Os potenciais de pico anódico e catódico ocorrem entre 50mV e -70mV sendo a corrente correspondente de pico anódico igual a  $|I_{pa}| \approx 233 \mu A$  e a de pico catódico  $|I_{pc}| \approx 251 \mu A$ . Essa diferença que ocorre no ensaio de validação da plataforma é proveniente de ruídos dos conversores digital analógico (DAC) e analógico digital (ADC), conforme comprovado na etapa inicial de calibração e também proveniente de impedância e ruído do circuito eletrônico projetado.

Figura 44 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol. L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> em 0,1 mol. L<sup>-1</sup> de PBS para os sensores utilizados para calibração e validação da plataforma (área do eletrodo de trabalho: 3mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 500 mV, potencial mínimo de -500 mV e velocidade de varredura de 100mV.s<sup>-1</sup>.



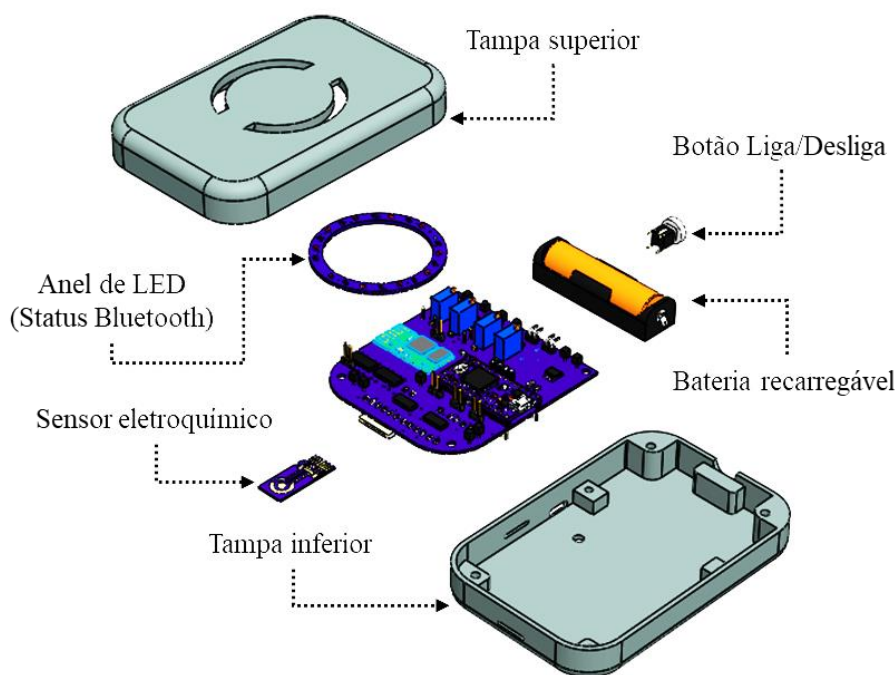
Fonte: Elaborado pelo autor.

A precisão do sistema pode ser aperfeiçoada através da implementação de filtros EMI (*Electromagnetic Interference*) contra ruídos eletromagnéticos e filtros passa-baixa para remoção de altas frequências provenientes de dispositivos eletrônicos próximos da plataforma. Além disso, o *software* pode ser ajustado pelo tratamento matemático dos dados obtidos definindo uma quantidade de números do intervalo de amostragem para obter uma média a cada um dos pontos coletados durante o ensaio eletroquímico. Porém, mesmo apresentando uma certa taxa de ruído, o sistema mostrou-se estável e reprodutivo, o que garante uma maior confiabilidade para a aplicação do sistema no diagnóstico clínico.

#### 5.4.5. Prototipagem 3D do módulo da plataforma laboratorial

A Figura 45 ilustra o projeto de encapsulamento da plataforma desenvolvido utilizando desenho assistido por Computador (CAD). O módulo é composto pela placa final desenvolvida, um anel de LED's responsável pela indicação de *status* da conexão *Bluetooth* para o usuário, um suporte soquete para a bateria recarregável e o botão de liga/desliga. As dimensões do módulo projetado para incluir todos os circuitos e componentes previamente listado foi de 115x75x30mm.

Figura 45 - Projeto de encapsulamento da plataforma utilizando desenho assistido por Computador (CAD).



Fonte: Elaborado pelo autor.

As tampas superiores e inferiores foram impressas por uma impressora 3D modelo GTMax®3D Core A1, utilizando um filamento ABS de 1,75mm de diâmetro. O *software* Simplify3D® também foi usado para obter o melhor desempenho e qualidade possível de impressão com este filamento. A Figura 46 ilustra o protótipo final desenvolvido e impresso por impressão 3D, demonstrando o tamanho e otimização do sistema para se obter um modelo ergonômico e de fácil manuseio da plataforma.

Figura 46 - Protótipo final desenvolvido e impresso por impressão 3D.



Fonte: Elaborado pelo autor.



