

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Thiago Serafim Martins

Dispositivos miniaturizados para o monitoramento acessível e no local de
moléculas de interesse ambiental e clínico

São Carlos

2022

Thiago Serafim Martins

Dispositivos miniaturizados para o monitoramento acessível e no local de
moléculas de interesse ambiental e clínico

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Sergio A. S. Machado.

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se na
Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2022

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

Assinatura:Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Martins, Thiago Serafim

Dispositivos miniaturizados para o monitoramento acessível e no local de moléculas de interesse ambiental e clínico / Thiago Serafim Martins. — São Carlos, 2022.

135 f.

Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

1. Sistemas miniaturizados. 2. Eletrodos impressos. 3. Poluentes emergentes. 4. Biomarcadores. 5. Câncer. I. Título.

Solange Puccinelli - CRB: 1500/8



AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta tese no âmbito intelectual e profissional.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto. E também a CAPES pela bolsa concedida (Código de Financiamento 001, N° de concessão: 88887.334689/2019-00).

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo e ao Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos por todo suporte estrutural (central de análises, oficinas mecânica e de vidrarias, biblioteca e salas) e pessoal (corpo docente e de funcionários).

Ao prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado pela orientação, confiança e apoio.

Ao prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior pelas sugestões e por dividir seus conhecimentos em escrita científica.

Ao José Luiz Bott Neto pela amizade, companheirismo, por todo suporte e contribuição intelectual para com este projeto.

Aos meus avós Ruth Tassinari Alves Martins e Osvaldo Alves Martins por todo suporte e incentivo a educação desde sempre.

Muito Obrigado!

RESUMO

Sistemas miniaturizados com eletrodos de carbono impressos (SPCEs) são tecnologias promissoras para monitorar no local, moléculas de interesse ambiental (e.g. poluente emergente) e clínico (e.g. biomarcador). Neste trabalho, sistemas eletroquímicos miniaturizados foram desenvolvidos para detectar as seguintes moléculas: sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP), antígeno de carboidrato 15-3 (câncer de mama), metabólito 25-hidroxivitamina D3 (vitamina D), lactato e o antígeno prostático específico (câncer de próstata). Um desempenho otimizado dos SPCEs caseiros foi obtido usando um tratamento eletroquímico em solução de tampão fosfato (PBS). Para os antibióticos SMX e TMP foi desenvolvido um sensor baseado em papel com nanofitas de óxido de grafeno reduzidas (rGN). Os limites de detecção (LOD) para SMX e TMP foram estimados em $0,09 \mu\text{M}$ e $0,04 \mu\text{M}$, respectivamente, com uma resposta linear de $1 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$. O sensor foi reprodutível (RSD $<5\%$) e seletivo, inclusive em amostras de água de torneira. Um imunossensor do tipo sanduíche constituído por um filme *layer-by-layer* de nanopartículas de ouro (Au) e óxido de grafeno reduzido (rGO) foi desenvolvido para detectar o biomarcador de câncer de mama CA15-3. O imunossensor foi capaz de detectar o CA15-3 em amostras de soro humano e saliva artificial com um LOD de $0,08 \text{ fg mL}^{-1}$ dentro de uma ampla faixa linear de concentração de $0,1 \text{ fg mL}^{-1}$ a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. O imunossensor também foi seletivo para CA15-3, robusto e estável para permitir o armazenamento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por mais de 30 dias. Para monitorar o metabólito 25(OH)D3 em soro humano e saliva, construiu-se um chip imunossensor flexível e sem rótulo. A plataforma do dispositivo foi feita com dendritos de ouro em forma de árvore (AuDdrites), obtidos eletroquimicamente pela dessorção seletiva da *L*-cisteína sobre os planos (111) do ouro. O chip foi capaz de detectar o metabólito em 15 minutos com uma faixa de concentração dentro dos valores de interesse clínico e apresentou um LOD de $0,03 \text{ ng mL}^{-1}$. Um sistema portátil com diodo emissor de luz (LED) de 3 W e compatível com SPCEs também foi desenvolvido para detecção fotoeletroquímica. O dispositivo produzido em impressora 3D, foi usado para detectar lactato e PSA sobre nanopartículas de TiO_2 modificadas com filme polimérico de [Ni(salen)] (referido como $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$) e nanopartículas de óxido de titânio (TiO_2) sensibilizado com nitreto de carbono grafítico e aril diazônio (referido como $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$), respectivamente. O sensor fotoeletroquímico para lactato exibiu excelente estabilidade, reprodutibilidade e seletividade em uma faixa linear de 0,1 a 20 mM com LOD de $88 \mu\text{M}$. Também foi demonstrado por medidas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) *in situ* que o dióxido de carbono (CO_2) é o produto principal da fotoeletrooxidação de lactato sobre $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$. Em adição, o sensor para o biomarcador de câncer de próstata PSA foi capaz de detectar o marcador tumoral em amostras de soro humano em uma faixa de 10^{-16} a $10^{-8} \text{ g mL}^{-1}$ com limite de detecção tão baixo quanto $0,06 \text{ fg mL}^{-1}$. A robustez do dispositivo foi confirmada com testes de reprodutibilidade e estabilidade. A estratégia de funcionalização dos nanomateriais fotoativos com sal de aril diazônio diminuiu a recombinação de portadores de carga fotogerados, levando a um aumento na fotocorrente e, forneceu grupos carboxílicos para ancorar anticorpos por meio da reação da carbodiimida, o que possibilita a extensão da plataforma de detecção a qualquer outro tipo de imunossensor fotoeletroquímico. Os dispositivos portáteis aqui apresentados são de baixo custo, operação amigável e promissores para monitorar no local, poluentes emergentes e biomarcadores sem atrasos associados aos laboratórios centralizados.

Palavras-chaves: sistemas miniaturizados, eletrodos impressos, poluentes emergentes, biomarcadores, câncer, monitoramento no local

ABSTRACT

Miniaturized systems with printed carbon electrodes (SPCEs) are promising technologies for on-site monitoring of molecules of environmental (e.g., emerging pollutant) and clinical (e.g., biomarker) interest. In this work, miniaturized electrochemical systems were developed to detect the following molecules: sulfamethoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), carbohydrate antigen 15-3 (breast cancer), 25-hydroxyvitamin D3 metabolite (vitamin D), lactate and prostate-specific antigen (prostate cancer). Optimal performance of homemade SPCEs was obtained using an electrochemical treatment in phosphate buffer solution (PBS). For the antibiotics SMX and TMP, a paper-based sensor with reduced graphene oxide nanoribbons (rGN) was developed. The limits of detection (LOD) for SMX and TMP were estimated at 0.09 μM and 0.04 μM , respectively, with a linear response from 1 μM to 10 μM . The sensor was reproducible (RSD <5%) and selective, including in tap water samples. A sandwich-type immunosensor consisting of a layer-by-layer film of gold (Au) nanoparticles and reduced graphene oxide (rGO) was developed to detect the breast cancer biomarker CA15-3. The immunosensor was able to detect CA15-3 in human serum and artificial saliva samples with a LOD of 0.08 fg mL^{-1} within a wide linear concentration range from 0.1 fg mL^{-1} to 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The immunosensor was also selective for CA15-3, robust, and stable to permit storage at 4°C for more than 30 days. To monitor the 25(OH)D3 metabolite in human serum and saliva, a flexible and label-free immunosensor chip was manufactured. The device platform was made with tree-shaped gold dendrites (AuDdrites), obtained electrochemically by selective desorption of L-cysteine on the (111) planes of gold. The chip was able to detect the metabolite within 15 minutes with a concentration range within the values of clinical interest and presented a LOD of 0.03 ng mL^{-1} . A portable photoelectrochemical system with screen-printed carbon electrodes (SPCEs) and a 3 W light-emitting diode (LED) was also developed. The 3D-printed device was used to detect lactate and PSA on titanium oxide (TiO_2) nanoparticles modified with [Ni(salen)] polymer film (referred to as $\text{TiO}_2@\text{poly}[\text{Ni}(\text{salen})]$) and TiO_2 nanoparticles sensitized with graphitic carbon nitride and aryl diazonium (referred to as $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$), respectively. The photoelectrochemical sensor for lactate exhibited excellent stability, reproducibility, and selectivity over a linear range from 0.1 to 20 mM with a LOD of 88 μM . It was also demonstrated by *in situ* Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements that carbon dioxide (CO_2) is the main product of the photoelectrooxidation of lactate on $\text{TiO}_2@\text{poly}[\text{Ni}(\text{salen})]$. In addition, the sensor for the prostate cancer biomarker PSA was able to detect the tumor marker in human serum samples in a range from 10^{-16} to 10^{-8} g mL^{-1} with a detection limit as low as 0.06 fg mL^{-1} . The device's robustness was confirmed with reproducibility and stability tests. The functionalization strategy of photoactive nanomaterials with aryl diazonium salt decreased the recombination of photogenerated charge carriers, leading to an increase in the photocurrent, and provided carboxylic groups to anchor antibodies through the carbodiimide reaction, which allows the extension of the platform of detection to any other type of photoelectrochemical immunosensor. The handheld devices presented here are low-cost, user-friendly, and promising to monitor on-site, emerging pollutants and biomarkers without the delays associated with centralized laboratories.

Keywords: miniaturized systems, printed electrodes, emerging pollutants, biomarkers, cancer, on-site monitoring

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Componentes de um sensor eletroquímico. | 24 |
| Figura 2. Esquema geral de um biossensor eletroquímico. | 25 |
| Figura 3. Estrutura genérica de um alcanotiol à esquerda e estrutura genérica de um sal de aril diazônio à direita. | 26 |
| Figura 4. Ilustração do processo de serigrafia. | 29 |
| Figura 5. Materiais baseados no grafeno. | 30 |
| Figura 6. Foto do sistema eletroquímico à direita, enquanto à esquerda há uma imagem renderizada com as partes identificadas individualmente: módulo relé para controlar a iluminação dos ciclos ON/OFF, 'base', entrada de fonte de 12 V, conectores para o potenciostato (eletrodos de trabalho, contra e de referência), um 'teto' para colocar o LED, uma 'tampa' para evitar interferência de luz externa, LED, uma 'ponta' para fixar o LED, parafuso, entrada da fonte de 3 V para o LED, conector FPC para a entrada do sensor, um 'deslize' para apoiar o sensor no conector FPC, sensor. | 42 |
| Figura 7. (a) SPCE; (b) micrografias com aumento de 500 e (c) 3000 vezes; e (d) primeiro e (e) último quadros de uma gota de água sobre o papel manteiga (os ângulos de contato também são fornecidos); (f) IES e (g) CVs a 50 mV s^{-1} em 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4/-3}$ em 0,1 M de solução de KCl antes e após o tratamento eletroquímico em meio ácido, básico e neutro. | 47 |
| Figura 8. Padrão de XRD da tinta condutora de carbono após o processo de cura. | 48 |
| Figura 9. Micrografias em 500 (superior) e 3000 (inferior) vezes de ampliação do papel manteiga após imersão em (a-b) 0,5 M de H_2SO_4 , (c-d) 0,5 M de NaOH e (e-f) PBS (pH 7,0). | 49 |
| Figura 10. Espectros de FTIR do papel manteiga (a) antes e depois do tratamento nas soluções de (b) 0,5 M de H_2SO_4 , (c) 0,5 M de NaOH, e (d) PBS (pH 7,0). Todos os espectros foram registrados entre 4000 e 640 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} (512 interferogramas cada espectro). | 50 |
| Figura 11. Imagens de TEM de (a) MWCNT e (b) rGNR; (c) espectros Raman de MWCNT e rGNR; espectros Raman desconvoluídos de (d) MWCNT, (e) GNR e (f) rGNR; espectros de C 1s desconvoluídos de (g) MWCNT, (h) GNRs e (i) rGNR. | 51 |
| Figura 12. Espectros de XPS de varredura ampla (survey) dos (a) MWCNTs, (b) GNRs, (c) rGNRs. As composições atômicas também são mostradas. | 52 |
| Figura 13. (a) Medidas de DPV realizadas em PBS (pH 7,0) em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V para o SPCE não modificado e para SPCE modificado com rGNR. (b) DPVs em diferentes pHs para SPCE revestido com rGNR. Ambos os experimentos foram realizados com $10,0 \mu\text{M}$ de SMX e TMP. | 53 |
| Figura 14. Medida de DPV em PBS (pH 7,0) realizada em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V para um SPCE modificado com $6,0 \mu\text{L}$ de uma dispersão $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de rGNR. O experimento foi realizado na presença de $10,0 \mu\text{M}$ de SMX e TMP. | 54 |
| Figura 15. (a) Perfis de DPV e (b, c) curvas analíticas do sensor para quantificação simultânea de SMX e TMP em pH 6,0. | 55 |
| Figura 16. Perfis de DPV obtidos de 0,4 a 1,1 V e curvas analíticas do sensor para quantificação individual de (a, c) SMX e (b, d) TMP. | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Estudo de (a) repetibilidade e (b) reprodutibilidade na presença de 10,0 μM SMX e TMP. Os experimentos foram realizados por DPV em 0,1 M de PBS (pH 6) em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V. | 58 |
| Figura 18. Seletividade do sensor na presença de 10,0 μM dos antibióticos e 30,0 μM dos interferentes (amoxicilina, carbonato, colecalciferol, β -estradiol, hidroquinona e sulfato). Os experimentos foram realizados por DPV em 0,1 M de PBS (pH 6,0) em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V. | 60 |
| Figura 19. (a) Espectros de EIS e (b) valores médios de impedância para os SPCEs antes e depois da limpeza eletroquímica com n ciclos (n = 1, 2 ou 5) registrados em solução PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 62 |
| Figura 20. (a) Espectro de FTIR preparado com pastilha de KBr, (b) padrão de XRD e (c-d) imagem de AFM do óxido de grafeno. | 64 |
| Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos durante a eletrodeposição para eletrodos com (a, d) AuNPs, (b, e) rGO e (c, f) Au-rGO em solução de PBS (pH 7,4) a 100 mV s^{-1} . À direita e à esquerda são mostrados o primeiro e o vigésimo ciclo, respectivamente. | 65 |
| Figura 22. Resposta de SWV da plataforma Au-rGO preparada com 5, 20 e 30 ciclos. As curvas foram registradas em solução de PBS contendo 2,5 mM de HQ e 2,5 mM de H_2O_2 . .. | 66 |
| Figura 23. (a) Voltamogramas cíclico do rGO e Au-rGO em 0,5 M de H_2SO_4 a 20 mV s^{-1} . (b) Curvas de impedância (gráficos de Bode) para os eletrodos AuNPs e Au-rGO (a inserção mostra os valores médios). (c) e (d) Imagens de SEM em seção transversal para a plataforma Au-rGO. (e) Gráficos de Bode para os diferentes estágios de fabricação do imunossensor. (f) Imagem de SEM do imunossensor desenvolvido. | 67 |
| Figura 24. (a) e (c) imagem de SEM em seção transversal de Au-rGO; (b) análise EDS; (d) mapeamento EDS. | 68 |
| Figura 25. 1ª varredura para potenciais mais positivos da plataforma Au-rGO, antes e após incubação com MPA. Medidas realizadas em solução de PBS (pH 7,4) a 20 mV s^{-1} | 69 |
| Figura 26. Imagens de SEM com ampliação de 5 k (esquerda) e 25 k vezes (direita) de $\text{Ab}_1/\text{Au-rGO}$ (imagens a e e), $\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{Au-rGO}$ (imagens b e f), $\text{CA15-3}/\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{Au-rGO}$ (imagens c e g) e $\text{Ab}_2/\text{CA15-3}/\text{Ab}_1/\text{Au-rGO}$ (imagens d e h). | 71 |
| Figura 27. Imagens de SEM de (a) SPCE e (b) Au-rGO/SPCE. | 72 |
| Figura 28. Otimização da preparação do imunossensor: mudança na impedância (0,1 Hz) conforme a concentração de Ab_1 (a) e o tempo de incubação (b) foram variados. Todas as análises de EIS foram registradas em solução de PBS (pH 7,4) com 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e n = 5. | 73 |
| Figura 29. Detecção eletroquímica do CA15-3 realizada no intervalo de potencial de 0,3 a -0,25 V (vs. Ag/AgCl) em solução de PBS (pH 7,4) na presença de 2,5 mM de HQ e 2,5 mM de H_2O_2 . (a) Curva analítica e (b) resposta de SWV do imunossensor a concentrações crescentes de CA15-3 de 0,1 fg mL^{-1} a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O branco é o sinal de $\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{MPA}/\text{Au-rGO}$ | 74 |
| Figura 30. (a) Estabilidade, reprodutibilidade e armazenamento do imunossensor em 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CA15-3 (n = 5). (b) Seletividade do imunossensor com 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CA15-3 e substâncias interferentes: BSA, PSA, p53, vitamina D3 e vitamina C a 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Resultados da resposta SWV do imunossensor conduzido em solução de PBS (pH 7,4) de 0,3 a -0,25 V (vs. Ag/AgCl). | 76 |
| Figura 31. Imagens de SEM-FEG de AuDdrites preparados em 0,5 M de H_2SO_4 com razão molar de 1:20 de HAuCl_4 para L-cis em (a) -0,4 V, (b) -0,6 V, (c) -0,8 V, (d) -1,0 V. | |

| | |
|--|----|
| Imagens SEM-FEG de AuDdrites a $-0,8$ V com diferentes razões molares de HAuCl_4 para L-cis: (e) 1:5, (f) 1:20, (g-h) 1:40. (i) Padrão de XRD dos AuDdrites preparados a $-0,8$ V com razão molar de 1:40 de HAuCl_4 para L-cis. (j) Voltamogramas cíclicos e (k) ECSA de eletrodos AuDdrites/SPCE em 0,5 M de H_2SO_4 a 20 mV s^{-1} | 80 |
| Figura 32. Imagem de SEM-FEG do eletrodo AuDdrites/SPCE preparado em 0,5 M de H_2SO_4 com razão molar de 1:20 de HAuCl_4 para L-cis a $-0,2$ V durante 900 s. | 81 |
| Figura 33. (a) Resposta de voltametria cíclica realizada em PBS 0,01 M (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sobre AuDdrites/SPCE. (b) Gráfico de corrente de pico anódica e catódica versus raiz quadrada da taxa de varredura. | 82 |
| Figura 34. (a) Imagem do chip imunossensor impresso em tela. (b) Gráfico de Bode dos (i) AuDdrites, (ii) L-cis/AuDdrites, (iii) Ab/L-cis/AuDdrites, (iv) BSA/Ab/L-cis/AuDdrites, e (v) eletrodos 25(OH)D3/BSA/Ab/L-cis/AuDdrites. (c) espectros PM-IRRAS de Au _s , L-cis/Au _s , Ab/L-cis/Au _s e 25(OH)D3/Ab/L-cis/Au _s . (d) Otimização do tempo de incubação de 25(OH)D3 a 10 ng mL^{-1} obtido por voltametria de onda quadrada. Os experimentos foram realizados em solução de PBS 0,01 M (pH 7,4) contendo 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 84 |
| Figura 35. Curvas de SWV para AuDdrites/SPCE otimizados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (passo de potencial = 5 mV): (a) Efeito da amplitude a 2 Hz e (b) da frequência com amplitude fixada em 75 mV..... | 85 |
| Figura 36. (a) Respostas de voltametria de onda quadrada do imunossensor a um aumento nas concentrações de 25(OH)D3 de 0 a $900,0 \text{ ng mL}^{-1}$. (b) Curva analítica de 0,1 a $900,0 \text{ ng mL}^{-1}$; (n = 5). Os experimentos foram realizados em solução de PBS 0,01 M (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 86 |
| Figura 37. Reprodutibilidade e estabilidade do imunossensor na presença de 10 ng mL^{-1} de 25(OH)D3. As medidas foram realizadas por voltametria de onda quadrada em solução de 0,01 M de PBS (pH 7,4) contendo 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 88 |
| Figura 38. (a) Seletividade do imunossensor na presença de $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de 25(OH)D3 e $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ dos interferentes (BSA, ácido úrico, glicose, vitamina B2, vitamina B1, vitamina C e vitamina D2). A mistura contém todas as substâncias mencionadas. Valores de recuperação de 25(OH)D3 para imunossensores incubados com $10,0$, $300,0$ e $700,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de 25(OH)D3 em (b) saliva artificial diluída e (c) amostras de soro humano. (n = 5). Os experimentos foram realizados por voltametria de onda quadrada em 0,01 M de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ | 89 |
| Figura 39. (a) Difratoograma de XRD e ficha do padrão PDF# 5-1537 de TiO_2 e (b) difratoograma de XRD e espectro de UV-vis do monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$ | 92 |
| Figura 40. Imagem de SEM (esquerda) e mapeamento EDS (direita) do eletrodo TiO_2 @poli $[\text{Ni}(\text{salen})]$ | 92 |
| Figura 41. Respostas de fotocorrente em solução de 0,1 M de PBS (pH 7) sob iluminação de ciclos ON/OFF para: (a) poli $[\text{Ni}(\text{salen})]$, (b) TiO_2 , (c) TiO_2 @poli $[\text{Ni}(\text{salen})]$ e (d) TiO_2 @poli $[\text{Ni}(\text{salen})]$ com 10,0 mM de lactato adicionado ao PBS. O potencial de polarização foi de 0 V (vs. OCP)..... | 94 |
| Figura 42. Espectros ATR-FTIR de água (H_2O) e água deuterada (D_2O). | 95 |
| Figura 43. Espectros de FTIR in situ no escuro (OFF) e sob iluminação (ON) durante a fotoeletrooxidação de 0,1 M de lactato sobre TiO_2 @poli $[\text{Ni}(\text{salen})]$ em solução de PBS preparada com (a) H_2O e (b) D_2O . Espectro ATR-FTIR do ácido láctico em soluções de (c) 0,1 M de H_2SO_4 , (d) 0,1 M de NaOH, e e) PBS..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| Figura 44. (a) Respostas PEC do TiO ₂ @poli[Ni(salen)] sob iluminação a diferentes pH (0 V vs. OCP). (b) Correntes no escuro (OFF) e sob iluminação (ON) em diferentes potenciais de polarização (0 a 0,5 V vs. OCP). Todas as medidas foram realizadas em soluções de PBS contendo 10,0 mM de lactato. | 97 |
| Figura 45. (a) Resposta PEC para TiO ₂ @poli[Ni(salen)] em 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 8,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 mM de lactato (a-1); b) curva analítica para TiO ₂ @poli[Ni(salen)] em solução de PBS a pH 7,0 sob iluminação de ciclos ON/OFF; (c) estudo de repetibilidade e reprodutibilidade em 10,0 mM de lactato; (d) testes de interferentes: NaCl (1), KCl (2), ácido ascórbico (3), ácido úrico (4), glicose (5), vitamina D3 (6) vitamina B1 (7), vitamina B2 (8) em 10 mM de lactato. Todos os experimentos foram realizados em um potencial de polarização de 0 V (vs. OCP) sob 3 W de excitação de luz LED. | 98 |
| Figura 46. (a) Ilustração esquemática da preparação do Ni-gC ₃ N ₄ e as principais unidades e grupos funcionais que formam nitretos de carbono poliméricos à base de heptazina. (b) Padrões de XRD do TiO ₂ , gC ₃ N ₄ e Ni-gC ₃ N ₄ . (c) espectros de FTIR de (i)TiO ₂ , (ii) gC ₃ N ₄ , (iii) Ni-gC ₃ N ₄ e (iv) Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ | 102 |
| Figura 47. Espectro de FTIR do gC ₃ N ₄ e Ni-gC ₃ N ₄ | 103 |
| Figura 48. Espectros de XPS de varredura ampla do (a) gC ₃ N ₄ , (b) Ni-gC ₃ N ₄ , (c) TiO ₂ e (d) Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ | 104 |
| Figura 49. Espectros de XPS de alta resolução desconvoluídos do (a-b) C 1s para (a) gC ₃ N ₄ e (b) Ni-gC ₃ N ₄ , (c-d) N 1s para (c) gC ₃ N ₄ e (d) Ni-gC ₃ N ₄ , Ti 2p para (e) TiO ₂ e (f) Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ | 105 |
| Figura 50. Imagens de TEM do (a-c) Ni-gC ₃ N ₄ e (d-f) Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ . Imagens de mapeamento do Ni-gC ₃ N ₄ para (b) Ni ou (c) N e Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ para (e) Ti (d) ou Ni (f) também são mostradas. | 106 |
| Figura 51. (a) Gráfico de Kubelka-Munk (F(r)). (b) Gráfico de Tauc do (F(r)hν) ^{1/2} versus energia do fóton para diferentes amostras como indicado na figura. | 107 |
| Figura 52. (a) Curvas transientes de fotocorrente para (i) TiO ₂ , (ii) gC ₃ N ₄ /TiO ₂ , (iii) Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ e (iv) Amb/Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ recordadas em solução de PBS (pH 7,4) com 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP). (b) Espectros de EIS (linhas contínuas correspondem ao fit usando o circuito de Randles). (c) voltamogramas cíclicos a 50 mV s ⁻¹ para os eletrodos de TiO ₂ , gC ₃ N ₄ /TiO ₂ , Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ obtidos em 0,1 M de KCl com 5,0 mM de [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} . (d) Gráfico de Mott-Schottky. | 108 |
| Figura 53. (a) Espectros de EIS e (b) voltamogramas cíclicos a 50 mV s ⁻¹ do gC ₃ N ₄ e Ni-gC ₃ N ₄ . Ambas as medidas foram registradas em 0,1 M de KCl contendo 5,0 mM de [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} | 109 |
| Figura 54. Resposta PEC na presença de 0,1 M de AA para (a) TiO ₂ (a diferentes concentrações) e (b) eletrodos com Ni _x -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ . Resposta PEC do (c) Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ , (1) sem ou (2) com 0,1 M de AA, e Amb/Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ com (3) 0,05, (4) 0,1 ou (5) 0,2 M de AA. (d) Fotocorrente de Amb/Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ para 1200 s com 0,1 M de AA. Todos os experimentos foram registrados em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP). | 112 |
| Figura 55. (a) Espectros de EIS registrados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} (as linhas contínuas correspondem ao ajuste usando o circuito de Randles). (b) Resposta PEC do imunossensor obtido em solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível (410 nm). (c) Curva analítica para concentrações crescentes de 10 ⁻¹⁸ a 10 ⁻⁸ g mL ⁻¹ ; (n = 5). (d) Estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor PEC em 10 ⁻⁹ g mL ⁻¹ de PSA. | 114 |

Figura 56. (a) Seletividade do imunossensor PEC: 10,0 ng mL⁻¹ PSA, 1,0 ng mL⁻¹ proteínas (CA15-3, p54, BSA) e 100,0 ng mL⁻¹ para os outros interferentes (KCl, NaCl, vitamina D3, ácido úrico). A mistura contém todos os elementos mencionados. (b) Valores de recuperação de PSA para os imunossensores PEC incubados com 10,0, 1,0 e 0,1 ng mL⁻¹ de PSA em amostras de soro humano diluídas. (n = 4). Todos os experimentos foram registrados em solução de PBS contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível 117

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|-----|
| Esquema 1. (a) Mecanismo de eletrossíntese de nanoestruturas de dendritos de ouro em forma de árvore por meio da dessorção seletiva da L-cis sobre os planos (111) do Au e (b) procedimentos de preparação dos imunossensores: (i) L-cis por 24 h; (ii) incubação do anticorpo por 16 h; (iii) BSA por 4 h; (iv) metabólito 25(OH)D3 por 15 min..... | 40 |
| Esquema 2. (a) Procedimento de preparação dos imunossensores PEC. (b) O sistema portátil usado em experimentos de PEC. | 45 |
| Esquema 3. (a) Ilustração da preparação das plataformas Au-rGO por co-eletrorredução in situ de GO e Au. (b) Diagrama esquemático do imunossensor eletroquímico sanduíche usando uma enzima HRP para detecção de CA15-3. As reações nos (b1) sítios ativos da enzima e (b2) na superfície do eletrodo também são mostradas. | 70 |
| Esquema 4. (a) Ilustração esquemática da fabricação de um sensor PEC: (a _i) SPCE, (a _{ii}) superfície do SPCE com nanopartículas de TiO ₂ , (a _{iii}) superfície do SPCE com TiO ₂ e poli[Ni(salen)]. | 91 |
| Esquema 5. Polimerização eletroquímica do [Ni(salen)]: (a) polimerização via empilhamento e (b) polimerização em cadeia. | 93 |
| Esquema 6. Mecanismo de fotodeteção de PSA sobre o fotocatalisador Amb/Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ sob irradiação de luz LED visível..... | 110 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos da literatura de sensores eletroquímicos para detecção simultânea dos antibióticos SMX e TMP. | 57 |
| Tabela 2. Recuperação de SMX e TMP em PBS (pH 6,0) feito com água da torneira, n = 3. | 59 |
| Tabela 3. Uma visão geral dos métodos para determinar biomarcadores de câncer de mama. | 75 |
| Tabela 4. Valores de recuperação para os imunossensores incubados com 1×10^{-16} , 1×10^{-12} e 1×10^{-6} g mL ⁻¹ CA15-3 em soro humano e amostras de saliva artificial diluídos (P = 0,05; n = 5). | 77 |
| Tabela 5. Camadas de detecção na literatura para detecção de 25-hidroxivitamina D3. | 87 |
| Tabela 6. Uma visão geral dos métodos para determinar o PSA. | 115 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | | |
|--|-----------------|-----|
| $HRP(FeIII) + H_2O_2 \rightarrow HRP(FeIV) + H_2O$ | Equação 1 | 70 |
| $HRP(FeIV) + HQ \rightarrow HRP(FeIII) + BQ$ | Equação 2 | 70 |
| $BQ + 2H + +2e^- \rightarrow HQ$ | Equação 3 | 70 |
| $lactato \rightarrow CO_2 + 11H + +12e^-$ | Equação 4..... | 95 |
| $ECB(NHE, pH 7) = EFBAg/AgCl, pH 6,9 + E0Ag/AgCl sat. KCl - 0,059(7 - 6,9) -$ $0,2$ | | |
| Equação 5 | | 109 |
| $EVB = EBC + Eg$ | Equação 6 | 109 |
| $Amb/Ni-gC_3N_4/TiO_2 + hv \rightarrow e^- + h^+$ | Equação 7 | 110 |
| $O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$ | Equação 8..... | 110 |
| $H_2O + h^+ \rightarrow \cdot OH$ | Equação 9 | 110 |
| $\cdot O_2^- / \cdot OH / h^+ + AA \rightarrow AA^+$ | Equação 10..... | 110 |

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|--|---|
| ΔE | separação entre os picos anódico e catódico |
| ΔI | diferença entre as correntes anódica e catódica |
| 25(OH)D3 | metabólito 25-hidroxivitamina D3 |
| Ab ₁ | anticorpo primário |
| Ab ₂ | anticorpo secundários |
| AFM | microscopia de força atômica |
| Amb | aril diazônio |
| Amb/Ni ₁₀ -gC ₃ N ₄ /TiO ₂ | nanopartículas de óxido de titânio (TiO ₂) sensibilizado com nitreto de carbono grafítico e aril diazônio |
| ATR | refletância total atenuada |
| Au | nanopartículas de ouro |
| AuDdrites | dendritos de ouro em forma de árvore |
| Au-rGO | nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido |
| BSA | albumina do soro bovino |
| CA15-3 | antígeno de carboidrato 15-3 |
| CB | banda de condução |
| CH ₃ CN | acetonitrila |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| CV | voltametria cíclica |
| DPV | voltametria de pulso diferencial |
| e.g. | por exemplo |
| E _{CB} | potencial da banda de condução |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida |
| EDS | espectroscopia de raios-X por dispersão em energia |
| E _{FB} | potencial da banda plana |
| EIS | espectroscopia de impedância |
| E _{VB} | potencial da banda de valência |
| FEG | feixe eletrônico por emissão de campo |
| FTIR | espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier |
| g-C ₃ N ₄ | nitretos de carbono grafítico |
| GNRs | nanofitas de grafeno |

| | |
|--|--|
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ | ácido sulfúrico |
| HAuCl ₄ | ácido tetracloroáurico |
| HCl..... | ácido clorídrico |
| HQ..... | hidroquinona |
| HRP..... | peroxidase de rábano |
| K ₂ S ₂ O ₈ | persulfato de potássio |
| K ₃ [Fe(CN) ₆]..... | hexacianoferrato de potássio (III) |
| K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O..... | hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado |
| KH ₂ PO ₄ | fosfato de potássio monobásico |
| KMnO ₄ | permanganato de potássio |
| KNO ₃ | nitrato de potássio |
| LED..... | diodo emissor de luz |
| LOD..... | limite de detecção |
| MIP..... | polímeros molecularmente impressos |
| MPA..... | ácido 3-mercaptopropiônico |
| MWCNTs..... | nanotubos de carbono de paredes múltiplas |
| Na ₂ HPO ₄ | fosfato de sódio dibásico |
| NaCl..... | cloreto de sódio |
| NaOH..... | hidróxido de sódio |
| NHE..... | eletrodo normal de hidrogênio |
| NHS..... | N-hidróxissuccinimida |
| Ni..... | níquel |
| OCP..... | potencial de circuito aberto |
| P ₂ O ₅ | pentóxido de fósforo |
| PBS..... | tampão fosfato salino |
| PEC..... | detecção fotoeletroquímica |
| PM-IRRAS..... | espectroscopia no infravermelho de reflexão e absorção com modulação da polarização |
| POC..... | ponto de atendimento |
| PSA..... | antígeno prostático específico |
| Rct..... | resistência a transferência de carga |
| rGN..... | nanofitas de grafeno reduzidas |

| | |
|--|--|
| rGO..... | óxido de grafeno reduzido |
| RSD..... | desvio padrão relativo |
| SAMs..... | monocamadas auto-montadas |
| SEM..... | microscopia eletrônica de varredura |
| SMX..... | sulfametoxazol |
| SPCEs..... | eletrodos de carbono impressos |
| SPE..... | eletrodos impressos com tela |
| SWV..... | voltametria de onda quadrada |
| TBAP..... | perclorato de tetrabutylamônio |
| TEM..... | microscopia eletrônica de transmissão |
| TiO ₂ | óxido de titânio |
| TiO ₂ @poli[Ni(salen)]..... | |
| | nanopartículas de óxido de titânio modificadas com filme polimérico de [Ni(salen)] |
| TMP..... | trimetoprima |
| UV-vis..... | ultravioleta-visível |
| VB..... | banda de valência |
| XPS..... | espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X |
| XRD..... | difração de raios-X |

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| AGRADECIMENTOS | iv |
| RESUMO | v |
| ABSTRACT | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE ESQUEMAS | xii |
| LISTA DE TABELAS | xiii |
| LISTA DE EQUAÇÕES | xiv |
| LISTA DE ABREVIACÕES | xv |
| SUMÁRIO | xviii |
| ASPECTOS GERAIS | 22 |
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 Sensores e biossensores eletroquímicos | 23 |
| 1.2 Sensores e biossensores fotoeletroquímicos | 27 |
| 1.3 Eletrodos impressos | 28 |
| 1.4 Materiais à base de grafeno | 29 |
| 2 OBJETIVO | 31 |
| 3 METODOLOGIA | 32 |
| 3.1 Reagentes e soluções | 32 |
| 3.2 Instrumentação | 33 |
| 3.2.1 Ultravioleta-visível | 33 |
| 3.2.2 Experimentos eletroquímicos | 33 |
| 3.2.3 Ângulos de contato | 33 |
| 3.2.4 Difração de raios-X | 33 |
| 3.2.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier | 33 |
| 3.2.6 Espectroscopia Raman | 34 |
| 3.2.7 Microscopia de força atômica | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de raios-X por dispersão em energia e microscopia eletrônica de varredura com feixe eletrônico por emissão de campo..... | 34 |
| 3.2.9 Microscopia eletrônica de Transmissão | 34 |
| 3.2.10 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X | 35 |
| 3.2.11 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier <i>in situ</i> | 35 |
| 3.2.12 Espectroscopia de absorção atômica | 35 |
| 3.2.13 Espectroscopia de refletância difusa no ultravioleta-visível | 35 |
| 3.2.14 Espectroscopia no infravermelho de reflexão e absorção com modulação da polarização | 35 |
| 3.3 Manufatura dos SPCEs | 36 |
| 3.4 Tratamento eletroquímico dos SPCEs | 36 |
| 3.5 Preparação da plataforma de detecção rGN e medidas eletroquímicas | 36 |
| 3.6 Preparação da plataforma de detecção Au-rGO | 37 |
| 3.7 Preparação do imunossensor para CA15-3 | 38 |
| 3.8 Detecção eletroquímica do CA15-3 | 38 |
| 3.9 Preparação da plataforma de detecção AuDdrites e do imunossensor para vitamina D..... | 39 |
| 3.10 Detecção eletroquímica da vitamina D | 40 |
| 3.11 Projeto do sistema fotoeletroquímico e principais características | 41 |
| 3.12 Preparação da plataforma de detecção TiO ₂ @poli[Ni(salen)] e medidas eletroquímicas | 42 |
| 3.13 Preparação da plataforma de detecção Ni-gC ₃ N ₄ /TiO ₂ | 43 |
| 3.14 Preparação do imunossensor para PSA..... | 44 |
| 3.15 Detecção eletroquímica de PSA | 45 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I | 46 |
| 4.1 Caracterização do SPCE | 47 |
| 4.2 Caracterização das rGNs | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3 Comportamento eletroquímico do sensor..... | 52 |
| 4.4 Curvas analíticas, repetibilidade e estudo de reprodutibilidade..... | 54 |
| 4.5 Detecção simultânea de SMX e TMP em amostras reais e estudo de interferência..... | 58 |
| 4.6 Conclusões parciais..... | 60 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE II..... | 61 |
| 5.1 Otimização do tratamento eletroquímico..... | 62 |
| 5.2 Caracterização da plataforma de detecção Au-rGO..... | 63 |
| 5.3 Determinação do potencial de oxidação do ácido 3-mercaptopropiônico..... | 68 |
| 5.4 Comportamento eletroquímico e caracterização do imunossensor..... | 69 |
| 5.5 Otimização da preparação do imunossensor..... | 72 |
| 5.6 Desempenho analítico do imunossensor para detecção de CA15-3..... | 73 |
| 5.7 Avaliação da estabilidade, reprodutibilidade, seletividade e armazenamento do imunossensor..... | 75 |
| 5.8 Desempenho analítico em amostras de soro humano e saliva artificial..... | 76 |
| 5.9 Conclusões parciais..... | 77 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE III..... | 78 |
| 6.1 Princípio de detecção..... | 79 |
| 6.2 Caracterização e otimização da plataforma de detecção eletroquímica..... | 79 |
| 6.3 Caracterização e otimização do chip imunossensor..... | 82 |
| 6.4 Desempenho analítico do chip imunossensor flexível e descartável..... | 84 |
| 6.5 Reprodutibilidade e estabilidade..... | 87 |
| 6.6 Estudo de especificidade e monitoramento de 25(OH)D3 em amostras de saliva artificial e soro humano..... | 88 |
| 6.7 Conclusões parciais..... | 89 |
| 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE IV..... | 90 |
| 7.1 Caracterização do sensor PEC..... | 91 |
| 7.2 FTIR <i>in situ</i> | 94 |
| 7.3 Efeito do pH e potencial aplicado..... | 96 |

| | |
|--|------------|
| 7.4 Detecção PEC de lactato..... | 97 |
| 7.5 Conclusões parciais..... | 98 |
| 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE V | 100 |
| 8.1 Estrutura e morfologia | 101 |
| 8.2 Propriedades fotoeletroquímicas..... | 106 |
| 8.3 Possível mecanismo..... | 109 |
| 8.4 Otimização da plataforma de detecção | 111 |
| 8.5 Análise do imunossensor PEC para PSA..... | 113 |
| 8.6 Reprodutibilidade e estabilidade | 115 |
| 8.7 Análise de amostra real e estudo de especificidade | 116 |
| 8.8 Conclusões parciais..... | 117 |
| 9 CONCLUSÕES GERAIS | 118 |
| Referências | 120 |

ASPECTOS GERAIS

Sensores eletroquímicos permitem uma análise rápida e apresentam portabilidade adequada para emprego em campo e dentro do paradigma de ponto de atendimento (POC, *point-of-care*). Eles podem ser feitos, por exemplo, com eletrodos de carbono impressos com tela (SPCEs, *screen printed carbon electrodes*), que são manufacturados com tintas condutoras de carbono aplicadas sobre um substrato (e.g. papel ou plástico) por meio de um processo de serigrafia. Nos últimos anos, a detecção eletroquímica com SPCE foi aprimorada (AMBAYE *et al.*, 2021; GARCÍA-MIRANDA FERRARI; ROWLEY-NEALE; BANKS, 2021), mas algumas limitações permanecem, principalmente aquelas relacionadas ao sinal de fundo inerente aos métodos eletroquímicos e aos solventes e aditivos orgânicos presentes nas tintas condutoras (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018). Essas limitações podem ser superadas combinando, por exemplo, as seguintes estratégias: (i) protocolos de tratamento dos eletrodos; (ii) busca por plataformas eletroquímicas otimizadas; (iii) uso de métodos para amplificação do sinal eletroquímico; (iv) outras formas de detecção analítica, como a detecção fotoeletroquímica. Dentro deste contexto, materiais à base de grafeno, nanoestruturas de ouro (Au), óxido de titânio (TiO₂), materiais poliméricos e nitreto de carbono grafítico (gC₃N₄) têm sido explorados em (bio)sensores (foto)eletroquímicos para detecção de moléculas de interesse ambiental e clínico (FANG *et al.*, 2021; RASHID *et al.*, 2021; SIEW *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021c). Os antibióticos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) são usados para tratar infecções bacterianas, fúngicas e pneumonia *pneumocystis* (MINATO *et al.*, 2018; MORRIS *et al.*, 2004; SMILACK, 1999). Há evidências de que cerca de 85% e 30% do conteúdo original do TMP e SMX, respectivamente, são eliminados inalterados na urina (KREMERS; DUVIVIER; HEUSGHEM, 1974; SIBER *et al.*, 1982), sendo então encontrados em águas residuais urbanas. Por outro lado, moléculas como antígeno de carboidrato 15-3 (CA15-3, *carbohydrate antigen 15-3*), metabólito 25-hidroxivitamina D3 (25(OH)D3), lactato e antígeno prostático específico (PSA, *prostatic-specific antigen*) são indicadoras de processos biológicos (HASAN *et al.*, 2021). Podem, portanto, ser usadas para diagnosticar doenças e monitorar o estado clínico dos pacientes.

Neste projeto de pesquisa, sensores eletroquímicos foram desenvolvidos em SPCEs serigrafados sobre papel manteiga e polietileno tereftalato (PET) para detectar os poluentes emergentes SMX e TMP e os biomarcadores CA15-3 (câncer de mama), 25(OH)D3 (vitaminada D), lactato e PSA (câncer de próstata) em matrizes de água de torneira ou em soro

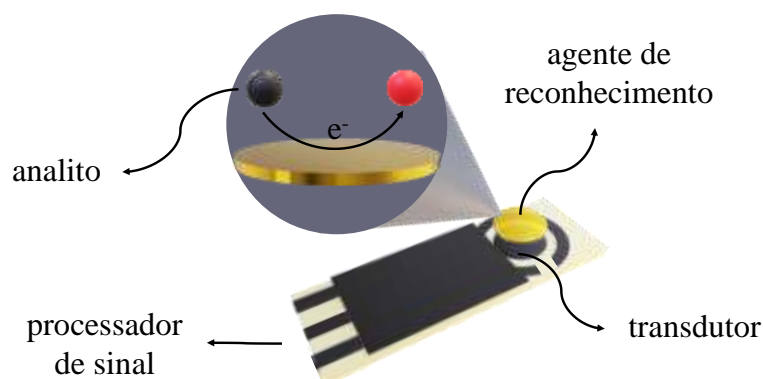
humano e saliva. Para a detecção simultânea dos antibióticos SMX e TMP, um sensor eletroquímico serigrafado em papel manteiga modificado via *drop-casting* de nanofitas de óxido de grafeno reduzidas (rGN) foi desenvolvido. O imunossensor para CA15-3 foi manufaturado via a eletrossíntese, por voltametria cíclica (CV, *cyclic voltammetry*), de nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido (Au-rGO). Um método de electrocristalização por cronoamperometria (CA) foi utilizado para gerar dendritos de ouro em forma de árvore (AuDdrites) sobre o SPCE aplicado no monitoramento do metabólito 25-hidroxitamina D3. O sensor para lactato foi desenvolvido com SPCE modificado com nanopartículas de TiO₂ via *drop-casting* seguido da eletropolimerização por CV do filme polimérico de [Ni(salen)]. Em adição, o sensor para PSA foi manufaturado via o *drop-casting* de nanopartículas de TiO₂ e gC₃N₄ seguido da eletrodeposição de aril diazônio (Amb). Os resultados e discussão estão apresentados em cinco partes com conclusões parciais para cada sensor desenvolvido.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sensores e biossensores eletroquímicos

Sensores eletroquímicos são dispositivos que detectam transformações químicas, físicas ou biológicas e as transformam em um sinal elétrico. Eles são constituídos de um transdutor, um agente de reconhecimento (nanomaterial ou elemento de biorreconhecimento) e um processador de sinal, conforme mostra a **Figura 1**. Quando o agente de reconhecimento utilizado é uma espécie biológica, esses são classificados como biossensores. Ambos são capazes de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas seletivas (GOLD, 2019), podendo ser utilizados para monitorar uma matriz biológica ou não biológica (THÉVENOT *et al.*, 2001). Os elementos de reconhecimento biológico mais recorrentes em biossensores eletroquímicos são: i) enzimas; ii) anticorpos; iii) oligonucleotídeos; iv) aptâmeros e v) materiais biomiméticos, que buscam imitar as propriedades de enzimas naturais e de sistemas biológicos. Dentre esses materiais estão inclusos nanozimes, sinzimes, polímeros molecularmente impressos (MIPs, *molecularly imprinted polymers*), nanocanais e complexos metálicos (ROMANHOLO *et al.*, 2021).

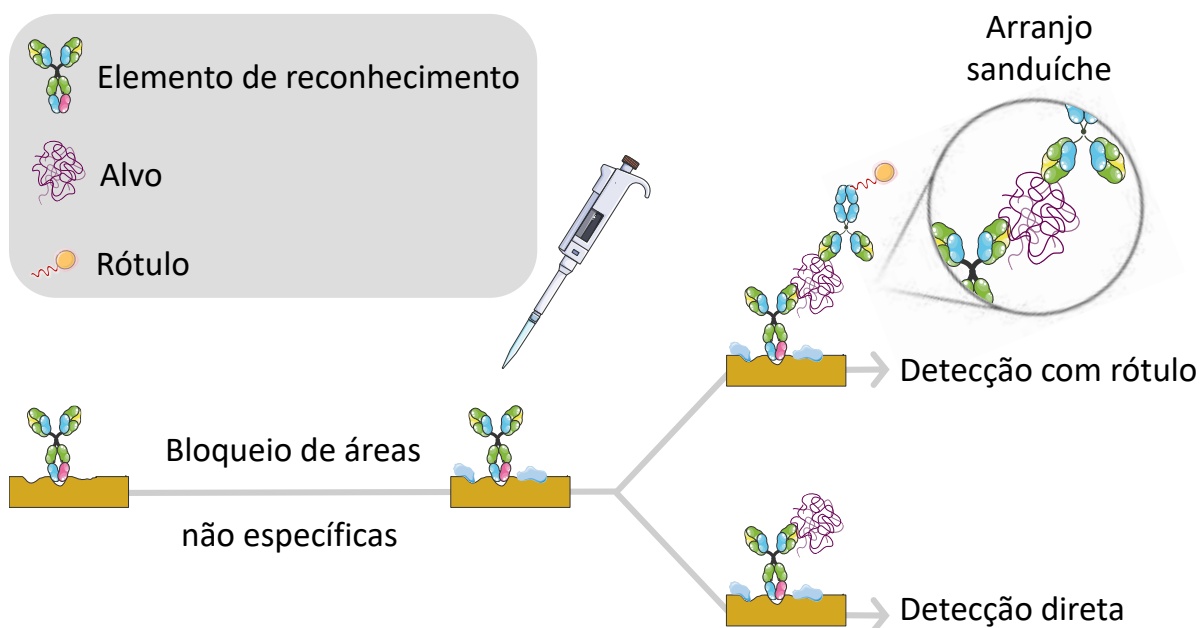
Figura 1. Componentes de um sensor eletroquímico.



Fonte: Autoria própria.

A **Figura 2** ilustra um esquema geral de possibilidades de preparo de biossensores utilizando proteínas como agente de reconhecimento. Inicialmente, um grande número de elementos de captura é imobilizado sobre a superfície eletródica. Após as etapas de lavagem e bloqueio de regiões não específicas, a plataforma é sondada com uma amostra contendo o analito de interesse. Se ocorrer interação, um sinal é produzido por detecção direta ou mediante a um elemento rotulado, com ou sem a utilização de abordagens baseadas em sanduíche. O rótulo pode ser um elemento (e.g. ferroceno) ou bioelemento (e.g. uma enzima peroxidase) que (bio)catalise uma reação de oxido-redução, sendo normalmente necessário o uso de um mediador de elétrons. Alguns autores também relataram que usar abordagens baseadas em sanduíche podem aumentar a sensibilidade dos imunossensores amperométricos por um fator de até 200 vezes (FENG *et al.*, 2017; VARGAS *et al.*, 2019; ZHENG; ZHAO; MA, 2018).

Figura 2. Esquema geral de um biossensor eletroquímico.



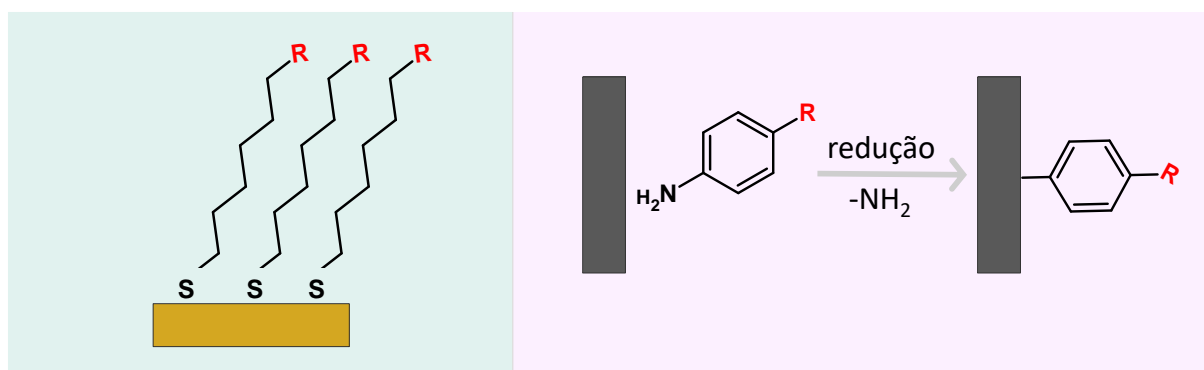
Fonte: Autoria própria.

A imobilização do elemento de reconhecimento biológico é uma etapa importante para o bom desempenho do biossensor eletroquímico, pois uma imobilização malsucedida pode levar à lixiviação da biomolécula ou perda de sua atividade. Entre os mecanismos mais comuns de imobilização estão: i) adsorção direta, ii) aprisionamento físico, iii) ligação covalente, e iv) uso de proteínas marcadas. Devido à sua simplicidade, o método de adsorção direta é bastante utilizado. Porém, a remoção da proteína por condições vigorosas de lavagens, adsorção de proteínas não específicas e desnaturação da proteína imobilizada podem vir a ocorrer. O aprisionamento físico é realizado em estruturas tridimensionais de géis como poliacrilamida ou agarose e, apesar dessas estruturas ajudarem na preservação das biomoléculas, devido ao seu ambiente aquoso, a estrutura do gel pode representar uma barreira à difusão e aos eventos de reconhecimento molecular podendo exigir longos tempos de incubação (CRETICH *et al.*, 2006). No caso do uso de proteínas marcadas (e.g. His-*tag*), a sua imobilização se dá tipicamente pela interação entre a *tag* (sequência sintética de polipeptídeos) e a superfície (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). A grande limitação desta abordagem consiste no uso de técnicas de engenharia genética. Finalmente, o mecanismo via ligação covalente requer a presença de grupos reativos no suporte capaz de reagir com os grupos da biomolécula, sendo este processo normalmente mediado por um agente de reticulação (e.g. 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidróxisuccinimida (NHS)) (RICCI; ADORNETTO; PALLESCHI, 2012).

Dentre as estratégias disponíveis para a funcionalização da superfície eletródica de modo a possibilitar a imobilização de um elemento de biorreconhecimento via ligação covalente, destacam-se o uso de monocamadas auto-montadas (SAMs, *self-assembled monolayers*) com alcanotióis e a redução de sais de aril diazônio (**Figura 3**). A funcionalização de superfícies metálicas como de ouro, platina, cobre e prata com SAMs à base de alcanotióis, dissulfetos dialquil e sulfetos é uma prática comum (RAYMUNDO-PEREIRA *et al.*, 2021). A formação de SAM é geralmente alcançada imergindo o substrato metálico limpo em uma solução diluída do tiol desejado, ao qual as funcionalidades tiol adsorvem quimicamente sobre o metal, formando espontaneamente as ligações S-metal. A natureza auto-montada da monocamada surge devido ao efeito hidrofóbico que impulsiona o alinhamento vertical espontâneo das estruturas de alceno, produzindo uma camada uniforme (SRISOMBAT; JAMISON; LEE, 2011). A metodologia de redução de sais de aril diazônio é teoricamente aplicável à funcionalização covalente de qualquer superfície condutora (MOHAMED *et al.*, 2015a). A funcionalização ocorre por meio da formação reductiva de um radical aril que posteriormente ataca a superfície do eletrodo, sendo assim, um processo eletroquimicamente controlável (COUGNON *et al.*, 2009). A maior limitação para o uso de sistemas SAM e de sais de aril diazônio em aplicações eletroquímicas é que eles são estáveis apenas em um intervalo limitado de potencial (YATES; FASCIONE; PARKIN, 2018).

Figura 3. Estrutura genérica de um alcanotiol à esquerda e estrutura genérica de um sal de aril diazônio à direita.



R Grupo funcional

Fonte: Autoria própria.

1.2 Sensores e biossensores fotoeletroquímicos

A detecção fotoeletroquímica (PEC, *photoelectrochemical*) é uma maneira analítica recente e de rápido desenvolvimento para detectar biomoléculas (CHEN *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2019), cujos princípios de trabalho envolvem as seguintes etapas: (i) um material fotoativo é irradiado com luz, promovendo elétrons da banda de valência (VB, *valence band*) para a banda de condução (CB, *conduction band*); (ii) elétrons ou buracos migram para a superfície do eletrodo na interface com o eletrólito, produzindo uma fotocorrente; (iii) analitos alvo interagem com o eletrodo, afetando a separação de cargas e/ou o processo de migração, alterando assim a fotocorrente (WANG; LIU, 2020). Como a fonte de luz de excitação e o sinal elétrico de saída são separados, o sinal de fundo exibido pelos sensores PEC é muito pequeno e o limite de detecção pode atingir um nível muito baixo (LIU *et al.*, 2015; WANG; LIU, 2020; YU *et al.*, 2019).

Os sensores PEC podem ser anódicos ou catódicos, dependendo se semicondutores tipo n ou tipo p são usados, respectivamente. Para sensores anódicos, o analito atua como um doador de elétrons para os buracos fotogerados, e os elétrons fotogerados são transferidos para o circuito externo, sob um potencial aplicado. Os sensores catódicos PEC operam ao contrário (WANG *et al.*, 2020). A maioria dos sensores fotoeletroquímicos, incluindo imunossensores, genossensores e aptassensores, usam grandes fontes de irradiação de alta potência (100 a 500 W) (ADHIKARI; KIM, 2018; FENG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2018; WANG; WU; ZHANG, 2019), o que impede a miniaturização. Como pequenos diodos emissores de luz (LEDs) oferecem baixa energia de irradiação, empregá-los em dispositivos PEC de alto desempenho requer materiais com alta atividade fotocatalítica (ZHAO; XU; CHEN, 2018).

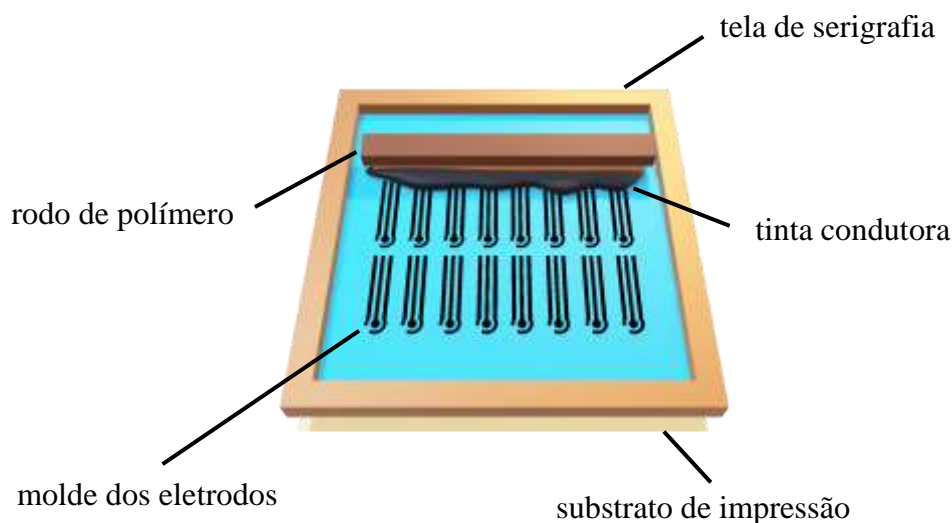
O semicondutor tipo n TiO_2 é um candidato a tal material devido ao seu baixo custo, forte absorção de luz e inércia química (WANG *et al.*, 2018a), mas é limitado por causa de sua rápida recombinação de portadores de carga fotogerados (DONG *et al.*, 2018; MOHAMED *et al.*, 2015b). Materiais com níveis de energia favoráveis à separação de carga podem acelerar a transferência de elétrons em reações PEC (ZANG; LEI; JU, 2017). Por exemplo, materiais à base de níquel (Ni) aumentam a atividade fotocatalítica e a estabilidade dos semicondutores (GAO *et al.*, 2004). Além disso, a dopagem com Ni pode promover a absorção de luz pela introdução de estados de Ni 3d na lacuna, melhorando também a atividade fotocatalítica (LIN *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2010). Compósitos com nanopartículas de TiO_2 e filmes poliméricos são usados em sensores e biossensores fotoeletroquímicos (THANGAMANI; PASHA, 2021; YANG *et al.*, 2021a,

2021b), pois suas estruturas porosas podem facilitar a penetração da luz e aumentar a intensidade coletada pelo fotoeletrocatalisador devido a múltiplas reflexões (GRANT *et al.*, 2002; RAMASUBBU *et al.*, 2019).

1.3 Eletrodos impressos

Desde a década de 1990, a tecnologia de impressão com tela (**Figura 4**), adaptada da indústria de microeletrônica, oferece produção em grande escala de sensores baratos, e ainda altamente sensíveis e reprodutíveis (DUTRONC *et al.*, 1992; GE *et al.*, 1998; HART; HARTLEY, 1994). Além da impressão com tela, sensores impressos são produzidos por outros métodos de fabricação, como litografia, filtração, impressão 3D e de jato de tinta (ATAIDE *et al.*, 2021; GIACOMELLI *et al.*, 2020; JEONG *et al.*, 2021; PURWIDYANTRI *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2021a). Os eletrodos impressos com tela (SPEs, *screen printed electrodes*) podem ser fabricados sobre vários substratos, como plástico, papel, luvas, sobre a pele como tatuagem etc., e são caracterizados pela alta versatilidade na seleção do método de fabricação, tamanho, geometria e personalização (CAGNANI *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2021b; SIBUG-TORRES *et al.*, 2021; SMART *et al.*, 2020). O uso de SPEs pode ser de grande interesse para desenvolver novos métodos e pesquisas, contudo, os aditivos e solventes orgânicos presentes nas tintas condutoras podem resultar em cinéticas mais lentas para reações eletroquímicas. Assim, tentativas de aprimorar a cinética destes eletrodos têm sido feitas com diferentes tratamentos. Por exemplo, González-Sánchez *et al.* reportaram um aumento na sensibilidade de 140 vezes para SPCEs submetidos a uma ativação eletroquímica usando H_2O_2 no tampão fosfato (pH 7) (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018), enquanto Wang *et al.* relataram um aumento na resposta eletroquímica de 80 vezes para SPCEs tratados com plasma de oxigênio (WANG; CHANG; YUAN, 2009). Além disso, nanomateriais à base de grafeno demonstram melhorar as características dos SPEs em termos de custo-efetividade, biocompatibilidade, condutividade e fotoatividade (MATERÓN *et al.*, 2021; VILLALONGA *et al.*, 2021).

Figura 4. Ilustração do processo de serigrafia.



Fonte: Autoria própria.

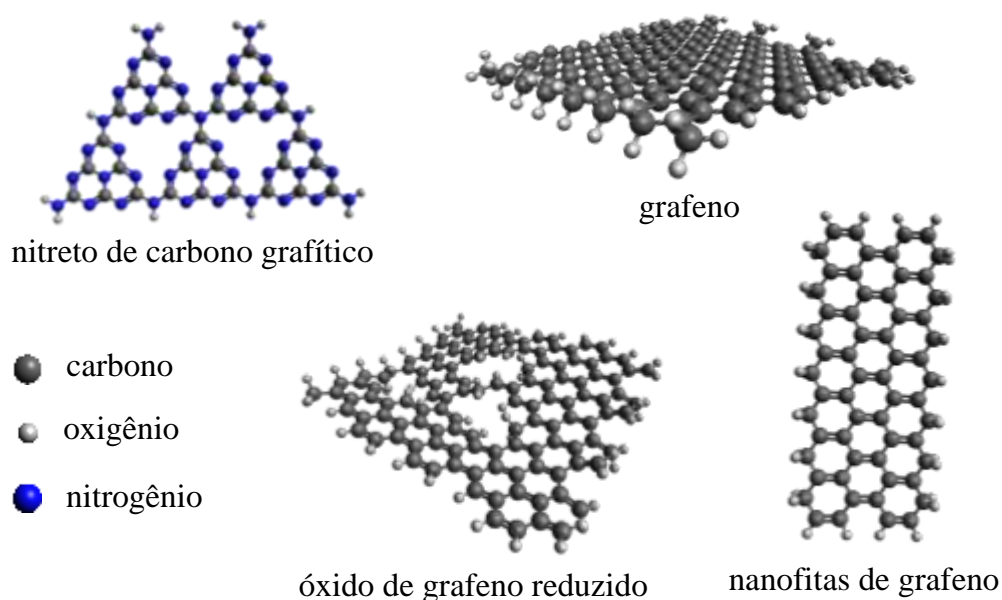
1.4 Materiais à base de grafeno

A atividade catalítica do grafeno e de seus derivados têm sido estudadas sob diferentes perspectivas, inclusive para (bio)sensores eletroquímicos e fotoeletroquímicos, para detectar biomarcadores e moléculas de interesse ambiental (KWON *et al.*, 2021; XIA *et al.*, 2021; ZHANG; PING; YING, 2020). Esse interesse se deve a sua condutividade, transparência, resistência mecânica, estabilidade química e flexibilidade. As propriedades do grafeno podem também serem adaptadas pela escolha do método de síntese, com otimização para detecção (foto)eletroquímica de uma vasta gama de moléculas (GENORIO; ZNIDARSIC, 2014; LIM; CHUA; PUMERA, 2014; PUMERA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2018b; ZHENG *et al.*, 2018). Conhecido como o primeiro nanomaterial bidimensional, o grafeno é formado por uma única camada de átomos de carbono com hibridização sp^2 . Apesar dessas características, foi observado que é fundamental funcionalizá-lo para minimizar as forças de Van der Waals e as interações de empilhamento $\pi - \pi$ entre as folhas de grafeno para construir sensores eletroquímicos (THANGAMANI; PASHA, 2021). Para resolver este problema, o grafeno é normalmente funcionalizado com nanopartículas inorgânicas, surfactantes, grupos hidrofílicos ou polímeros (DONG *et al.*, 2018). Estes materiais podem proporcionar sinergia e permitir construir sensores eletroquímicos e biossensores mais eficientes (GRANT *et al.*, 2002).

Outra abordagem consiste em usar derivados do grafeno como matriz para os sensores. Pode-se empregar óxido de grafeno reduzido (rGO, *reduced graphene oxide*), nanofitas de

grafeno (GNRs, *graphene nanoribbons*) e nitretos de carbono grafítico (g-C₃N₄) (BOLLELLA *et al.*, 2016), **Figura 5**. Por exemplo, Ma *et al.* reportaram o uso de rGO dopado com prata capaz de monitorar íons mercúrio a nível de traços em amostras de peixe e sangue humano (MA *et al.*, 2021). Já, Rana *et al.* e Mao *et al.* obtiveram baixos limites de detecção utilizando os compósitos MoS₂/GNR/Au e CuO/g-C₃N₄ na determinação de hepcidina e aflatoxina B1, respectivamente (MAO *et al.*, 2021; RANA *et al.*, 2021). Pode-se esperar, portanto, que compósitos com estes materiais permitam o ajuste de propriedades na exploração de novos fenômenos para construção de sensores e biossensores eletroquímicos com desempenhos aprimorados.

Figura 5. Materiais baseados no grafeno.



Fonte: Autoria própria.

2 OBJETIVO

Este trabalho, teve como objetivo desenvolver dispositivos miniaturizados, para o monitoramento acessível e no local de moléculas de interesse ambiental e clínico. Os objetivos específicos foram: (i) aprimorar a resposta do transdutor (eletrodo de trabalho) por meio de protocolos de tratamento eletroquímico; (ii) sintetizar e caracterizar compósitos à base de ouro, grafeno, e nitretos de carbono grafítico; (iii) construir sensores eletroquímicas para detectar os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima; (iv) fabricar imunossensores eletroquímicos para o antígeno de carboidrato 15-3 (câncer de mama) e o metabólito 25-hidroxivitamina D3 (vitamina D); (v) construir sensores fotoeletroquímicos para a detecção de lactato e do antígeno prostático específico (câncer de próstata); (vi) desenvolver uma sistema portátil para a realização de detecção fotoeletroquímica com eletrodos impressos.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes foram usados sem qualquer procedimento de purificação. Anticorpo anti-MUC1 (Ab₁), proteína MUC1 humana recombinante (CA 15-3) e anticorpo anti-MUC1 conjugado com peroxidase de rábano (Ab₂, HRP) foram obtidos da ABCAM (Cambridge, Reino Unido). Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) com dimensões 6-9 nm × 5 μm (D × L), nitrato de potássio (KNO₃), óxido de titânio (TiO₂), ácido láctico, ácido ascórbico, glicose, vitamina D₃, B₁ e B₂, amoxicilina, colecalciferol, β-estradiol, sulfametoxazol (SMX), trimetoprima (TMP), salicilaldeído, metanol, perclorato de tetrabutilamônio (TBAP), acetonitrila (CH₃CN), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado (K₄[Fe(CN)₆].3H₂O), hexacianoferrato de potássio (III) (K₃[Fe(CN)₆]), ácido tetracloroáurico 30% em peso em cloreto de hidrogênio (HAuCl₄ 30% em peso diluído em HCl), ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-cloridrato de etilcarbodiimida (EDC), hidroxissuccinimida (NHS), albumina de soro bovino (BSA), hidroquinona (HQ), antígeno prostático específico (PSA), anticorpo monoclonal PSA, ácido 4-aminobenzóico, nitrito de sódio (NaNO₂), soro humano e saliva artificial para pesquisa farmacêutica foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Saint Louis, Estados Unidos). Acetato de níquel (II) foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Brasil). Éter, sulfato de sódio e carbonato de sódio foram adquiridos na Mallinckrodt[®] (Staines-upon-Thames, Reino Unido). O ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95% e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos na Exodus Científica (Sumaré, Brasil). Persulfato de potássio (K₂S₂O₈), pentóxido de fósforo (P₂O₅), permanganato de potássio (KMnO₄) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 35% foram adquiridos da Synth[®] (Diadema, Brasil). A tinta condutora de carbono LOCTITE[®] (EDAG 423SS E&C) usada para impressão dos eletrodos foi obtida da Henkel[®] (Düsseldorf, Alemanha). As tintas condutoras de Ag (CW2200MTP) e de Ag/AgCl usadas nos eletrodos de referência foram obtidas da Chemtronics[®] (Kennesaw, Georgia) e TICON[®] (Sorocaba, Brasil), respectivamente. A água ultrapura utilizada foi purificada com sistema da Millipore Corporation[®] com resistividade > 18 MΩ cm (Darmstadt, Alemanha). Soluções de tampão fosfato salino (PBS) foram

preparadas com NaCl 137,0 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10,0 mM e KH₂PO₄ 1,8 mM. A amostra de água da torneira foi coletada de uma torneira local (22°00'19.5"S 47°53'56.1"W).

3.2 Instrumentação

3.2.1 Ultravioleta-visível

Os espectros de ultravioleta-visível (UV-vis) foram coletados em espectrofotômetro Jasco[®] V-630 utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

3.2.2 Experimentos eletroquímicos

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato/galvanostato Metrohm Autolab[®] modelo PGSTAT30 controlado pelo software Nova[®] versão 2.1.4. Os espectros de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, *electrochemical impedance spectroscopy*) foram analisados por meio do software ZView 2[®].

3.2.3 Ângulos de contato

As medidas dos ângulos de contato foram registradas em um tensiômetro Attension[®].

3.2.4 Difração de raios-X

As análises de difração de raios-X (XRD, *X-ray diffraction*) foram conduzidas em um difratômetro Brucker[®] D8 Advance operando a uma potência de 40kV/40 mA usando radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$)

3.2.5 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) dos materiais preparados em KBr foram realizadas em um espectrômetro Shimadzu[®] IRAffinity-1 de 4000 a 400 cm⁻¹. As medidas de FTIR do papel manteiga foram realizadas em um espectrômetro Bruker[®] Vertex 70/70v com um detector

de baixo ruído (MCT, telureto de cádmio e mercúrio) usando o módulo de refletância total atenuada (Platinum Diamond ATR, Bruker®). Todos os espectros foram registrados entre 4000 e 640 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Cada espectro apresentado é uma média de um conjunto de 512 interferogramas.

3.2.6 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos usando um laser com comprimento de onda de 532 nm em um sistema Horiba® LabRAM HR Evolution com uma grade de alumínio e uma objetiva de 50 \times . Os espectros Raman foram desconvoluídos usando a função Lorentziana.

3.2.7 Microscopia de força atômica

As medidas de microscopia de força atômica (AFM, *atomic force microscopy*) foram realizadas em um microscópio Nanosurf EasyScan2, com modo de operação de não contato. Os resultados foram tratados com o software Nanosurf EasyScan2.

3.2.8 Microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de raios-X por dispersão em energia e microscopia eletrônica de varredura com feixe eletrônico por emissão de campo

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM, *scanning electron microscopy*), mapeamento por espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS, *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) e microscopia eletrônica de varredura com feixe eletrônico por emissão de campo (FEG, *field emission gun*) foram obtidas usando um microscópio LEO 440 com um detector Oxford (modelo 7060) operando com um feixe de elétrons de 20 kV e um microscópio Zeiss® Sigma, respectivamente.

3.2.9 Microscopia eletrônica de Transmissão

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*) foram obtidos usando um microscópio JEOL JEM-2100 (LaB6) operando a 200 kV.

3.2.10 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

As análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS, *X-Ray photoelectron spectroscopy*) foram conduzidas em um espectrômetro Scientia Omicron ECSA equipado com uma fonte de raios-X modelo XM1000 usando radiação $k\alpha$ (1486,7 eV). Os espectros foram calibrados em 284,8 eV para C 1s, ajustados pelo método de Shirley e simulados usando uma função Gaussiana-Lorentziana (GL30).

3.2.11 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier *in situ*

Os experimentos de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) *in situ* foram realizados em um espectrômetro Shimadzu® prestige 21 equipado com um detector de MCT (telureto de mercúrio e cádmio).

3.2.12 Espectroscopia de absorção atômica

A análise de espectroscopia de absorção atômica (AAS) foi realizada em um espectrômetro Perkin Elmer (modelo PINAACLE 900 T). Para isso, 10,0 mg de Ni-gC₃N₄ foram dissolvidos em 8,0 mL de água régia durante 48 h e depois diluídos para 1000,0 mL de ácido clorídrico a 5% em água ultrapura.

3.2.13 Espectroscopia de refletância difusa no ultravioleta-visível

Os espectros de refletância difusa no ultravioleta-visível (UV-vis DRS) foram registrados em um espectrofotômetro Shimadzu® 3600 equipado com esfera integradora operando entre 200 e 800 nm. As amostras foram diluídas em BaSO₄ (5% em peso).

3.2.14 Espectroscopia no infravermelho de reflexão e absorção com modulação da polarização

A espectroscopia no infravermelho de reflexão e absorção com modulação da polarização (PM-IRRAS, *polarization modulation-infrared reflection-absorption spectroscopy*) foi usada para estudar a imobilização de anticorpos na plataforma de detecção e

as interações antígeno-metabólito. As medições de PM-IRRAS foram realizadas em um instrumento KSV PMI550 com um feixe focado na amostra em um ângulo de incidência de 80°. Todos os espectros PM-IRRAS foram coletados com resolução de 8 cm⁻¹ durante 600 s, sendo uma superfície de ouro limpa (Au_s) usada como referência para registrar o espectro de fundo.

3.3 Manufatura dos SPCEs

Os SPCEs foram produzidos pelo método de serigrafia com tecido monofilamentar de poliéster de 77 fios com dimensões de 40 × 35 cm. A tinta condutora de carbono foi transferida para as superfícies do papel manteiga e polietileno tereftalato (PET) empregando um rodo de poliuretano com dureza de 75 shores. O processo de cura da tinta de carbono foi realizado em um forno a 90 °C por 30 min. Os SPCEs possuem três eletrodos: um eletrodo de trabalho (área de 7 mm²), um contra-eletrodo de carbono e um eletrodo de pseudo-referência de prata (pintado com tinta condutora de prata ou de prata/cloreto de prata).

3.4 Tratamento eletroquímico dos SPCEs

Os SPCEs foram tratados eletroquimicamente por voltametria cíclica (CV, *cyclic voltammetry*), em que ciclos de potencial foram executados entre -2,5 e 2,5 V a 100 mV s⁻¹ em PBS. O efeito de outros eletrólitos (0,5 M de H₂SO₄ e 0,5 M de NaOH) e número de ciclos na etapa de tratamento também foram investigados. Após o tratamento, os eletrodos foram lavados com água e armazenados em dessecador.

3.5 Preparação da plataforma de detecção rGN e medidas eletroquímicas

As rGNRs foram sintetizadas por um método *eco-friendly* (quando comparado com os demais métodos reportados na literatura) a partir de MWCNTs, conforme descrito por Yan-Sheng Li *et al.* (LI *et al.*, 2016). Para isto, 0,2 g MWCNTs e 2,0 g KNO₃ foram dispersos em 20,0 mL de H₂SO₄ concentrado. A mistura foi agitada durante 2 h. Em seguida, foi adicionado 1,0 g de KMnO₄ e o sistema foi aquecido a 70 °C e mantido sob agitação por mais 2 h. A purificação das GNRs foi realizada em várias etapas. Inicialmente, a mistura obtida foi resfriada à temperatura ambiente e dispersa em 350,0 g de água gelada contendo 5,0 mL de H₂O₂ (35%).

A mistura foi então centrifugada a 11000 rpm durante 12 min. O sólido foi redisperso em 60,0 mL de solução de HCl em água (1:1), sonificado durante 30 min e centrifugado a 11000 rpm durante 12 min. O material foi novamente redisperso em 60,0 mL de éter, sonificado e centrifugado a 11000 rpm durante 12 min. O material foi seco, pesado e redisperso em água para fornecer uma dispersão de 1,0 mg mL⁻¹ de GNR. As GNRs foram reduzidas em solução de ácido ascórbico à temperatura ambiente. Uma concentração de 50,0 mM de ácido ascórbico (444,75 mg) foi adicionado em 50,0 mL de GNR (1,0 mg mL⁻¹). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante 48 h (FERNÁNDEZ-MERINO *et al.*, 2010). O material obtido foi dialisado por 3 dias em bolsa de diálise de 3500 DA.

Para modificação do SPCE, 6,0 µL de uma dispersão aquosa de rGNR (0,1 mg mL⁻¹) foram adicionados na superfície do eletrodo de trabalho e secos à temperatura ambiente. A curva analítica e outros experimentos foram conduzidos com medidas de voltametria de pulso diferencial (DPV, *differential pulse voltammetry*) em PBS (pH 6,0). Os seguintes parâmetros foram aplicados: potencial de condicionamento de 0,4 V; tempo de condicionamento de 5 s; faixa de potencial de 0,4 a 1,1 V; passo de potencial de 5 mV; amplitude de modulação 25 mV; e tempo de modulação 50 ms.

3.6 Preparação da plataforma de detecção Au-rGO

As folhas de óxido de grafeno foram sintetizadas em duas etapas (XU *et al.*, 2008). Em primeiro lugar, foi realizado uma pré-oxidação do grafite. Para isso, 3,0 g de pó de grafite foram colocados em uma solução a 80 °C composta por 12,0 mL de H₂SO₄ concentrado, 2,5 g de K₂S₂O₈ e 2,5 g de P₂O₅. A mistura foi mantida a 80 °C durante 4,5 h usando um banho de óleo de silicone, após isso, foi arrefecida à temperatura ambiente. A dispersão foi então diluída com 500,0 mL de água, filtrada e lavada com água para remover o ácido residual. O produto obtido foi seco à temperatura ambiente. Para a segunda etapa, o pó de grafite pré-tratado foi disperso em 120,0 mL de H₂SO₄ concentrado e mantido resfriado com o auxílio de um banho de gelo. Em seguida, 15,0 g de KMnO₄ foram gradualmente e cuidadosamente adicionados à mistura com agitação para evitar que a temperatura ultrapassasse 20 °C. Na etapa seguinte, a mistura foi agitada a 35 °C por 2h, sendo então diluída com 250,0 mL de água em banho de gelo para manter a temperatura abaixo de 50 °C. Depois disso, a mistura foi agitada por 2 h e, mais 700,0 mL de água e 2,0 mL de H₂O₂ a 30% foram adicionados. Finalmente, a mistura foi filtrada e lavada com uma solução aquosa 1:10 de HCl e depois com água.

Os SPCEs foram modificados com Au e rGO em uma síntese de uma etapa por co-redução de HAuCl_4 e GO usando voltametria cíclica (JIAN *et al.*, 2018) com uma mistura de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ GO (esfoliado por agitação por 48 h em banho ultrassônico por 1 h) e $3,4 \text{ mM}$ de HAuCl_4 em PBS (pH 7,4). Volumes iguais dessas dispersões foram misturados por 5 min sob agitação para produzir uma mistura homogênea de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO e $1,7 \text{ mM}$ de Au. Misturas frescas foram preparadas antes de cada experimento, com $95,0 \text{ }\mu\text{L}$ no eletrodo, e 20 ciclos de potencial executados de 0 a $-1,3 \text{ V}$ a 50 mV s^{-1} . Os SPCEs modificados foram lavados com água e secos à temperatura ambiente.

3.7 Preparação do imunossensor para CA15-3

A plataforma Au-rGO foi imersa em uma solução etanólica de $50,0 \text{ mM}$ de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA, *mercaptopropionic acid*) por 20 h, lavada com etanol e então revestida com $15,0 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de $100,0 \text{ mM}$ do agente de cross-linking N-(3-dimetilaminopropil)-N₂-etilcarbodiimida cloridrato/hidroxisuccinimida (EDC/NHS) sendo gotejado e incubado por 30 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, $15,0 \text{ }\mu\text{L}$ de anti-CA15-3 (Ab_1 , $2,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) foram dispensados no eletrodo modificado e incubados por 60 min. Para bloquear os sítios de ligação não específicos entre o antígeno e a plataforma de detecção, foram adicionados $15,0 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de albumina de soro bovino (BSA, 1% em peso). Entre as etapas de preparação subsequentes, o eletrodo modificado foi lavado com solução de PBS.

3.8 Detecção eletroquímica do CA15-3

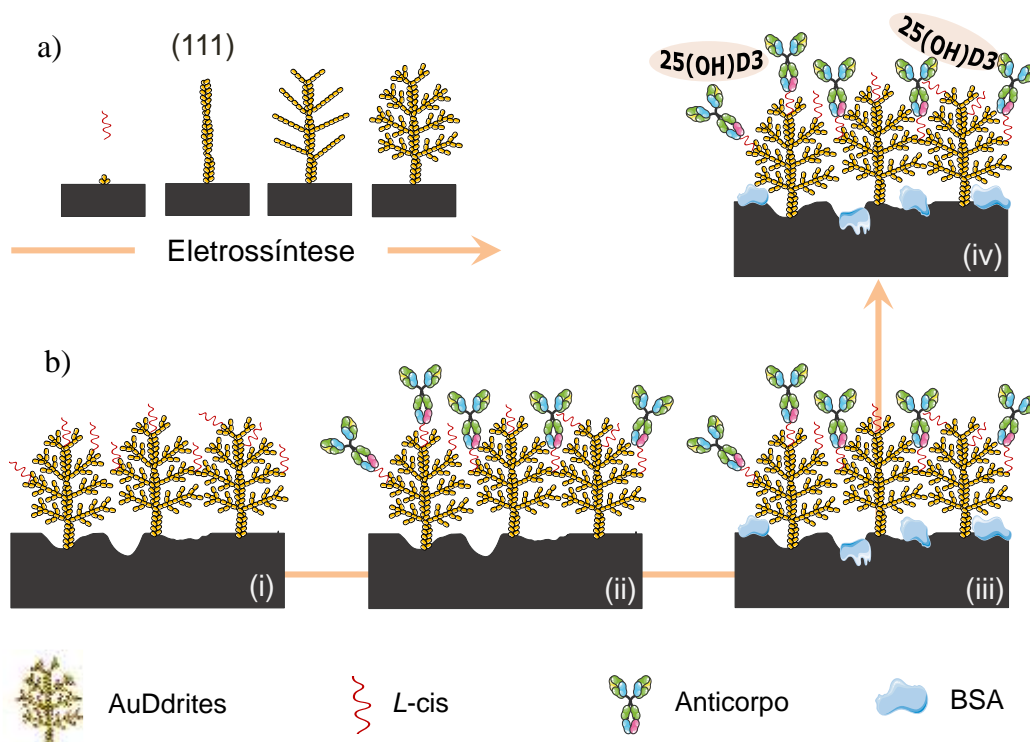
CA15-3 foi detectado usando o método de imunensaio sanduíche na qual a enzima HRP atua como um bioeletrocatalisador, oxidando hidroquinona (HQ) a benzoquinona (BQ) que é posteriormente reduzida na plataforma Au-rGO, como mostrado no **Esquema 3b**. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como substrato primário para HRP, possibilitando a reação redox da HQ (AKBARI NAKHJAVANI *et al.*, 2018), cujo mecanismo será discutido na **Seção 5.4**. A detecção do CA15-3 foi realizada por meio de voltametria de onda quadrada (SWV, *square wave voltammetry*) que se mostrou o mais sensível entre os métodos eletroquímicos (CHAŁUPNIAK; MERKOÇI, 2017). Para isso, uma série de soluções de CA15-3 ($15,0 \text{ }\mu\text{L}$) em diferentes concentrações foram incubadas por 30 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Para formar imunocomplexos sanduíche, $10,0 \text{ }\mu\text{L}$ de anti-CA15-3 conjugados com HRP (Ab_2 , $1,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$)

foram adicionados por 30 min. Os SWV foram registrados em solução de PBS (pH 7,4) na presença de 2,5 mM de HQ e 2,5 mM de H₂O₂. Os parâmetros foram tomados com base em relatórios anteriores (GE; JIAO; CHEN, 2012; SANGILI *et al.*, 2020). Os seguintes parâmetros foram aplicados: faixa de potencial de 0,3 a -0,25 V, potencial de passo de -5 mV, amplitude de 75 mV e frequência de 2 Hz. A faixa de potencial para detecção de CA15-3 foi limitada a 0,3 V para evitar a eletro-oxidação do MPA, conforme discutido na **Seção 5.3**.