## CAPÍTULO 6

### **Aplicação da plataforma e sensores eletroquímicos como imunodiagnóstico da hepatite C**

#### **6.1. Introdução**

Neste capítulo serão descritos os procedimentos, materiais e métodos empregados na funcionalização dos sensores eletroquímicos amperométricos, análise e caracterização por voltametria cíclica utilizando a plataforma laboratorial desenvolvida para a aplicação como imunodiagnóstico do VHC (Vírus da Hepatite C). Todo o experimento de incubação e ligação dos antígenos e anticorpos para detecção da hepatite C foi realizado no Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular – LICBM do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara.

#### **6.2. Método de imobilização do receptor bioquímico sobre a superfície do eletrodo de trabalho**

A funcionalização de um transdutor eletroquímico com o receptor bioquímico de interesse, tem como objetivo promover reações de elevado grau de seletividade para o desenvolvimento de diagnósticos de baixo custo. No caso do diagnóstico de hepatite C proposto, a funcionalização tem como objetivo identificar a variação de corrente na superfície do eletrodo de trabalho, em função da interação antígeno+anticorpo.

Existem diversas maneiras de realizar a imobilização do receptor bioquímico no eletrodo de trabalho do transdutor eletroquímico. Um dos métodos mais utilizados para a imobilização de diferentes receptores bioquímicos é por meio de monocamadas auto organizadas (SAMs).

A SAM consiste basicamente na formação de camadas monomoleculares e organizadas espontaneamente sobre uma superfície sólida através de interações intermoleculares entre a superfície e uma solução de moléculas anfóteras, ou seja, que possuem regiões polares e apolares. A adsorção desse tipo de molécula à superfície do eletrodo de trabalho, permite a construção de biossensores, para a detecção e quantificação de biomarcadores de forma específica e seletiva [106,107].

Atualmente, existe uma variedade de materiais que podem ser utilizados para a construção do sensor (como o ouro, platina, prata, cobre e o carbono) e biomoléculas para a construção das camadas auto organizadas (como os tióis, aminas, álcoois, etc.) [107]. O sistema que apresenta melhores resultados para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos são os baseados em eletrodos de ouro modificados por sulfetos, dissulfetos, tióis e alcanotióis, pois apresentam elevada estabilidade e se coordenam fortemente a superfície, devido a ligação covalente do enxofre com o ouro.

Um dos métodos de funcionalização mais utilizados para a modificação da superfície do eletrodo é através da ligação covalente entre amino-grupos da Cistamina com o grupo carboxílico do Glutaraldeído, método este utilizado para o desenvolvimento do imunossensor eletroquímico proposto neste trabalho [108].

### **6.2.1. Cistamina**

A cistamina (2,2-diaminoetildissulfeto) é um amino-sulfeto que possui dois átomos de enxofre ligados entre si e grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) em suas extremidades. Quando imobilizado sobre a superfície do eletrodo de ouro, a ligação de sulfetos se rompe, fazendo com que os enxofres se adsorvam covalentemente na superfície do ouro, deixando livre o grupamento amina para a ligação covalente com o glutaraldeído[108,109].

### **6.2.2. Glutaraldeído**

O glutaraldeído é um dialdeído saturado (1,5 pentanedial) responsável pela ligação covalente cruzada entre os grupos amina da cistamina e o carboxílico do glutaraldeído, os grupos aldeídos livres permitem outras ligações covalentes com amino grupos de proteínas, com consequente imobilização destas na superfície do sensor eletroquímico. Estas ligações conferem uma excelente estabilidade ao sistema frente a variações de pH, força iônica e temperatura [108,109].

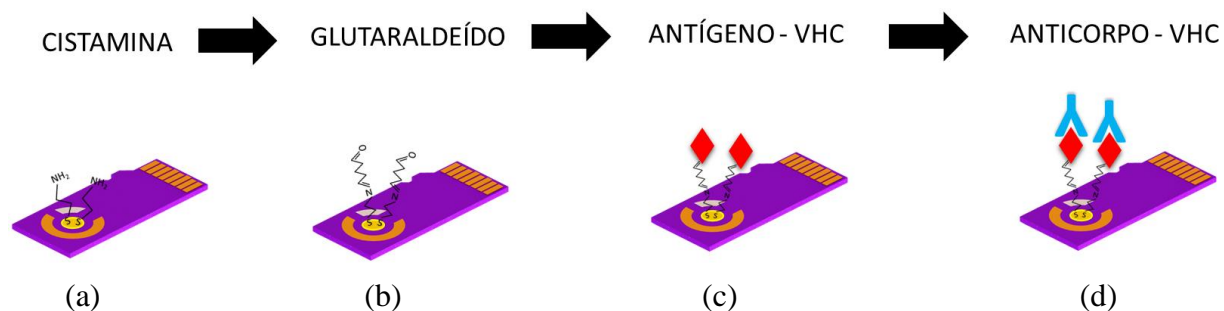
### **6.2.3. Antígenos e anticorpos**

Os antígenos são partículas ou moléculas de complexidade estrutural, reconhecidas como estranhas pelo organismo, sendo responsáveis por desencadear uma resposta imunológica a partir de seu reconhecimento por receptores específicos localizados nas membranas de linfócitos B, no caso da produção de anticorpos[110].

### 6.2.4. Preparo dos biossensores eletroquímicos

Para a funcionalização dos sensores desenvolvidos, foram adicionados sobre o eletrodo de trabalho 10 $\mu$ L da solução de cistamina 20mmol.L<sup>-1</sup> diluída em água deionizada por um tempo 30 minutos para a ligação. Após a funcionalização da cistamina, foram adicionados 10 $\mu$ L de uma solução de glutaraldeído 2,5% e incubado por igual período à temperatura ambiente. Para a imobilização do antígeno (proteína recombinante do core-VHC, produzida pelo LICBM-FCF-UNESP) foi utilizado 0,1 $\mu$ g. $\mu$ L<sup>-1</sup> da solução proteica diluída em PBS 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A incubação do antígeno foi realizada *overnight* em um ambiente úmido controlado à 4°C. Em seguida os sensores foram lavados com água destilada e adicionados 10 $\mu$ L da solução contendo 10ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> de anticorpos IgG anti-VHC ou soro controle negativo. A Figura 47 mostra uma representação esquemática da preparação do sensor.

Figura 47 - Preparação do biossensor: (a) Funcionalização do sensor com cistamina, (b) ativação com glutaraldeído, (c) imobilização do antígeno da hepatite C, (d) captura do anticorpo do VHC (interação antígeno+anticorpo).



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 6.4. Ensaio voltamétrico do biossensor para diagnóstico da hepatite C

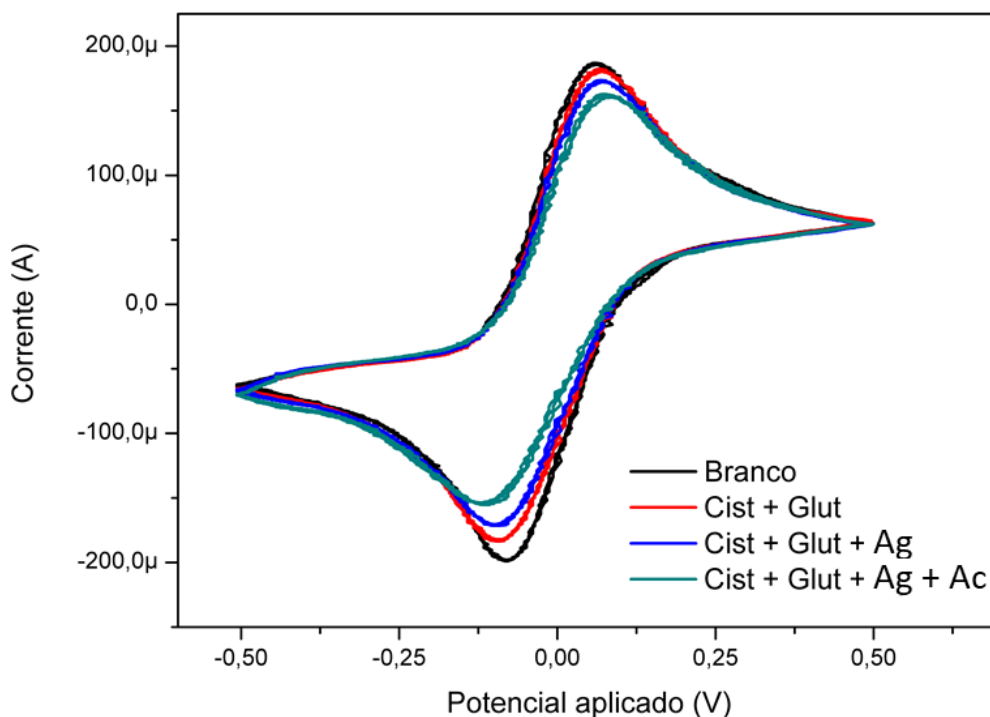
Ensaio voltamétricos foram realizados na plataforma laboratorial desenvolvida, utilizando a solução padrão de ferrocianeto de potássio 5mmol.L<sup>-1</sup> em eletrólito suporte de PBS (tampão fosfato-salino) 0,1 mol. L<sup>-1</sup>, onde foram avaliadas as variações de corrente frente às modificações na superfície do eletrodo de trabalho com a cistamina e glutaraldeído. Esta monocamada automontada (SAM) foi utilizada como controle da reação eletroquímica. Um segundo controle foi estabelecido após a ligação do antígeno; de tal forma que ao adicionar a solução contendo o anticorpo, na presença da solução padrão de ferrocianeto, uma variação na corrente no pico de redução poderia indicar a presença da interação antígeno+anticorpo.

Os ensaios de voltametria cíclicas foram realizados em triplicata para cada modificação realizada no sensor, de modo a determinar a precisão e exatidão do sistema no diagnóstico da infecção viral. Os parâmetros definidos para a voltametria foram: (1) potências de ciclagem de -500mV a 500mV, 20 semiciclos para cada sensor, (2) escala de corrente configurada em 1mA e (3) velocidade de varredura de 100mV/s.