3.9 Preparação da plataforma de detecção AuDdrites e do imunossensor para vitamina D

O **Esquema 1a** ilustra o mecanismo de eletrossíntese das nanoestruturas de dendritos de ouro por meio da dessorção seletiva da L-cis sobre os planos (111) do Au. Dendritos de ouro (AuDdrites) foram eletrodepositados sobre os SPCEs tratados aplicando um potencial de -0,8 V por 900 s em 100 µL de eletrólito contendo 7,5 mM de HAuCl₄, 0,15 M de L-cis e 0,5 M de H₂SO₄. Os eletrodos AuDdrites/SPCE foram cuidadosamente lavados com água e secos ao ar (LV *et al.*, 2014). A área superficial eletroquimicamente ativa (ECSA) dos AuDdrites foi calculada usando a densidade de carga associada à redução de uma monocamada de óxido de ouro, assumindo uma carga específica de 386 µC cm⁻² para redução de ouro policristalino (DO; SELAND; JOHANNESSEN, 2018).

Esquema 1. (a) Mecanismo de eletrossíntese de nanoestruturas de dendritos de ouro em forma de árvore por meio da dessorção seletiva da *L*-cis sobre os planos (111) do Au e (b) procedimentos de preparação dos imunossensores: (i) *L*-cis por 24 h; (ii) incubação do anticorpo por 16 h; (iii) BSA por 4 h; (iv) metabólito 25(OH)D3 por 15 min.



Fonte: Autoria própria.

O **Esquema 1b** ilustra a preparação do chip imunossensor. Primeiro, a plataforma de detecção AuDdrites/SPCE foi imersa em uma solução aquosa de 50,0 mM de *L*-cis por 24 h, lavada com água e incubada com 15,0 μ L de EDC/NHS (ambos a 100,0 mM em água) por 4 h a 25 °C. Em seguida, 15,0 μ L de anti-25(OH)D3 foram dispensados no eletrodo modificado e incubados por 16 h a 4°C. Para bloquear sítios de ligação não específicos, 15,0 μ L de solução de BSA (1% em peso em PBS 0,01 M) foram adicionados por 4 h a 4°C. Entre cada etapa de preparação, o eletrodo foi lavado com uma solução de PBS 0,01 M.

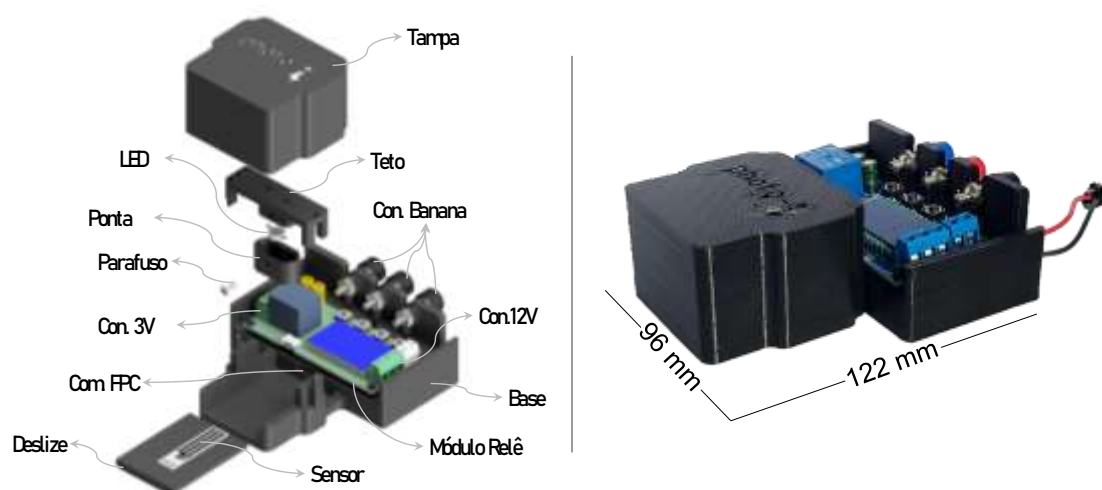
3.10 Detecção eletroquímica da vitamina D

A detecção eletroquímica do 25(OH)D3 foi realizada com medições de SWV em um volume de amostra de 100,0 μ L contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Foram utilizados os seguintes parâmetros otimizados: faixa de potencial entre 0 e 0,4 V, potencial de passo de 5 mV, amplitude de pulso de 75 mV e frequência de 10 Hz.

3.11 Projeto do sistema fotoeletroquímico e principais características

O sistema fotoeletroquímico na **Figura 6** compreende um suporte mecânico e um circuito elétrico que inclui um módulo de relé programável para controlar os ciclos ON/OFF do LED. A fotocorrente é gerada no sensor e flui por meio de um circuito impresso flexível (FPC, *flexible printed circuit*) de passo de 2,54 mm e três conectores banana para o potenciostato. O módulo de relé é alimentado por uma fonte de 12 V e o LED é alimentado por um driver comercial de 3W. O suporte mecânico contém cinco peças: (i) uma 'base' projetada para segurar o módulo de relé e conectores, (ii) um 'deslizador' para segurar o sensor horizontalmente no conector FPC, (iii) um 'teto' para colocar o LED 0,5 mm acima do sensor, (iv) uma 'ponta' para parafusar o LED sob o teto, e (v) uma 'tampa' para evitar interferência de luz externa. Todas as peças foram confeccionadas com impressora 3D da GTMax3D (Brasil), utilizando filamento de ácido polilático (PLA) preto de 1,75 mm. As dimensões externas do sistema são 96 mm (largura), 122 mm (profundidade) e 36 mm (altura). O design permite que o sistema seja facilmente desmontado para a troca do LED e do sensor, tornando-o utilizável para outras aplicações.

Figura 6. Foto do sistema fotoeletroquímico à direita, enquanto à esquerda há uma imagem renderizada com as partes identificadas individualmente: módulo relé para controlar a iluminação dos ciclos ON/OFF, 'base', entrada de fonte de 12 V, conectores para o potenciostato (eletrodos de trabalho, contra e de referência), um 'teto' para colocar o LED, uma 'tampa' para evitar interferência de luz externa, LED, uma 'ponta' para fixar o LED, parafuso, entrada da fonte de 3 V para o LED, conector FPC para a entrada do sensor, um 'deslize' para apoiar o sensor no conector FPC, sensor.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

3.12 Preparação da plataforma de detecção $\text{TiO}_2@$ poli[Ni(salen)] e medidas eletroquímicas

O complexo [Ni(salen)] foi obtido a partir da condensação de salicilaldeído com uma amina, seguido pela etapa de coordenação com íons metálicos de níquel, conforme descrito por nosso grupo (BOTT-NETO *et al.*, 2019a; MARTINS *et al.*, 2018). Em resumo, uma solução etanólica de etilenodiamina (proporção em volume de 2:5) e salicilaldeído (proporção em volume de 3:5) foram misturadas e refluxadas durante 2 h a 40 °C sob uma atmosfera de nitrogênio. Depois disso, um precipitado amarelo foi coletado por filtração a vácuo, recristalizado em metanol e resfriado à temperatura ambiente. 100,0 mL de etanol foram então colocados em um balão de reação e mantido a 40 °C por 30 min sob uma atmosfera inerte para remover o ar. Posteriormente, 6,4 mmol do ligante H_2salen preparado e 6,4 mmol de acetato de níquel (II) foram dissolvidos em 100,0 mL de etanol tratado. A solução foi submetida a refluxo por 2h a 40 °C sob atmosfera de nitrogênio.

Os SPCEs foram modificados com 6,0 μL de uma suspensão de TiO_2 comercial ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e secos à temperatura ambiente. Em seguida, o monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$, sintetizado conforme descrito a cima, foi eletropolimerizado nos eletrodos imersos em uma solução 0,1 M de TBAP/ CH_3CN contendo 5,0 mM de $[\text{Ni}(\text{salen})]$. Seis ciclos entre 0 e 1,2 V a 100 mV s^{-1} foram feitos e os eletrodos foram então lavados com etanol. As correntes do PEC foram registradas durante as medições cronoamperométricas em 100,0 μL de solução de PBS a 0 V vs. potencial de circuito aberto (OCP). O fotoanodo foi irradiado com um LED de 3 W de 365 nm com ciclos de irradiação ON/OFF de 20 s.

3.13 Preparação da plataforma de detecção $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$

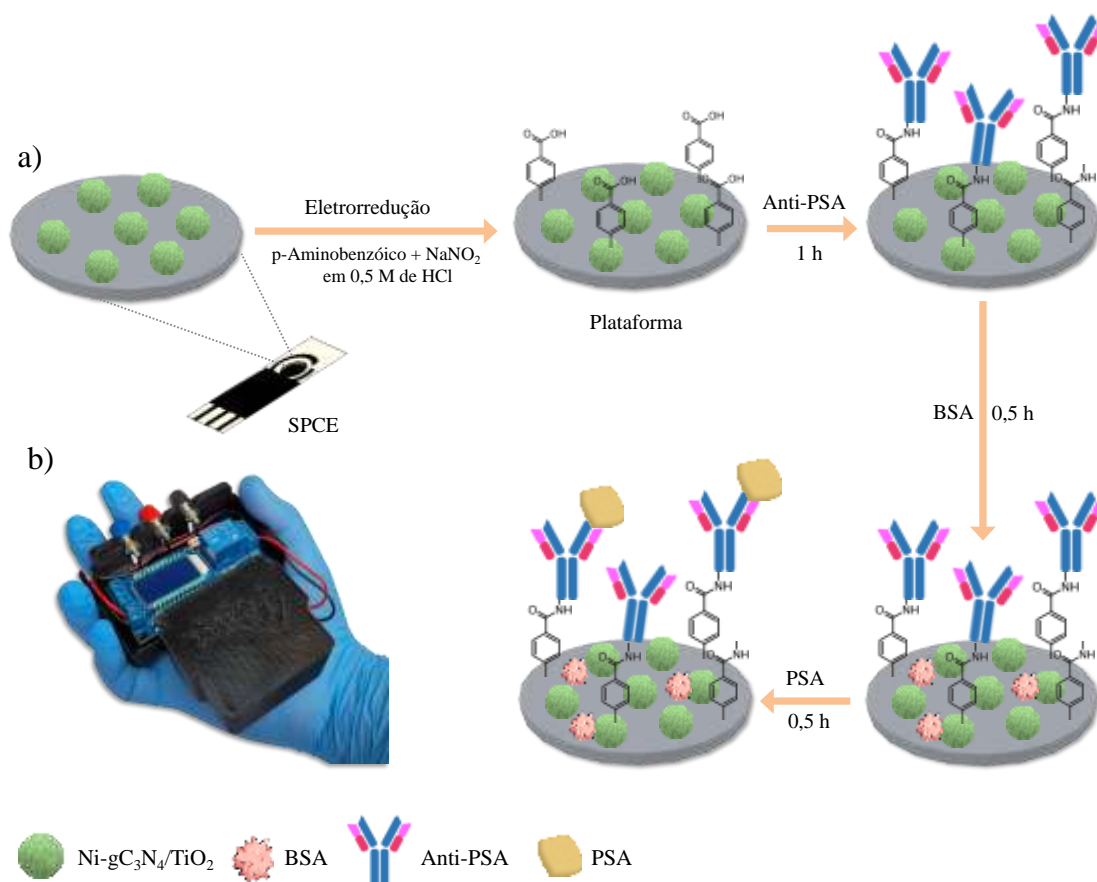
O nitreto de carbono grafítico (gC_3N_4) foi sintetizado pela policondensação térmica da melamina. Conforme descrito na ref. (CHEN *et al.*, 2017), 1,0 g de melamina foi macerada com 10,0 g de NaCl e transferida para um cadinho de porcelana com tampa. O sistema foi aquecido em um forno sob atmosfera de ar a $600 \text{ }^\circ\text{C}$ ($5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) por 4 h e deixado resfriar até a temperatura ambiente. O produto de coloração amarela obtido foi retirado do cadinho e disperso em 100,0 mL de água e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. Este procedimento foi repetido mais seis vezes. Em seguida, o material foi seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. Íons de níquel foram introduzidos na estrutura gC_3N_4 pelo método de troca catiônica (ZHAO *et al.*, 2017). Para isso, 0,1 g de gC_3N_4 em 2,0 mL de água foi esfoliado em banho ultrassônico por 10 min. Em seguida, 0,4 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 2,0 mL de água. Ambas as soluções foram misturadas e mantidas sob agitação por 24 h. O material foi então lavado por centrifugação e seco a 60°C durante a noite. Por fim, compósitos $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ ($x = 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70\%$ em peso de $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ em TiO_2) foram preparados por adsorção. Alíquotas de 5,0 mL de soluções contendo $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de TiO_2 e quantidades apropriadas de $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ foram preparadas. O material foi então mantido sob agitação por 24 h e seco a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Em seguida, os eletrodos foram modificados com 6,0 μL de $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de TiO_2) e secos sob vácuo à temperatura ambiente. Posteriormente, as superfícies dos eletrodos foram funcionalizadas via redução eletroquímica de um sal de aril diazônio (EISSA *et al.*, 2018). O sal de 4-carboxifenil diazônio foi preparado *in situ* misturando 2,0 mM de ácido p-aminobenzóico com 2,0 mM de NaNO_2 em 0,5 M de HCl e agitado durante 5 min à temperatura ambiente. Três ciclos voltamétricos foram registrados entre 0,2 e $-0,6 \text{ V}$ a 100 mV s^{-1} . Os eletrodos são referidos como $\text{Amb/Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$.

3.14 Preparação do imunossensor para PSA

O **Esquema 2a** ilustra a preparação do imunossensor PEC. Os eletrodos Amb/Ni-gC₃N₄/TiO₂ foram incubados com 15,0 µL de EDC/NHS (ambos a 100,0 mM em água) por 30 min a 20°C para ativar o grupo carboxílico do ácido benzóico eletrodepositado. Em seguida, 15,0 µL de anti-PSA (2,0 µg mL⁻¹) foram dispensados no eletrodo modificado e incubados por 1 h a 20°C. Para bloquear sítios de ligação não específicos, 15,0 µL de solução de albumina de soro bovino (BSA, 1% em peso em água) foram adicionados por 30 min a 20°C. Entre cada etapa de preparação, o eletrodo foi lavado com solução de PBS. A detecção de PSA por PEC foi realizada usando medidas de cronoamperometria (CA) em um sistema portátil (**Esquema 2b**) com uma luz LED de 3W (410 nm; 350 mW cm⁻²) durante ciclos de irradiação ON/OFF de 20 s. Soluções de PSA (15,0 µL) em diferentes concentrações foram incubadas por 30 min a 20°C. As fotocorrentes foram registradas em 100,0 µL de solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de ácido ascórbico (AA) a 0 V vs. potencial de circuito aberto (OCP).

Esquema 2. (a) Procedimento de preparação dos imunossensores PEC. (b) O sistema portátil usado em experimentos de PEC.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

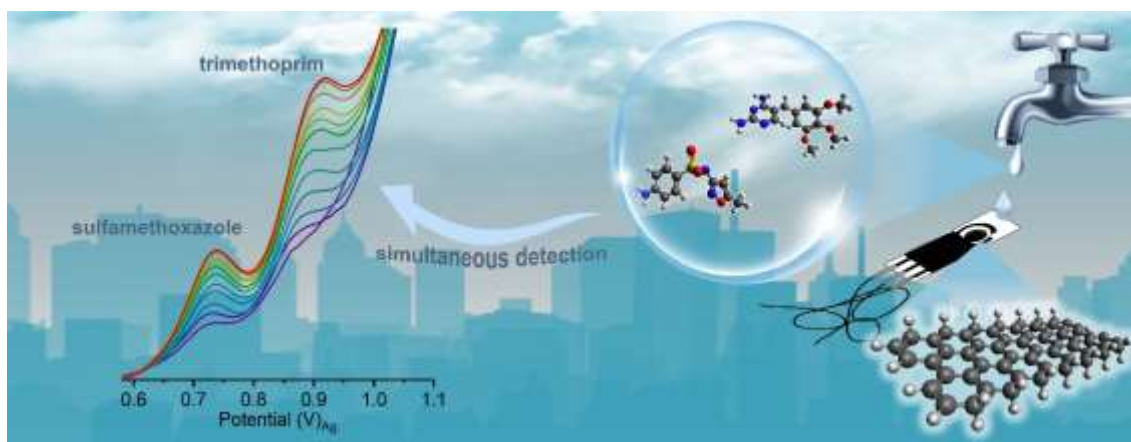
3.15 Detecção eletroquímica de PSA

Um SPCE modificado com nanopartículas de TiO₂, Ni-gC₃N₄ e aril diazônio foi usado como plataforma PEC, conforme ilustrado no **Esquema 2**. A combinação desses elementos aumenta a eficiência da coleta de luz visível e diminui a recombinação de portadores de carga, permitindo assim sua aplicação sob luz LED azul ($\lambda = 410$ nm). Os anticorpos foram imobilizados covalentemente via grupos carboxil do sal de aril diazônio por EDC/NHS. Por meio de imunorreações, o PSA foi reconhecido e capturado pelo anticorpo. Quando o LED é aceso, pares elétron-buraco são fotogerados na superfície do fotocatalisador, resultando na eletrooxidação do ácido ascórbico (AA). Assim, a mudança na fotocorrente induzida pela variação da concentração de PSA é detectada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE I

Sensores eletroquímicos baseados em papel com nanofitas de grafeno reduzidas para detecção simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em amostras de água

Aqui, descrevemos um sensor eletroquímico totalmente impresso em papel com nanofitas de grafeno reduzidas capaz de detectar simultaneamente os antibióticos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) em amostras de água. Os eletrodos foram impressos em papel manteiga, que é ecologicamente correto e tem uma capacidade de impressão eficiente. Um melhor desempenho dos eletrodos foi obtido usando um tratamento eletroquímico em solução de tampão fosfato (PBS) a pH neutro. O sensor baseado em papel apresentou uma resposta linear de 1 μM a 10 μM para ambos os antibióticos, com limites de detecção de 0,09 μM e 0,04 μM para SMX e TMP, respectivamente.

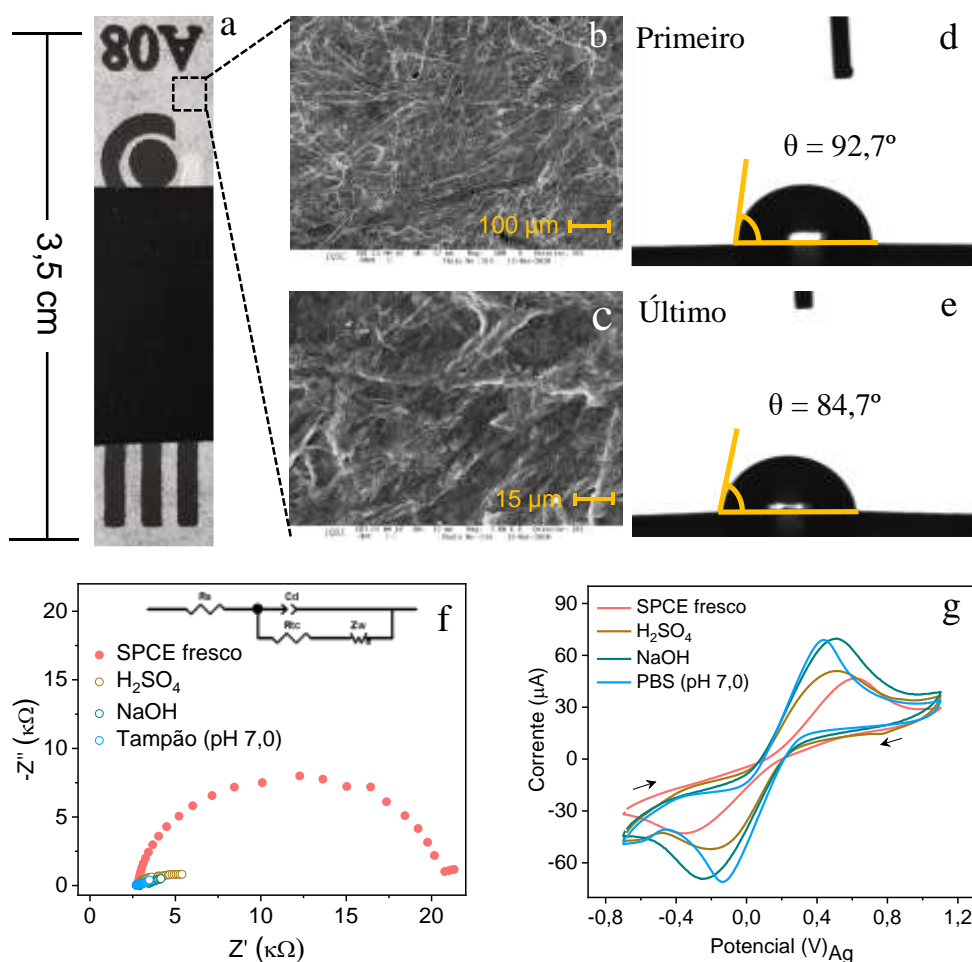


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

4.1 Caracterização do SPCE

Uma foto do SPCE impresso em papel manteiga é mostrada na **Figura 7a**. O papel utilizado na construção do eletrodo possui fibras curtas e compactas, conforme mostrado nas imagens de SEM (**Figura 7b-c**). A análise do ângulo de contato nas **Figura 7d-e** confirma o caráter hidrofílico do papel (ZHAN *et al.*, 2018), que é uma característica desejada, uma vez que substratos hidrofílicos têm altas taxas de transferência de tinta com boa reprodutibilidade (KIM *et al.*, 2011).

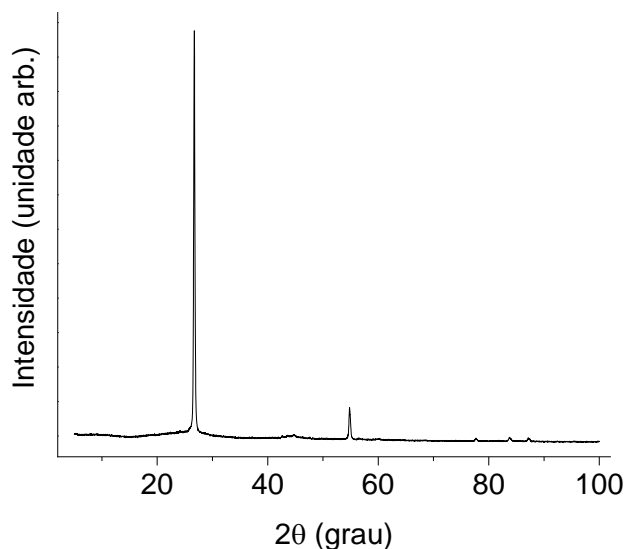
Figura 7. (a) SPCE; (b) micrografias com aumento de 500 e (c) 3000 vezes; e (d) primeiro e (e) último quadros de uma gota de água sobre o papel manteiga (os ângulos de contato também são fornecidos); (f) IES e (g) CVs a 50 mV s^{-1} em 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em $0,1 \text{ M}$ de solução de KCl antes e após o tratamento eletroquímico em meio ácido, básico e neutro.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

Os padrões de XRD para a tinta condutora de carbono na **Figura 8** incluem picos de difração em $2\theta = 26,7^\circ$ e $2\theta = 54,8^\circ$ atribuídos aos planos (002) e (004) da estrutura grafítica, com um espaçamento interplanar de $d_{002} = 0,3$ nm (BADENHORST, 2014).

Figura 8. Padrão de XRD da tinta condutora de carbono após o processo de cura.

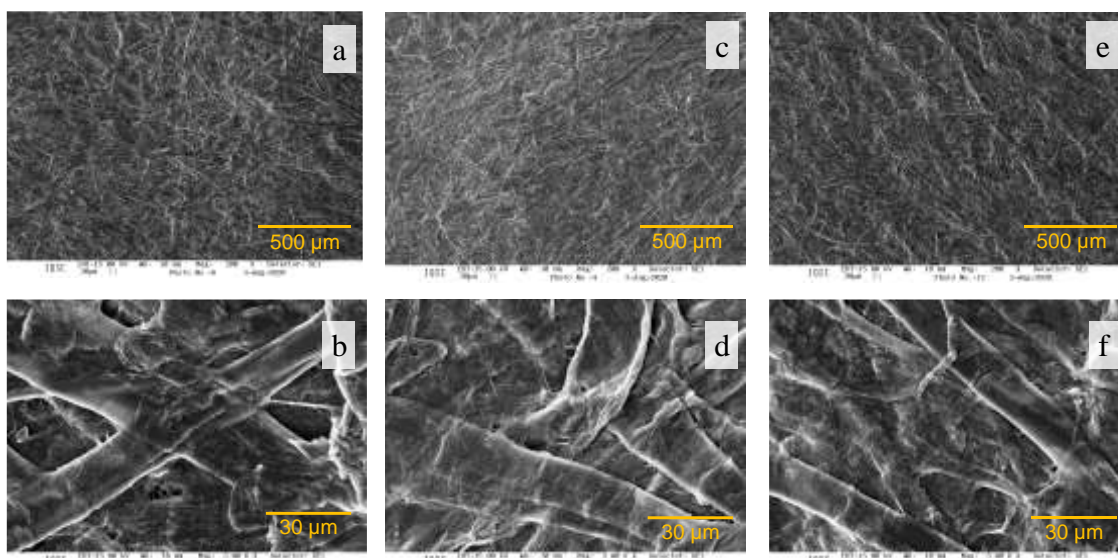


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

Para avaliar o efeito do pH na ativação eletroquímica dos SPCEs, o eletrodo foi submetido à ciclagem de potencial em meios ácido, básico e neutro. A **Figura 7f** mostra os típicos gráficos de Nyquist do SPCE antes e depois desses tratamentos. A ativação eletroquímica dos eletrodos reduz significativamente os valores da resistência de transferência de carga (R_{ct}) em até 39 vezes em comparação com o SPCE novo (18,12 k Ω), como mostrados pelos valores de R_{ct} que são 1,87, 0,67 e 0,46 k Ω para o SPCE tratado em ácido, básico e meio neutro, respectivamente. O aumento da taxa de transferência de elétrons também é observado na diminuição da separação entre os picos anódico e catódico (ΔE) do processo redox Fe^{2+}/Fe^{3+} . Este valor foi de 0,69, 0,75 e 0,56 V para SPCEs tratados em meio ácido, básico e neutro, respectivamente, a ser comparado com 0,98 V para o eletrodo não ativado. Além disso, o aumento de ΔI (diferença entre as correntes anódica e catódica) também mostra que o SPCE tratado em pH neutro apresentou a maior corrente, cujo valor é 56% maior que o eletrodo não tratado. O melhor desempenho do SPCE tratado em pH neutro é provavelmente devido à remoção de impurezas orgânicas da tinta de carbono e à introdução de grupos carbono-oxigênio no eletrodo de trabalho (SU; WANG; CHENG, 2011).

A estabilidade estrutural do papel manteiga após esse ser exposto às soluções de trabalho (ácidas, básicas e neutras) foi confirmada com análises SEM que não mostram mudanças nas fibras do papel devido à imersão por 600 s (**Figura 9**).

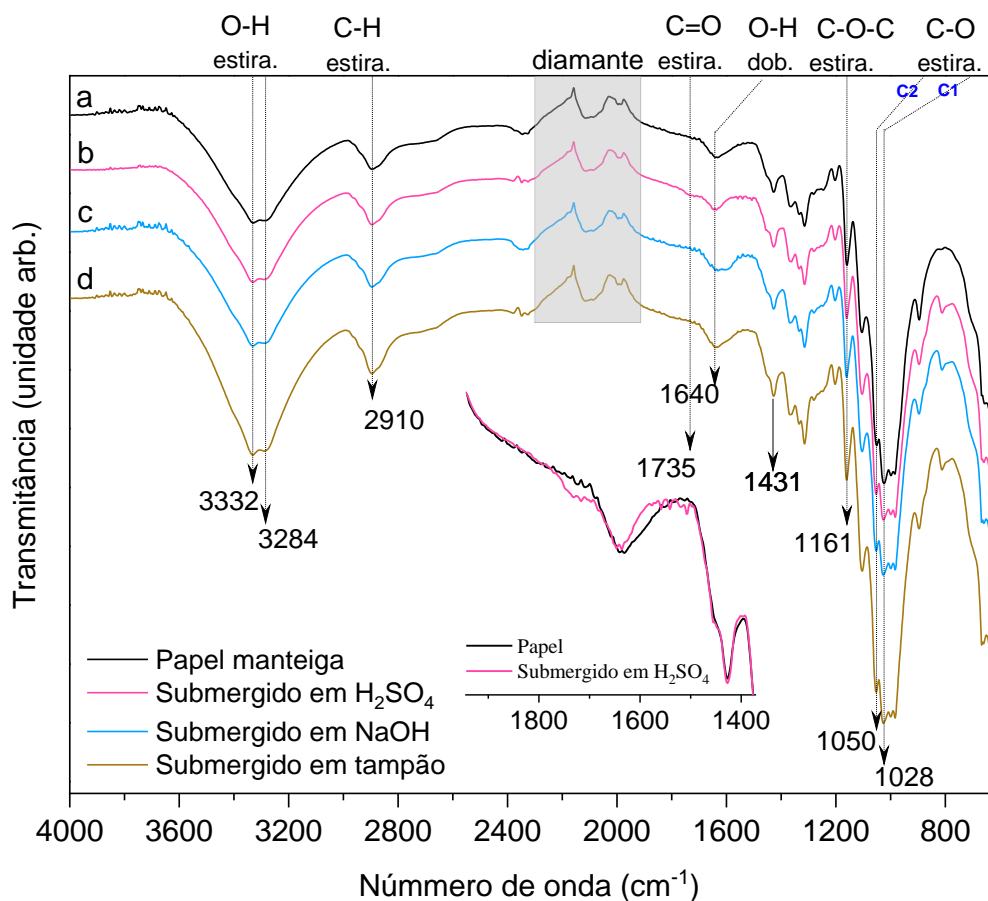
Figura 9. Micrografias em 500 (superior) e 3000 (inferior) vezes de ampliação do papel manteiga após imersão em (a-b) 0,5 M de H_2SO_4 , (c-d) 0,5 M de NaOH e (e-f) PBS (pH 7,0).



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

Os espectros de FTIR na **Figura 10** do papel imerso em uma solução básica e neutra são semelhantes aos do papel novo. Quando imerso em uma solução ácida, o espectro do papel mostra uma banda fraca em 1738 cm^{-1} , típica de grupos carboxílicos (COSERI *et al.*, 2015), indicando que neste meio o papel sofre uma leve oxidação. Portanto, o papel manteiga utilizado na construção dos SPCEs apresenta excelente estabilidade química e estrutural para aplicações em meio aquoso em diferentes pHs, na qual a estabilidade é maior em pH neutro e básico seguido de pH ácido.

Figura 10. Espectros de FTIR do papel manteiga (a) antes e depois do tratamento nas soluções de (b) 0,5 M de H_2SO_4 , (c) 0,5 M de NaOH , e (d) PBS (pH 7,0). Todos os espectros foram registrados entre 4000 e 640 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} (512 interferogramas cada espectro).



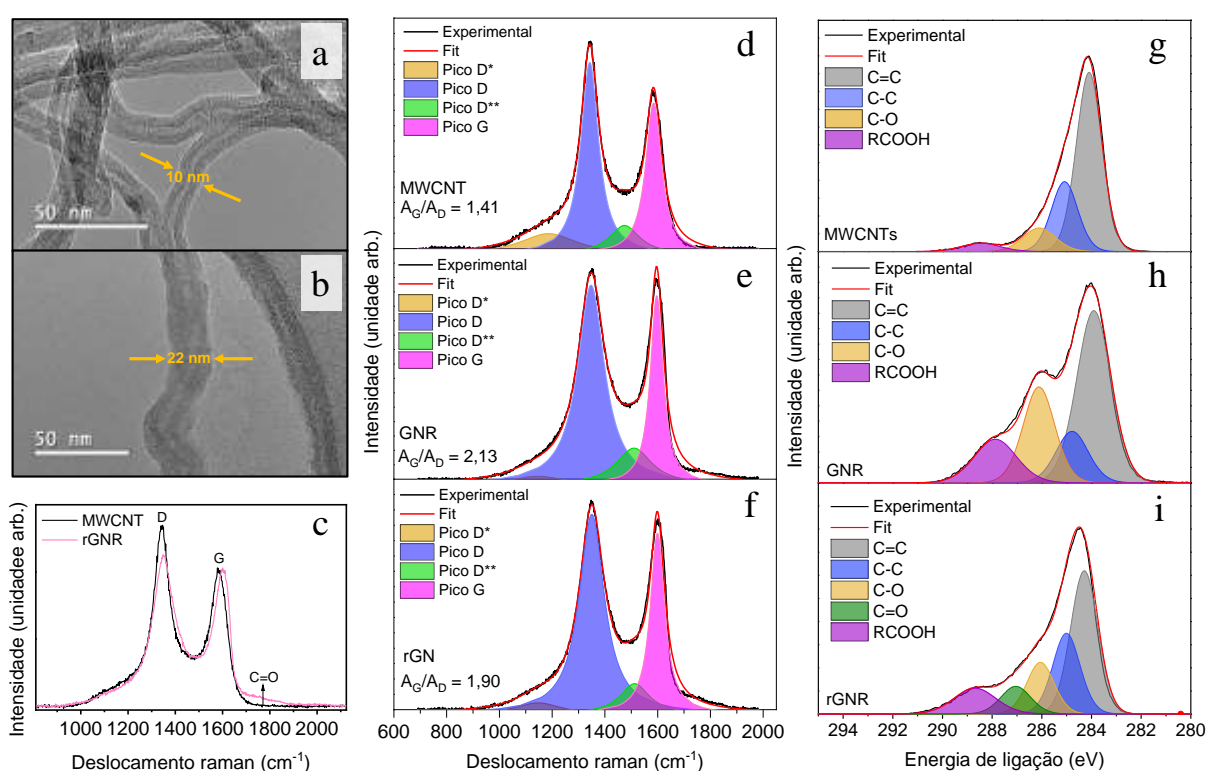
Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

4.2 Caracterização das rGNs

A **Figura 11a** exibe imagens de TEM dos MWCNTs usados na síntese dos rGNRs com diâmetro médio de $\sim 10\text{ nm}$. Em contraste, as rGNRs sintetizadas pelo método de descompactação oxidativa apresenta uma largura média de 22 nm (**Figura 11b**). Observe que este processo de abertura dos nanotubos leva a grandes quantidades de grupos oxigenados e, portanto, a redução das nanofitas é necessária para aumentar a condutividade das GNRs (KOSYNKIN *et al.*, 2009). Análises RAMAN e de XPS foram realizadas para determinar a extensão da formação e redução de tais grupos de oxigênio. A **Figura 11c** mostra os espectros Raman típicos de materiais à base de grafite para MWCNT, GNR e rGNR. Os picos em

1345 cm^{-1} e 1585 cm^{-1} correspondem às bandas convencionais D e G, respectivamente (FERRARI; BASKO, 2013). A relação entre as áreas das bandas D e G (A_D/A_G) é maior para nanofitas do que para nanotubos, o que indica um aumento do número de defeitos na estrutura gráfitica. Além disso, após a redução das nanofitas, a relação A_D/A_G sugere uma diminuição no número de defeitos e/ou grupos oxigenados, conforme esperado.

Figura 11. Imagens de TEM de (a) MWCNT e (b) rGNR; (c) espectros Raman de MWCNT e rGNR; espectros Raman desconvoluídos de (d) MWCNT, (e) GNR e (f) rGNR; espectros de C 1s desconvoluídos de (g) MWCNT, (h) GNRs e (i) rGNR.

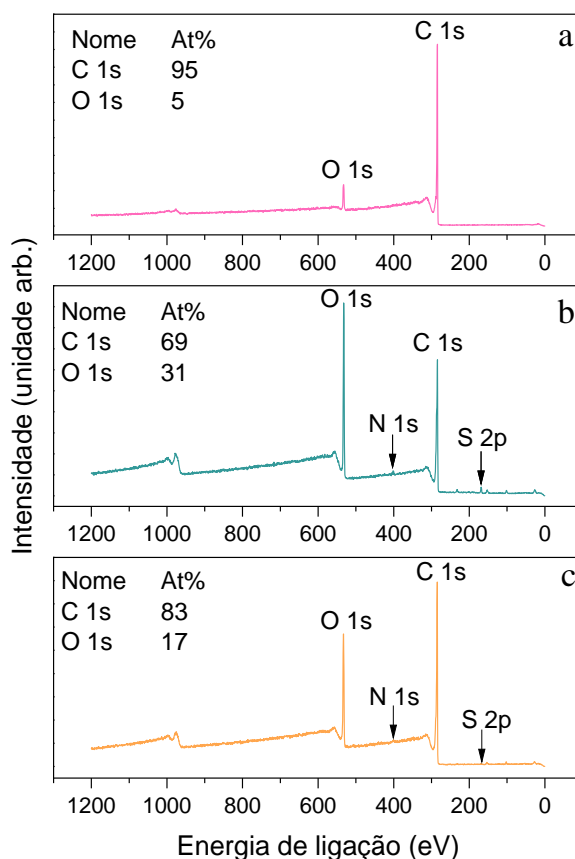


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

A composição química determinada por análises de XPS mostra um aumento no conteúdo de oxigênio de 5% a 31% após a abertura dos nanotubos (**Figura 12**). Por outro lado, o tratamento com ácido ascórbico reduziu a quantidade total de espécies de oxigênio para 17%. As **Figuras 11g-i** exibem os espectros de C 1s desconvoluídos. Todos os materiais mostram picos em ~284 e ~285 eV atribuídos ao carbono nas estruturas gráfitica (sp^2) e alifática (sp^3). O pico C sp^3 indica a presença de materiais de estrutura defeituosas (ZHANG *et al.*, 2014). Os espectros desconvoluídos de MWCNTs mostram um pico em ~286 eV relacionado aos grupos

hidroxilas, que aumentam consideravelmente quando os nanotubos são abertos (**Figura 11g**) e diminuem após sua redução (**Figura 11i**). Além disso, a partir da análise de XPS, é notado que após o tratamento com ácido ascórbico parte dos grupos hidroxila é reduzida a grupos carbonila, como indicado pelo pico em ~ 287 eV.

Figura 12. Espectros de XPS de varredura ampla (*survey*) dos (a) MWCNTs, (b) GNRs, (c) rGNRs. As composições atômicas também são mostradas.



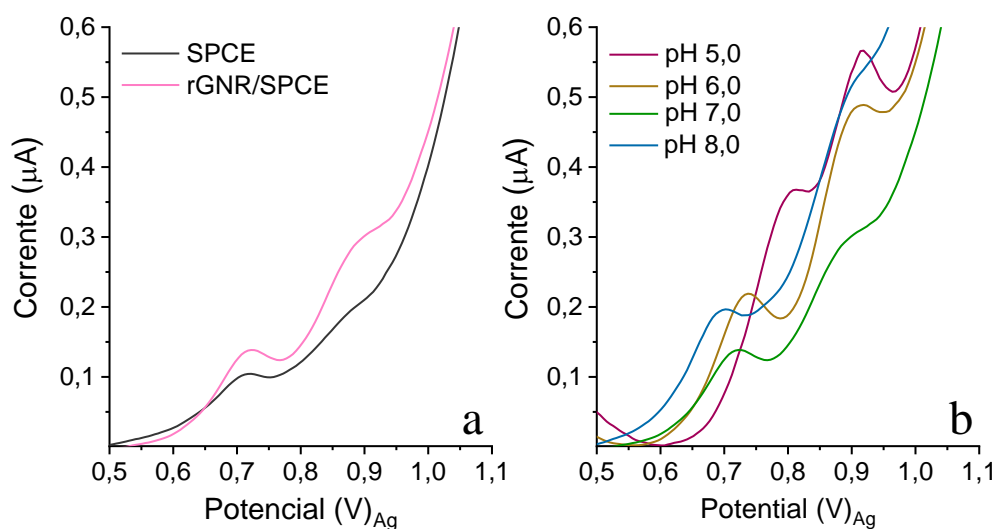
Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

4.3 Comportamento eletroquímico do sensor

A **Figura 13a** mostra os DPVs em PBS (pH 7,0) do SPCE e rGNR/SPCE na presença dos antibióticos SMX e TMP ($10,0 \mu\text{M}$ cada). O SPCE exibe picos em $\pm 0,7$ e $\pm 0,9$ V associados à detecção de SMX e TMP, respectivamente. O uso de rGNR aumenta consideravelmente a sensibilidade para a detecção simultânea, com a corrente de pico aumentando em 33 e 56% para SMX e TMP, respectivamente. A **Figura 13b** mostra que a detecção simultânea é mais eficiente em pH 5,0 e 6,0. Embora as correntes sejam maiores em

pH 5,0, a separação de pico para SMX e TMP é maior em pH 6,0, razão pela qual o último pH foi escolhido para os experimentos de detecção subsequentes.

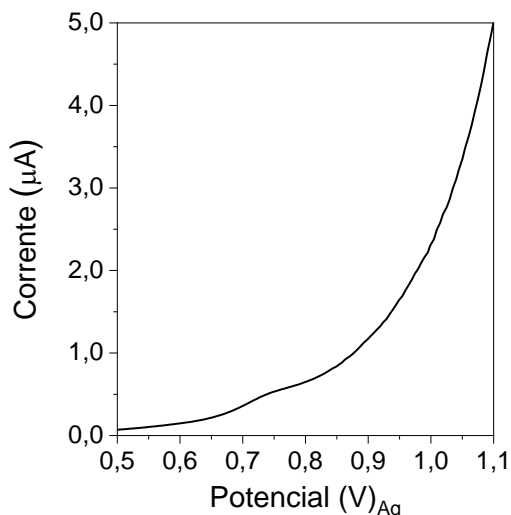
Figura 13. (a) Medidas de DPV realizadas em PBS (pH 7,0) em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V para o SPCE não modificado e para SPCE modificado com rGNR. (b) DPVs em diferentes pHs para SPCE revestido com rGNR. Ambos os experimentos foram realizados com 10,0 μM de SMX e TMP.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

A **Figura 14** mostra a DPV de um eletrodo preparado com 6,0 μL de uma dispersão contendo 1,0 mg mL^{-1} do material eletrocatalítico. Um aumento de 10 vezes na concentração de rGNR diminui a sensibilidade do eletrodo, uma vez que o pico relacionado à detecção de TMP não é mais observado. Provavelmente, essa perda de sensibilidade se deve ao empilhamento de nanofitas de grafeno durante a secagem, resultando em uma estrutura gráfica, conforme observado em outros trabalhos (GUO *et al.*, 2014; SI; SAMULSKI, 2008; SONG *et al.*, 2011).

Figura 14. Medida de DPV em PBS (pH 7,0) realizada em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V para um SPCE modificado com 6,0 μL de uma dispersão 1,0 mg mL^{-1} de rGNR. O experimento foi realizado na presença de 10,0 μM de SMX e TMP.