O perfil voltamétrico obtido pela variação de corrente, resultante da reação imunoquímica de interesse, em comparação com o padrão branco e a funcionalização com as monocamadas automontadas (Cist + Glut), pode ser observado na Figura 48. Ao imobilizar o antígeno na monocamada (Cist + Glut + Ag), observou-se uma redução da corrente sobre o eletrodo, o que pode ser explicado pelo bloqueio de transferência de elétrons entre o par redox de ferrocianeto de potássio e a superfície do eletrodo.

Com a formação do complexo antígeno+anticorpo sobre a monocamada (Cist + Glut + Ag + Ac), foi observado o bloqueio da transferência dos elétrons, em relação ao controle sem o anticorpo (Cist + Glut + Ag), indicando assim, que a ligação foi bem-sucedida e o biossensor desenvolvido produziu o resultado esperado; ou seja, é capaz de detectar a presença de anticorpos anti-VHC em amostras biológicas.

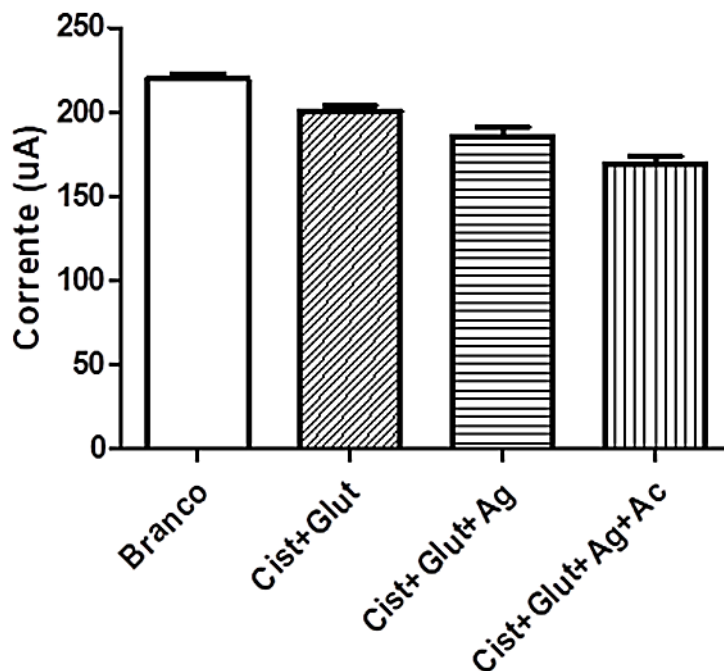
Figura 48 - Voltamogramas cíclicos em solução de 5 mmol. L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> em 0,1 mol. L<sup>-1</sup> de PBS para os sensores utilizados como imunodiagnóstico da hepatite C (área do eletrodo de trabalho: 3mm). Os parâmetros utilizados foram: Potencial máximo de 500 mV, potencial mínimo de -500 mV e velocidade de varredura de 100mV.s<sup>-1</sup>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As variações nas correntes entre as fases de construção do biossensor foram analisadas por meio do teste de análise de variância One-Way (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey, com a finalidade de identificar os grupos que apresentavam diferença. O nível de significância considerado foi  $P < 0,05$  (GraphPad Prism 5). Os resultados das médias  $\pm$  desvios padrão dos bloqueios das correntes em cada modificação sobre o eletrodo de trabalho estão demonstrados na Figura 49. Observa-se que houve uma significativa correlação entre as modificações ( $r^2=0,9653$ ,  $p < 0,05$ ), como também foi possível determinar que as reduções ou bloqueios nas transferências de elétrons para o eletrodo de trabalho foram significativas ( $p < 0,05$ ) entre todas as modificações, principalmente quando a comparação foi realizada entre os biossensores tratado com soro positivo para o VHC (Cist+Glut+Ag+Ac), contendo  $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de Ac IgG, e o tratado com soro negativo (Cist+Glut+Ag), respectivamente  $169,3 \pm 4,509\mu\text{A}$  e  $185,7 \pm 5,686\mu\text{A}$  ( $p < 0,05$ , IC95% de 5,061-27,61).

Figura 49 - Curva de bloqueio de transferência de elétrons no eletrodo de trabalho para as diferentes modificações realizadas no sensor. As barras representam as médias das correntes de cada modificação com respectivos desvios padrão. Todas as comparações apresentaram  $p < 0,05$ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos foram muito significativos e satisfatórios o que possibilitará a utilização do biossensor desenvolvido para aplicações no diagnóstico da hepatite viral C, como também para aplicação em outros diagnósticos ou pesquisa científica.

A variação de corrente, devido ao bloqueio da superfície do eletrodo, permitiu a detecção da ligação do complexo anticorpo + antígeno, revelando uma boa sensibilidade de detecção do biossensor na ordem de  $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  do anticorpo da classe IgG anti-VHC presente na amostra biológica. Como a concentração sérica de IgG humana varia de  $7\text{-}16\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , o sensor desenvolvido foi capaz de detectar um anticorpo na mistura de IgG na ordem de 1000 vezes inferior à concentração normal. Embora melhorias no sistema podem ser realizadas, é possível utilizar a plataforma e o biossensor desenvolvidos para o diagnóstico da hepatite C numa fase muito precoce da infecção.

## CAPÍTULO 7

### Conclusão e perspectiva do trabalho

O projeto proposto teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma portátil para leitura de reações eletroquímicas e também a construção de biossensores amperométricos com aplicação diagnóstica, que neste caso, optou-se pelo imunodiagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C. Como resultado, foram avaliadas diferentes técnicas de fabricação de sensores eletroquímicos, bem como as suas caracterizações, para definir o método mais viável para o desenvolvimento de um diagnóstico de elevada reprodutibilidade, exatidão e que possua baixo custo. Com isso obteve-se os sensores eletroquímicos por métodos de PCI e modificados por galvanoplastia.

Definido os parâmetros dos sensores, foi desenvolvida a plataforma laboratorial portátil, que consistiu em uma placa de aquisição e recepção de dados eletroquímicos e o desenvolvimento de aplicativo de interface com o usuário para dispositivos móveis via conexão *Bluetooth*, onde os dados coletados dos ensaios eletroquímicos foram plotados em tempo real no dispositivo móvel.

A plataforma foi calibrada e validada em comparação com o equipamento comercial Autolab PGSTAT 128N, onde os resultados obtidos pelo sistema desenvolvido, utilizando a técnica de voltametria cíclica, apresentou uma correlação linear de  $r^2 = 0,99995$ , fornecendo medidas com valores confiáveis.

Validado como imunodiagnóstico de Hepatite C, o sistema desenvolvido em conjunto com os biossensores funcionalizados com monocamadas automontadas e a ligação covalente entre o complexo antígeno+anticorpo, apresentou uma excelente sensibilidade e seletividade, boa estabilidade e reprodutibilidade, e um limite de detecção de anticorpos da classe IgG relativamente baixo, em torno de  $10\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

A portabilidade do sistema projetado e o baixo custo, conforme representado na Tabela 5, baixo consumo de energia (280,5mW quando o *Bluetooth* não está pareado com o dispositivo móvel e 165mW quando conectado), e tempo médio de duração da bateria de 195min, apresentam excelentes perspectivas de uma aplicação promissora em diagnósticos clínicos mais precisos, rápidos e de baixo custo que podem propiciar um controle e tratamento mais específico da doença.

Tabela 6 - Custos de fabricação da plataforma laboratorial portátil

COMPONENTES	PREÇO
Teensyduino	R\$165,00
Componentes discretos	R\$33,28
Módulo Bluetooth	R\$23,50
Módulo TP4056	R\$10,00
Amplificadores operacionais	R\$33,20
Conectores de cartão microSD	R\$17,00
Bateria recarregável	R\$5,90
Placa PCB dupla face	R\$37,80
Impressão 3D	R\$108,65
TOTAL	R\$434,33

### Perspectivas futuras

Os trabalhos futuros relacionados a este projeto devem buscar o aperfeiçoamento do circuito eletrônico contra ruídos, incorporando filtros nas saídas e entradas analógicas, permitindo uma melhor qualidade do sinal gerado no ensaio eletroquímico. Adicionar novos métodos de aquisição de sinal eletroquímico, como a voltametria de onda pulsada, amperometria e espectroscopia de impedância.

Em relação ao módulo potenciostático: desenvolver um circuito integrado que possua todos os amplificadores necessários para realizar as medidas eletroquímicas em um único dispositivo, o que irá permitir a redução do circuito eletrônico e a redução de ruídos externos, uma vez que o circuito integrado será isolado galvanicamente.

Como diagnóstico clínico: realizar novos estudos de variação de concentração do analito de modo a encontrar os melhores parâmetros e limite de detecção que o sistema possui para aplicação em outros tipos de doenças.



## REFERÊNCIAS

- [1] MCGOWAN, C. E. et al. A global view of hepatitis C: Physician knowledge, opinions, and perceived barriers to care. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1325–1332, abr. 2013.
- [2] MOHD HANAFIAH, K. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1333–1342, abr. 2013.
- [3] STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69–82, fev. 2001.
- [4] SIN, M. L. et al. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 2, p. 225–244, 13 mar. 2014.
- [5] GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45–S57, nov. 2014.
- [6] THE CENTER FOR DISEASE ANALYSIS. **HCV Epidemiology**. Disponível em: <<http://www.centerforda.com/downloads.htm>>. Acesso em: 21 fev. 2017.
- [7] MOREIRA, C. et al. Biossensores: Tecnologia e Aplicações. Disponível em: <<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biossensores.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2017.
- [8] RICCARDI, C. D. S. et al. Immobilization of streptavidin in sol-gel films: Application on the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 637–43, 15 out. 2006.
- [9] HEJAZI, M. S.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. **Analytical biochemistry**, v. 399, n. 1, p. 118–24, 1 abr. 2010.
- [10] MA, C. et al. Label-free sandwich type of immunosensor for hepatitis C virus core antigen based on the use of gold nanoparticles on a nanostructured metal oxide surface. **Microchimica Acta**, v. 178, n. 3–4, p. 331–340, 9 set. 2012.
- [11] MA, C. et al. MultisHRP-DNA-coated CMWNTs as signal labels for an ultrasensitive hepatitis C virus core antigen electrochemical immunosensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 47, p. 467–74, 15 set. 2013.
- [12] MORAES, M. L. et al. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 29, n. 11, p. 3829–34, 19 mar. 2013.
- [13] DONMEZ, S.; ARSLAN, F.; ARSLAN, H. A Nucleic Acid Biosensor for Detection of