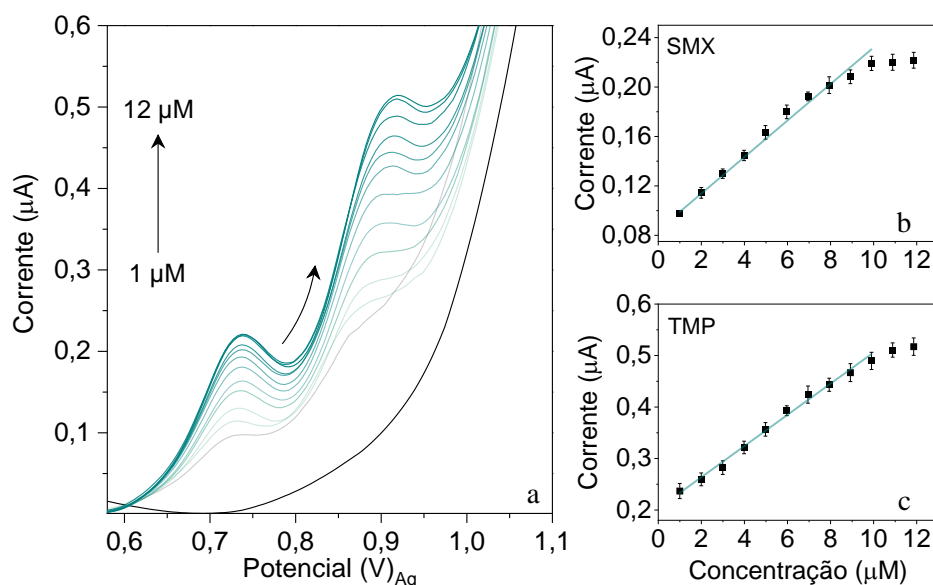


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

4.4 Curvas analíticas, repetibilidade e estudo de reprodutibilidade

A **Figura 15** mostra a resposta do sensor para a detecção simultânea do SXM e TMP. O sinal de corrente de pico anódico aumenta linearmente com o aumento da concentração de SMX e TMP no intervalo de 1,0 a 10,0 μM (**Figura 15b-c**). As equações de regressão linear para SMX e TMP são $\text{Corrente (A)} = 0,014 \times C_{\text{SMX}} (\text{M}) + 5,60 \times 10^{-9}$ ($r = 0,996$, $n = 3$) e $\text{Corrente (A)} = 0,029 \times C_{\text{TMP}} (\text{M}) + 2,04 \times 10^{-7}$ ($r = 0,995$, $n = 3$), respectivamente. O limite de detecção (LOD) foi calculado por meio da equação $\text{LOD} = 3S_b / b$, na qual S_b é o desvio padrão do branco ($n = 10$) e b é a inclinação da curva analítica, conforme recomendado pela IUPAC (MOCAK *et al.*, 1997). O LOD para SMX e TMP foi estimado em 0,09 μM e 0,04 μM , respectivamente.

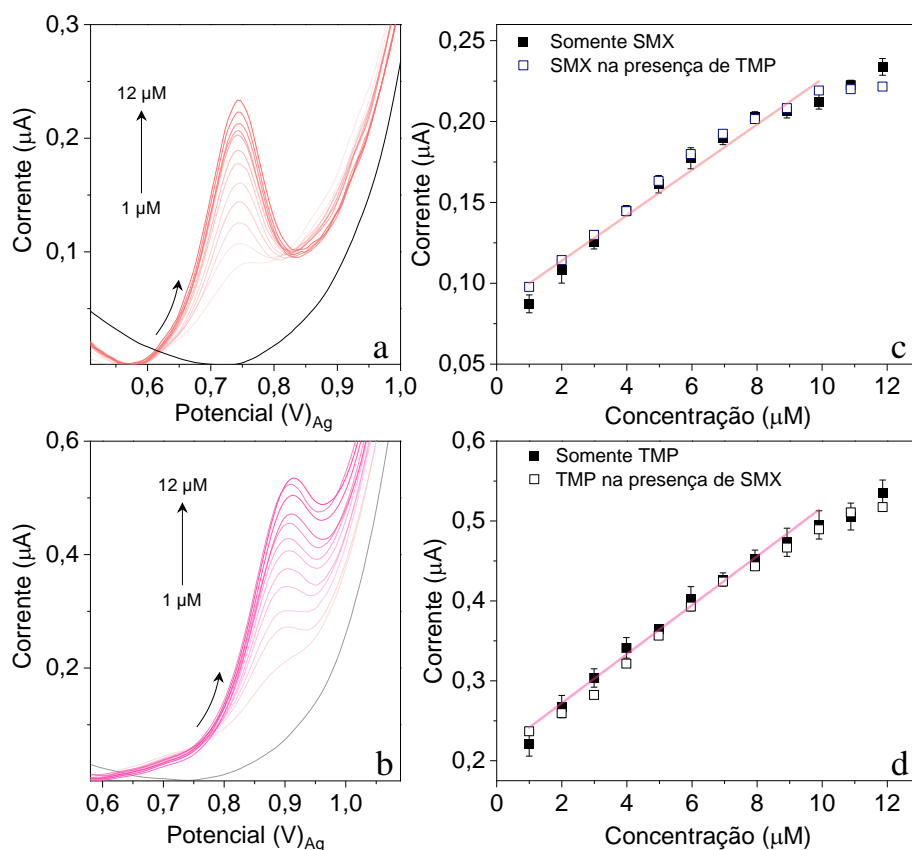
Figura 15. (a) Perfis de DPV e (b, c) curvas analíticas do sensor para quantificação simultânea de SMX e TMP em pH 6,0.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

A **Figura 16** mostra os resultados para a detecção individual dos antibióticos. As curvas analíticas nas **Figuras 16 c-d** são consistentes com aquelas para detecção simultânea, sugerindo que os antibióticos não interferem um com o outro. As equações de regressão linear são $\text{Corrente (A)} = 0,014 \times C_{\text{SMX}} (\text{M}) + 8,286 \times 10^{-8}$ ($r = 0,984$, $n = 3$) para SMX e $\text{Corrente (A)} = 0,030 \times C_{\text{TMP}} (\text{M}) + 2,094 \times 10^{-7}$ ($r = 0,994$, $n = 3$) para TMP. Os valores estimados de LOD para detecção individual de SMX e TMP são iguais aos da detecção simultânea.

Figura 16. Perfis de DPV obtidos de 0,4 a 1,1 V e curvas analíticas do sensor para quantificação individual de (a, c) SMX e (b, d) TMP.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

A **Tabela 1** lista os resultados de determinação simultânea de SMX e TMP para sensores eletroquímicos reportados na literatura. O sensor aqui proposto apresenta excelentes características e possui uma faixa linear competitiva com outros sensores eletroquímicos. Além disso, o dispositivo eletroquímico baseado em papel é barato, portátil, descartável e ecologicamente correto.

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos da literatura de sensores eletroquímicos para detecção simultânea dos antibióticos SMX e TMP.

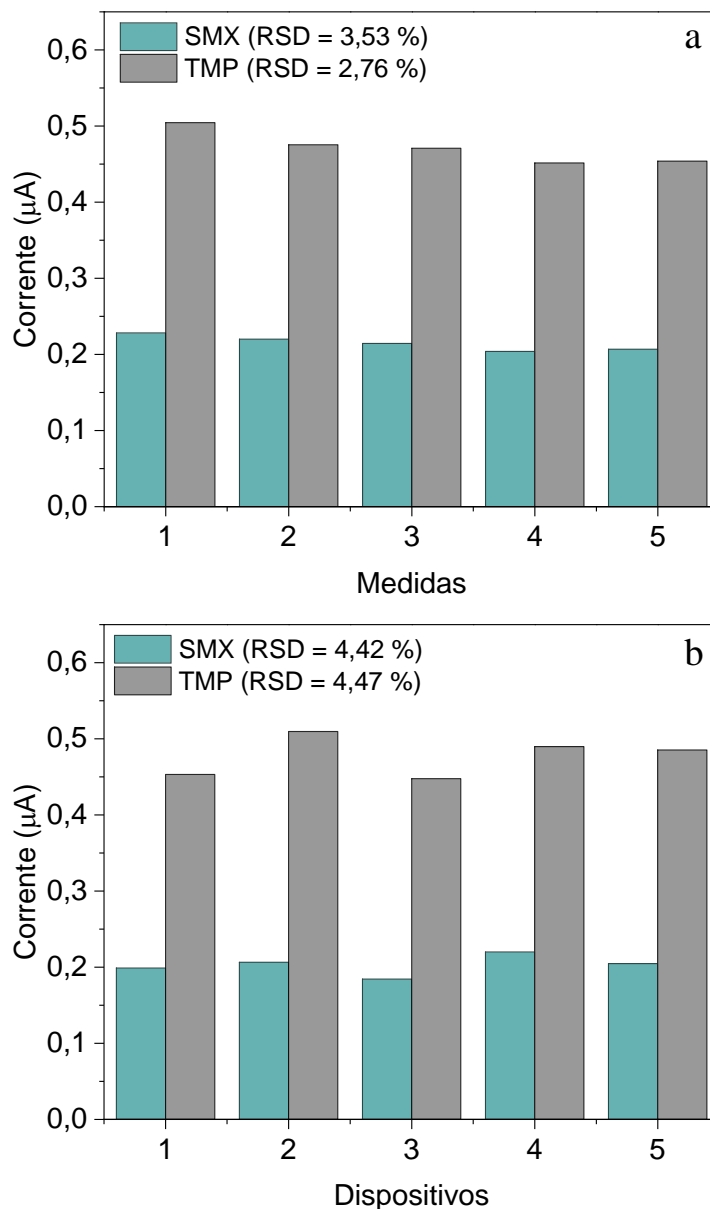
| Plataforma eletroquímica | Faixa linear para SMX (μM) | Faixa linear para TMP (μM) | LOD para SMX (μM) | LOD para TMP (μM) | Ref. |
|---|---|---|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| GR-ZnO/GCE | 1 - 40; 40 - 170 | 1 - 10; 10 - 170 | 0,4 | 0,3 | (YUE; LI; ZHAO, 2020) |
| Parafina/SbNPs-MWCNT | 0,1 - 0,7 | 0,1 - 0,7 | 0,024 | 0,031 | (SANTOS ANDRADE <i>et al.</i> , 2010) |
| GCE | 55,0 - 395,0 | 10,5 - 104,0 | 8,52 | 0,931 | (CALAÇA <i>et al.</i> , 2014) |
| HT-BDD | 3,95 - 39,48 | 0,69 - 6,89 | 0,0144 | 0,0135 | (ANDRADE <i>et al.</i> , 2009) |
| AgNPs-rGO/GCE | 1,0 - 10,0 | 1,0 - 10,0 | 0,6 | 0,4 | (GOLINELLI; MACHADO; CESARINO, 2017) |
| Fe ₃ O ₄ -MWCNT/GCE | 0,1 - 0,5 | 0,1 - 0,5 | 0,011 | 0,021 | (BHENGO <i>et al.</i> , 2018) |
| SPCE baseado em papel | 1,0 - 10,0 | 1,0 - 10,0 | 0,09 | 0,04 | Este trabalho |

Notas GR-ZnO/GCE: eletrodos de carbono vítreo modificados com grafeno e nanobastões de ZnO.
 Parafina/SbNPs-MWCNT: Nanotubos de carbono decorados com eletrodo composto de parafina modificada com nanopartículas de antimônio.
 GCE: eletrodo de carbono vítreo
 HT-BDD: eletrodo de diamante dopado com boro terminado em hidrogênio
 AgNPs-rGO/GCE: nanopartículas de prata e eletrodo de carbono vítreo modificado com composto de óxido de grafeno reduzido.
 Fe₃O₄-MWCNT/GCE: nanotubos de carbono de paredes múltiplas decorados com nanopartículas de Fe₃O₄ sobre eletrodo de carbono.

Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

A **Figura 17** mostra os resultados de repetibilidade e reprodutibilidade realizados por DPV para 10,0 μM dos antibióticos em 0,1 M de PBS (pH 6,0). A repetibilidade foi verificada usando o mesmo eletrodo (medição intra-eletrodo), na qual 5 medições da corrente de pico de oxidação do SMX e TMP resultaram em um desvio padrão relativo (RSD) de 3,53 e 2,76%, respectivamente. Para o estudo de reprodutibilidade, 5 medições com sensores novos (medição entre eletrodos) foram realizadas nas mesmas condições. O sensor proposto apresenta um valor de RSD satisfatório de 4,42 e 4,47% para SMX e TMP, respectivamente.

Figura 17. Estudo de (a) repetibilidade e (b) reprodutibilidade na presença de 10,0 μM SMX e TMP. Os experimentos foram realizados por DPV em 0,1 M de PBS (pH 6) em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

4.5 Detecção simultânea de SMX e TMP em amostras reais e estudo de interferência

O dispositivo eletroquímico proposto foi aplicado em amostras de água da torneira contaminadas com concentrações conhecidas dos antibióticos. Os resultados da **Tabela 2** para

análise simultânea indicaram valores de recuperação entre 97,8 e 102,0% com um RSD abaixo de 4%.

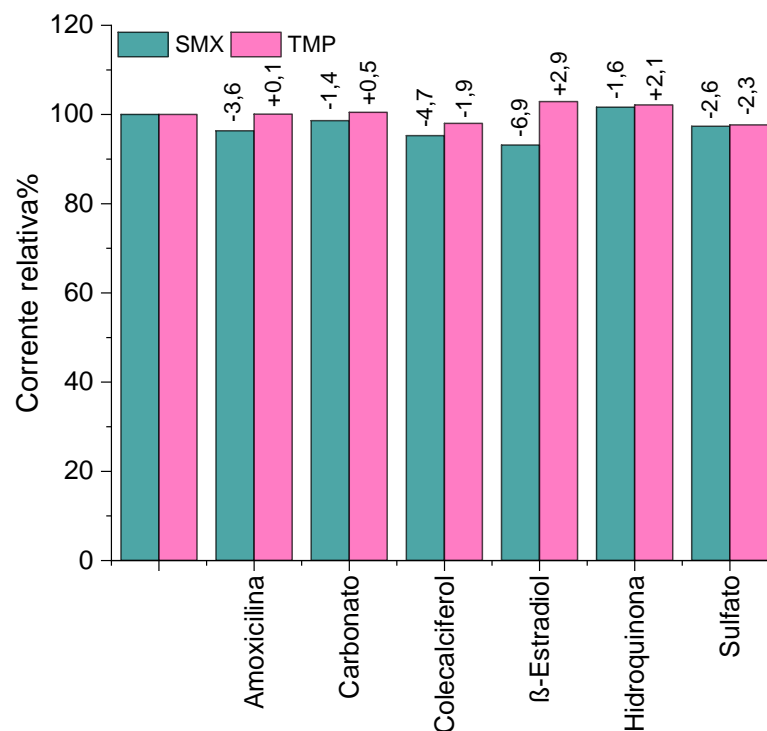
Tabela 2. Recuperação de SMX e TMP em PBS (pH 6,0) feito com água da torneira, n = 3.

| Sinal | Adicionado (μM) | Encontrado (μM) | Recuperado (%) | RSD (%) |
|-------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|------------|
| SMX | 1,0 | 1,0 | 102,0 | 3,5 |
| TMP | 1,0 | 1,0 | 100,1 | 3,8 |
| SMX | 4,9 | 4,9 | 98,5 | 2,0 |
| TMP | 4,9 | 5,0 | 100,5 | 1,9 |
| SMX | 9,9 | 9,7 | 97,8 | 1,1 |
| TMP | 9,9 | 9,9 | 100,3 | 3,0 |

Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

A seletividade do sensor foi avaliada para seis possíveis substâncias interferentes a 30 μM , com resultados de DPV normalizados pelos picos de oxidação dos antibióticos a 10,0 μM . A **Figura 18** mostra mudanças relativas variando de -6,9 a +2,9% para amoxicilina, carbonato, colecalciferol, β -estradiol, hidroquinona e sulfato. Portanto, a especificidade do sensor para a detecção simultânea dos antibióticos é confirmada.

Figura 18. Seletividade do sensor na presença de 10,0 μM dos antibióticos e 30,0 μM dos interferentes (amoxicilina, carbonato, colecalciferol, β -estradiol, hidroquinona e sulfato). Os experimentos foram realizados por DPV em 0,1 M de PBS (pH 6,0) em um intervalo de potencial de 0,4 a 1,1 V.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 882, p. 114985, 2021. (MARTINS *et al.*, 2021)

4.6 Conclusões parciais

Neste trabalho, um sensor eletroquímico baseado em papel totalmente impresso modificado com nanofitas de grafeno reduzidas para a detecção de SMX e TMP foi desenvolvido. O SPCE apresentou melhor desempenho quando tratado eletroquimicamente em meio neutro em comparação aos tratamentos ácido e básico. A adição da rGNR aumenta a sensibilidade do sensor para a detecção dos antibióticos. Além disso, estudos de reprodutibilidade, repetibilidade e interferência atestam a confiabilidade do sistema, cuja detecção ocorre entre 1 e 10 μM com limites de detecção de 0,04 e 0,09 μM para SMX e TMP, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE II

Imunossensor eletroquímico tipo sanduíche contendo o compósito Au-rGO para detecção do marcador tumoral CA15-3

Nesta parte, desenvolvemos um imunossensor eletroquímico tipo sanduíche capaz de detecção rápida de CA15-3 dentro de uma ampla faixa de concentração linear de $0,1 \text{ fg mL}^{-1}$ a $1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ com um limite de detecção (LOD) de $0,08 \text{ fg mL}^{-1}$. O imunossensor possui uma matriz de um filme camada por camada de nanopartículas de Au e óxido de grafeno reduzido (Au-rGO) co-eletrodepositado em eletrodos serigrafados de carbono (SPCE). A alta sensibilidade foi alcançada usando anticorpos secundários (Ab_2) marcados com peroxidase de rábano (HRP) na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como amplificadores de sinal e hidroquinona (HQ) como mediador eletrônico. O imunossensor foi seletivo para CA15-3 em amostras de soro humano e saliva artificial, robusto e estável para permitir o armazenamento a 4°C por mais de 30 dias.

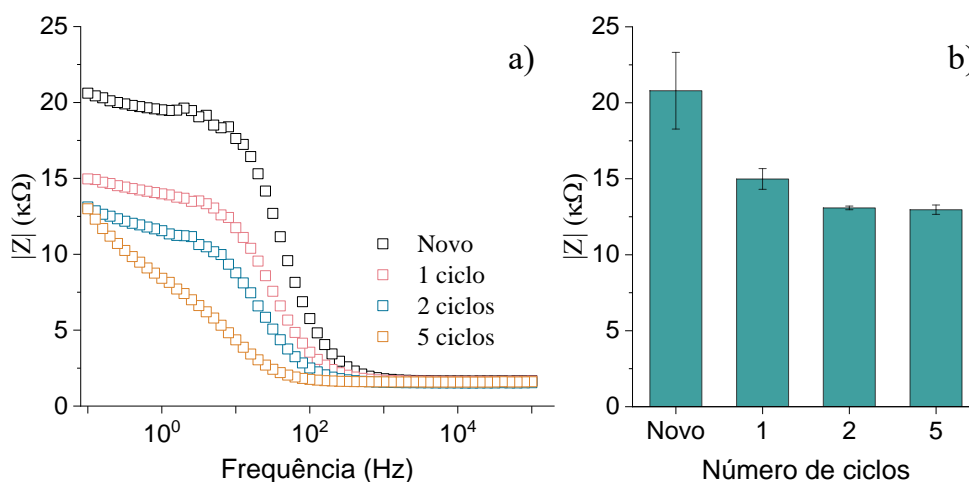


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.1 Otimização do tratamento eletroquímico

Os SPCEs foram tratados por voltametria cíclica entre $-2,5$ e $2,5$ V a 100 mV s^{-1} em solução de PBS (pH 7,4). O efeito do número de varreduras no perfil voltamétrico do eletrodo foi investigado. A **Figura 19a** mostra os espectros de EIS para os SPCEs antes e depois do pré-tratamento com n ciclos ($n = 1, 2$ ou 5). Os valores de impedância (gráfico de Bode) do SPCE novo mostram que a resistência a transferência de carga diminuiu de 21 para 15 ou 13 $\text{k}\Omega$ quando o potencial de eletrodo é ciclado uma ou duas vezes, respectivamente, **Figura 19b**. Dois ciclos forneceram eletrodos estáveis e reproduzíveis. Além disso, a reprodutibilidade do eletrodo com 5 ciclos é ligeiramente inferior e pode estar associada à oxidação do carbono. Portanto, 2 ciclos foram definidos como a condição ideal para a limpeza dos eletrodos.

Figura 19. (a) Espectros de EIS e (b) valores médios de impedância para os SPCEs antes e depois da limpeza eletroquímica com n ciclos ($n = 1, 2$ ou 5) registrados em solução PBS (pH 7,4) contendo $5,0$ mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

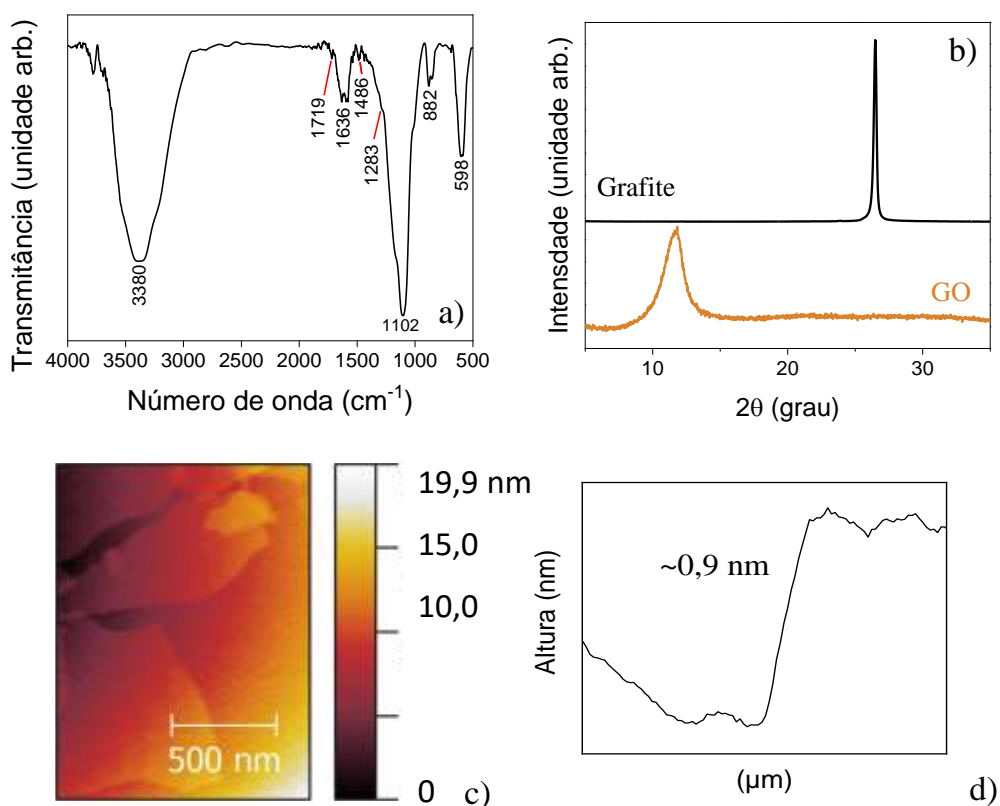


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.2 Caracterização da plataforma de detecção Au-rGO

A **Figura 20a** mostra o espectro de FTIR do GO obtido a partir de grafite natural. As bandas largas e intensas em 3380 e 1719 cm^{-1} são características de vibrações O-H (dos grupos hidroxila e carbonila) e dos grupos C=O, respectivamente. Por outro lado, as bandas em 1486 , 1283 e 1102 cm^{-1} podem ser atribuídas à deformação O-H, estiramento C-OH e estiramento C-O, respectivamente. Todas as bandas observadas aqui são encontradas em compostos à base de óxido de grafeno (XU *et al.*, 2008). Os difratogramas de grafite e óxido de grafeno são mostrados na **Figura 20b**. O difratograma de grafite exibe um pico de difração em $2\theta = 26^\circ$ com um espaçamento entre camadas de $\sim 0,3\text{ nm}$. Em contraste, após a oxidação, um pico em $2\theta = 11^\circ$ correspondente ao plano (002) com um espaçamento entre camadas de $\sim 0,8\text{ nm}$ é observado (SHEN *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2008). Este resultado era esperado, uma vez que as folhas de óxido de grafeno devem ser "mais espessas" com o oxigênio ligado covalentemente e o deslocamento de sp^3 com átomos de carbono hibridizados ligeiramente acima e abaixo do plano do grafeno original, conforme verificado por FTIR (STANKOVICH *et al.*, 2007). Para determinar a espessura das folhas de GO esfoliadas, foram adquiridas imagens de AFM nas **Figuras 20c-d**. A espessura medida foi de $\pm 0,9\text{ nm}$, ligeiramente maior do que o espaçamento entre camadas determinado por XRD. Portanto, os valores de espessura encontrados indicam que o GO esfoliado possui uma estrutura de camada única (BAI; LI; SHI, 2011), que são essenciais para uma co-eletrodeposição satisfatória de Au-rGO (JIAN *et al.*, 2018).

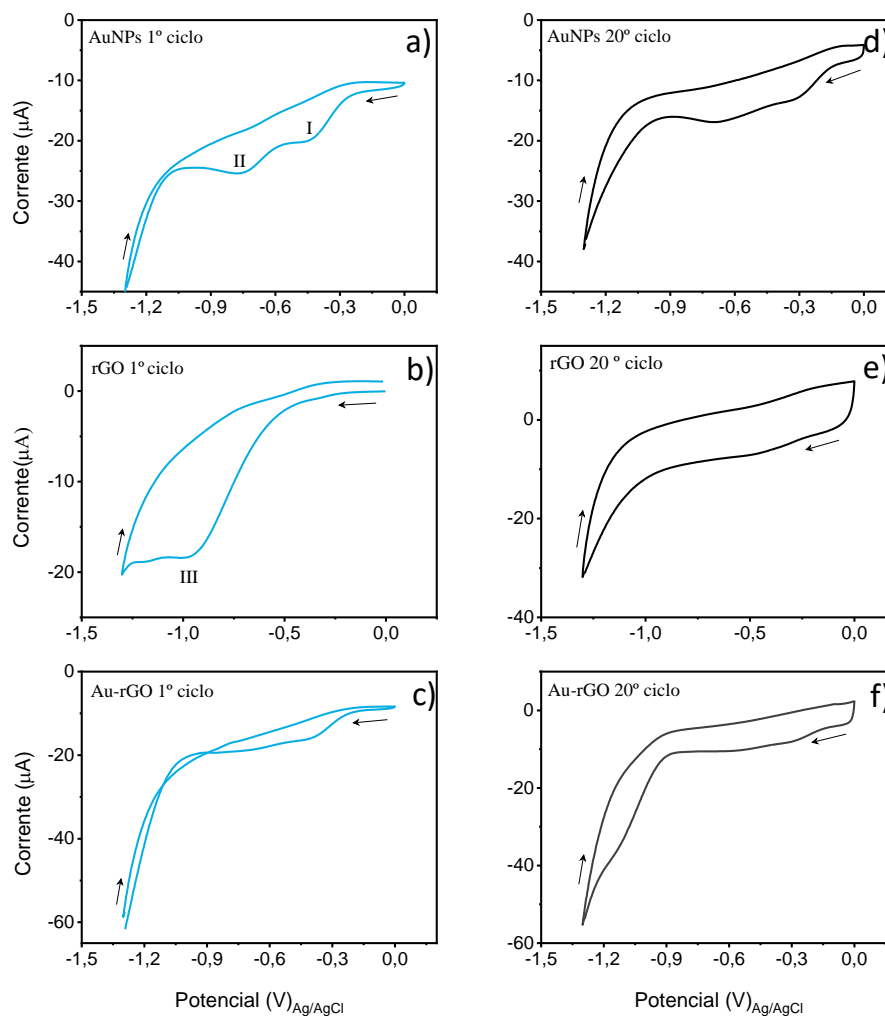
Figura 20. (a) Espectro de FTIR preparado com pastilha de KBr, (b) padrão de XRD e (c-d) imagem de AFM do óxido de grafeno.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

A **Figura 21** exibe o 1º e o 2º CV durante a eletrorredução de GO, Au e Au-GO. O eletrodo modificado com Au exibe dois picos em $-0,45$ V e $-0,76$ V atribuídos à eletrorredução de Au^{3+} para Au^+ e Au^+ para Au^0 , respectivamente (**Figura 21a**) (DE SÁ *et al.*, 2011). A eletrorredução de GO para rGO é denotada por um pico em $-0,98$ V na **Figura 21b**, que também ocorre quando GO e Au são co-eletrorreduzidos para formar Au-rGO na **Figura 21c**.

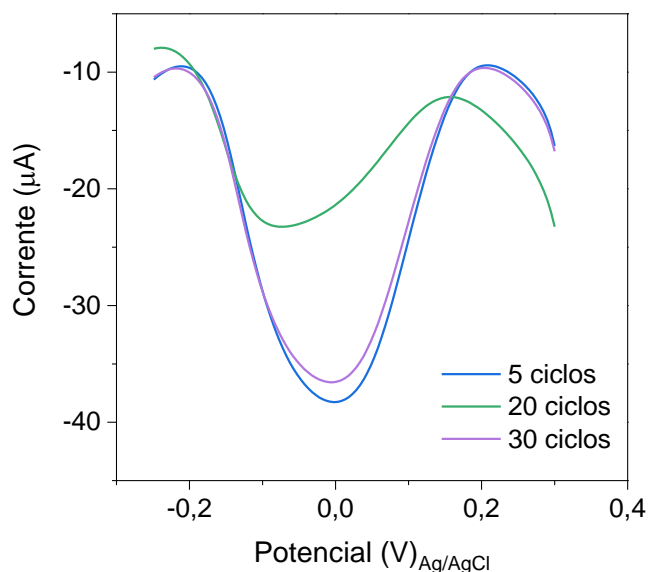
Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos durante a eletrodeposição para eletrodos com (a, d) AuNPs, (b, e) rGO e (c, f) Au-rGO em solução de PBS (pH 7,4) a 100 mV s^{-1} . À direita e à esquerda são mostrados o primeiro e o vigésimo ciclo, respectivamente.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

Conforme o número de ciclos aumenta, a intensidade de todos os picos diminui e o composto tridimensional Au-rGO é formado (JIAN *et al.*, 2018), como ilustrado no **Esquema 3a**. Para otimizar a resposta da plataforma Au-rGO, foi realizada a co-eletrorredução de Au e GO empregando diferentes números de ciclos e avaliada a resposta dos eletrodos na presença de HQ e H_2O_2 . Conforme mostra a **Figura 22**, os eletrodos preparados com 20 e 30 ciclos exibem valores de corrente muito próximos e são $\sim 1,7$ vezes mais eletroativos do que o eletrodo modificado com apenas 5 ciclos. Portanto, 20 ciclos foram escolhidos como o parâmetro ideal.

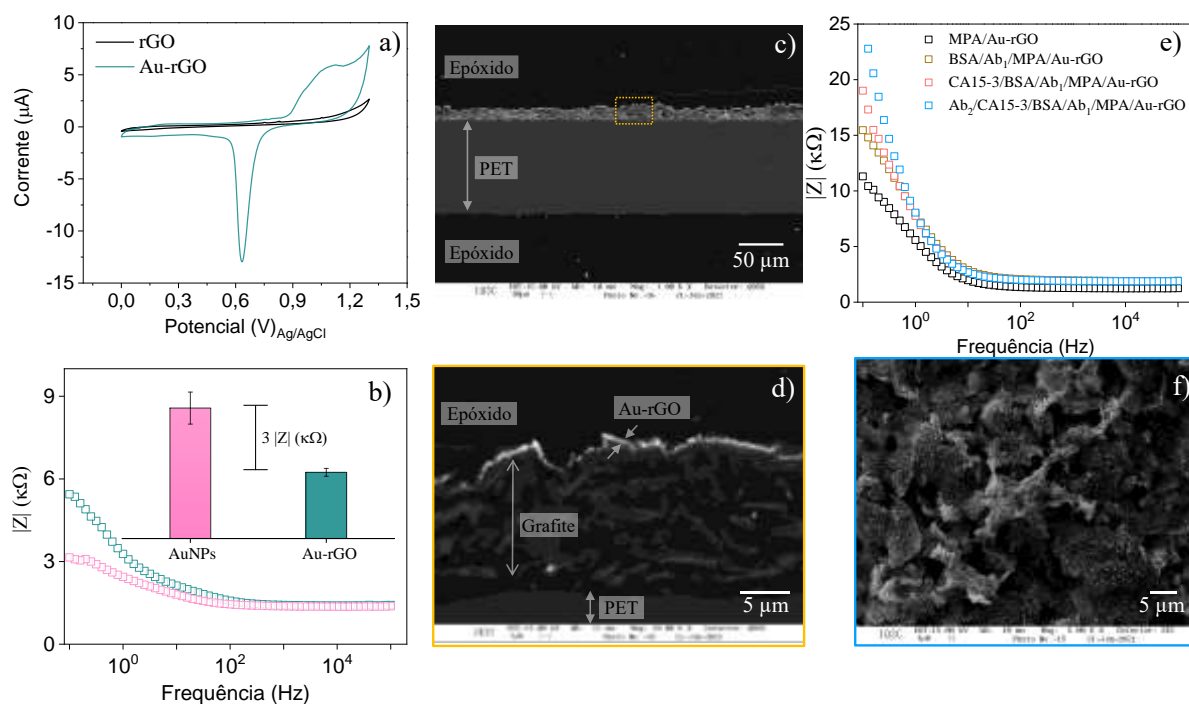
Figura 22. Resposta de SWV da plataforma Au-rGO preparada com 5, 20 e 30 ciclos. As curvas foram registradas em solução de PBS contendo 2,5 mM de HQ e 2,5 mM de H₂O₂.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

A **Figura 23a** mostra os voltamogramas cíclicos em 0,5 M de H₂SO₄ para confirmar a plataforma Au-rGO com um pico amplo em ~1,11 V característicos do óxido de ouro. Há também um pico de redução em ~0,63 V relacionado à redução de óxido de ouro. A impedância nos gráficos de Bode na **Figura 23b** é menor para Au-rGO do que para eletrodos AuNPs e, portanto, eletrodos Au-rGO foram escolhidos para os sensores eletroquímicos, especialmente porque a condutividade pode ser afetada negativamente após a incorporação das biomoléculas.

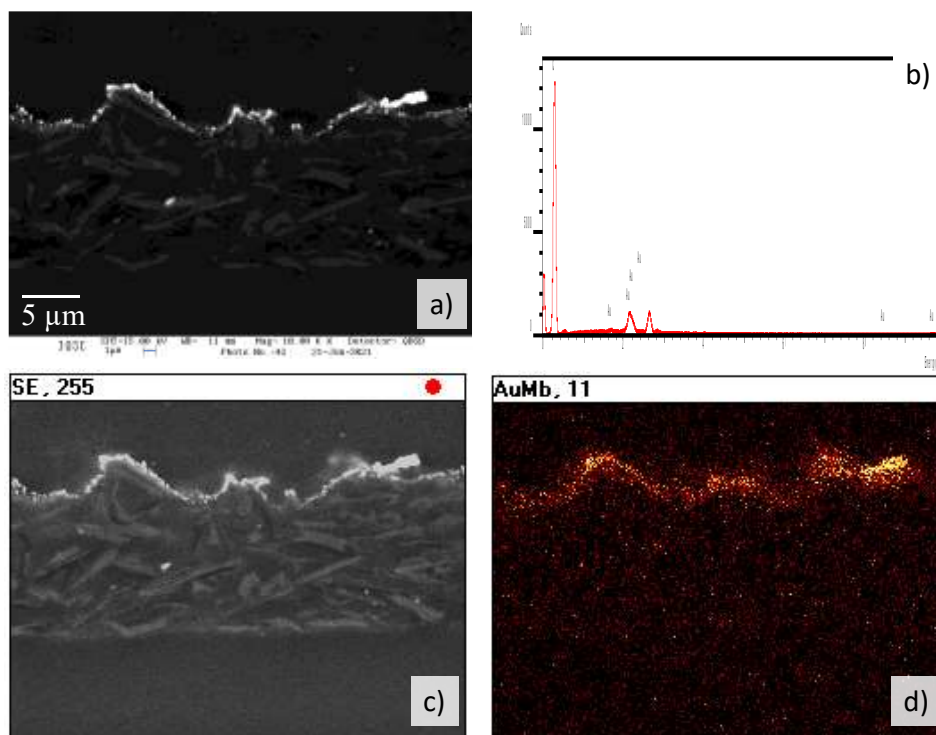
Figura 23. (a) Voltamogramas cíclico do rGO e Au-rGO em 0,5 M de H_2SO_4 a 20 mV s^{-1} . (b) Curvas de impedância (gráficos de Bode) para os eletrodos AuNPs e Au-rGO (a inserção mostra os valores médios). (c) e (d) Imagens de SEM em seção transversal para a plataforma Au-rGO. (e) Gráficos de Bode para os diferentes estágios de fabricação do imunossensor. (f) Imagem de SEM do imunossensor desenvolvido.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

As **Figuras 23c-d** mostram as imagens de SEM em diferentes ampliações, a partir das quais foram obtidas espessuras médias em 50 regiões distintas para as diferentes camadas. A espessura média foi de $102 \pm 1,6$; $12,6 \pm 2,2$ e $0,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$, para as camadas PET, carbono e Au-rGO, respectivamente. Uma análise de espectroscopia de dispersão de energia de raios-X (EDS) confirmou que a camada mais clara na **Figura 23d** se refere ao depósito de ouro, indicando que o composto Au-rGO está concentrado na camada de carbono (**Figura 24**).

Figura 24. (a) e (c) imagem de SEM em seção transversal de Au-rGO; (b) análise EDS; (d) mapeamento EDS.

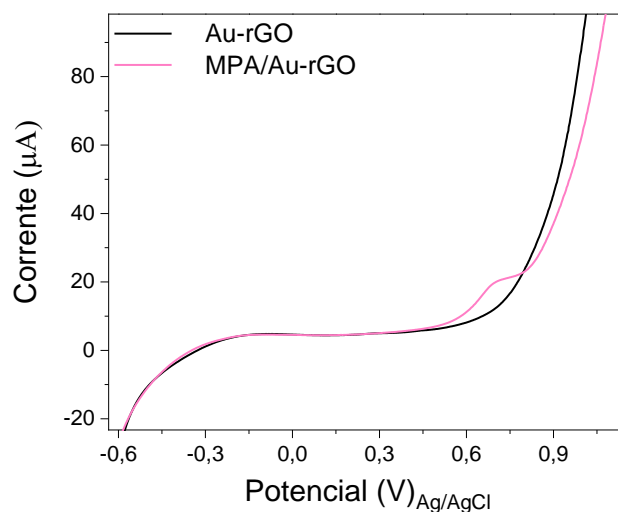


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.3 Determinação do potencial de oxidação do ácido 3-mercaptopropiônico

O MPA foi usado para imobilizar os anticorpos Ab₁. A estabilidade desta molécula sobre a superfície da plataforma foi estudada com respectivas mudanças no potencial de detecção na SWV. CVs foram obtidos para a plataforma Au-rGO com e sem MPA (**Figura 25**). O eletrodo MPA/Au-rGO exibe um pico em ~0,7 V associado à eletrooxidação de MPA, que começa em 0,33 V. Assim, o potencial limite superior foi definido como 0,3 V.

Figura 25. 1ª varredura para potenciais mais positivos da plataforma Au-rGO, antes e após incubação com MPA. Medidas realizadas em solução de PBS (pH 7,4) a 20 mV s^{-1} .

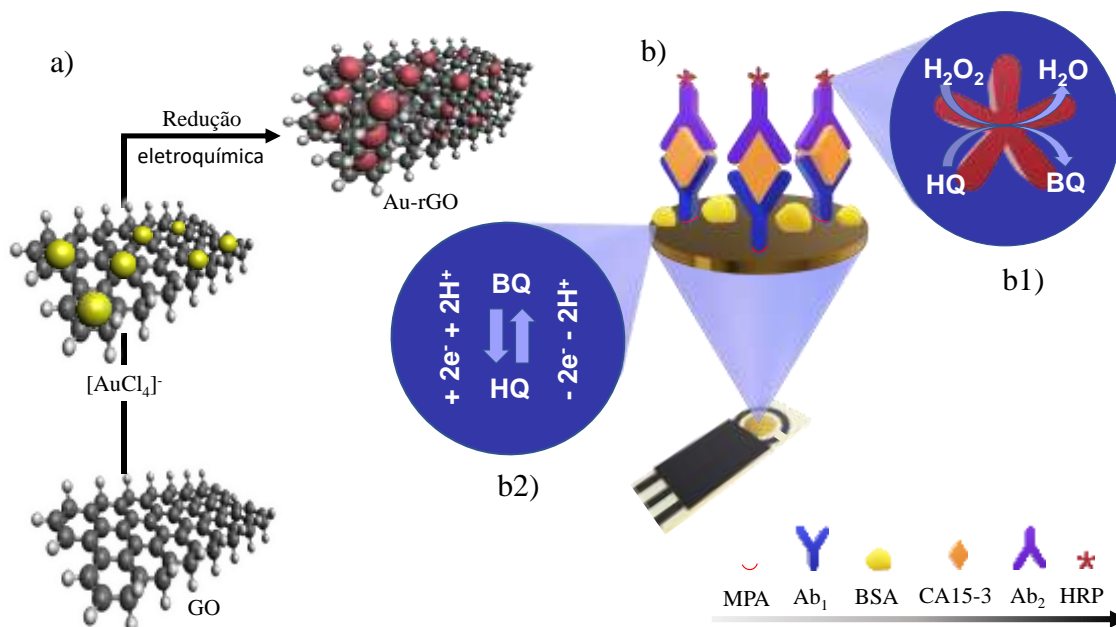


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.4 Comportamento eletroquímico e caracterização do imunossensor

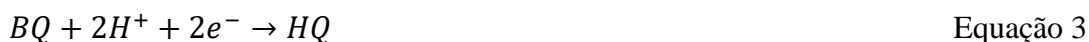
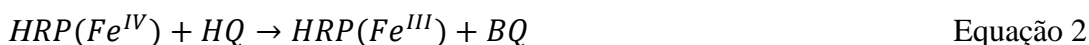
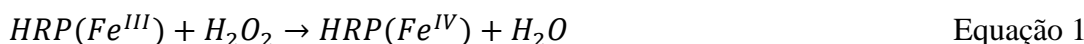
O **Esquema 3** ilustra o princípio analítico do imunossensor eletroquímico para a detecção de CA15-3. O anticorpo Ab_1 foi usado como sonda de captura e o anticorpo Ab_2 marcado com HRP atua como um amplificador de sinal. Na presença de CA15-3, o complexo imune sanduíche foi obtido por meio de interações específicas anticorpo-antígeno, formando o sistema $\text{Ab}_2/\text{CA15-3}/\text{BSA}/\text{Ab}_1/\text{MPA}/\text{Au-rGO}$.