Hepatitis C Virus Genotype 1a Using Poly(l-Glutamic Acid)-Modified Electrode. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1431–1444, 7 jul. 2015.

[14] CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 15 dez. 2006.

[15] LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 492–500, 2008.

[16] UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The Enzyme Electrode. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 986–988, 3 jun. 1967.

[17] GUILBAULT, G. G.; MONTALVO, J. G. Urea-specific enzyme electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, abr. 1969.

[18] MASCINI, M. A Brief Story of Biosensor Technology. In: **Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices**. Boston, MA: Springer US, 2006. p. 4–10.

[19] THÉVENOT, D. R. et al. **Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification** *Biosensors and Bioelectronics*, 2001.

[20] MOHANTY, S.; KOUGIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **Ieee Potentials**, 2006.

[21] ANDRADE, V. M. **Confecção de biossensores através da imobilização de biocomponentes por eletropolimerização de pirrol**. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 200

[22] RONKAINEN, N. J. et al. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747, 2010.

[23] CHAMBERS, J. P. et al. Biosensor recognition elements. **Current issues in molecular biology**, v. 10, n. 1–2, p. 1–12, 2008.

[24] WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. **Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants** Elsevier, , 2014.

[25] PALCHETTI, I. New Trends in the Design of Enzyme-based Biosensors for Medical Applications. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 14, p. 1125–33, 2016.

[26] JUSTINO, C. I. L. et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2–17, 2015.

[27] HASAN, A. et al. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. **BioMed research international**, v. 2014, p. 307519, 2014.

[28] D’SOUZA, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p.

337–353, ago. 2001.

[29] WANG, P. et al. Cell-based biosensors and its application in biomedicine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 108, n. 1, p. 576–584, 2005.

[30] ACHA, V. et al. Tissue-Based Biosensors. In: **Recognition Receptors in Biosensors**. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 365–381.

[31] SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International journal of nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433–40, 2006.

[32] HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 12–24, 2012.

[33] SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D. ; Blum, L. J. DNA Biosensors and Microarrays. **American Chemical Society** , v. 108, n. 1, p. 109-139, 2008.

[34] WANG, J. From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 16, p. 3011–6, 15 ago. 2000.

[35] SEOK KIM, Y.; AHMAD RASTON, N. H.; BOCK GU, M. Aptamer-based nanobiosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 2–19, 2016.

[36] KADIOGLU, O. et al. Aptamers as a novel tool for diagnostics and therapy. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 2, p. 513–520, 1 abr. 2015.

[37] HU, P.-P. Recent Advances in Aptamers Targeting Immune System. **Inflammation**, p. 1–8, 2 set. 2016.

[38] PATEL, S. et al. Biosensors in Health Care: The Milestones Achieved in Their Development towards Lab-on-Chip-Analysis. **Biochemistry research international**, v. 2016, p. 3130469, 2016.

[39] LIU, X. et al. **Development and performance research of a novel thermal biosensor**. 2011 IEEE 5th International Conference on Cybernetics and Intelligent Systems (CIS). **Anais...IEEE**, set. 2011Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6070363/>>. Acesso em: 28 out. 2016

[40] ZHANG, Y.; TADIGADAPA, S. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1733–1743, 2004.

[41] YAKOVLEVA, M.; BHAND, S.; DANIELSSON, B. The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 1–12, 2013.

[42] PANG, W. et al. Piezoelectric microelectromechanical resonant sensors for chemical and biological detection. **Lab on a chip**, v. 12, n. 1, p. 29–44, 7 jan. 2012.