Esquema 3. (a) Ilustração da preparação das plataformas Au-rGO por co-eletrorredução *in situ* de GO e Au. (b) Diagrama esquemático do imunossensor eletroquímico sanduíche usando uma enzima HRP para detecção de CA15-3. As reações nos (b1) sítios ativos da enzima e (b2) na superfície do eletrodo também são mostradas.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

O mecanismo eletroquímico da reação da hidroquinona na presença do biossensor marcado com HRP e H₂O₂ é descrito abaixo (AFSHARAN *et al.*, 2016; AKBARI NAKHJAVANI *et al.*, 2018):

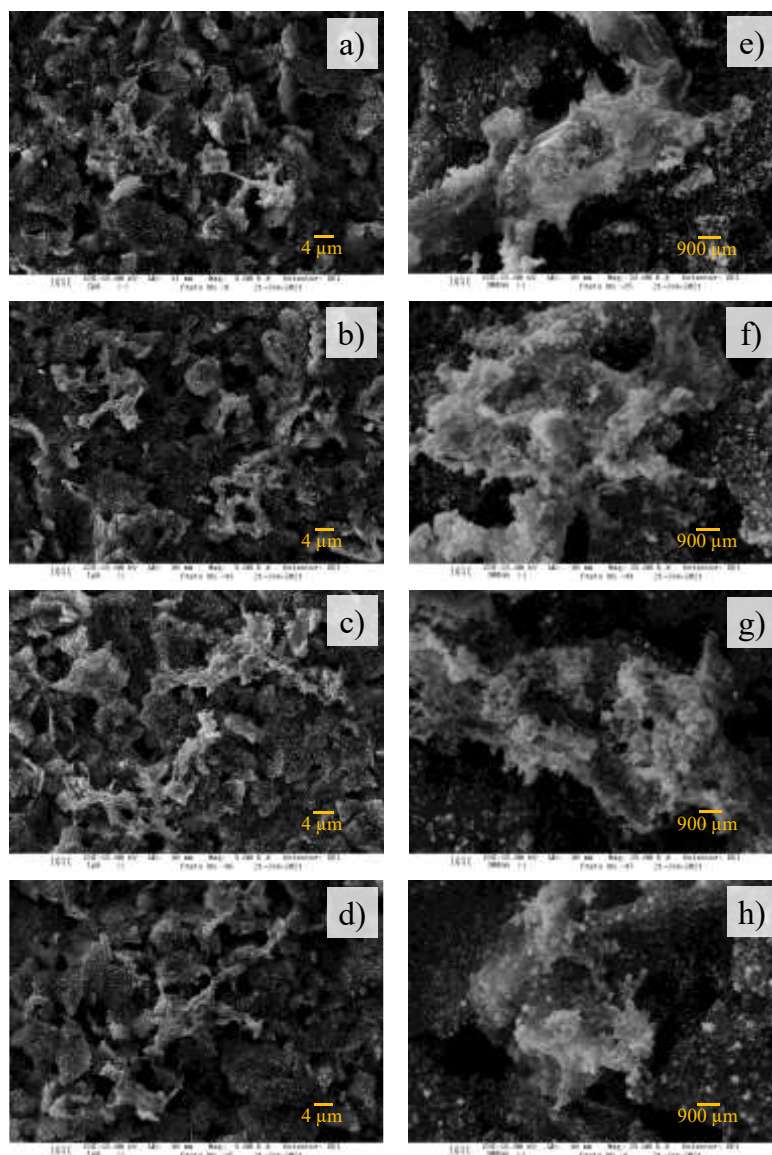


O H₂O₂ na solução é inicialmente reduzido pela enzima HRP (Fe^{III}). Em seguida, a enzima HRP (Fe^{IV}) é regenerada com o mediador HQ, enquanto este é oxidado a benzoquinona (BQ). Por último, o BQ é reduzido eletroquimicamente na superfície do eletrodo. Aqui foi usada a SWV para quantificar a concentração de CA15-3.

A construção do imunossensor foi avaliada usando diferentes métodos. A **Figura 23e** mostra os gráficos de Bode registrados em solução de PBS (pH 7,4) com 5,0 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, na qual a impedância aumenta gradualmente conforme as biomoléculas são adicionadas. Imagens de SEM em diferentes ampliações foram registradas e nenhuma mudança na topografia

da superfície foi observada, sugerindo que a estrutura do composto Au-rGO permanece estável ao longo deste processo (**Figura 26**).

Figura 26. Imagens de SEM com ampliação de 5 k (esquerda) e 25 k vezes (direita) de Ab₁/Au-rGO (imagens a e e), BSA/Ab₁/Au-rGO (imagens b e f), CA15-3/BSA/Ab₁/Au-rGO (imagens c e g) e Ab₂/CA15-3/Ab₁/Au-rGO (imagens d e h).

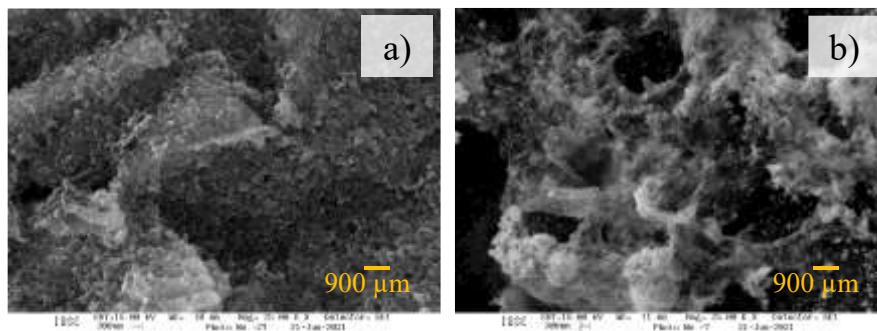


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

É importante salientar que as imagens de SEM do eletrodo Au-rGO exibem uma estrutura mais porosa do que o SPCE não modificado (**Figura 27**). Esta maior rugosidade produz uma área de superfície maior para a ligação de anticorpo, o que pode minimizar o

impedimento estérico e melhorar a eficiência da reação de anticorpos e antígenos CA15-3 (WELCH *et al.*, 2017).

Figura 27. Imagens de SEM de (a) SPCE e (b) Au-rGO/SPCE.

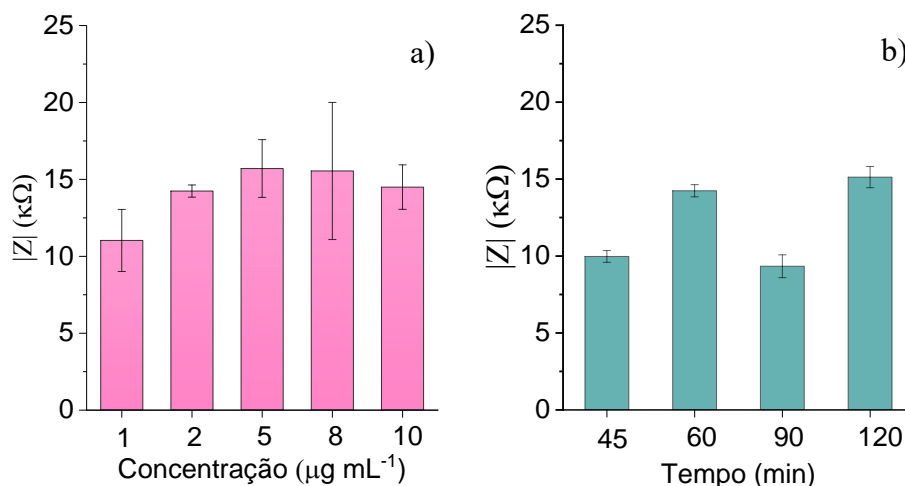


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.5 Otimização da preparação do imunossensor

A eficiência de um imunossensor eletroquímico depende de sua composição, morfologia e arquitetura molecular. Portanto, foram otimizados os parâmetros de fabricação, começando com a concentração de Ab_1 seguido pelo tempo de incubação. Mudanças na impedância medidas por EIS foram usadas como referência no procedimento de otimização. A impedância em 0,1 Hz (região governada por mudanças na dupla camada elétrica) é mostrada na **Figura 28** para diferentes concentrações de Ab_1 e diversos tempos de incubação. Foi selecionado uma concentração de Ab_1 de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para construção do imunossensor porque a impedância foi maior do que para uma concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando um maior número de Ab_1 imobilizado, e porque houve uma diminuição da reprodutibilidade para concentrações de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e acima. O tempo de incubação foi escolhido em 60 min, o que foi suficiente para adsorver uma grande quantidade de Ab_1 com boa reprodutibilidade, como observado nos valores de impedância.

Figura 28. Otimização da preparação do imunossensor: mudança na impedância (0,1 Hz) conforme a concentração de Ab₁ (a) e o tempo de incubação (b) foram variados. Todas as análises de EIS foram registradas em solução de PBS (pH 7,4) com 5,0 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} e n = 5.

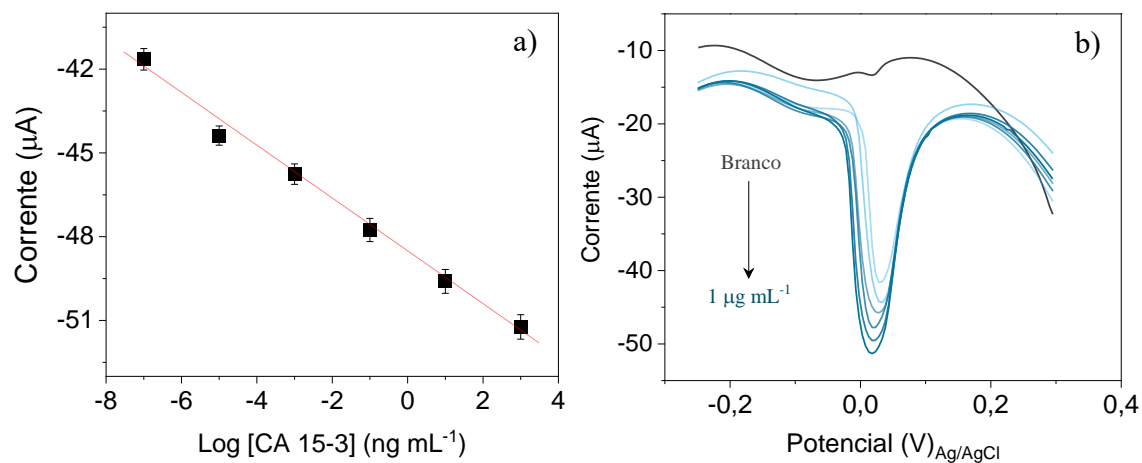


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.6 Desempenho analítico do imunossensor para detecção de CA15-3

Sob as condições otimizadas, o imunossensor foi submetido a soluções com várias concentrações de CA15-3. A curva analítica na **Figura 29** é linear com o logaritmo da concentração no intervalo de 0,1 fg mL⁻¹ a 1,0 μg mL⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0,993. A equação de regressão é $I (\mu\text{A}) = -0,936 \log C (\text{ng mL}^{-1}) - 48,602$, na qual I representa a intensidade da corrente e C é a concentração de CA15-3. O limite de detecção foi 0,08 fg mL⁻¹ (calculado com $\text{LOD} = 3S_b/b$, na qual S_b é o desvio padrão do branco (BSA/Ab₁/MPA/Au-rGO, n = 15) e b é a inclinação da curva analítica (MOCÁK *et al.*, 1997)). O LOD do imunossensor é o menor em comparação com os valores de outros métodos de detecção de biomarcadores de câncer de mama presentes na literatura. Além disso, apresenta uma faixa linear mais ampla, conforme apresentado na **Tabela 3**.

Figura 29. Detecção eletroquímica do CA15-3 realizada no intervalo de potencial de 0,3 a -0,25 V (vs. Ag/AgCl) em solução de PBS (pH 7.4) na presença de 2,5 mM de HQ e 2,5 mM de H₂O₂. (a) Curva analítica e (b) resposta de SWV do imunossensor a concentrações crescentes de CA15-3 de 0,1 fg mL⁻¹ a 1,0 µg mL⁻¹. O branco é o sinal de BSA/Ab₁/MPA/Au-rGO.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

Tabela 3. Uma visão geral dos métodos para determinar biomarcadores de câncer de mama.

| Método de detecção | Biomarcador de câncer de mama | Faixa linear | LOD | Ref. |
|--------------------|-------------------------------|---|--------------------------|---------------------------------------|
| Amperométrico | HER-2 | 2 pg mL ⁻¹ - 12,5 ng mL ⁻¹ | 12 pg mL ⁻¹ | (CARVAJAL <i>et al.</i> , 2018) |
| SPRi | CEA | 0,40 - 20 ng mL ⁻¹ | 0,12 ng mL ⁻¹ | (SZYMANSKA <i>et al.</i> , 2020) |
| Amperométrico | HER2-ECD | 7,5 - 50 ng mL ⁻¹ | 0,16 ng mL ⁻¹ | (FREITAS; NOUWS; DELERUE-MATOS, 2019) |
| ECL | CEA | 5,0 pg mL ⁻¹ - 300 ng mL ⁻¹ | 0,25 pg mL ⁻¹ | (HU <i>et al.</i> , 2021) |
| Amperométrico | HER2-ECD | 5,0 - 50 ng mL ⁻¹ e 50 - 100 ng mL ⁻¹ | 2,8 ng mL ⁻¹ | (FREITAS <i>et al.</i> , 2020) |
| CLIA | CEA | 0,1 - 60,0 ng mL ⁻¹ | 0,05 ng mL ⁻¹ | (LI <i>et al.</i> , 2018a) |
| Amperométrico | MMP-9 | 8,0 - 75 pg mL ⁻¹ e 75 - 10000 pg mL ⁻¹ | 12 pg mL ⁻¹ | (ARÉVALO <i>et al.</i> , 2021) |
| PEC | CEA | 2,0 pg mL ⁻¹ - 10 ng mL ⁻¹ | 1,3 pg mL ⁻¹ | (WEI <i>et al.</i> , 2019) |
| Amperométrico | CEA | 0,01 - 75,0 ng mL ⁻¹ | 3,9 pg mL ⁻¹ | (SHEKARI; ZARE; FALAHATI, 2021) |
| Amperométrico | ErbB2 | 1,0 - 200,0 ng mL ⁻¹ | 0,22 ng mL ⁻¹ | (ZHONG <i>et al.</i> , 2020) |
| Amperométrico | CA15-3 | 1,0 - 240 ng mL ⁻¹ | 0,6 ng mL ⁻¹ | (YANG <i>et al.</i> , 2008) |
| Amperométrico | CA15-3 | 5,0 pg mL ⁻¹ - 100 ng mL ⁻¹ | 5,0 pg mL ⁻¹ | (WU <i>et al.</i> , 2013) |
| Impedimétrico | CA15-3 | 0,5 - ,0 ng mL ⁻¹ | 0,39 ng mL ⁻¹ | (ARORA; TOMAR; GUPTA, 2017) |
| Amperométrico | CA15-3 | 1,0 fg mL ⁻¹ - 0,1 µg mL ⁻¹ | 0,35 fg mL ⁻¹ | (LIU <i>et al.</i> , 2017) |
| Amperométrico | CA15-3 | 0,1 fg mL ⁻¹ - 1 µg mL ⁻¹ | 0,08 fg mL ⁻¹ | Este trabalho |

Notes SPRi ressonância plasmônica de superfície
 ECL luminescência eletroquímica
 CLIA imunoenensaio de quimiluminescência
 PEC fotoeletroquímica

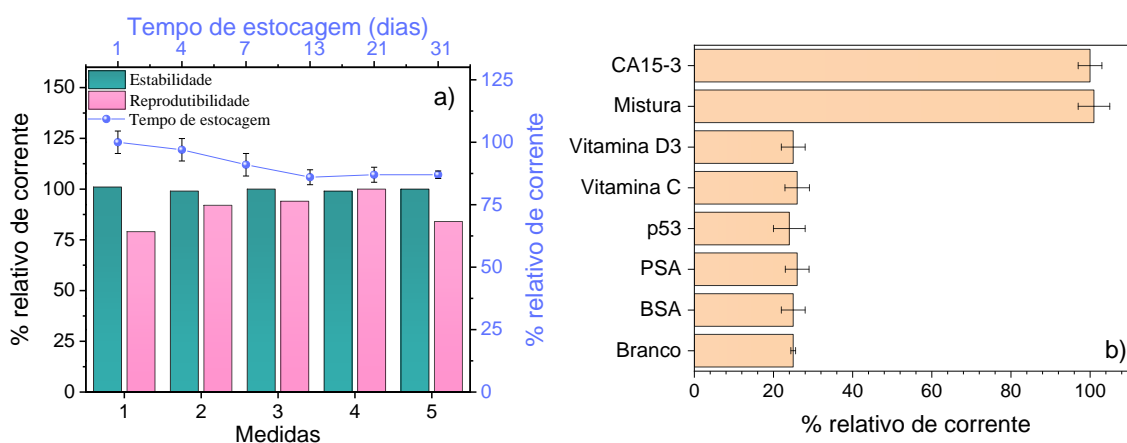
Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.7 Avaliação da estabilidade, reprodutibilidade, seletividade e armazenamento do imunossensor

A estabilidade e a reprodutibilidade são indicadores essenciais do desempenho do imunossensor, que foram determinados aqui com a detecção de 1,0 µg mL⁻¹ de CA15-3, e os resultados são mostrados na **Figura 30a**. A estabilidade foi verificada usando o mesmo eletrodo (medição intra-eletrodo), na qual 5 medições resultaram em um RSD de 0,8%. Para o estudo de reprodutibilidade, 5 medições com imunossensores novos (medição entre eletrodos) foram realizadas nas mesmas condições, e o RSD foi de 9,2%. Para confirmar a confiabilidade do imunossensor, as substâncias BSA, PSA, p53, vitamina D3 e vitamina C a 1,0 µg mL⁻¹ e sua mistura (1,0 µg mL⁻¹ cada) foram selecionadas como potenciais interferentes na determinação de CA15-3. Conforme mostrado na **Figura 30b**, a resposta de sinal de corrente para esses interferentes é comparável ao valor encontrado para o branco. Além disso, a mistura exibiu

valores comparáveis ao CA15-3 puro. Quando o imunossensor sanduíche ($Ab_2/CA15-3/BSA/Ab_1/MPA/Au-rGO$) foi armazenado a $4^\circ C$, houve perda de 3 e 13% nas respostas primárias por 4 e 31 dias, respectivamente, indicando uma excelente estabilidade em comparação com a literatura (AKBARI NAKHJAVANI *et al.*, 2018; HASANZADEH *et al.*, 2018; JIA *et al.*, 2018).

Figura 30. (a) Estabilidade, reprodutibilidade e armazenamento do imunossensor em $1,0 \mu g mL^{-1}$ de CA15-3 ($n = 5$). (b) Seletividade do imunossensor com $1,0 \mu g mL^{-1}$ de CA15-3 e substâncias interferentes: BSA, PSA, p53, vitamina D3 e vitamina C a $1,0 \mu g mL^{-1}$. Resultados da resposta SWV do imunossensor conduzido em solução de PBS (pH 7,4) de 0,3 a $-0,25 V$ (vs. Ag/AgCl).



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

5.8 Desempenho analítico em amostras de soro humano e saliva artificial

Para estudar a viabilidade do imunossensor em aplicações práticas, analisamos amostras de soro humano e saliva artificial. Soro humano e saliva artificial foram diluídos em solução de PBS (1:100, v/v) e enriquecidos com três concentrações conhecidas de CA15-3, cobrindo a curva analítica. As concentrações de CA15-3 foram calculadas por interpolação com a curva analítica (**Figura 29a**). As recuperações variaram de 97,4 a 103,6% para soro humano e de 98,6 a 101,8% para saliva artificial (**Tabela 4**), comprovando a confiabilidade deste imunossensor para detecção de CA15-3 em matrizes complexas.

Tabela 4. Valores de recuperação para os imunossensores incubados com 1×10^{-16} , 1×10^{-12} e 1×10^{-6} g mL⁻¹ CA15-3 em soro humano e amostras de saliva artificial diluídos (P = 0,05; n = 5).

| Adicionado (g mL ⁻¹) | Soro humano | | Saliva artificial | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
| | Encontrado (g mL ⁻¹) | Recuperado (%) | Encontrado (g mL ⁻¹) | Recuperado (%) |
| 1×10^{-16} | $1,0 \times 10^{-16}$ | 100,9 ± 7,4 | $0,9 \times 10^{-16}$ | 98,6 ± 8,2 |
| 1×10^{-12} | $0,9 \times 10^{-12}$ | 97,4 ± 6,7 | $1,0 \times 10^{-12}$ | 99,6 ± 5,8 |
| 1×10^{-6} | $1,0 \times 10^{-6}$ | 103,6 ± 9,3 | $1,0 \times 10^{-6}$ | 101,8 ± 9,1 |

Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **Microchimica Acta**, v. 189, p. 1-7, 2021. (MARTINS *et al.*, 2022)

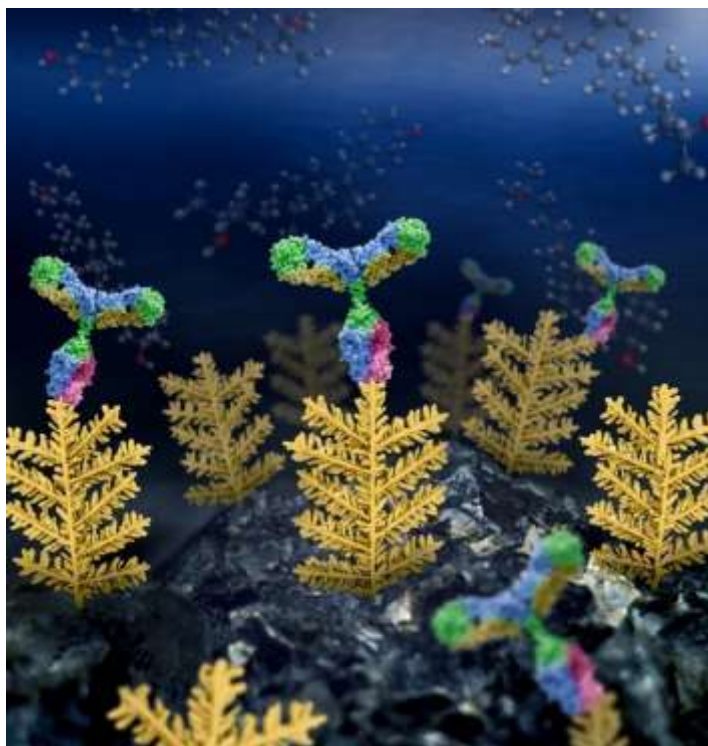
5.9 Conclusões parciais

Um imunossensor eletroquímico ultrasensível para monitoramento de CA15-3 foi desenvolvido. Usamos uma técnica simples de eletrodeposição para produzir nanoestruturas 3D de Au-rGO sobre SPCEs, o que resultou em uma superfície robusta, homogênea e de alta condutividade. Este compósito também apresentou uma grande área de superfície para ligação de anticorpos e foi adequado para preservar a atividade das biomoléculas. O LOD foi o menor encontrado na literatura para detecção de biomarcador de câncer de mama. O imunossensor também exibiu uma ampla faixa linear, excelente estabilidade e resultados confiáveis na análise de soro e saliva artificial. O imunossensor é promissor para rastreamento, teste rápido e descentralizado do câncer de mama CA15-3, permitindo monitoramento e diagnóstico precoce. De fato, com este imunossensor, pode-se vislumbrar a detecção em amostras menos invasivas como a saliva, cujo nível de CA15-3 é ca. de dez vezes menor do que no soro (LIANG *et al.*, 2012). Além disso, a abordagem empregada para construir o imunossensor pode ser estendida a outros biomarcadores para aplicações no local de atendimento.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE III

Imunosensor eletroquímico sem rótulo feito com dendritos de ouro em forma de árvore para monitorar o metabólito 25-hidroxivitamina

Neste capítulo, relatamos chips imunossensores flexíveis e livres de rótulos feitos com dendritos de ouro em forma de árvore formados eletroquimicamente por dessorção seletiva da *L*-cisteína (*L*-cis) sobre os planos (111) do ouro. A eletrodeposição foi usada porque é escalável, econômica e, por permitir o crescimento rápido e direto de estruturas dendríticas de Au hiperramificadas. O metabólito 25-hidroxivitamina D3 (25(OH)D3) foi detectado em 15 minutos com limite de detecção de 0,03 ng mL⁻¹. Este alto desempenho foi possível devido à otimização cuidadosa da camada eletroativa e das condições de trabalho para com a voltametria de onda quadrada. A electrocristalização foi manipulada controlando o potencial de deposição e a razão molar entre H₂AuCl₄ e *L*-cis. A detecção do metabólito foi realizada em amostras de soro humano e saliva com recuperação adequada entre 97 e 100%.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

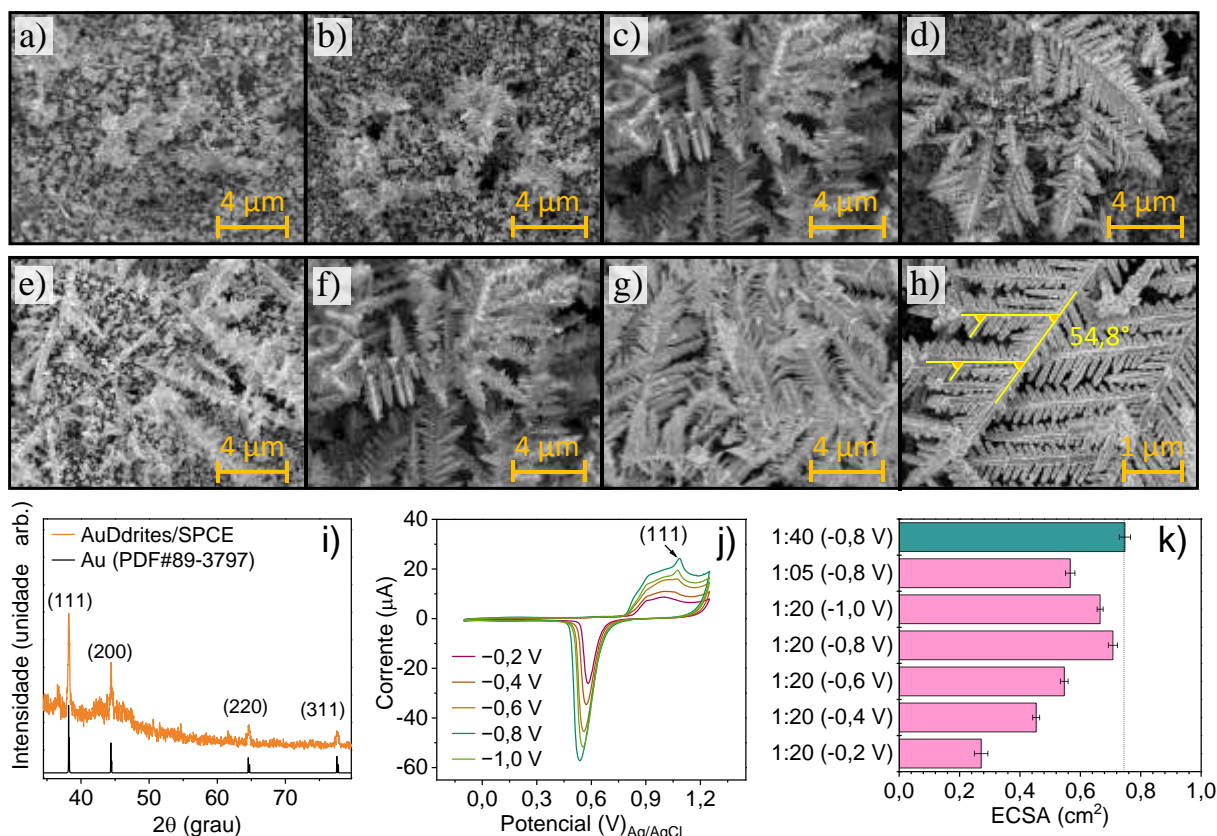
6.1 Princípio de detecção

Um SPCE modificado com AuDdrites foi utilizado como plataforma de detecção eletroquímica, conforme ilustrado no **Esquema 1**. Essas nanoestruturas possuem alta condutividade e biocompatibilidade que proporcionam uma grande área de superfície para imobilização de anticorpos. Os anticorpos foram imobilizados covalentemente via ligação carbodiimida com EDC/NHS. O anticorpo reconheceu e capturou 25(OH)D3 por meio de imunorreações. A corrente gerada na superfície do catalisador surge da eletrooxidação da sonda redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$). Os imunocomplexos entre anticorpos e metabólitos atuam como uma camada isolante, bloqueando parcialmente a difusão da sonda redox. Assim, a mudança na corrente induzida pela variação da concentração de 25(OH)D3 é detectada.

6.2 Caracterização e otimização da plataforma de detecção eletroquímica

A **Figura 31** mostra os resultados compilados durante a otimização da eletrossíntese de AuDdrites sobre SCPE. Os depósitos de Au foram sensíveis aos potenciais aplicados, conforme mostrado nas **Figuras 31a-d** e **32**. Potenciais menos negativos de $-0,2$ a $-0,6$ V produzem nanoestruturas irregulares (incluindo nanopartículas e estrelas), enquanto potenciais de $-0,8$ a $-1,0$ V produz nanoestruturas dendríticas de ouro semelhantes a árvores.

Figura 31. Imagens de SEM-FEG de AuDdrites preparados em 0,5 M de H_2SO_4 com razão molar de 1:20 de HAuCl_4 para *L*-cis em (a) $-0,4$ V, (b) $-0,6$ V, (c) $-0,8$ V, (d) $-1,0$ V. Imagens SEM-FEG de AuDdrites a $-0,8$ V com diferentes razões molares de HAuCl_4 para *L*-cis: (e) 1:5, (f) 1:20, (g-h) 1:40. (i) Padrão de XRD dos AuDdrites preparados a $-0,8$ V com razão molar de 1:40 de HAuCl_4 para *L*-cis. (j) Voltamogramas cíclicos e (k) ECSA de eletrodos AuDdrites/SPCE em 0,5 M de H_2SO_4 a 20 mV s^{-1} .

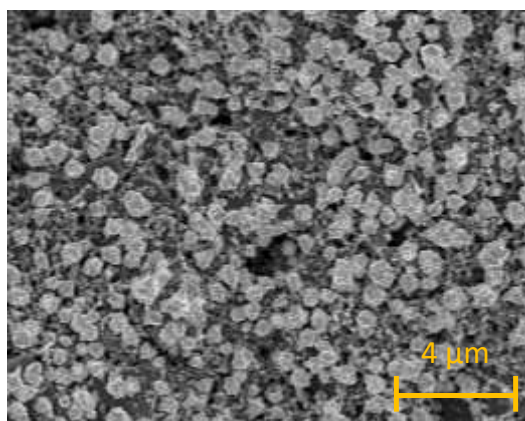


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

De acordo com as **Figuras 31e-h**, a síntese de estruturas dendríticas de Au com diferentes comprimentos e densidades pode ser controlada variando a razão molar entre HAuCl_4 e *L*-cis. Dendritos mais volumosos com áreas de superfície maiores são observados aumentando a proporção molar de *L*-cis para ouro, de 1:5 para 1:40. O padrão de XRD dos AuDdrites sobre SPCE na **Figura 31i** mostra estruturas cristalinas com uma rede cúbica de face centrada com picos em $2\theta = 38,2^\circ$ (111), $44,4^\circ$ (200), $64,6^\circ$ (220), $77,7^\circ$ (311) (BOTT-NETO *et al.*, 2014). Os voltamogramas cíclicos para os eletrodos AuDdrites na **Figura 31j** exibem um perfil típico de ouro, mostrando um pico amplo de oxidação relacionado à formação de óxido entre 0,8 e 1,15 V e um pico de redução em $\sim 0,55$ V atribuído à redução de óxido de ouro a ouro metálico. Um

aumento na intensidade do pico em $\sim 1,1$ V característico do plano (111) (JEYABHARATHI *et al.*, 2016) foi notado, à medida que estruturas mais complexas de dendritos de ouro foram formadas. Além disso, o aumento na área superficial eletroquimicamente ativa na **Figura 31k** é consistente com a formação de estruturas mais complexas com dimensões maiores. O eletrodo com a maior área eletroativa foi preparado com 1:40 H_{AuCl}₄ para *L-cis* a $-0,8$ V. A eletrodeposição de dendritos de Au sobre SPCE parece ocorrer por dessorção seletiva da *L-cis* nos planos (111) do Au. Conforme mostrado na **Figura 31h**, os ângulos entre esses grupos de ramos e tronco estão próximos do ângulo teórico de $54,7^\circ$ entre duas direções (111) sob a visão da projeção de (110) (HAU *et al.*, 2017). A ligação de tióis em Au(110) e Au(100) é mais forte do que em Au(111) por causa das energias relativas de superfície dos planos cristalográficos (110)>(100)>(111) em ouro metálico (ARIHARA *et al.*, 2003). Portanto, tióis adsorvidos podem ser dessorvidos por meio de reações eletroquímicas em um potencial que depende do plano cristalográfico do Au. Como a energia do plano (111) do Au é menor, a *L-cis* em um determinado potencial pode ser dessorvida seletivamente dos planos (111) do Au, enquanto permanece adsorvida nos planos Au(110) e Au(100). Isso favorece o crescimento de planos (111) com formação dos AuDdrites.

Figura 32. Imagem de SEM-FEG do eletrodo AuDdrites/SPCE preparado em 0,5 M de H₂SO₄ com razão molar de 1:20 de H_{AuCl}₄ para *L-cis* a $-0,2$ V durante 900 s.

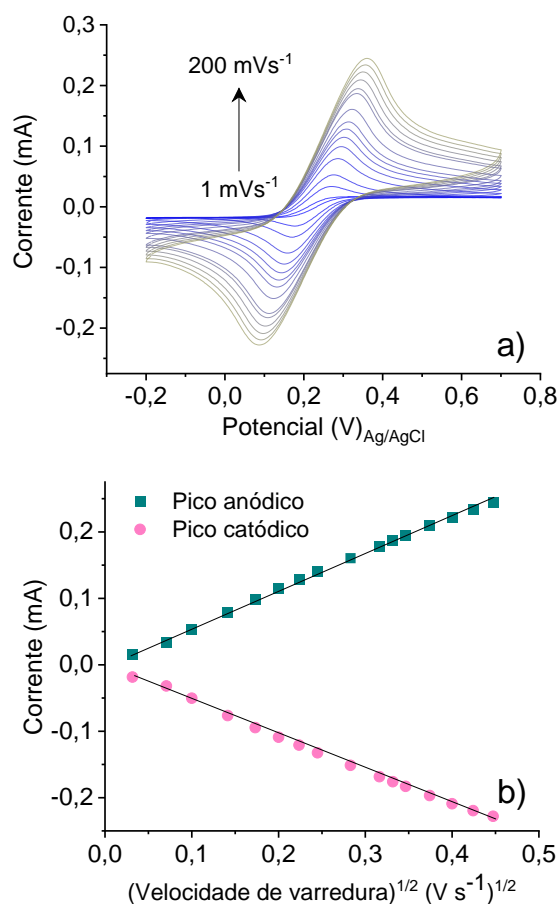


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

O processo da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sobre AuDdrites/SPCE pode ser investigado variando a taxa de varredura nas medições de voltametria cíclica. A **Figura 33a** mostra que as correntes de pico anódica (*I*_{pa}) e catódica (*I*_{pc}) aumentaram com a taxa de varredura de 1 a 200 mV s⁻¹. A **Figura 33b** mostra uma relação linear entre correntes de pico anódicas e

catódicas plotadas com a raiz quadrada da taxa de varredura, representada com as seguintes equações de regressão: $I_{pa} \text{ (mA)} = 0,56 \log v - 2,42 \times 10^{-4}$ ($R^2 = 0,99$) e $I_{pc} \text{ (mA)} = -0,52 \log v - 2,29 \times 10^{-3}$ ($R^2 = 0,99$). Ambas as inclinações estão próximas do valor teórico de 0,5 esperado para um processo controlado por difusão.

Figura 33. (a) Resposta de voltametria cíclica realizada em PBS 0,01 M (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sobre AuDdrites/SPCE. (b) Gráfico de corrente de pico anódica e catódica versus raiz quadrada da taxa de varredura.



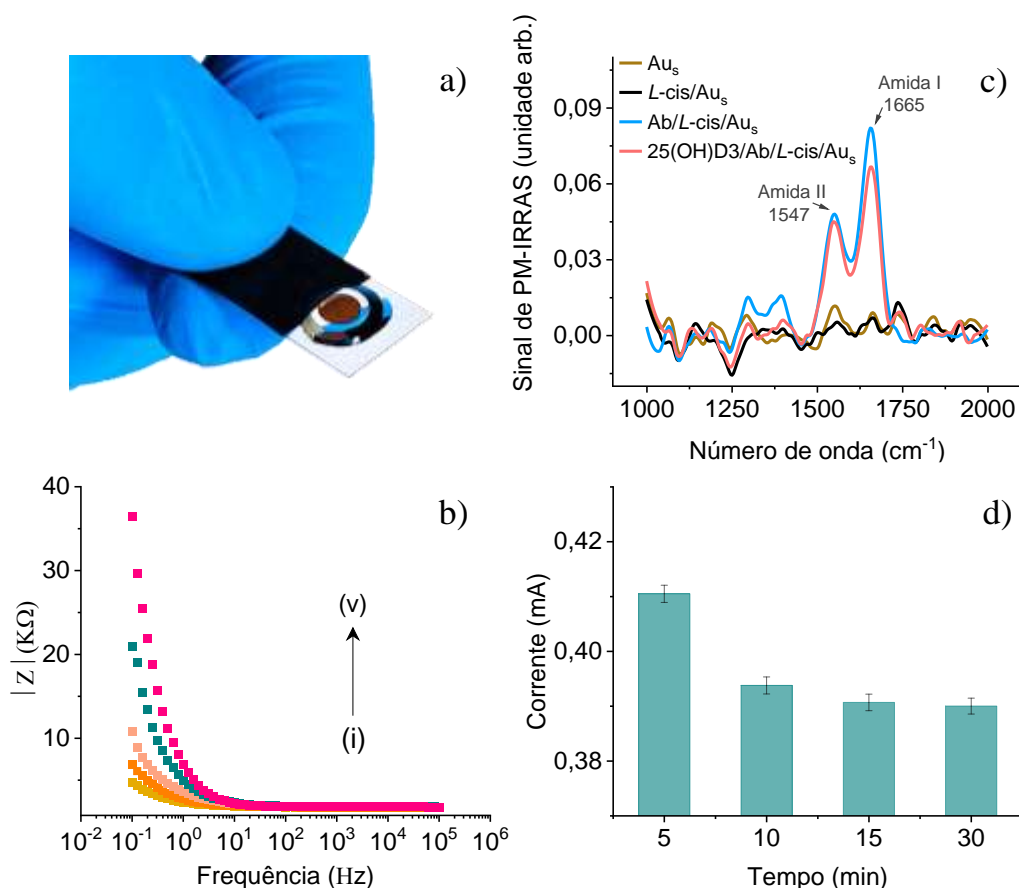
Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

6.3 Caracterização e otimização do chip imunossensor

A **Figura 34a** exibe a imagem de um chip imunossensor impresso em tela. Uma vez que o desempenho da imunodeteção depende de um arranjo adequado e interação anticorpo-alvo eficaz, investigamos a imobilização do anticorpo e a interação com o 25(OH)D3 com medidas de EIS e PM-IRRAS. O gráfico de Bode na **Figura 34b** mostra um aumento na impedância em

baixas frequências entre 0,1 e 100 Hz, região governada pela dupla camada elétrica. A adsorção dos materiais imunossensores induz aumentos de impedância na região da dupla camada, consistente com a arquitetura molecular pretendida. Os experimentos PM-IRRAS foram registrados em substratos de ouro (Au_s) devido à pequena área geométrica e alta refletância difusa dos AuDrites/SPCEs. Os espectros na **Figura 34c** coletados antes e depois da imunorreação Ab/L-cis/ Au_s mostram duas bandas em ~ 1665 e 1547 cm^{-1} atribuídas ao alongamento de carbonila (C=O) de amidas primárias e secundárias, respectivamente (BOUJDAY *et al.*, 2008). A interação entre o metabólito e o anticorpo parecem ocorrer por meio das amidas primárias, cuja intensidade da banda diminui em maior extensão do que para a amida secundária. As correntes na **Figura 34d** diminuíram com o tempo até 15 min, o que é considerado suficiente para uma interação satisfatória anticorpo-25(OH)D3. Este resultado é relevante porque para dispositivos de autoteste é crucial alcançar um tempo de análise curto.

Figura 34. (a) Imagem do chip imunossensor impresso em tela. (b) Gráfico de Bode dos (i) AuDdrites, (ii) *L*-cis/AuDdrites, (iii) Ab/*L*-cis/AuDdrites, (iv) BSA/Ab/*L*-cis/AuDdrites, e (v) eletrodos 25(OH)D3/BSA/Ab/*L*-cis/AuDdrites. (c) espectros PM-IRRAS de Au_s, *L*-cis/Au_s, Ab/*L*-cis/Au_s e 25(OH)D3/Ab/*L*-cis/Au_s. (d) Otimização do tempo de incubação de 25(OH)D3 a 10 ng mL⁻¹ obtido por voltametria de onda quadrada. Os experimentos foram realizados em solução de PBS 0,01 M (pH 7,4) contendo 5 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.

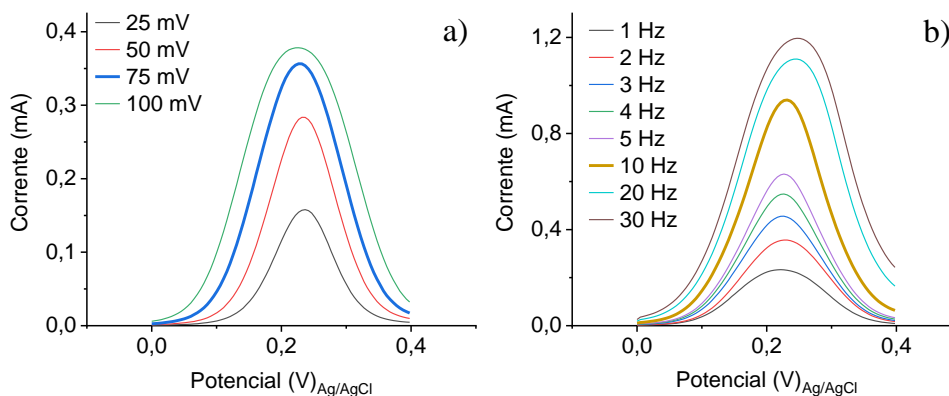


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

6.4 Desempenho analítico do chip imunossensor flexível e descartável

A corrente nas curvas de SWV depende dos valores de amplitude e frequência utilizados. A **Figura 35** mostra a otimização de amplitude e frequência realizadas com passo de potencial fixo de 5 mV em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} para o eletrodo AuDdrites/SPCE. A amplitude e a frequência foram escolhidas como 75 mV e 10 Hz, respectivamente, devido aos maiores valores de corrente com largura de pico aceitável.

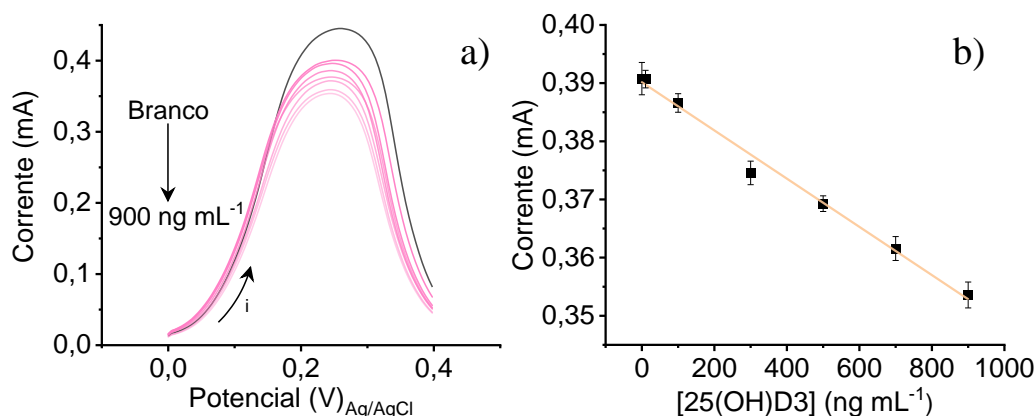
Figura 35. Curvas de SWV para AuDdrites/SPCE otimizados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})]^{3-/4-}$ (passo de potencial = 5 mV): (a) Efeito da amplitude a 2 Hz e (b) da frequência com amplitude fixada em 75 mV.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

A resposta do imunossensor em condições ideais é mostrada na **Figura 36**. O sinal de corrente da SWV diminui com o aumento da concentração de 25(OH)D3 de 0,1 para 900,0 ng mL⁻¹ (**Figura 36a**). A corrente varia linearmente com a concentração de 25(OH)D3, de acordo com a equação $I[\text{mA}] = 0,39 - 4,15 \times 10^{-5} C_{25(\text{OH})\text{D}3} [\text{ng mL}^{-1}]$ ($R^2 = 0,99$, $n = 5$), na qual C é a concentração de 25(OH)D3 e I é a corrente (**Figura 36b**). O LOD foi estimado em 0,03 ng mL⁻¹ ($n = 5$). Esse desempenho em termos de limite de detecção e faixa linear é adequado para monitorar a vitamina D, pois a faixa de concentração está dentro dos valores de interesse clínico.

Figura 36. (a) Respostas de voltametria de onda quadrada do imunossensor a um aumento nas concentrações de 25(OH)D3 de 0 a 900,0 ng mL⁻¹. (b) Curva analítica de 0,1 a 900,0 ng mL⁻¹; (n = 5). Os experimentos foram realizados em solução de PBS 0,01 M (pH 7,4) contendo 5,0 mM de [Fe(CN)₆]^{3-/4-}.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

A **Tabela 5** lista os parâmetros analíticos do sensor para monitoramento do metabólito 25(OH)D3, que são comparáveis aos sensores eletroquímicos *bulk* relatados na literatura. O imunossensor tem a vantagem de ser flexível, com fabricação e operação simples. Além disso, pode ser personalizado para ser inserido em um protetor bucal e atuar como um sensor vestível, atendendo assim às necessidades dos usuários com faixas lineares específicas de acordo com seu metabolismo. Com essa customização, os impactos dos efeitos colaterais resultantes de concentrações baixas e altas da vitamina D podem ser evitados.

Tabela 5. Camadas de detecção na literatura para detecção de 25-hidroxivitamina D3.

| Camada de detecção | Portátil | Tempo de análise (minuto) | Amostra | Faixa de detecção (ng mL ⁻¹) | LOD (ng mL ⁻¹) | Ref. |
|-----------------------------|----------------|---------------------------|---------------|--|----------------------------|--|
| GCN/ β -CD/AuNPs/GCE | Não | 60 | Soro | 0,1-500 | 0,01 | (ANUSHA <i>et al.</i> , 2022) |
| Eletrodo de ouro | Não | 135 | Soro | 0,04-400 | 0,01 | (YIN <i>et al.</i> , 2022) |
| Eletrodo de ouro | Não | 15 | Soro | 1-1000 | 0,08 | (YIN <i>et al.</i> , 2021a) |
| CAEF/RCP | Não | 5 | Soro | 10-100 | 10,0 | (CHAUHAN; SOLANKI, 2019) |
| SPAuE | Sim (rígido) | 60 | Tampão | 20-200 | 10,0 | (CARLUCCI <i>et al.</i> , 2013) |
| AuNPs/MoS ₂ /FTO | Não | 25 | Soro | 1-100 | 0,00038 | (KAUR <i>et al.</i> , 2021) |
| p-PD-Res/SPCE | Sim (rígido) | 15 | Plasma | 4-801 | 0,4 | (KIA; BAHAR; BOHLOOLI, 2019) |
| Au-Pt/APTES/FTO | Não | 12 | Soro | 0,0001-1000000 | 0,00049 | (KAUR <i>et al.</i> , 2020) |
| MoS ₂ /rGO/GCE | Não | 30 | Saliva | 0,1-150 | 0,02 | (PARK <i>et al.</i> , 2022) |
| Ouro-pulverizado/Vidro | Sim (rígido) | 25 | Saliva | 50-200 | 25 | (RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL <i>et al.</i> , 2021) |
| AuDdrites/SPCE | Sim (flexível) | 15 | Soro e Saliva | 0,1-900 | 0,03 | Este trabalho |

Nota GCN: nitreto de carbono; β -CD: β -ciclodextrina; Au: ouro; GCE: eletrodo de carbono vítreo; Au- μ E: eletrodo comercial de ouro pulverizado sobre vidro; GQDs: pontos quânticos de grafeno; CAEF: fibras de acetato de celulose eletrofiadas; RCP: papel condutor; SPAuE: eletrodos de ouro serigrafados; MoS₂: sulfureto de molibdênio; FTO: eletrodo de vidro modificado com óxido de estanho e flúor; p-PD: p-fenilenediamina; Res: resorcinol; Au-Pt: nanopartículas de ouro-platina; APTES: (3-Aminopropil)triétoxissilano; rGO: óxido de grafeno reduzido.

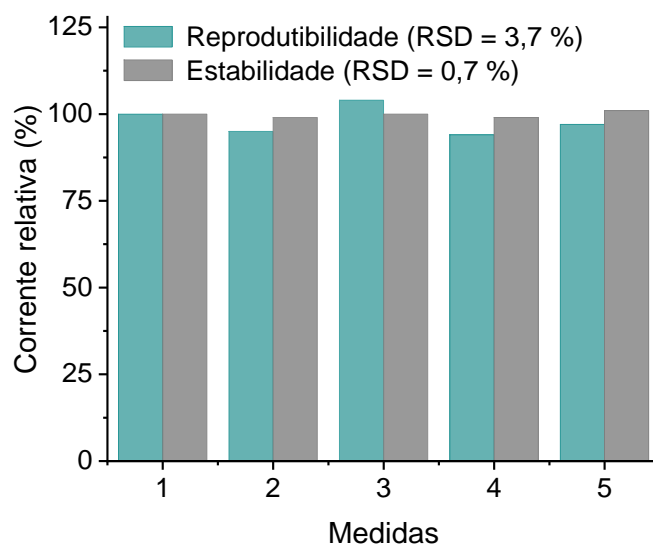
Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

6.5 Reprodutibilidade e estabilidade

A reprodutibilidade e estabilidade do imunossensor foram testadas com medidas para detectar 10 ng mL⁻¹ de 25(OH)D3. Os resultados da **Figura 37** confirmam a reprodutibilidade com um RSD de 3,7% nas correntes medidas com 5 dispositivos diferentes. Os valores de

corrente relativa tiveram um desvio padrão de 0,7% para os testes de estabilidade com o mesmo sensor.

Figura 37. Reprodutibilidade e estabilidade do imunossensor na presença de 10 ng mL^{-1} de 25(OH)D3. As medidas foram realizadas por voltametria de onda quadrada em solução de 0,01 M de PBS (pH 7,4) contendo 5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

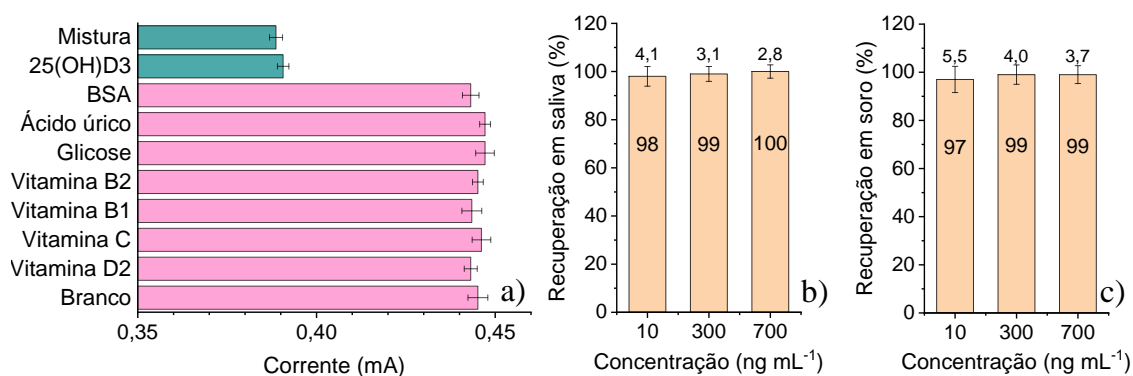


Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

6.6 Estudo de especificidade e monitoramento de 25(OH)D3 em amostras de saliva artificial e soro humano

A especificidade do imunossensor foi testada pela detecção de 25(OH)D3 na presença dos possíveis interferentes BSA, ácido úrico, glicose, vitamina B2, vitamina B1, vitamina C e vitamina D2 a 10 ng mL^{-1} , além de suas misturas. A **Figura 38a** mostra que a resposta de corrente desses interferentes é comparável ao valor encontrado para a amostra do branco. A mistura incluindo 25(OH)D3, BSA, ácido úrico, glicose, vitamina B2, vitamina B1, vitamina C e vitamina D2 exibiu valores de corrente comparáveis ao 25(OH)D3 puro. A recuperação para as concentrações de 25(OH)D3 calculadas a partir da curva analítica variou entre 98% e 100%, com RSD inferior a 4,2% para amostras diluídas de saliva artificial na **Figura 38b**. Valores de recuperação entre 97% e 99% foram obtidos para amostras diluídas de soro humano na **Figura 38c**, com um RSD relativo inferior a 5,6%. Esses resultados satisfatórios confirmam a potencial aplicação no diagnóstico clínico.

Figura 38. (a) Seletividade do imunossensor na presença de $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de 25(OH)D3 e $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ dos interferentes (BSA, ácido úrico, glicose, vitamina B2, vitamina B1, vitamina C e vitamina D2). A mistura contém todas as substâncias mencionadas. Valores de recuperação de 25(OH)D3 para imunossensores incubados com $10,0$, $300,0$ e $700,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de 25(OH)D3 em (b) saliva artificial diluída e (c) amostras de soro humano. ($n = 5$). Os experimentos foram realizados por voltametria de onda quadrada em $0,01 \text{ M}$ de PBS (pH 7,4) contendo $5,0 \text{ mM}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.



Fonte: Martins; Bott-Neto *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 31455–31462, 2022. (Martins *et al.*, 2022)

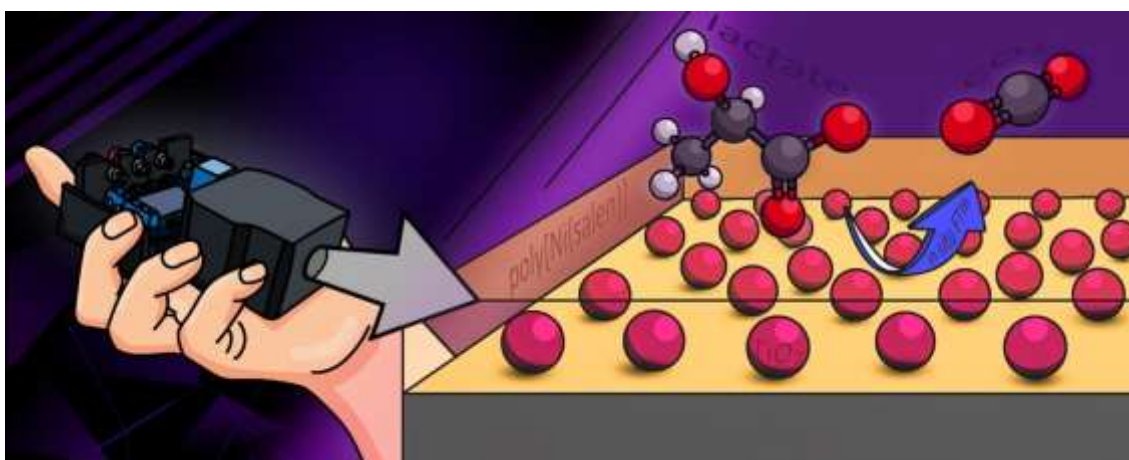
6.7 Conclusões parciais

O imunossensor flexível e totalmente impresso provou ser adequado para nutrição de precisão com detecção rápida, sensível e seletiva do metabólito 25(OH)D3. O uso da serigrafia pode permitir a produção em massa de imunossensores em diversos substratos, como luvas e protetores bucais, especialmente para aplicação dentro do paradigma vestível. O imunossensor foi capaz de detectar 25(OH)D3 em amostras de soro humano e saliva artificial em uma ampla faixa de concentração, de $0,1$ a $900,0 \text{ ng mL}^{-1}$, com limite de detecção de $0,03 \text{ ng mL}^{-1}$. O imunossensor também apresentou excelente reprodutibilidade e estabilidade, com RSD de 3,7 e 0,7%, respectivamente. O alto desempenho alcançado com o sensor foi possível devido a uma otimização cuidadosa da camada eletroativa formada por nanoestruturas de dendritos de ouro em forma de árvore e dos parâmetros de detecção, o que deve ter permitido à sonda redox acessar um número maior de sítios ativos. Além disso, acreditamos que investigar outras sondas redox inorgânicas e orgânicas pode levar a sensores com desempenho ainda melhor. Este é um desenvolvimento oportuno com a tendência de tecnologias vestíveis para nutrição de precisão, visando intervenções personalizadas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE IV

Um sistema portátil para detecção fotoeletroquímica de lactato sobre nanopartículas de TiO₂ e filme polimérico de [Ni(salen)]

Nesta parte, é apresentado um sistema fotoeletroquímico portátil desenvolvido com eletrodos de carbono serigrafados e um diodo emissor de luz de 3 W. O sistema com estrutura impressa em 3D foi aplicado na detecção do lactato sobre nanopartículas de TiO₂ modificadas com filme de polímero [Ni(salen)]. O revestimento do eletrodo com o polímero aumentou a sensibilidade do sensor fotoeletroquímico, resultando em uma faixa linear de 0,1 a 20,0 mM com limite de detecção de 88,0 µM. Também demonstramos por medidas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier *in situ* que o dióxido de carbono é o principal produto da fotoeletrooxidação do lactato.

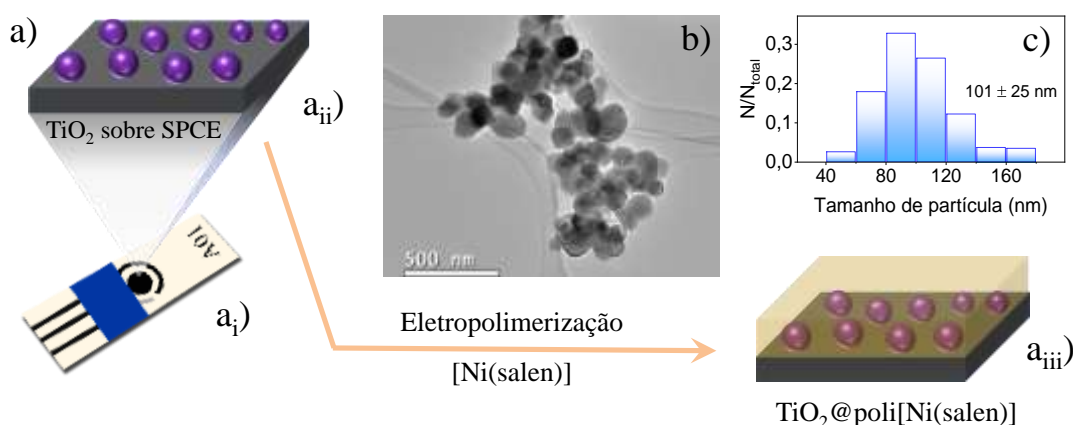


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

7.1 Caracterização do sensor PEC

O **Esquema 4a** ilustra a construção do sensor fotoeletroquímico $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ a partir de nanopartículas de TiO_2 comerciais e do monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$. As nanopartículas de TiO_2 têm uma forma quase esférica, conforme mostrado no **Esquema 4b**, com um tamanho médio de 101 ± 25 nm (como mostra o **Esquema 4c**). Os picos no padrão de XRD de TiO_2 comercial na **Figura 39a** correspondem à fase anatase (PDF#75-1537).

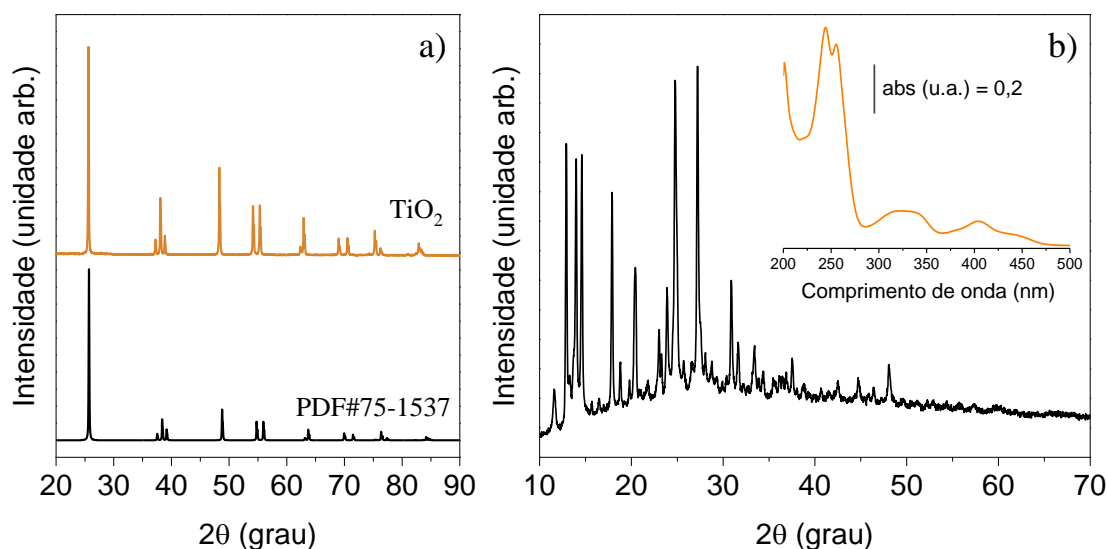
Esquema 4. (a) Ilustração esquemática da fabricação de um sensor PEC: (a_i) SPCE, (a_{ii}) superfície do SPCE com nanopartículas de TiO_2 , (a_{iii}) superfície do SPCE com TiO_2 e $\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

As propriedades físico-químicas do monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$ e $\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ preparado com o método usado aqui estão melhor discutidas anteriormente (BOTT-NETO *et al.*, 2019b; MARTINS *et al.*, 2018). Um complexo de níquel salen foi obtido de acordo com a análise do padrão de XRD e espectros de UV-Vis na **Figura 39b**.

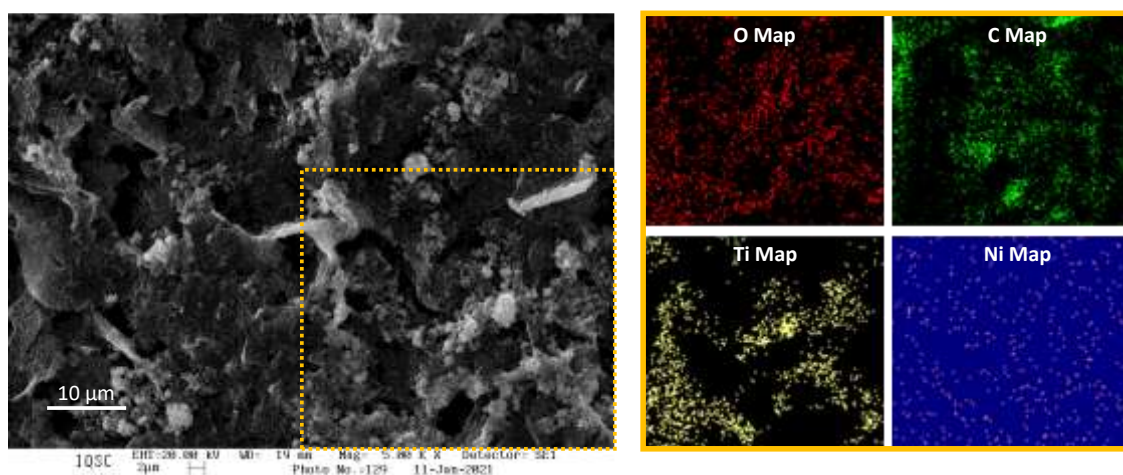
Figura 39. (a) Difratoograma de XRD e ficha do padrão PDF# 5-1537 de TiO_2 e (b) difratograma de XRD e espectro de UV-vis do monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

Na etapa de eletropolimerização, o monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$ é eletro-oxidado para produzir um filme oligomérico/polimérico sobre o SPCE, referido aqui como $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ (NUNES *et al.*, 2017).

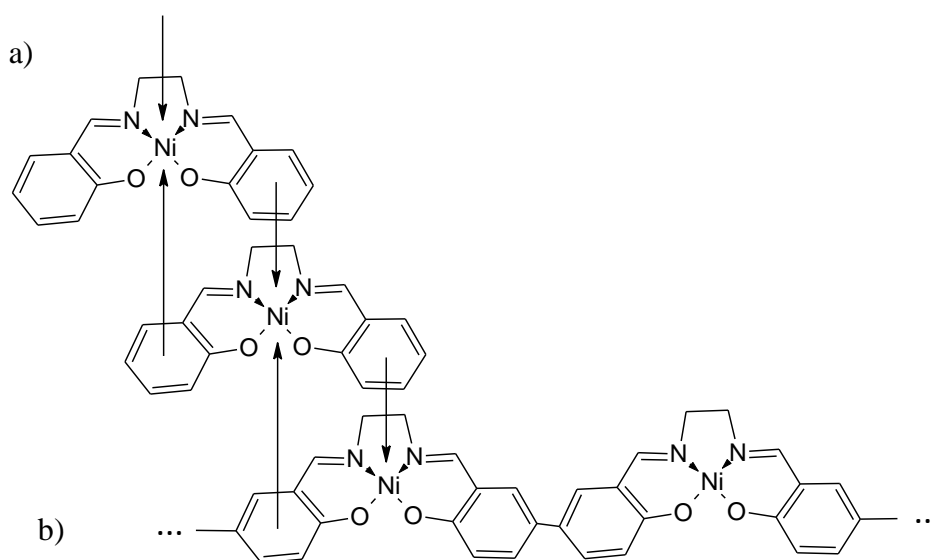
Figura 40. Imagem de SEM (esquerda) e mapeamento EDS (direita) do eletrodo $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

A imagem de SEM e o mapeamento EDS do sensor $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ na **Figura 40** indicam nanopartículas de TiO_2 bem distribuídas sobre a superfície do SPCE, em adição ao recobrimento homogêneo do filme de $\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$. A estrutura química do $\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ é mostrada no **Esquema 5**.

Esquema 5. Polimerização eletroquímica do $[\text{Ni}(\text{salen})]$: (a) polimerização via empilhamento e (b) polimerização em cadeia.

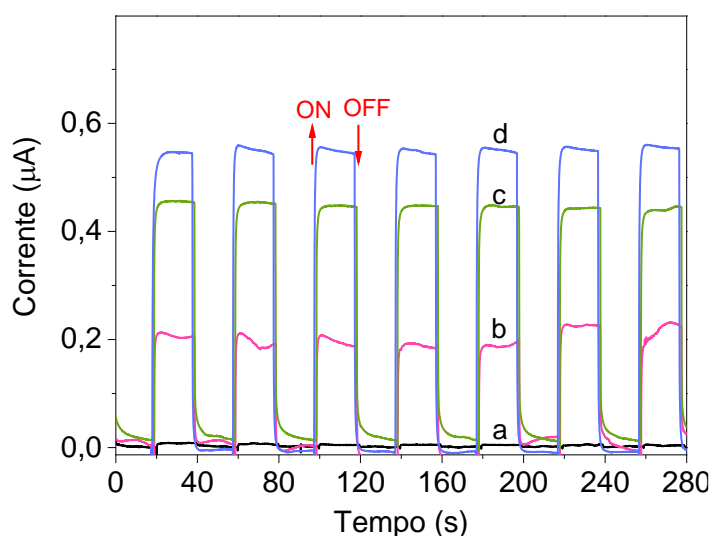


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

As respostas da PEC para os eletrodos $\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$, TiO_2 , $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ e $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ com 10,0 mM de lactato adicionado à solução de PBS (pH 7) sob iluminação UV-LED 365 nm a 0 V (vs. OCP) são mostradas na **Figura 41**. Uma baixa fotocorrente foi medida com o SPCE modificado apenas com o filme de $\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ (**curva a**). A resposta aumentou consideravelmente para os eletrodos com TiO_2 (**curva b**) e $\text{TiO}_2@\text{poli}[\text{Ni}(\text{salen})]$ (**curva c**), com a corrente atingindo rapidamente um valor estável quando o LED foi ligado, seguido por uma rápida diminuição quando o LED foi desligado. Este comportamento indica que os buracos e elétrons na superfície são separados sob irradiação de luz ultravioleta. A eletropolimerização do monômero $[\text{Ni}(\text{salen})]$ no eletrodo contendo TiO_2 causou um aumento de 2,4 vezes na fotocorrente em relação ao eletrodo contendo apenas TiO_2 . Isso é atribuído a uma transferência de elétrons mais rápida entre as espécies de TiO_2 e Ni na matriz polimérica e a uma maior intensidade de luz devido a reflexos múltiplos na estrutura do

compósito. Na presença de 10,0 mM de lactato, é observado um aumento de cerca de 23% na corrente para o eletrodo TiO₂@poli[Ni(salen)] (**curva d**).

Figura 41. Respostas de fotocorrente em solução de 0,1 M de PBS (pH 7) sob iluminação de ciclos ON/OFF para: (a) poli[Ni(salen)], (b) TiO₂, (c) TiO₂@poli[Ni(salen)] e (d) TiO₂@poli[Ni(salen)] com 10,0 mM de lactato adicionado ao PBS. O potencial de polarização foi de 0 V (vs. OCP).

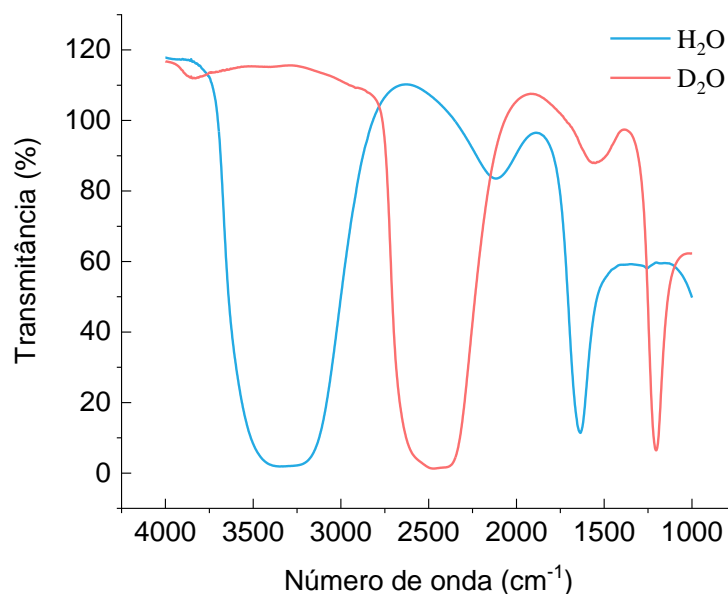


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

7.2 FTIR *in situ*

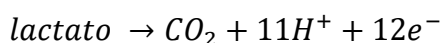
A oxidação fotoeletroquímica do lactato foi investigada por FTIR *in situ* em uma solução de PBS preparada com água (H₂O) ou água deuterada (D₂O), uma vez que a última não absorve fortemente a 1600 cm⁻¹, como mostrado na **Figura 42**.

Figura 42. Espectros ATR-FTIR de água (H₂O) e água deuterada (D₂O).



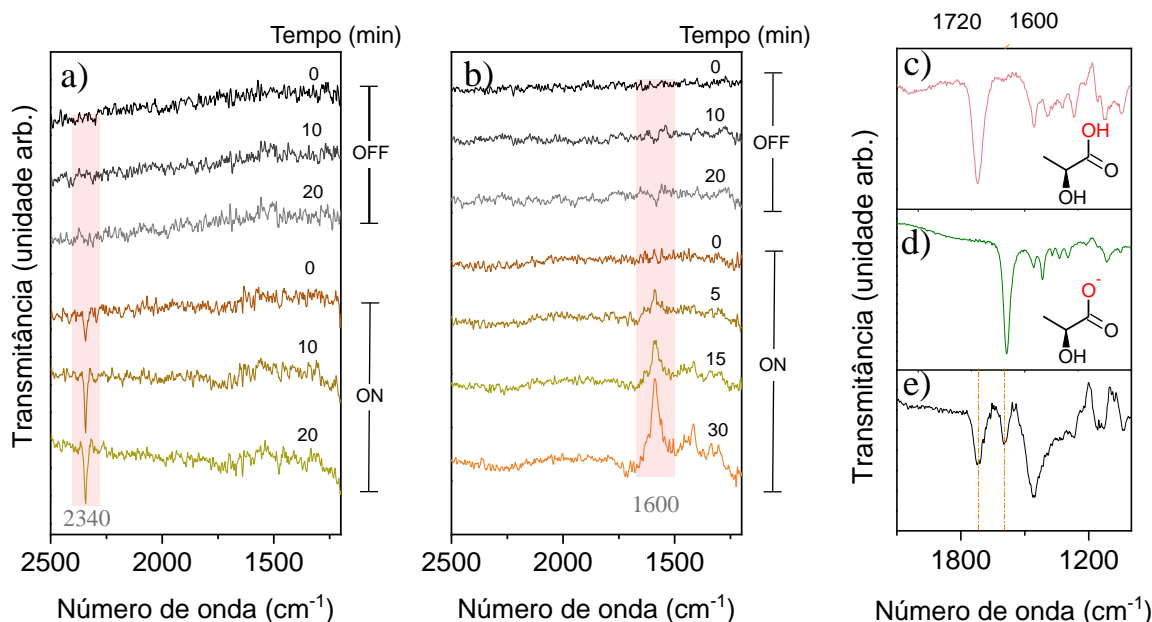
Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

Os espectros nas **Figuras 43a e 43b**, registrados no escuro por 20 min, não apresentam bandas, indicando que não há processos faradaicos na ausência de luz, consistentes com os valores de corrente até então observados. Quando os espectros são registrados sob iluminação, uma banda positiva em 2340 cm^{-1} atribuída ao dióxido de carbono (CO₂) aparece, como mostrado na **Figura 43a** (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Além disso, os espectros registrados em solução de PBS em D₂O sob iluminação exibem uma banda negativa em 1600 cm^{-1} , atribuída ao alongamento C=O dos carboxilatos. Para determinar quais espécies (ácido láctico e/ou lactato) oxida na presença de luz, foram obtidos os espectros ATR-FTIR de ácido láctico em diferentes meios (**Figura 43c-e**). Bandas típicas de grupos carboxílicos (1720 cm^{-1}) e carboxilato (1600 cm^{-1}) são vistas em meio ácido (**Figura 43c**) e básico (**Figura 43d**), respectivamente (BOTT-NETO *et al.*, 2019a; SIMÕES; BARANTON; COUTANCEAU, 2010). O experimento em solução de PBS mostra ambas as bandas devido à presença de espécies protonadas e desprotonadas (**Figura 43e**). A correspondência entre a banda do lactato e a banda negativa na **Figura 43b** indica que o ácido láctico sofre desprotonação, resultando em seu ânion correspondente (lactato), que é a espécie fotoeletroquimicamente oxidada a CO₂, conforme a seguinte reação:



Equação 4

Figura 43. Espectros de FTIR *in situ* no escuro (OFF) e sob iluminação (ON) durante a fotoeletrooxidação de 0,1 M de lactato sobre TiO_2 @poli[Ni(salen)] em solução de PBS preparada com (a) H_2O e (b) D_2O . Espectro ATR-FTIR do ácido láctico em soluções de (c) 0,1 M de H_2SO_4 , (d) 0,1 M de NaOH, e e) PBS.

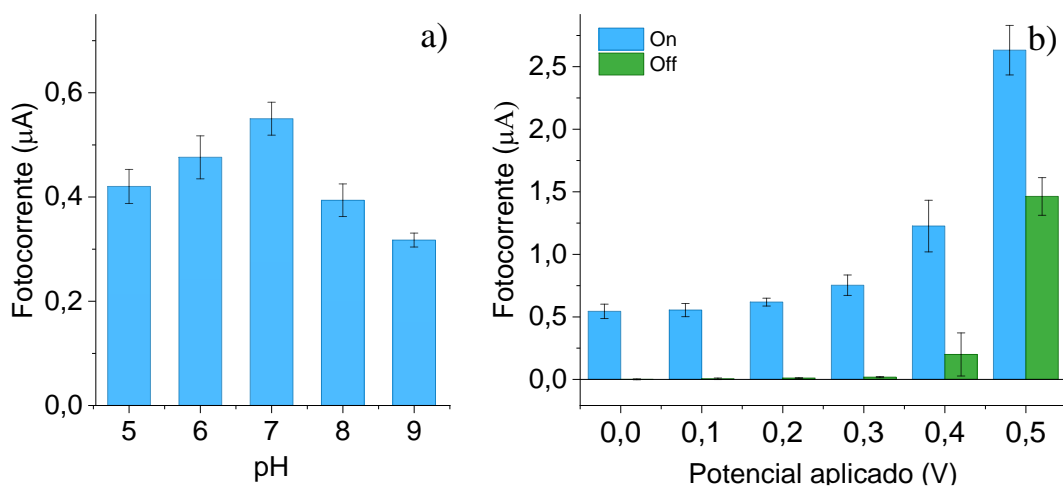


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

7.3 Efeito do pH e potencial aplicado

A resposta de fotocorrente de TiO_2 @poli[Ni(salen)] sob irradiação é estável ao longo dos ciclos ON e OFF para cada valor de pH investigado. A **Figura 44a** mostra que a fotocorrente aumenta de pH 5,0 para 7,0 e, em seguida, diminui à medida que o pH é aumentado para pH 9,0. Como mostrado por FTIR *in situ*, o lactato é a espécie eletroativa e, portanto, os valores de fotocorrente mais baixos em um meio mais ácido podem estar associados ao aumento da protonação do lactato. A resposta de fotocorrente para o lactato em solução de PBS a pH 7,0 aumenta quando o potencial aplicado muda de 0 para 0,5 V, como mostrado na **Figura 44b**. Este aumento pode estar associado ao aumento do potencial de polarização anódica que leva a mais elétrons fotogerados no contraeletrodo e suprime a recombinação de pares de elétron-buraco de forma mais eficiente (LIU *et al.*, 2015). Além disso, há um aumento considerável na corrente faradaica em 0,4 e 0,5 V (vs. OCP) devido à eletrooxidação do lactato. Os experimentos subsequentes foram realizados em pH 7,0 (corrente máxima) e com o eletrodo polarizado em 0 V (vs. OCP) para suprimir os sinais de interferências indesejadas.

Figura 44. (a) Respostas PEC do TiO₂@poli[Ni(salen)] sob iluminação a diferentes pH (0 V vs. OCP). (b) Correntes no escuro (OFF) e sob iluminação (ON) em diferentes potenciais de polarização (0 a 0,5 V vs. OCP). Todas as medidas foram realizadas em soluções de PBS contendo 10,0 mM de lactato.

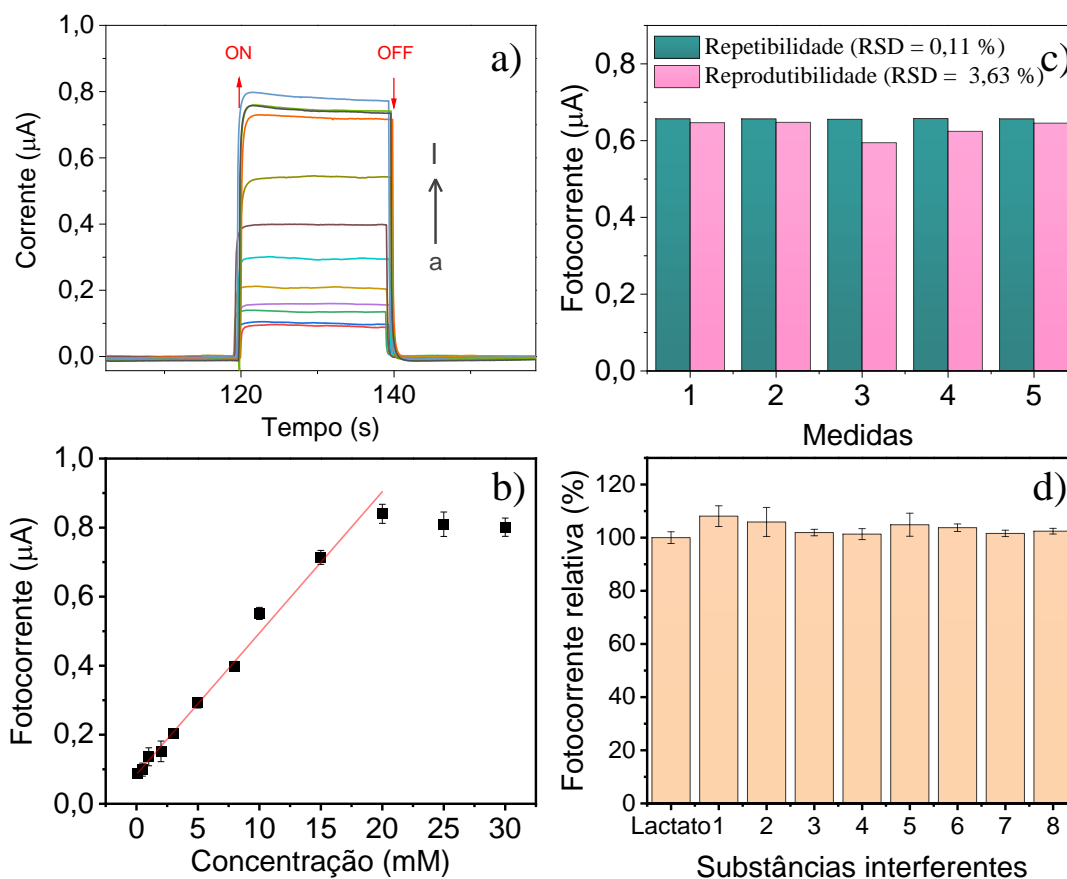


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021.(BOTT-NETO *et al.*, 2021)

7.4 Detecção PEC de lactato

As **Figuras 45a** e **45b** mostram que a resposta de fotocorrente aumenta com a concentração de lactato de 0,1 mM a 30,0 mM. O aumento é linear até 20,0 mM, descrito por Corrente (A) = $4,095 \times 10^{-8} \times C$ (mM) + $8,45 \times 10^{-8}$ ($r = 0,994$, $n = 3$). O LOD foi estimado em 88 µM usando $LOD = 3S_b/b$, na qual S_b é o desvio padrão do branco ($n = 10$) e b é a inclinação da curva analítica, conforme recomendado pela IUPAC (MOCÁK *et al.*, 1997). Estudos de reprodutibilidade e repetibilidade foram implementados registrando respostas PEC para 10,0 mM de lactato em solução a 0,1 M de PBS a pH 7,0, cujos resultados são ilustrados na **Figura 45c**. Para reprodutibilidade, cinco novos eletrodos (medições intra-eletrodo) foram usados, enquanto para repetibilidade, a fotocorrente de 5 ciclos contínuos de irradiação ON/OFF foi registrada. O sensor exibiu um excelente RSD de 3,63 e 0,11% para reprodutibilidade e repetibilidade, respectivamente. Como a seletividade é um grande problema no sensoriamento fotoeletroquímico, o sensor foi testado a 10,0 mM de lactato com várias possíveis interferências, que não afetaram o desempenho do sensoriamento, conforme demonstrado na **Figura 45d**.