- [43] MARRAZZA, G. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. **Biosensors**, v. 4, n. 3, p. 301–317, 9 set. 2014.
- [44] BUNDE, R. L.; JARVI, E. J.; ROSENRETER, J. J. Piezoelectric quartz crystal biosensors. **Talanta**, v. 46, n. 6, p. 1223–1236, 1998.
- [45] QIU, H. et al. Evanescent wave absorption sensor based on tapered multimode fiber coated with monolayer graphene film. **Optics Communications**, v. 366, p. 275–281, 2016.
- [46] CHAN, W. C. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 40–6, fev. 2002.
- [47] KŁOS-WITKOWSKA, A. The phenomenon of fluorescence in immunosensors. **Acta biochimica Polonica**, v. 63, n. 2, p. 215–21, 2016.
- [48] ABUTOAMA, M.; ABDULHALIM, I. Angular and Intensity Modes Self-Referenced Refractive Index Sensor Based on Thin Dielectric Grating Combined With Thin Metal Film. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 23, n. 2, p. 1–9, mar. 2017.
- [49] GUO, X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. **Journal of Biophotonics**, v. 5, n. 7, p. 483–501, jul. 2012.
- [50] LIU, H. et al. A study of the electron transfer and photothermal effect of gold nanorods on a glucose biosensor. **Nanotechnology**, v. 21, n. 18, p. 185504, 7 maio 2010.
- [51] YANG, B. et al. A resonance light scattering sensor based on bioinspired molecularly imprinted polymers for selective detection of papain at trace levels. **Analytica Chimica Acta**, v. 912, p. 125–132, 2016.
- [52] DUQUE, T. et al. New Insights on Optical Biosensors: Techniques, Construction and Application. In: **State of the Art in Biosensors - General Aspects**. [s.l.] InTech, 2013.
- [53] GERD KEISER. **Comunicações por Fibras Ópticas**. 4. ed. New York: [s.n.].
- [54] KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 17 jan. 2012.
- [55] SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F. Capítulo 18 - Introdução à Eletroquímica. In: **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 464–492.
- [56] LUIZ MANOEL ALEIXO (IN MEMORIAN). Voltametria: Conceitos e Técnicas. **Chemkeys**, [s.d.].
- [57] BARD, A. et al. Chapter 1. Introduction and Overview of Electrode Processes. In: **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [58] KOYUN, A.; AHLATCOLU, E.; KOCA, Y. Biosensors and Their Principles. In: **A**

**Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones.** [s.l.] InTech, 2012.

- [59] JAFFREZIC-RENAULT, N.; DZYADEVYCH, S. V. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2569–2588, 11 abr. 2008.
- [60] WANG, Y. et al. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 4, p. 2043, 2008.
- [61] GUAN, J.-G.; MIAO, Y.-Q.; ZHANG, Q.-J. Impedimetric biosensors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219–226, 2004.
- [62] PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors—A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4227–4233, 2010.
- [63] BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. A review on impedimetric biosensors. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 248–62, 2016.
- [64] STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159–173, abr. 2003.
- [65] KONCKI, R. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 599, n. 1, p. 7–15, 2007.
- [66] NAGELS, L. et al. Potentiometric Sensors for Organic Analytes: Insights to Proceed to Miniaturization. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 120–126, 1 maio 2009.
- [67] GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 3, p. 1400, 2008.
- [68] PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.
- [69] CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6, p. 441–456, 2002.
- [70] HEYROVSKÝ, J. Polarographie. **Chemisch-technische Untersuchungsmethoden**, 1939.
- [71] PACHECO, W. F. et al. Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.
- [72] BRETT, C.; BRETT, O.; **Electrochemistry: principles, methods, and applications.** Mindsomer Norton, UK, Oxford University Press, 1993.
- [73] GOSSER, D. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms.** New York, EUA, Wiley - VCH, 1993.
- [74] WANG, J. Study of Electrode Reactions. In: **Analytical Electrochemistry.** New York,

USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002. p. 28–59.

[75] ISAQUE, L. G.; **Estudo voltamétrico de citroflavonóides**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Coimbra. 2010.

[76] UETA, R. R.; RUDNICK, R. A espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo da interface platina/lectina. 2002.

[77] AUCÉLIO, R. **Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina**. 2004 XXf. Dissertação (Mestrado em Química). Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC/RJ. 2004.

[78] AGOSTINHO, S. M. L. et al. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813–817, out. 2004.

[79] DOELLING, R. **Potentiostats**. Disponível em: <<http://www.bank-ic.de/encms/downloads/potstae2.pdf>>. Acesso em: 16 maio. 2018.

[80] CORREIA, J. H.; CARMO, J. P. Introdução à Instrumentação Médica. In: **LIDEL, Fev**. Lisboa: LIDEL, 2013. p. 91–105.

[81] SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F. Capítulo 23 - Voltametria. In: **Fundamentos de química analítica**. v.8, p627-66, Ed. Thomson, São Paulo ,2006

[82] **Electrochemical Cell: EuroCell General Purpose Electrochemical Cell Kit**. Disponível em: <<https://www.gamry.com/cells-and-accessories/electrochemical-cells/eurocell-corrosion-cell/>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

[83] **DropSens: Screen-printed electrodes**. Disponível em: <[http://dropsens.com/en/screen\\_printed\\_electrodes\\_pag.html](http://dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html)>. Acesso em: 21 fev. 2017.

[84] NASCIMENTO, V.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Química Nova**, 1998.