Figura 45. (a) Resposta PEC para TiO_2 @poli[Ni(salen)] em 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 8,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 mM de lactato (a-1); b) curva analítica para TiO_2 @poli[Ni(salen)] em solução de PBS a pH 7,0 sob iluminação de ciclos ON/OFF; (c) estudo de repetibilidade e reprodutibilidade em 10,0 mM de lactato; (d) testes de interferentes: NaCl (1), KCl (2), ácido ascórbico (3), ácido úrico (4), glicose (5), vitamina D3 (6) vitamina B1 (7), vitamina B2 (8) em 10 mM de lactato. Todos os experimentos foram realizados em um potencial de polarização de 0 V (vs. OCP) sob 3 W de excitação de luz LED.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130390, 2021. (BOTT-NETO *et al.*, 2021)

7.5 Conclusões parciais

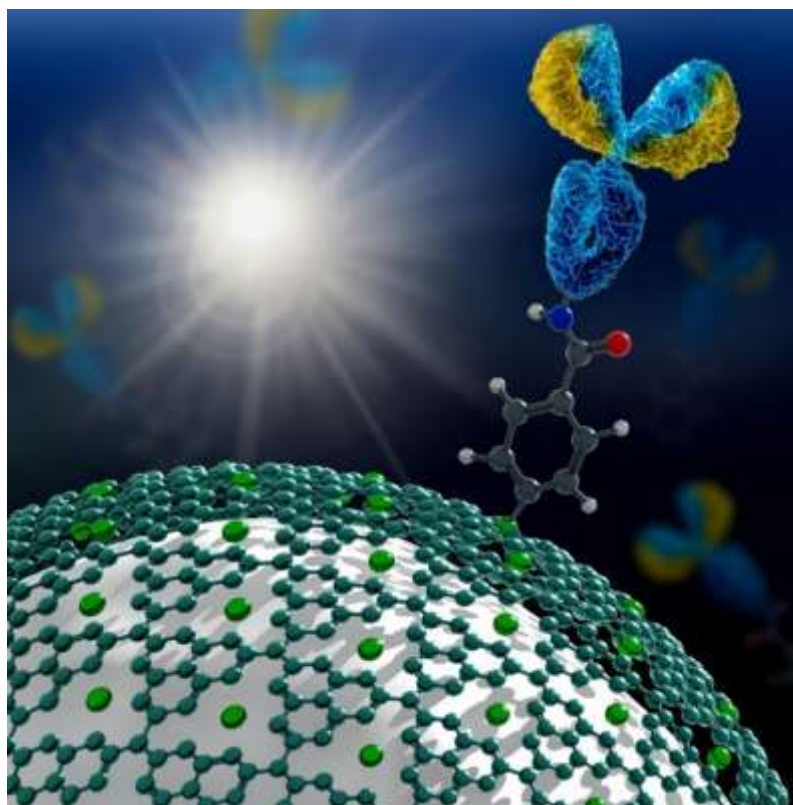
Foi desenvolvida uma plataforma miniaturizada para realizar experimentos fotoeletroquímicos em eletrodos impressos para um diagnóstico rápido. O dispositivo foi aplicado para a detecção de lactato em TiO_2 modificado com filme de poli[Ni(salen)] e apresentou excelente reprodutibilidade e estabilidade. A combinação de TiO_2 com filme polimérico fornece um sistema capaz de fotodetectar lactato usando um LED de baixa potência

(3 W). Também foi mostrado que a fotoeletrooxidação do lactato em poli[Ni(salen)] tem o CO₂ como seu principal produto. Isso difere significativamente do mecanismo comumente defendido para (bio)sensores eletroquímicos, na qual a conversão de lactato em piruvato é assumida. Além disso, acredita-se que uma maior miniaturização é possível, uma vez que os componentes usados na construção do dispositivo não são uma barreira. Espera-se que esta plataforma forneça oportunidades para o desenvolvimento de dispositivos fotoeletroquímicos para diagnósticos dentro do paradigma POC.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE V

Fotocatálise do TiO₂ sensibilizado com nitreto de carbono grafítico e aril diazônio eletrodepositado em eletrodos serigrafados para detecção do antígeno específico da próstata sob luz visível

Aqui, é relatado um dispositivo fotoeletroquímico para detectar, no local, o antígeno prostático específico (PSA) sob irradiação de luz LED visível. O dispositivo consiste em um sistema fotoeletroquímico miniaturizado impresso em 3D e um imunossensor PEC descartável feito com SPCEs. Os SPCEs foram revestidos com átomos únicos de níquel ancorados em nitreto de carbono grafítico (Ni-gC₃N₄), nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e sal de aril diazônio preparado a partir do ácido p-aminobenzóico. O aril diazônio eletrodepositado sobre Ni-gC₃N₄/TiO₂ diminuiu a recombinação de portadores de carga fotogerados, levando a um aumento de 3,1 vezes na fotocorrente em relação ao TiO₂ puro. Essa estratégia de funcionalização fornece grupos carboxílicos para ancorar anticorpos por meio da reação da carbodiimida, que pode ser estendida a qualquer outro tipo de imunossensor. Sob condições ideais, o imunossensor PEC foi capaz de detectar PSA de 10⁻¹⁶ a 10⁻⁸ g mL⁻¹ com um limite de detecção de 0,06 fg mL⁻¹.

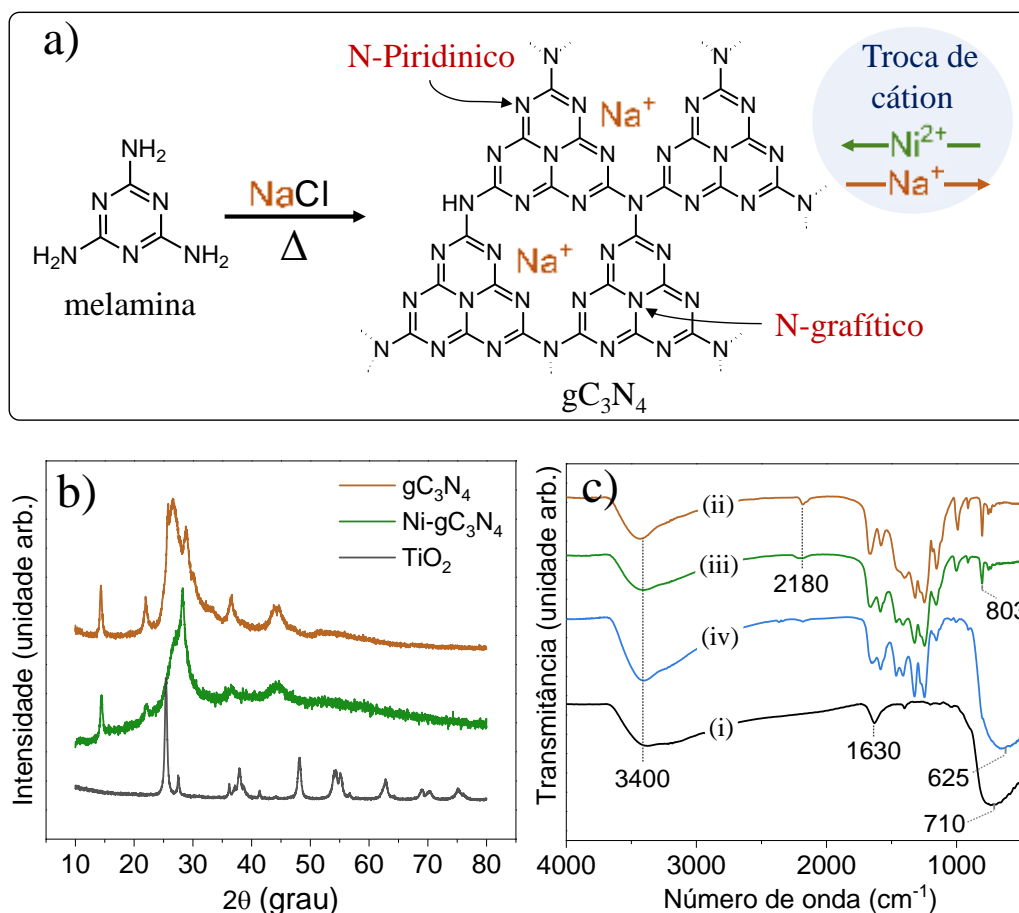


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

8.1 Estrutura e morfologia

O compósito Ni-gC₃N₄ foi preparado pela policondensação térmica da melamina na presença de NaCl, seguida da troca catiônica de sódio por níquel (**Figura 46a**). Uma análise com espectroscopia de absorção atômica indicou a presença de 10,7% (RSD = 0,69%) de Ni no gC₃N₄. Os padrões de XRD do gC₃N₄ e Ni-gC₃N₄ são mostrados na **Figura 46b**. O pico de difração em $\sim 2\theta = 14,2^\circ$ corresponde à periodicidade das unidades de heptazina (SAVATEEV *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017). O outro pico largo em $\sim 2\theta = 26,7^\circ$ é característico do plano de reflexão (002) do grafite em camadas. Após a incorporação de átomos únicos de Ni no gC₃N₄, os picos de difração em $2\theta = 26,6^\circ$ e $2\theta = 28,8^\circ$ são quase completamente suprimidos por um pico intenso em $2\theta = 28,2^\circ$, indicando mudanças significativas no espaçamento interplanar (SAVATEEV *et al.*, 2017). A ausência de padrões de difração característicos de materiais à base de níquel (como NiO e Ni(OH)₂) confirma a formação de uma única estrutura de átomo de Ni. O padrão de XDR do TiO₂ comercial na **Figura 46b** pode ser indexado principalmente à fase anatase, cujo tamanho médio de cristalito (calculado usando a equação de *Scherrer*) é de 20 nm ($2\theta = 25,4^\circ$). Sinais fracos devido à fase rutilo também foram observados.

Figura 46. (a) Ilustração esquemática da preparação do Ni-gC₃N₄ e as principais unidades e grupos funcionais que formam nitretos de carbono poliméricos à base de heptazina. (b) Padrões de XRD do TiO₂, gC₃N₄ e Ni-gC₃N₄. (c) espectros de FTIR de (i)TiO₂, (ii) gC₃N₄, (iii) Ni-gC₃N₄ e (iv) Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂.

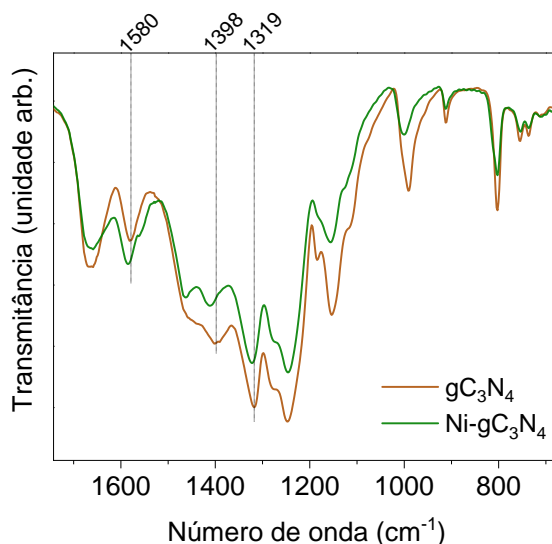


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

A **Figura 46c** mostra os espectros de FTIR do TiO₂, gC₃N₄, Ni-gC₃N₄ e Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂. O TiO₂ apresenta uma banda larga em torno de 710 cm⁻¹ atribuída ao alongamento Ti-O-Ti, enquanto as bandas em 3400 e 1360 cm⁻¹ são devidas a espécies de OH adsorvidas (LI *et al.*, 2018b). Para o gC₃N₄ várias bandas fortes são observadas entre 1650 e 1200 cm⁻¹, correspondendo ao estiramento heterocíclico típico de ν(C-NH-C) e ν(C=N) (TIAN *et al.*, 2017). A banda em 803 cm⁻¹ é característica do modo de respiração do anel da triazina (KRIVTSOV *et al.*, 2020). Após a incorporação do níquel, um pequeno deslocamento foi observado nas bandas de 1580, 1398 e 1319 cm⁻¹ a 1585, 1412 e 1323 cm⁻¹, respectivamente. Esses deslocamentos indicam que a coordenação do níquel ocorre nas unidades de heptazina (**Figura 47**). O

fotocatalisador Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ (curva iv) apresenta as principais características do Ni-gC₃N₄ e do TiO₂. Além disso, o deslocamento de 710 para 625 cm⁻¹ sugere a formação de uma heterojunção entre Ni-gC₃N₄ e TiO₂.

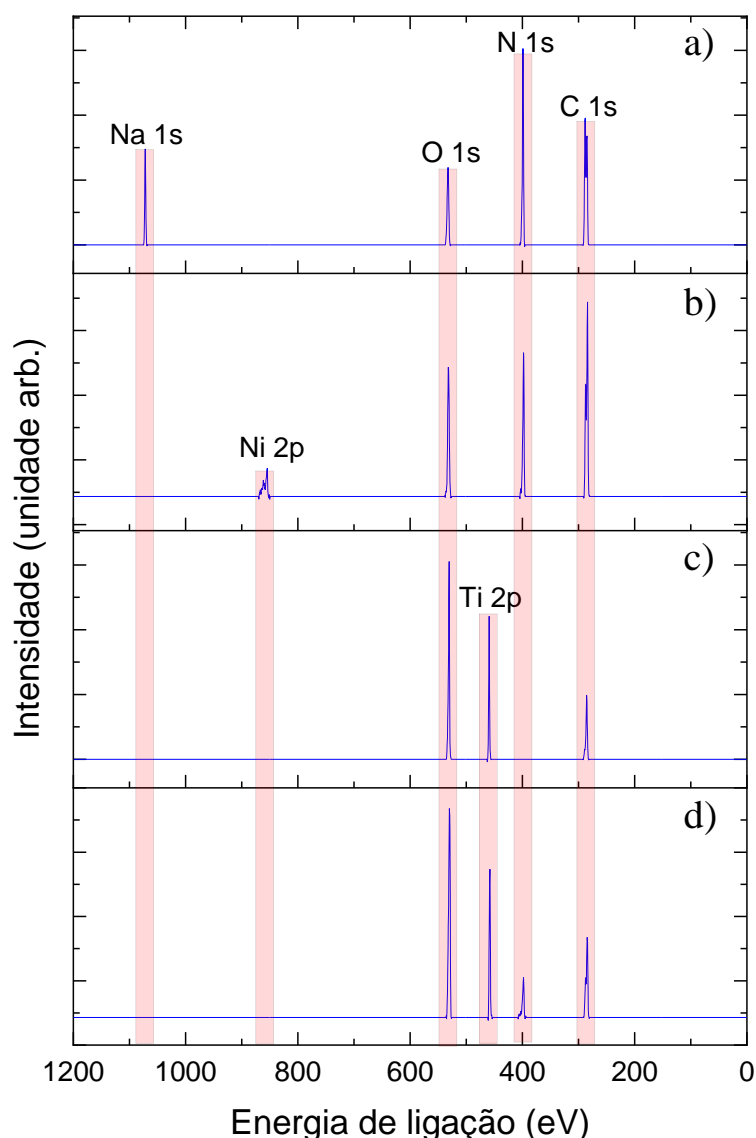
Figura 47. Espectro de FTIR do gC₃N₄ e Ni-gC₃N₄.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

A composição química e o estado de oxidação dos compósitos foram investigados por espectroscopia de fotoelétrons de raios X. Os espectros de XPS de varredura ampla na **Figura 48** confirmam a troca catiônica de sódio por níquel. Além disso, gC₃N₄, Ni-gC₃N₄ e Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ também exibem picos característicos de C 1s, N 1s, Ti 2p e O 1s. Os sinais de O 1s e C 1s em todas as amostras são devidos à contaminação carbonácea adventícia.

Figura 48. Espectros de XPS de varredura ampla do (a) gC_3N_4 , (b) $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$, (c) TiO_2 e (d) $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$.

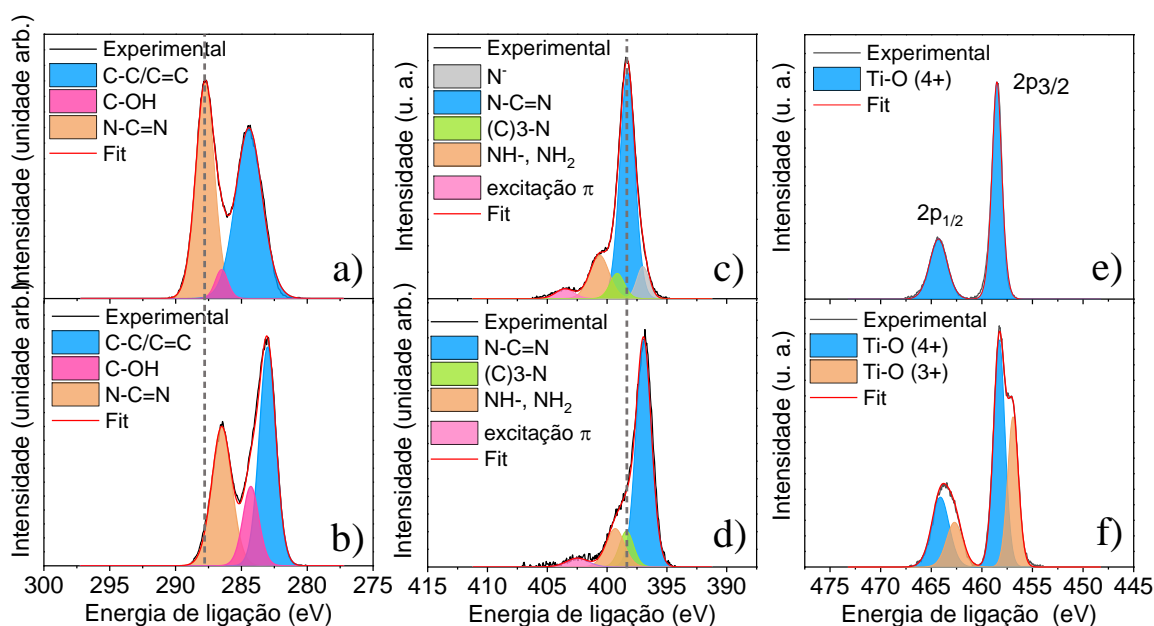


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

Para o gC_3N_4 na **Figura 49a**, o sinal C 1s consiste em três contribuições em 284,5, 286,6 e 287,7 eV que correspondem a grupos C-C/C=C, C-O (ambos de contaminação adventícia externa ou produtos de degradação parcial) e N-C=N no anel heterocíclico, respectivamente (CHEN *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2016). Como mostrado na **Figura 49b**, o espectro do C 1s do $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ exibiu um perfil semelhante ao do gC_3N_4 . No entanto, houve uma mudança na energia de ligação devido à interação entre as espécies de gC_3N_4 e Ni. As **Figuras 49c-d** mostram os espectros de gC_3N_4 e $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ na região de energia do N 1s. Ambos os espectros são

consistentes com uma estrutura baseada em heptazina com contribuições de ligações N-C=N (398,3 eV, N piridínico) e (C)3-N (399,2 eV, N grafitico) no anel heterocíclico. Contribuições também são observadas em 397, 400,6 e 403,5 eV atribuídas a átomos de nitrogênio desprotonados, ligações -NH/NH₂ (devido à condensação parcial ou polimerização incompleta), e excitação do elétron π nos grupos ciano, respectivamente (CHEN *et al.*, 2017; DAS *et al.*, 2022). Há também uma mudança na energia de ligação do Ni-gC₃N₄ em comparação com gC₃N₄. As **Figuras 49-f** exibem os espectros XPS do Ti 2p para TiO₂ e Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂. O TiO₂ exibe dois picos em 458,5 e 464,3 eV característicos de Ti⁴⁺, enquanto Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ exibe dois picos adicionais em 456,9 e 462,7 eV atribuídos a Ti³⁺, o que provavelmente é devido à redução de Ti⁴⁺ durante a formação da heterojunção. Isso pode ser benéfico do ponto de vista fotocatalítico, uma vez que quantidades específicas de Ti³⁺ podem suprimir a recombinação de portadores de carga (LU; ZHANG; WAN, 2015; REN; LI; YU, 2014).

Figura 49. Espectros de XPS de alta resolução desconvoluídos do (a-b) C 1s para (a) gC₃N₄ e (b) Ni-gC₃N₄, (c-d) N 1s para (c) gC₃N₄ e (d) Ni-gC₃N₄, Ti 2p para (e) TiO₂ e (f) Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂.

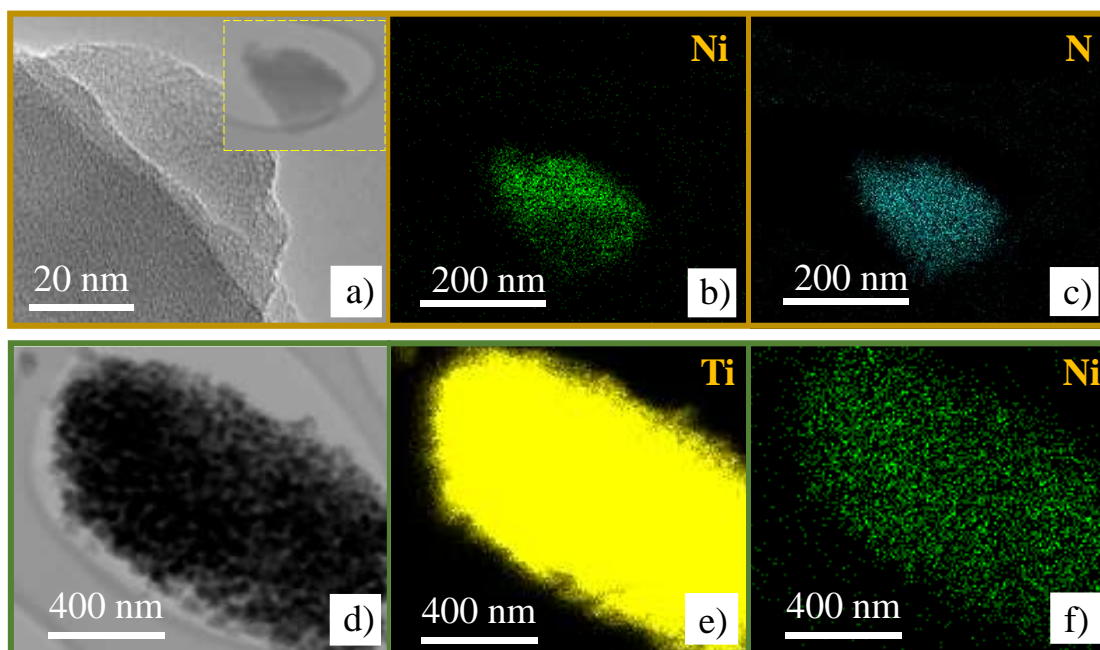


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

A morfologia do Ni-gC₃N₄ e Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ é avaliada com as imagens de TEM na **Figura 50**. O Ni-gC₃N₄ é formado por algumas camadas que se sobrepõem para gerar a parte mais escura da imagem na **Figura 50a**. O mapeamento elemental confirma a distribuição

uniforme do átomo de níquel (**Figura 50b-c**). As **Figuras 50d-f** mostram as imagens e o mapeamento elemental do compósito Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂, na qual o mapeamento para Ni e Ti é uma evidência clara de que Ni-gC₃N₄ está bem distribuído junto ao TiO₂.

Figura 50. Imagens de TEM do (a-c) Ni-gC₃N₄ e (d-f) Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂. Imagens de mapeamento do Ni-gC₃N₄ para (b) Ni ou (c) N e Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ para (e) Ti (d) ou Ni (f) também são mostradas.



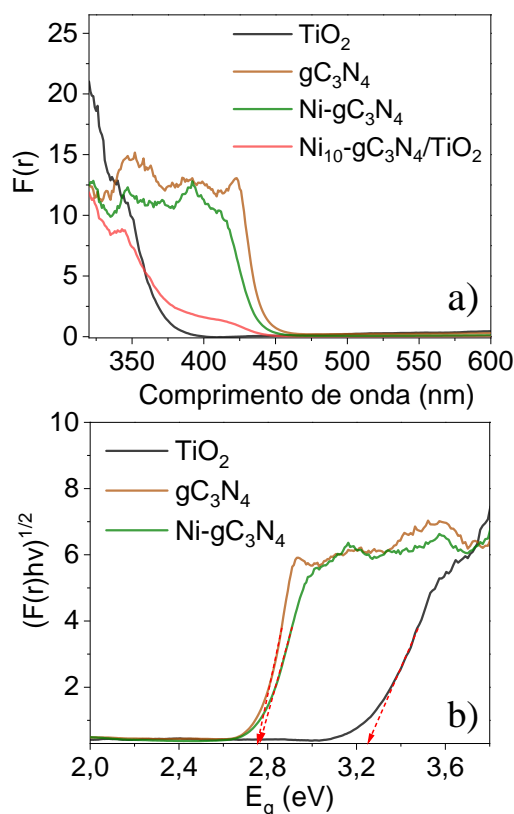
Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

8.2 Propriedades fotoeletroquímicas

A **Figura 51a** mostra o gráfico de Kubelka-Munk obtido a partir de espectros UV-vis no modo de refletância difusa. A borda de absorção do compósito Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ exibiu um desvio para o vermelho em comparação com o TiO₂ comercial, indicando que a heterojunção de Ni-gC₃N₄ e TiO₂ aumenta significativamente a absorção de luz visível. Além disso, a incorporação de níquel na estrutura do gC₃N₄ não altera muito a borda de absorção. O mesmo é observado ao comparar gC₃N₄/TiO₂ e Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ (não mostrado aqui). As energias de *band gap* para transição indireta foram calculadas a partir do gráfico de Tauc da função Kubelka-Munk usando $[F(r)hv]^{1/2} = k(hv - E_g)$, (MAKUŁA; PACIA; MACYK, 2018) na qual $F(r)$ é a função de Kubelka-Munk, h é a constante de Plank, k é uma constante relacionada ao

material, e $h\nu$ é a energia do fóton. Como mostrado na **Figura 51b**, os valores de *band gap* para TiO_2 , gC_3N_4 , e $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ foram estimados como 3.23, 2.75, e 2.76 eV, respectivamente.

Figura 51. (a) Gráfico de Kubelka-Munk ($F(r)$). (b) Gráfico de Tauc do $(F(r)h\nu)^{1/2}$ versus energia do fóton para diferentes amostras como indicado na figura.

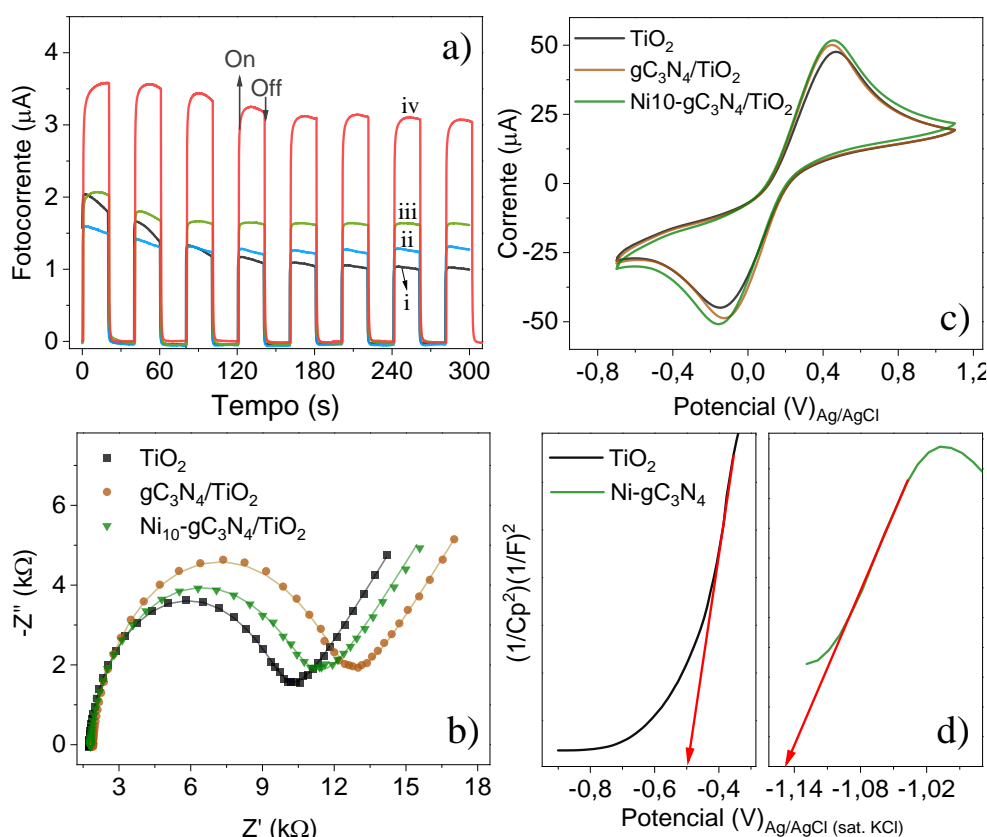


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

A resposta PEC dos materiais foi avaliada medindo-se as curvas de fotocorrente transiente em solução de PBS 0,1 M com 0,1 M de AA sob irradiação de luz LED visível (410 nm). As fotocorrentes na **Figura 52a** para os compósitos $\text{gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ e $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ são 1,3 e 1,6 vezes o valor do TiO_2 . O eletrodo $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ é 3,1 vezes mais fotoeletroativo, indicando que a funcionalização da superfície com aril diazônio pode gerar mais fotoelétrons e diminuir a recombinação de portadores de carga. Os gráficos de Nyquist na **Figura 52b** foram usados para determinar a resistência à transferência de carga (R_{ct}) ajustando os dados ao modelo de circuito de Randles. O R_{ct} é 7,85 k Ω , 10,12 k Ω e 7,83 k Ω para TiO_2 , $\text{gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ e $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$, respectivamente. O aumento da fotocorrente para Ni_{10} -

gC_3N_4/TiO_2 em comparação com gC_3N_4/TiO_2 também deve estar associado à diminuição de R_{ct} , embora os *band gaps* para gC_3N_4 (2,75 eV) e $Ni-gC_3N_4$ (2,76 eV) sejam muito próximos.

Figura 52. (a) Curvas transientes de fotocorrente para (i) TiO_2 , (ii) gC_3N_4/TiO_2 , (iii) $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ e (iv) $Amb/Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ recordadas em solução de PBS (pH 7,4) com 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP). (b) Espectros de EIS (linhas contínuas correspondem ao *fit* usando o circuito de Randles). (c) voltamogramas cíclicos a 50 mV s^{-1} para os eletrodos de TiO_2 , gC_3N_4/TiO_2 , $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ obtidos em 0,1 M de KCl com 5,0 mM de $[Fe(CN)_6]^{4-/-3-}$. (d) Gráfico de Mott-Schottky.

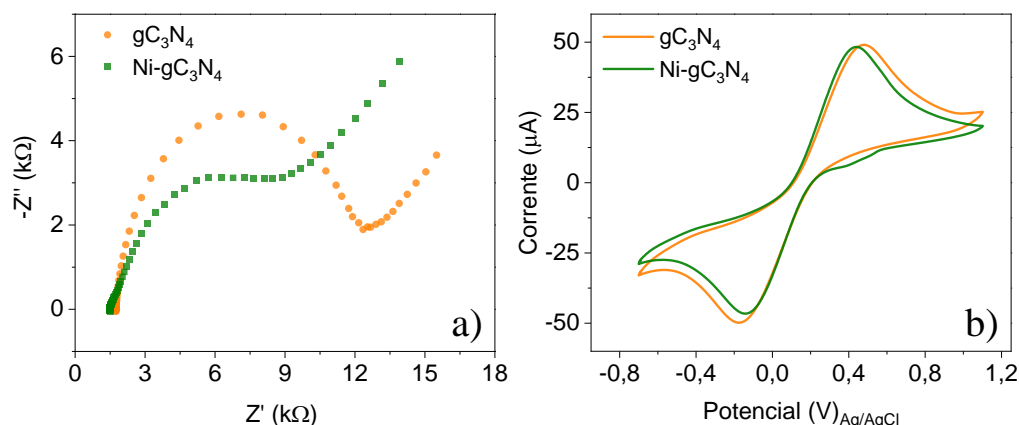


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

Além disso, a R_{ct} para gC_3N_4 e $Ni-gC_3N_4$ são 10,10 $k\Omega$ e 8,47 $k\Omega$, indicando também um aumento na condutividade de gC_3N_4 após a inserção de níquel (**Figura 53**). Os voltamogramas cíclicos registrados em 0,1 M de KCl contendo 5,0 mM de $[Fe(CN)_6]^{4-/-3-}$ na **Figura 52c** mostram correntes ligeiramente mais altas para $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ do que para os eletrodos TiO_2 ou gC_3N_4/TiO_2 , que sugere que o eletrodo $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ tem uma área de

superfície maior. Esta característica deve ser favorável para o desempenho do imunossensor PEC.

Figura 53. (a) Espectros de EIS e (b) voltamogramas cíclicos a 50 mV s^{-1} do gC_3N_4 e $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$. Ambas as medidas foram registradas em $0,1 \text{ M}$ de KCl contendo $5,0 \text{ mM}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/^{3-}$.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

8.3 Possível mecanismo

O potencial de banda plana (E_{FB}) do TiO_2 e $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ foi determinado a partir do gráfico de Mott-Schottky (GELDERMAN; LEE; DONNE, 2007), na qual foi observado uma inclinação positiva (linha vermelha na **Figure 52d**), típica de semicondutores do tipo n. O potencial da banda de condução (E_{CB}) é próximo ($0,1 - 0,2 \text{ V}$ mais negativo) a E_{FB} (LI *et al.*, 2015) para semicondutores do tipo n. Assumindo que E_{CB} é $0,2 \text{ V}$ mais negativa do que E_{FB} , o E_{CB} e E_{VB} podem ser calculados tomando como referência o eletrodo normal de hidrogênio (NHE) a $\text{pH } 7,0$ a partir das seguintes equações (ZHANG *et al.*, 2017):

$$E_{CB(\text{NHE}, \text{pH } 7)} = E_{FB(\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{pH } 6,9)} + E^0_{(\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl})} - 0,059(7 - 6,9) - 0,2$$

Equação 5

$$E_{VB} = E_{BC} + E_g$$

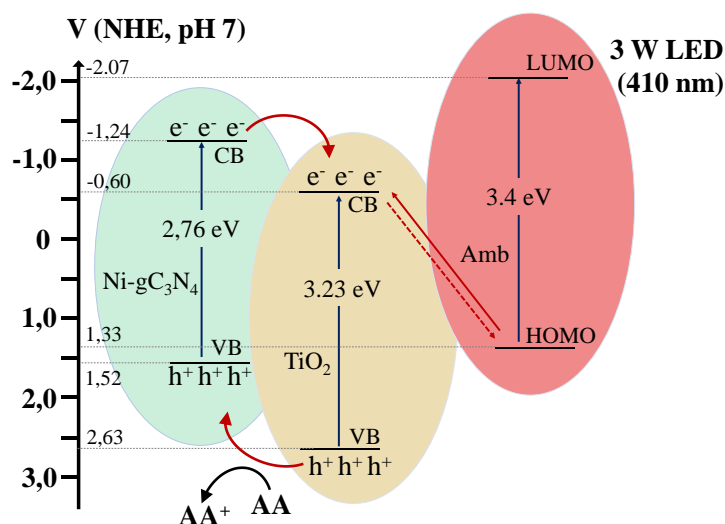
Equação 6

na qual $E^0_{(\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl})}$ é $0,199 \text{ V}$. Os valores de E_{FB} para $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ e TiO_2 a partir da intersecção com o eixo x são $-1,14$ e $-0,50 \text{ V}$ (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl}$). Assim, E_{CB} (e ' E_{VB} ') para $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ e TiO_2 são aproximadamente $-1,15$ (' $1,61 \text{ V}$ ') e $-0,51 \text{ V}$ (' $2,72 \text{ V}$ ') versus NHE a $\text{pH } 7$, respectivamente. Em adição, o orbital HOMO do ácido p-aminobenzóico não ligado

está 1,3 eV acima do topo da banda de valência do TiO₂, com um *gap* HOMO-LUMO de 3,4 eV (THOMAS *et al.*, 2014). Conforme indicado no **Esquema 6**, a posição da banda de condução do Ni-gC₃N₄ é mais negativa do que para TiO₂, permitindo assim a transferência de elétrons da banda de condução do Ni-gC₃N₄ para a banda de condução do TiO₂ sob irradiação de luz LED visível. Além disso, os elétrons são fotoexcitados diretamente do orbital HOMO do ácido p-aminobenzóico para a banda de condução do TiO₂, resultando em uma forte resposta de fotocorrente. O Amb pode ser regenerado por transferência de volta do elétron fotoexcitado ou mesmo pela reação com o ácido ascórbico doador de elétrons. Buracos foto gerados em TiO₂, Ni-gC₃N₄ podem ser aprisionados pelo ácido ascórbico, diminuindo a recombinação de pares buraco-elétron fotoinduzidos. De acordo com as análises acima, um possível mecanismo para as alterações da fotocorrente do imunossensor pode ser descrito pelas seguintes equações:



Esquema 6. Mecanismo de fotodeteccção de PSA sobre o fotocatalisador Amb/Ni₁₀-gC₃N₄/TiO₂ sob irradiação de luz LED visível.

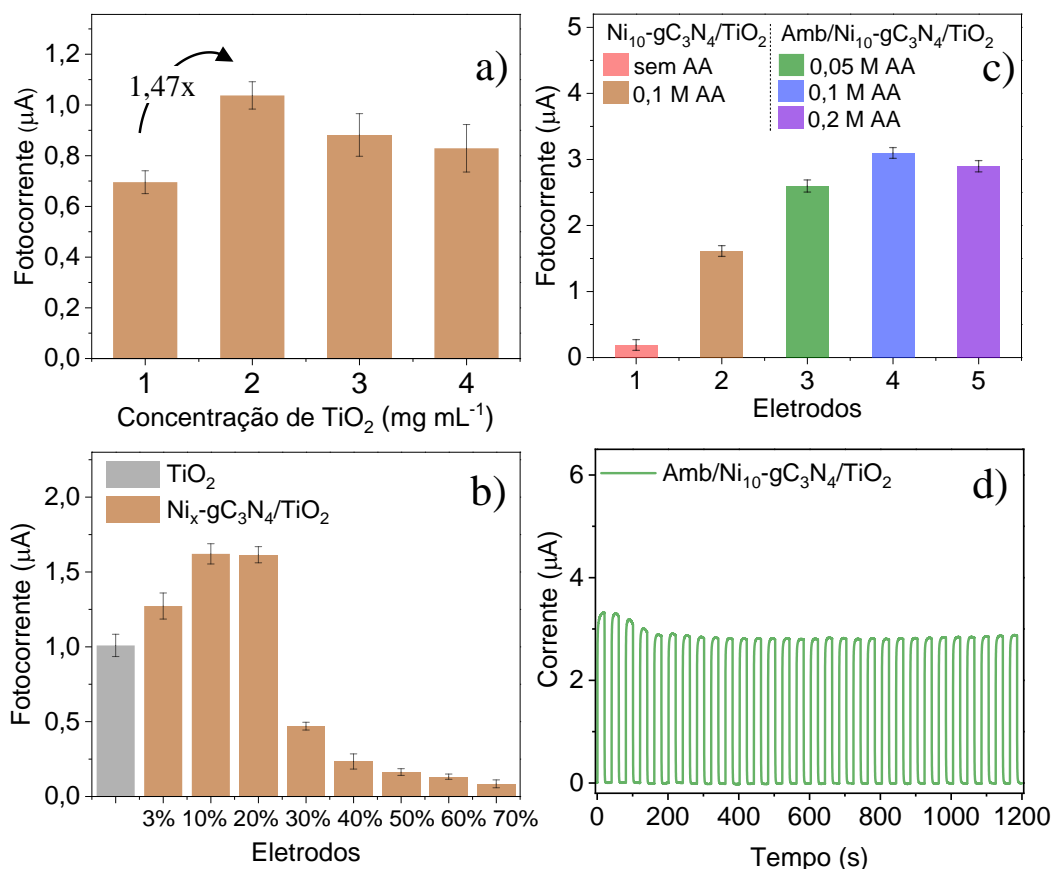


Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

8.4 Otimização da plataforma de detecção

A imobilização de (bio)moléculas (anticorpos, bloqueadores, etc.) é conhecida por afetar negativamente a resposta PEC. Portanto, vários parâmetros foram otimizados para melhorar a sensibilidade, incluindo a concentração de TiO_2 , a razão de massa de $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ e TiO_2 e a concentração de AA. A **Figura 54a** mostra os resultados dos SPCEs modificados apenas com NPs de TiO_2 registrados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de AA. A intensidade da fotocorrente aumentou 47% quando o eletrodo foi modificado com 6,0 μL de solução contendo 2,0 mg mL^{-1} de TiO_2 em comparação com uma solução contendo apenas 1,0 mg mL^{-1} . Em contraste, a fotocorrente diminuiu à medida que a concentração aumentou de 2,0 para 4,0 mg mL^{-1} .

Figura 54. Resposta PEC na presença de 0,1 M de AA para (a) TiO_2 (a diferentes concentrações) e (b) eletrodos com $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$. Resposta PEC do (c) $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$, (1) sem ou (2) com 0,1 M de AA, e $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ com (3) 0,05, (4) 0,1 ou (5) 0,2 M de AA. (d) Fotocorrente de $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ para 1200 s com 0,1 M de AA. Todos os experimentos foram registrados em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP).