[85] TRACTON, A. A. **Coatings Technology Fundamentals, Testing, And Processing Techniques**. Boca Raton, FL, CRC Press, 2007

[86] ALAN HOBBY. **Screen printing for the industrial user**. Disponível em: <[http://www.gwent.org/gem\\_screen\\_printing.html](http://www.gwent.org/gem_screen_printing.html)>. Acesso em: 21 jan. 2017.

[87] GROZA, J. R. et al. **Materials Processing Handbook**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

[88] SARAQUINOS, K.; ALAMI, J.; KONSTANTINIDIS, S. High power pulsed magnetron sputtering: A review on scientific and engineering state of the art. **Surface and Coatings Technology**, v. 204, n. 11, p. 1661–1684, 2010.

- [89] TATSCH, P. Deposição de filmes finos. Disponível em: <<http://www.ccs.unicamp.br/cursos/fee107/download/cap11.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2017.
- [90] EISLER, P. Reflections on My Life as an Inventor. **Circuit World**, v. 11, n. 1, p. 30–34, abr. 1984.
- [91] FERNANDO DAQUINO. **Como as placas de circuito impresso são produzidas - TecMundo**. Disponível em: <<https://www.tecmundo.com.br/como-e-feito/18501-como-as-placas-de-circuito-impresso-sao-produzidas.htm>>. Acesso em: 5 jan. 2017.
- [92] Ewaldo Luiz de Mattos Mehl. **Conceitos fundamentais sobre placas de circuito impresso**. Disponível em: <[http://www.eletrica.ufpr.br/mehl/te232/textos/PCI\\_Conceitos\\_fundamentais.pdf](http://www.eletrica.ufpr.br/mehl/te232/textos/PCI_Conceitos_fundamentais.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2017.
- [93] CLYDE F. COOMBS, J. **Printed Circuits Handbook**. [s.l.] McGraw-Hill Professional, 2008. v. Sixth Edit
- [94] **Electroplating - Chemistry LibreTexts**. Disponível em: <[https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Electrochemistry/Electrolytic\\_Cells/Electroplating](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Electrochemistry/Electrolytic_Cells/Electroplating)>. Acesso em: 2 fev. 2017.
- [95] FODES, P. A. **Galvanotécnica Prática**. São Paulo: Editora Polígono, 1973.
- [96] GASPAROTTO, G. et al. Electrochemical immunosensor based on ZnO nanorods-Au nanoparticles nanohybrids for ovarian cancer antigen CA-125 detection. **Materials Science and Engineering: C**, fev. 2017.
- [97] **Teensy 3.2 & 3.1: New Features**. Disponível em: <<https://www.pjrc.com/teensy/teensy31.html>>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- [98] MARTYN CURREY. **Arduino to Arduino by Bluetooth**. Disponível em: <<http://www.martyncurrey.com/arduino-to-arduino-by-bluetooth/>>. Acesso em: 22 fev. 2017.
- [99] **TP4056 1A Standalone Linear Li-Ion Battery Charger with Thermal Regulation in SOP-8**. Disponível em: <<https://www.mikrocontroller.net/attachment/273612/TP4056.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- [100] PLETCHER, D. et al. The design of electrochemical experiments. In: **Instrumental Methods in Electrochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 356–387.
- [101] SOUZA, F. **Introdução ao Arduino - Primeiros passos na plataforma Arduino**. Disponível em: <<https://www.embarcados.com.br/arduino-primeiros-passos/>>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- [102] **Arduino IDE ferramenta - Como usar!(iMasters BOX)**. Disponível em:

- <<https://imasters.com.br/box/ferramenta/arduino-ide/>>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- [103] MEDEIROS, A. et al. Desenvolvimento de aplicativo para android com uso do MIT App Inventor. **Revista Científica da FASETE**, v. 2, 2017.
- [104] **MIT APP INVENTOR**. Disponível em:  
<[http://www.aedmoodle.ufpa.br/pluginfile.php?file=/170097/mod\\_book/chapter/2317/MITAPP\\_Inventor\\_apostila.pdf](http://www.aedmoodle.ufpa.br/pluginfile.php?file=/170097/mod_book/chapter/2317/MITAPP_Inventor_apostila.pdf)>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- [105] ARNOBIO, V. **Introdução ao MIT App Inventor**. Disponível em:  
<[https://technovationchallenge.org/wp-content/uploads/2015/01/tutorial-construcao\\_app-FaleComigo-pt.pdf](https://technovationchallenge.org/wp-content/uploads/2015/01/tutorial-construcao_app-FaleComigo-pt.pdf)>. Acesso em: 2 maio. 2018.
- [106] ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 20 jun. 1996.
- [107] FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381–389, maio 2003.
- [108] FERREIRA, A. A. P. et al. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 634, n. 2, p. 111–122, 15 set. 2009.
- [109] JANEGITZ, B. C. Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro. 22 jun. 2012.
- [110] SAMUEL, L. **What is Antigen-Antibody Complex? - Interactive Biology, with Leslie Samuel**. Disponível em: <<http://www.interactive-biology.com/3538/what-is-antigen-antibody-complex/>>. Acesso em: 16 maio. 2018.