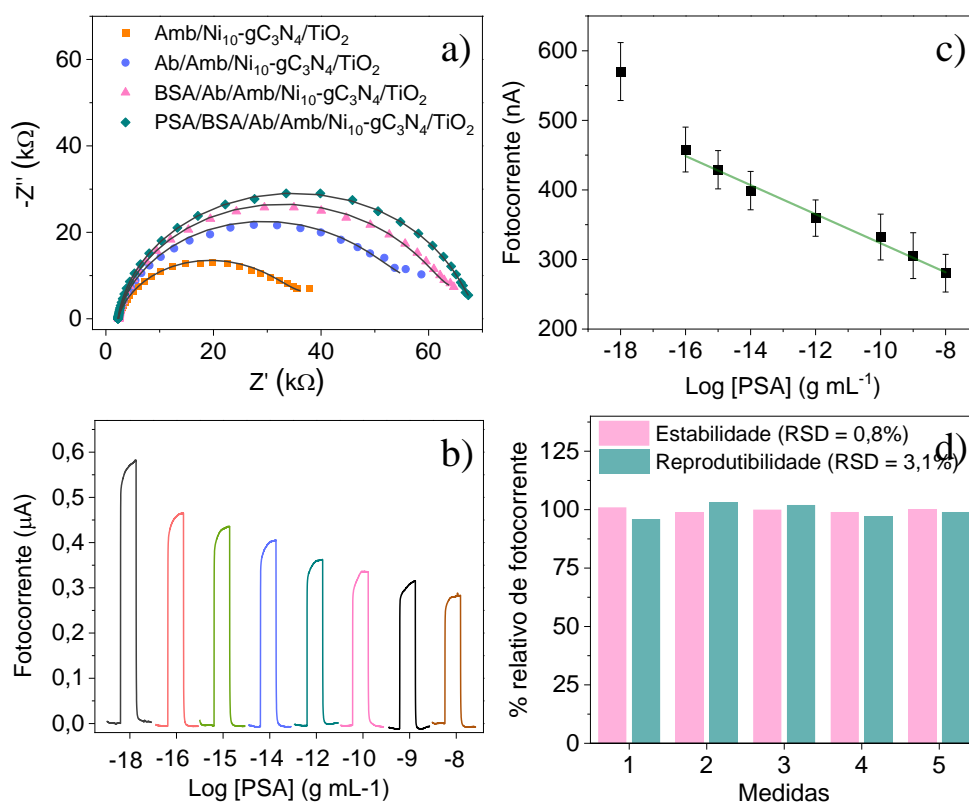
Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

A incorporação de $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ melhora significativamente a resposta PEC, conforme mostrado na **Figura 54b**. A fotocorrente em PBS contendo 0,1 M de AA aumentou com a concentração de $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ em TiO_2 de 3 a 10 \cong 20%, e então diminuiu abruptamente em concentrações mais altas. Portanto, $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ é mais adequado para fabricar o imunossensor PEC. A incorporação de AA causa um aumento de 8,5 vezes na fotocorrente para $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ na **Figura 54c** devido à diminuição na recombinação dos portadores de carga. Para $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$, as fotocorrentes atingem um máximo com 0,1 M de AA, que foi a concentração selecionada para os estudos subsequentes. As medidas de fotocorrente com ciclos de irradiação de 1200 s confirmam a estabilidade da plataforma de detecção (**Figura 54d**).

8.5 Análise do imunossensor PEC para PSA

A construção da plataforma imunossensora foi monitorada com medições de EIS em solução de PBS contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. A R_{ct} determinada a partir do gráfico de Nyquist na **Figure 55a** é 51,69 $k\Omega$ para o eletrodo $\text{Ab}/\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$, sendo consideravelmente maior do que para $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ (32,54 $k\Omega$). Portanto, a imobilização dos anticorpos foi bem sucedida. A R_{ct} também aumentou após o bloqueio da superfície com BSA (56,29 $k\Omega$) e após incubação com 10^{-9} g mL^{-1} de PSA (64,90 $k\Omega$). A **Figura 55b** mostra a resposta do imunossensor PEC sob condições ideais. O sinal da fotocorrente diminui com o aumento da concentração de PSA de 10^{-18} a 10^{-8} g mL^{-1} , provavelmente devido ao bloqueio parcial da difusão do doador de elétrons (AA neste caso). A fotocorrente varia linearmente com o log da concentração de PSA na **Figura 55c**, de acordo com a equação $I[\text{nA}] = 114,9 - 20,9 \log C_{\text{PSA}} [\text{g mL}^{-1}]$ ($r = 0,982$, $n = 5$), na qual C é a concentração de PSA e I é a fotocorrente. O limite de detecção (LOD) foi estimado em $0,06 \text{ fg mL}^{-1}$ ($S/N = 3$), o menor relatado na literatura até onde sabemos.

Figura 55. (a) Espectros de EIS registrados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ (as linhas contínuas correspondem ao ajuste usando o circuito de Randles). (b) Resposta PEC do imunossensor obtido em solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível (410 nm). (c) Curva analítica para concentrações crescentes de 10^{-18} a 10^{-8} g mL $^{-1}$; (n = 5). (d) Estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor PEC em 10^{-9} g mL $^{-1}$ de PSA.



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

Além disso, este imunossensor possui uma faixa linear mais ampla em comparação com outros semelhantes na literatura (ver **Tabela 6**). O dispositivo PEC combina a alta sensibilidade da detecção fotoeletroquímica com a portabilidade e operação amigável de um sistema impresso em 3D, o que o torna mais próximo de uma aplicação no local de atendimento do que os dispositivos existentes.

Tabela 6. Uma visão geral dos métodos para determinar o PSA.

| Método de detecção | Faixa linear (g mL ⁻¹) | LOD (g mL ⁻¹) | Ref. |
|--------------------|--|---------------------------|-------------------------------|
| DPV | $1,0 \times 10^{-11}$ - $1,2 \times 10^{-9}$ | $3,0 \times 10^{-12}$ | (ZHANG <i>et al.</i> , 2021a) |
| ECL | $1,0 \times 10^{-14}$ - $5,0 \times 10^{-7}$ | $4,6 \times 10^{-15}$ | (LIU <i>et al.</i> , 2021b) |
| PEC | $1,0 \times 10^{-14}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ | $1,3 \times 10^{-15}$ | (LIU <i>et al.</i> , 2021a) |
| Fluorescência | $1,0 \times 10^{-12}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ | $7,3 \times 10^{-13}$ | (ZHOU <i>et al.</i> , 2021) |
| PEC | $5,0 \times 10^{-12}$ - $5,0 \times 10^{-8}$ | $1,0 \times 10^{-12}$ | (SHI <i>et al.</i> , 2019) |
| SWV | $1,0 \times 10^{-11}$ - $5,0 \times 10^{-7}$ | $1,2 \times 10^{-12}$ | (ZHAO <i>et al.</i> , 2021a) |
| Fluorescência | $5,0 \times 10^{-14}$ - $5,0 \times 10^{-8}$ | $2,7 \times 10^{-14}$ | (YAO <i>et al.</i> , 2019) |
| PEC | $1,0 \times 10^{-12}$ - $5,0 \times 10^{-8}$ | $2,5 \times 10^{-13}$ | (ZHU <i>et al.</i> , 2021) |
| SERS | $1,0 \times 10^{-11}$ - $1,0 \times 10^{-9}$ | $1,0 \times 10^{-11}$ | (GAO <i>et al.</i> , 2019) |
| FET | $1,0 \times 10^{-15}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ | $1,0 \times 10^{-15}$ | (ZHANG <i>et al.</i> , 2021b) |
| PEC | $1,0 \times 10^{-12}$ - $2,0 \times 10^{-8}$ | $6,0 \times 10^{-13}$ | (CAO <i>et al.</i> , 2020) |
| ECL | $1,0 \times 10^{-10}$ - $2,0 \times 10^{-7}$ | $1,0 \times 10^{-10}$ | (WANG <i>et al.</i> , 2016) |
| PL | $1,0 \times 10^{-12}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ | $6,4 \times 10^{-13}$ | (YIN <i>et al.</i> , 2021b) |
| CL | $1,0 \times 10^{-10}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ | $5,0 \times 10^{-14}$ | (ZHAO <i>et al.</i> , 2021b) |
| PEC | $1,0 \times 10^{-16}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ | $6,0 \times 10^{-17}$ | Este trabalho |

Nota LOD limite de detecção

DPV voltametria de pulso diferencial

ECL eletroquimioluminescência

PEC fotoeletroquímica

SWV voltametria de onda quadrada

SERS espalhamento raman

FET transistor de efeito de campo

PL luminescência persistente

CL quimioluminescência

Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

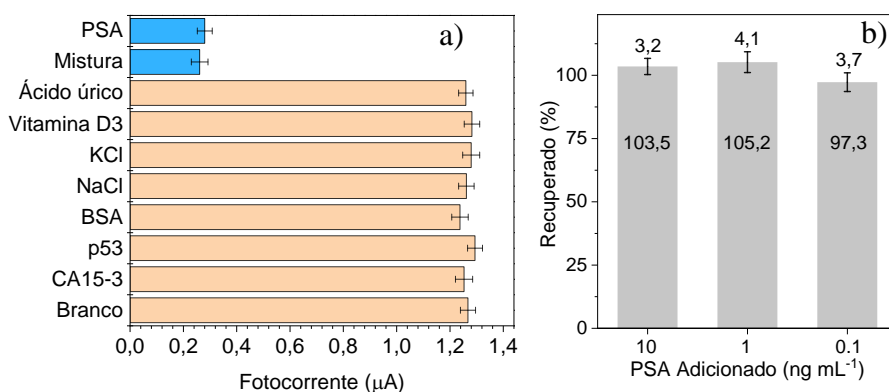
8.6 Reprodutibilidade e estabilidade

A reprodutibilidade e estabilidade do imunossensor PEC foram testadas com medições para detectar 10^{-9} g mL⁻¹ de PSA. A **Figura 55d** mostra os resultados em que a reprodutibilidade foi demonstrada obtendo um desvio padrão relativo (RSD) de 3,1% nas medidas de fotocorrente usando 5 eletrodos diferentes. Para os testes de estabilidade, as fotocorrentes registradas sob irradiação durante os ciclos ON/OFF de 20 s tiveram um desvio padrão de 0,8%.

8.7 Análise de amostra real e estudo de especificidade

Para estudar a especificidade do imunossensor PEC, $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ de proteínas (CA15-3, p54, BSA), $100,0 \text{ ng mL}^{-1}$ para os demais interferentes (KCl, NaCl, Vitamin D3, ácido úrico) e sua mistura foram selecionados como potenciais interferentes na determinação do PSA. A **Figura 56a** mostra que a resposta de fotocorrente desses interferentes é comparável ao valor encontrado para a amostra em branco. Além disso, a mistura apresentou valores de fotocorrente comparáveis ao PSA puro. O possível uso do imunossensor PEC na prática clínica foi avaliado pela dosagem da concentração de PSA em amostras diluídas de soro humano. O soro humano foi diluído em solução de PBS (1:100, v/v) e contaminado com concentrações conhecidas de PSA. As concentrações de PSA calculadas a partir da curva analítica e outros parâmetros estão resumidas na **Figura 56b**. A recuperação para o imunossensor PEC variou entre 97,3% e 105,2%, com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 4,1%. Esses resultados satisfatórios confirmam a potencial aplicação no diagnóstico clínico.

Figura 56. (a) Seletividade do imunossensor PEC: 10,0 ng mL⁻¹ PSA, 1,0 ng mL⁻¹ proteínas (CA15-3, p54, BSA) e 100,0 ng mL⁻¹ para os outros interferentes (KCl, NaCl, vitamina D3, ácido úrico). A mistura contém todos os elementos mencionados. (b) Valores de recuperação de PSA para os imunossensores PEC incubados com 10,0, 1,0 e 0,1 ng mL⁻¹ de PSA em amostras de soro humano diluídas. (n = 4). Todos os experimentos foram registrados em solução de PBS contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível



Fonte: Bott-Neto; Martins *et al.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 14, p. 22114-22121, 2022. (BOTT-NETO *et al.*, 2022)

8.8 Conclusões parciais

O desafio de fabricar imunossensores fotoeletroquímicos (PEC) passíveis de miniaturização e aplicação em diagnóstico no local de atendimento foi abordado aqui. Foram produzidos dispositivos PEC miniaturizados impressos em 3D com eletrodos serigrafados para detectar PSA sob irradiação de luz LED visível. A alta sensibilidade e seletividade do imunossensor foi atribuída à heterojunção entre Ni-gC₃N₄ e TiO₂. De especial relevância é que o TiO₂ foi funcionalizado com sal de aril diazônio eletrodepositado, que serviu tanto para aumentar a fotoatividade quanto para ancorar os anticorpos anti-PSA. A sinergia obtida ao combinar esses três materiais permitiu uma maior separação dos portadores de carga e uma diminuição da recombinação de carga, aumentando assim a estabilidade e a fotocorrente em relação ao TiO₂ puro. O imunossensor PEC foi capaz de detectar PSA em amostras de soro humano em uma ampla faixa de concentração, de 10⁻¹⁶ a 10⁻⁸ g mL⁻¹, com um limite de detecção de 0,06 fg mL⁻¹, o menor já relatado até o nosso conhecimento. É significativo que a plataforma PEC possa ser estendida a qualquer outro tipo de biossensor, pois outros elementos de bioreconhecimento podem ser imobilizados com a mesma estratégia. Além disso, a sensibilidade de tais dispositivos PEC pode ser aumentada pelo estudo de outras sondas.

9 CONCLUSÕES GERAIS

Dispositivos (foto)eletroquímicos miniaturizados, de operação simples e baratos foram desenvolvidos para o monitoramento acessível e no local de moléculas de interesse ambiental e clínico. No total foram fabricados cinco sensores eletroquímicos para os seguintes analitos: antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima; biomarcador CA15-3 (câncer de mama); metabolito 25(OH)D3 (vitamina D); biomarcador lactato; biomarcador PSA (câncer de próstata). A arquitetura de cada dispositivo foi pensada e otimizada considerando a molécula de interesse, aplicação e outras características. Em todos os casos, o emprego do método de impressão com tela foi eficaz na fabricação dos eletrodos de carbono (SPCE) sobre diferentes substratos, incluindo papel e plástico. O primeiro trabalho, descreve a construção de um sensor eletroquímico biodegradável, modificado com nanofitas de óxido de grafeno reduzidas (rGN), para a quantificação dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima em água de abastecimento. O dispositivo foi fabricado sobre substrato de papel manteiga. Aqui, também foram estudados diferentes protocolos eletroquímicos para a ativação da superfície do eletrodo de carbono. Os eletrodos submetidos a tratamento eletroquímico em meio neutro (tampão fosfato, pH 7) exibiram melhores desempenho comparado aos eletrodos submetidos a tratamentos em meio ácido (0,5 M de H₂SO₄) e básico (0,5 M de NaOH). A modificação da superfície do eletrodo com rGN aumentou a intensidade das correntes dos picos de oxidação de ambos os antibióticos. O sensor exibiu bons resultados e foi seletivo na detecção dos antibióticos em água de torneira. O uso de papel, nanomateriais de carbono, e protocolos de ativação ecologicamente amigáveis vem de encontro com a preocupação do descarte desse tipo de tecnologia no meio ambiente, pois sabe-se que um volume considerável desses dispositivos é descartado todos os anos. O segundo trabalho descreve o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico sanduíche para o biomarcador CA15-3. Anticorpos secundários marcados com HRP foram usados como amplificadores de sinal. O dispositivo exibiu um limite e faixa de detecção que permitiu a análise do CA15-3 em amostras de soro humano e saliva (uma matriz não invasiva). Este alto desempenho foi alcançado com um composto de Au-rGO formado *in situ* sobre o SPCE. A abordagem adotada permitiu um alto controle superficial com a formação de uma arquitetura robusta, de alta área de superfície para ligação de anticorpos e recursos que ajudaram a preservar a atividade das biomoléculas por mais de 30 dias. Posteriormente, um dispositivo imunossensor flexível e portátil com estruturas dendríticas de ouro hiperramificadas foi desenvolvido para monitorar, em tempo real e no local, o metabolito

25-hidroxivitamina D3. A eletrocristalização foi usada por ser uma abordagem econômica e escalável para o crescimento rápido e direto de dendritos de ouro no chip de detecção. O dispositivo sem rótulo foi capaz de detectar o metabólito em soro humano e saliva artificial em 15 minutos dentro de uma ampla faixa linear. O chip é vantajoso por ser flexível, com fabricação e operação simples. Esses recursos o tornam mais próximo da aplicação como dispositivo vestível.

Com relação aos sensores fotoeletroquímicos, um sistema impresso em 3D operando com LED de baixa potência e compatível com eletrodos impressos foi desenvolvido para mitigar a necessidade de miniaturização de dispositivos de detecção fotoeletroquímica. Até então, na literatura era reportados sensores fotoeletroquímicos que operavam com fontes de alta potência (incluindo simuladores solares) e células eletroquímicas convencionais de três eletrodos. O dispositivo desenvolvido é portátil e permite a rápida troca do LED, possibilitando que este seja escolhido de acordo com as propriedades do fotocatalisador empregado. Isto é extremamente vantajoso, visto que alguns comprimentos de onda (e.g. região UV) pode ser prejudicial para as biomoléculas, afetando negativamente o desempenho do imunossensor. Como prova de conceito, um sensor fotoeletroquímico com TiO_2 e filme polimérico $[\text{Ni}(\text{salen})]$ foi empregado na detecção de lactato dentro da faixa de interesse clínico. Bons resultados de seletividade e estabilidade foram obtidos. Por último, foi desenvolvido um imunossensor fotoeletroquímico capaz de detectar no soro humano e no local o biomarcador PSA. Um alto desempenho foi alcançado com uma plataforma contendo $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ funcionalizado com sal de aril diazônio preparado a partir do ácido p-aminobenzóico. O aril diazônio eletrodepositado foi usado pela primeira vez para melhorar a fotocatalise do TiO_2 e ancorar anticorpos. A plataforma desenvolvida é adequada para a imobilização de diversos elementos de biorreconhecimento e, portanto, pode ser estendida a outros biossensores fotoeletroquímicos para diagnóstico clínico.

Referências

- ADHIKARI, S.; KIM, D. H. Synthesis of $\text{Bi}_2\text{S}_3/\text{Bi}_2\text{WO}_6$ hierarchical microstructures for enhanced visible light driven photocatalytic degradation and photoelectrochemical sensing of ofloxacin. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 354, p. 692–705, 2018.
- AFSHARAN, H.; KHALILZADEH, B.; TAJALLI, H.; MOLLABASHI, M.; NAVAEIPOUR, F.; RASHIDI, M. R. A sandwich type immunosensor for ultrasensitive electrochemical quantification of p53 protein based on gold nanoparticles/graphene oxide. **Electrochimica Acta**, Kidlington, v. 188, p. 153–164, 2016.
- AKBARI NAKHJAVANI, S.; KHALILZADEH, B.; SAMADI PAKCHIN, P.; SABER, R.; GHAREMANI, M. H.; OMIDI, Y. A highly sensitive and reliable detection of CA15-3 in patient plasma with electrochemical biosensor labeled with magnetic beads. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 122, p. 8–15, 2018.
- AMBAYE, A. D.; KEFENI, K. K.; MISHRA, S. B.; NXUMALO, E. N.; NTSENDWANA, B. Recent developments in nanotechnology-based printing electrode systems for electrochemical sensors. **Talanta**, Amsterdam, v. 225, p. 121951, 2021.
- ANDRADE, L. S.; ROCHA FILHO, R. C.; CASS, Q. B.; FATIBELLO FILHO, O. Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 21, n. 13, p. 1475–1480, 2009.
- ANUSHA, T.; BHAVANI, K. S.; SHANMUKHA KUMAR, J. V.; BRAHMAN, P. K.; HASSAN, R. Y. A. Fabrication of electrochemical immunosensor based on GCN- β -CD/Au nanocomposite for the monitoring of vitamin D deficiency. **Bioelectrochemistry**, Kidlington, v. 143, p. 107935, 2022.
- ARÉVALO, B.; BEN HASSINE, A.; VALVERDE, A.; SERAFÍN, V.; MONTERO CALLE, A.; RAOUAFI, N.; CAMPS, J.; ARENAS, M.; BARDERAS, R.; YÁÑEZ SEDEÑO, P.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical immunoplatfrom to assist in the diagnosis and classification of breast cancer through the determination of matrix-metalloproteinase-9. **Talanta**, Amsterdam, v. 225, p. 122054, 2021.
- ARIHARA, K.; ARIGA, T.; TAKASHIMA, N.; ARIHARA, K.; OKAJIMA, T.; KITAMURA, F.; TOKUDA, K.; OHSAKA, T. Multiple voltammetric waves for reductive desorption of cysteine and 4-mercaptobenzoic acid monolayers self-assembled on gold substrates. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Milton, v. 5, n. 17, p. 3758, 2003.
- ATAIDE, V. N.; AMEKU, W. A.; BACIL, R. P.; ANGNES, L.; DE ARAUJO, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C. Enhanced performance of pencil-drawn paper-based electrodes by laser-scribing treatment. **RSC Advances**, Milton, v. 11, n. 3, p. 1644–1653, 2021.
- BADENHORST, H. Microstructure of natural graphite flakes revealed by oxidation: Limitations of XRD and Raman techniques for crystallinity estimates. **Carbon**, Kidlington, v. 66, p. 674–690, 2014.
- BAI, H.; LI, C.; SHI, G. Functional composite materials based on chemically converted graphene. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 23, n. 9, p. 1089–1115, 2011.
- BHENGO, T.; MOYO, M.; SHUMBA, M.; OKONKWO, O. J. Simultaneous oxidative determination of antibacterial drugs in aqueous solutions using an electrode modified with MWCNTs decorated with Fe_3O_4 nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, Milton, v. 42, n. 7, p. 5014–5023, 2018.

GOLD, V. (org.). **The IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019.

BOLLELLA, P.; FUSCO, G.; TORTOLINI, C.; SANZÒ, G.; FAVERO, G.; GORTON, L.; ANTIOCHIA, R. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 89, p. 1–15, 2017.

BOTT NETO, J. L.; GARCIA, A. C.; OLIVEIRA, V. L.; DE SOUZA, N. E.; TREMILIOSI-FILHO, G. Au/C catalysts prepared by a green method towards C3 alcohol electrooxidation: A cyclic voltammetry and in situ FTIR spectroscopy study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 735, p. 57–62, 2014.

BOTT NETO, J. L.; MARTINS, T. S.; BUSCAGLIA, L. A.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA, O. N. Photocatalysis of TiO₂ sensitized with graphitic carbon nitride and electrodeposited aryl diazonium on screen-printed electrodes to detect prostate specific antigen under visible light. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 14, n. 19, p. 22114–22121, 2022.

BOTT NETO, J. L.; MARTINS, T. S.; BUSCAGLIA, L. A.; SANTIAGO, P. V. B.; FERNÁNDEZ, P. S.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA JR., O. N. A portable system for photoelectrochemical detection of lactate on TiO₂ nanoparticles and [Ni(salen)] polymeric film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 345, p. 130390, 2021.

BOTT NETO, J. L.; MARTINS, T. S.; MACHADO, S. A. S.; TICIANELLI, E. A. Electrocatalytic oxidation of methanol, ethanol, and glycerol on Ni(OH)₂ nanoparticles encapsulated with poly[Ni(salen)] film. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 11, n. 34, p. 30810–30818, 2019.

BOUJDAY, S.; BANTEGNIE, A.; BRIAND, E.; MARNET, P. G.; SALMAIN, M.; PRADIER, C.M. In-depth investigation of protein adsorption on gold surfaces: correlating the structure and density to the efficiency of the sensing layer. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 112, n. 21, p. 6708–6715, 2008.

CAGNANI, G. R.; IBÁÑEZ-REDÍN, G.; TIRICH, B.; GONÇALVES, D.; BALOGH, D. T.; OLIVEIRA, O. N. Fully-printed electrochemical sensors made with flexible screen-printed electrodes modified by roll-to-roll slot-die coating. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 165, p. 112428, 2020.

CALAÇA, G. N.; PESSOA, C. A.; WOHRNATH, K.; NAGATA, N. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Bhopal, v. 6, n. 9, p. 438–442, 2006.

CAO, J. T.; DONG, Y. X.; MA, Y.; WANG, B.; MA, S. H.; LIU, Y. M. A ternary CdS@Au-g-C₃N₄ heterojunction-based photoelectrochemical immunosensor for prostate specific antigen detection using graphene oxide-CuS as tags for signal amplification. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1106, p. 183–190, 2020.

CARLUCCI, L.; FAVERO, G.; TORTOLINI, C.; DI FUSCO, M.; ROMAGNOLI, E.; MINISOLA, S.; MAZZEI, F. Several approaches for vitamin D determination by surface plasmon resonance and electrochemical affinity biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 40, n. 1, p. 350–355, 2013.

CARVAJAL, S.; FERA, S. N.; JONES, A. L.; BALDO, T. A.; MOSA, I. M.; RUSLING, J. F.; KRAUSE, C. E. Disposable inkjet-printed electrochemical platform for detection of clinically relevant HER-2 breast cancer biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 104, p. 158–162, 2018.

CHAŁUPNIAK, A.; MERKOÇI, A. Toward integrated detection and graphene-based removal of contaminants in a lab-on-a-chip platform. **Nano Research**, Beijing, v. 10, n. 7, p. 2296–2310, 2017.

CHAUHAN, D.; SOLANKI, P. R. Hydrophilic and insoluble electrospun cellulose acetate fiber-based biosensing platform for 25-hydroxy vitamin-D3 detection. **ACS Applied Polymer Materials**, Washington, v. 1, n. 7, p. 1613–1623, 2019.

CHEN, Y.; YIN, H.; LI, F.; ZHOU, J.; WANG, L.; WANG, J.; AI, S. Polydopamine-sensitized WS₂/black-TiO₂ heterojunction for histone acetyltransferase detection with enhanced visible-light-driven photoelectrochemical activity. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 393, p. 124707, 2020.

CHEN, Z.; SAVATEEV, A.; PRONKIN, S.; PAPAETHIMIOU, V.; WOLFF, C.; WILLINGER, M. G.; WILLINGER, E.; NEHER, D.; ANTONIETTI, M.; DONTSOVA, D. “The easier the better” preparation of efficient photocatalysts-metastable poly(heptazine imide) salts. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 29, n. 32, p. 1700555, 2017.

COSERI, S.; BILIUTA, G.; ZEMLJIČ, L. F.; SRNDOVIC, J. S.; LARSSON, P. T.; STRNAD, S.; KREŽE, T.; NADERI, A.; LINDSTRÖM, T. One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate. **RSC Advances**, Milton, v. 5, n. 104, p. 85889–85897, 2015.

COUGNON, C.; GOHIER, F.; BÉLANGER, D.; MAUZEROLL, J. In situ formation of diazonium salts from nitro precursors for scanning electrochemical microscopy patterning of surfaces. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 121, n. 22, p. 4066–4068, 2009.

CRETICH, M.; DAMIN, F.; PIRRI, G.; CHIARI, M. Protein and peptide arrays: recent trends and new directions. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 23, n. 2–3, p. 77–88, 2006.

DAS, D.; KUMAR DAS, B.; SARKAR, R.; MUKHERJEE, S.; KUMAR CHATTOPADHYAY, K. Copper and nickel decorated g-C₃N₄ as superior catalysts for reduction of toxic pollutants: a combined experimental and theoretical approach. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 580, p. 152137, 2022.

DE SÁ, A. I.; EUGÉNIO, S.; QUARESMA, S.; RANGEL, C. M.; VILAR, R. Electrodeposition of gold thin films from 1-butyl-1-methylpyrrolidinium dicyanamide Au³⁺ solutions. **Thin Solid Films**, Lausanne, v. 519, n. 19, p. 6278–6283, 2011.

DO, U. P.; SELAND, F.; JOHANNESSEN, E. A. The real area of nanoporous catalytic surfaces of gold and palladium in aqueous solutions. **Journal of The Electrochemical Society**, Pennington, v. 165, n. 5, p. H219–H228, 2018.

DONG, Z.; DING, D.; LI, T.; NING, C. Ni-doped TiO₂ nanotubes photoanode for enhanced photoelectrochemical water splitting. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 443, p. 321–328, 2018.

DUTRONC, P.; CARBONNE, B.; MENIL, F.; LUCAT, C. Influence of the nature of the screen-printed electrode metal on the transport and detection properties of thick-film semiconductor gas sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 6, n. 1–3, p. 279–284, 1992.

- EISSA, S.; ALSHEHRI, N.; RAHMAN, A. M. A.; DASOUKI, M.; ABU-SALAH, K. M.; ZOUROB, M. Electrochemical immunosensors for the detection of survival motor neuron (SMN) protein using different carbon nanomaterials-modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 101, p. 282–289, 2018.
- FANG, Y.; WANG, D.; LV, X.; XU, X.; ZHOU, H.; LIU, P.; CUI, B.; WANG, L. Simultaneous electrochemical determination of nitrophenol isomers Based on spirofluorene - based microporous polymer film modified electrodes through one-step electropolymerization strategy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 333, n. July, p. 129568, 2021.
- FENG, J.; LI, F.; LI, X.; WANG, Y.; FAN, D.; DU, B.; LI, Y.; WEI, Q. Label-free photoelectrochemical immunosensor for NT-proBNP detection based on La-CdS/3D ZnIn₂S₄/Au@ZnO sensitization structure. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 117, p. 773–780, 2018.
- FENG, J.; LI, Y.; LI, M.; LI, F.; HAN, J.; DONG, Y.; CHEN, Z.; WANG, P.; LIU, H.; WEI, Q. A novel sandwich-type electrochemical immunosensor for PSA detection based on PtCu bimetallic hybrid (2D/2D) rGO/g-C₃N₄. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 91, p. 441–448, 2017.
- FERNÁNDEZ, P. S.; FERNANDES GOMES, J.; ANGELUCCI, C. A.; TERESHCHUK, P.; MARTINS, C. A.; CAMARA, G. A.; MARTINS, M. E.; DA SILVA, J. L. F.; TREMILIOSI-FILHO, G. Establishing a link between well-ordered pt(100) surfaces and real systems: how do random superficial defects influence the electro-oxidation of glycerol? . **ACS Catalysis**, Washington, v. 5, n. 7, p. 4227–4236, 2015.
- FERNÁNDEZ-MERINO, M. J.; GUARDIA, L.; PAREDES, J. I.; VILLAR-RODIL, S.; SOLÍS-FERNÁNDEZ, P.; MARTÍNEZ-ALONSO, A.; TASCÓN, J. M. D. Vitamin C is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 114, n. 14, p. 6426–6432, 2010.
- FERRARI, A. C.; BASKO, D. M. Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. **Nature Nanotechnology**, Berlin, v. 8, n. 4, p. 235–246, 2013.
- FREITAS, M.; NOUWS, H. P. A.; DELERUE-MATOS, C. Electrochemical sensing platforms for her2-ecd breast cancer biomarker detection. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 31, n. 1, p. 121–128, 2019.
- FREITAS, M.; NOUWS, H. P. A.; KEATING, E.; DELERUE-MATOS, C. High-performance electrochemical immunomagnetic assay for breast cancer analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 308, p. 127667, 2020.
- GAO, D.; LIU, Y.; LIU, P.; SI, M.; XUE, D. Atomically thin b doped g-c₃n₄ nanosheets: high-temperature ferromagnetism and calculated half-metallicity. **Scientific Reports**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 35768, 2016.
- GAO, R.; LV, Z.; MAO, Y.; YU, L.; BI, X.; XU, S.; CUI, J.; WU, Y. SERS-based pump-free microfluidic chip for highly sensitive immunoassay of prostate-specific antigen biomarkers. **ACS Sensors**, Washington, v. 4, n. 4, p. 938–943, 2019.
- GAO, W.; JIN, R.; CHEN, J.; GUAN, X.; ZENG, H.; ZHANG, F.; GUAN, N. Titania-supported bimetallic catalysts for photocatalytic reduction of nitrate. **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 90, n. 3–4, p. 331–336, 2004.

- GARCÍA-MIRANDA FERRARI, A.; ROWLEY-NEALE, S. J.; BANKS, C. E. Screen-printed electrodes: transitioning the laboratory in-to-the field. **Talanta Open**, Amsterdam, v. 3, p. 100032, 2021.
- GE, F.; ZHANG, X. E.; ZHANG, Z. P.; XIAO-MEI, Z. Simultaneous determination of maltose and glucose using a screen-printed electrode system. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 13, n. 3–4, p. 333–339, 1998.
- GE, S.; JIAO, X.; CHEN, D. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for CA 15-3 using thionine-nanoporous gold-graphene as a platform and horseradish peroxidase-encapsulated liposomes as signal amplification. **The Analyst**, Milton, v. 137, n. 19, p. 4440, 2012.
- GELDERMAN, K.; LEE, L.; DONNE, S. W. Flat-band potential of a semiconductor: using the mott-schottky equation. **Journal of Chemical Education**, Washington, v. 84, n. 4, p. 685, 2007.
- GENORIO, B.; ZNIDARSIC, A. Functionalization of graphene nanoribbons. **Journal of Physics D: applied physics**, Bristol, v. 47, n. 9, p. 094012, 2014.
- GIACOMELLI, C.; ÁLVAREZ-DIDUK, R.; TESTOLIN, A.; MERKOÇI, A. Selective stamping of laser scribed rGO nanofilms: from sensing to multiple applications. **2D Materials**, Bristol, v. 7, n. 2, p. 024006, 2020.
- GOLINELLI, D. L. C.; MACHADO, S. A. S.; CESARINO, I. Synthesis of silver nanoparticle-graphene composites for electroanalysis applications using chemical and electrochemical methods. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 29, n. 4, p. 1014–1021, 2020.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M. I. I.; GÓMEZ-MONEDERO, B.; AGRISUELAS, J.; INIESTA, J.; VALERO, E. Highly activated screen-printed carbon electrodes by electrochemical treatment with hydrogen peroxide. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 91, n. February, p. 36–40, 2018.
- GRANT, C. D.; SCHWARTZBERG, A. M.; SMESTAD, G. P.; KOWALIK, J.; TOLBERT, L. M.; ZHANG, J. Z. Characterization of nanocrystalline and thin film TiO₂ solar cells with poly(3-undecyl-2,2'-bithiophene) as a sensitizer and hole conductor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 522, n. 1, p. 40–48, 2002.
- GUO, F.; CREIGHTON, M.; CHEN, Y.; HURT, R.; KÜLAOTS, I. Porous structures in stacked, crumpled and pillared graphene-based 3D materials. **Carbon**, Kidlington, v. 66, p. 476–484, 2014.
- HART, J. P.; HARTLEY, I. C. Voltammetric and amperometric studies of thiocholine at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine: studies towards a pesticide sensor. **The Analyst**, Milton, v. 119, n. 2, p. 259, 1994.
- HASAN, M. R.; AHOMMED, M. S.; DAIZY, M.; BACCHU, M. S.; ALI, M. R.; AL-MAMUN, M. R.; SAAD ALY, M. A.; KHAN, M. Z. H.; HOSSAIN, S. I. Recent development in electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronics: X**, Kidlington, v. 8, p. 100075, 2021.
- HASANZADEH, M.; TAGI, S.; SOLHI, E.; MOKHTARZADEH, A.; SHADJOU, N.; EFTEKHARI, A.; MAHBOOB, S. An innovative immunosensor for ultrasensitive detection of breast cancer specific carbohydrate (CA 15-3) in unprocessed human plasma and MCF-7 breast cancer cell lysates using gold nanoparticle electrochemically assembled onto thiolated graphene quantum dots. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 114, p. 1008–1017, 2018.

- HAU, N. Y.; YANG, P.; LIU, C.; WANG, J.; LEE, P. H.; FENG, S. P. Aminosilane-assisted electrodeposition of gold nanodendrites and their catalytic properties. **Scientific Reports**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 39839, 2017.
- HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 48, n. 2, p. 107–122, 2011.
- HU, Y.; CHEN, Y.; TANG, Q.; LIU, H. A sandwich-type ECL immunosensor for the sensitive determination of CEA content based on red emission carbon quantum dots as luminophores. **New Journal of Chemistry**, Milton, v. 45, n. 28, p. 12613–12621, 2021.
- JEONG, Y.; HONG, S.; JUNG, G.; SHIN, W.; PARK, J.; KIM, D.; CHOI, Y. S.; BAE, J. H.; HONG, B. H.; LEE, J. H. Highly stable Si MOSFET-type humidity sensor with ink-jet printed graphene quantum dots sensing layer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 343, p. 130134, 2021.
- JEYABHARATHI, C.; AHRENS, P.; HASSE, U.; SCHOLZ, F. Identification of low-index crystal planes of polycrystalline gold on the basis of electrochemical oxide layer formation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, New York, v. 20, n. 11, p. 3025–3031, 2016.
- JIA, H.; TIAN, Q.; XU, J.; LU, L.; MA, X.; YU, Y. Aerogels prepared from polymeric β -cyclodextrin and graphene aerogels as a novel host-guest system for immobilization of antibodies: a voltammetric immunosensor for the tumor marker CA 15–3. **Microchimica Acta**, Wien, v. 185, n. 11, p. 517, 2018.
- JIAN, J.M.; FU, L.; JI, J.; LIN, L.; GUO, X.; REN, T.L. Electrochemically reduced graphene oxide/gold nanoparticles composite modified screen-printed carbon electrode for effective electrocatalytic analysis of nitrite in foods. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 262, p. 125–136, 2018.
- KAUR, A.; KAPOOR, S.; BHARTI, A.; RANA, S.; CHAUDHARY, G. R.; PRABHAKAR, N. Gold-platinum bimetallic nanoparticles coated 3-(aminopropyl)triethoxysilane (APTES) based electrochemical immunosensor for vitamin D estimation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 873, p. 114400, 2020.
- KAUR, A.; RANA, S.; BHARTI, A.; CHAUDHARY, G. R.; PRABHAKAR, N. Voltammetric detection of vitamin D employing Au-MoS₂ hybrid as immunosensing platform. **Microchimica Acta**, Wien, v. 188, n. 7, p. 222, 2021.
- KIA, S.; BAHAR, S.; BOHLOOLI, S. A novel electrochemical sensor based on plastic antibodies for vitamin d3 detection in real samples. **IEEE Sensors Journal**, Piscataway, v. 19, n. 13, p. 4752–4757, 2019.
- KIM, S.; KANG, H. W.; LEE, K. H.; SUNG, H. J. Effect of hydrophobic microstructured surfaces on conductive ink printing. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, Bristol, v. 21, n. 9, p. 095026, 2011.
- KOSYNKIN, D. V.; HIGGINBOTHAM, A. L.; SINITSKII, A.; LOMEDA, J. R.; DIMIEV, A.; PRICE, B. K.; TOUR, J. M. Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. **Nature**, Berlin, v. 458, n. 7240, p. 872–876, 2009.
- KREMERS, P.; DUVIVIER, J.; HEUSGHEM, C. Pharmacokinetic studies of co-trimoxazole in man after single and repeated doses. **The Journal of Clinical Pharmacology**, Hoboken, v. 14, n. 2–3, p. 112–117, 1974.

KRIVTSOV, I.; MITORAJ, D.; ADLER, C.; ILKAEVA, M.; SARDO, M.; MAFRA, L.; NEUMANN, C.; TURCHANIN, A.; LI, C.; DIETZEK, B.; LEITER, R.; BISKUPEK, J.; KAISER, U.; IM, C.; KIRCHHOFF, B.; JACOB, T.; BERANEK, R. Water-soluble polymeric carbon nitride colloidal nanoparticles for highly selective quasi-homogeneous photocatalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 59, n. 1, p. 487–495, 2020.

KWON, S. S.; KIM, D.; YUN, M.; SON, J. G.; LEE, S. H. The role of graphene patterning in field-effect transistor sensors to detect the tau protein for Alzheimer's disease: simplifying the immobilization process and improving the performance of graphene-based immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 192, p. 113519, 2021.

LI, J.; CAO, Y.; HINMAN, S. S.; MCKEATING, K. S.; GUAN, Y.; HU, X.; CHENG, Q.; YANG, Z. Efficient label-free chemiluminescent immunosensor based on dual functional cupric oxide nanorods as peroxidase mimics. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 100, p. 304–311, 2018.

LI, J.; DU, L.; JIA, S.; SUI, G.; ZHANG, Y.; ZHUANG, Y.; LI, B.; XING, Z. Synthesis and photocatalytic properties of visible-light-responsive, three-dimensional, flower-like La-TiO₂/g-C₃N₄ heterojunction composites. **RSC Advances**, Milton, v. 8, n. 52, p. 29645–29653, 2018.

LI, J.; XIONG, P.; TANG, J.; LIU, L.; GAO, S.; ZENG, Z.; XIE, H.; TANG, D.; ZHUANG, J. Biocatalysis-induced formation of BiOBr/Bi₂S₃ semiconductor heterostructures: a highly efficient strategy for establishing sensitive photoelectrochemical sensing system for organophosphorus pesticide detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Lausanne, v. 331, n. December 2020, p. 129451, 2021.

LI, X.; YU, J.; LOW, J.; FANG, Y.; XIAO, J.; CHEN, X. Engineering heterogeneous semiconductors for solar water splitting. **Journal of Materials Chemistry A**, Milton, v. 3, n. 6, p. 2485–2534, 2015.

LI, Y. S.; LIAO, J. L.; WANG, S. Y.; CHIANG, W. H. Intercalation-assisted longitudinal unzipping of carbon nanotubes for green and scalable synthesis of graphene nanoribbons. **Scientific Reports**, Berlin, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.

LIANG, Y.-H.; CHANG, C.-C.; CHEN, C.-C.; CHU-SU, Y.; LIN, C.-W. Development of an Au/ZnO thin film surface plasmon resonance-based biosensor immunoassay for the detection of carbohydrate antigen 15-3 in human saliva. **Clinical Biochemistry**, Oxford, v. 45, n. 18, p. 1689–1693, 2012.

LIM, C. S.; CHUA, C. K.; PUMERA, M. Detection of biomarkers with graphene nanoplatelets and nanoribbons. **Analyst**, Milton, v. 139, n. 5, p. 1072–1080, 2014.

LIN, Y. M.; JIANG, Z. Y.; ZHU, C. Y.; HU, X. Y.; ZHANG, X. D.; FAN, J. Visible-light photocatalytic activity of Ni-doped TiO₂ from ab initio calculations. **Materials Chemistry and Physics**, Lausanne, v. 133, n. 2–3, p. 746–750, 2012.

LIU, X. P.; CHEN, J. S.; MAO, C. jie; NIU, H. L.; SONG, J. M.; JIN, B. K. Enhanced photoelectrochemical DNA sensor based on TiO₂/Au hybrid structure. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 116, n. February, p. 23–29, 2018.

LIU, X. P.; CHANG, N.; CHEN, J. S.; MAO, C. J.; JIN, B. K. Ultrasensitive photoelectrochemical immunosensor based on a g-C₃N₄/SnS₂ nanocomposite for prostate-specific antigen detection. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 168, p. 106337, 2021.

LIU, Y.; WANG, R.; ZHU, Y.; LI, R.; ZHANG, J. Photoelectrochemical sensing of catechol based on CdS-DNA-pristine graphene nanocomposite film. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Lausanne, v. 210, n. 2015, p. 355–361, 2015.

- LIU, Y.; WENG, X.; WANG, K. K.; XUE, Y.; WANG, A. J.; WU, L.; FENG, J. J. A novel enzyme-free sandwich-like electrochemical immunosensor for the detection of carbohydrate antigen 15-3 based on hierarchical AuPd nanochain networks. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 247, p. 349–356, 2017.
- LIU, Z.; WANG, J.; LU, Y.; CUI, C.; ZHENG, L.; HU, L. Ultrasensitive prostate specific antigen monitoring based on electrochemiluminescent immunesystem with synergistic signal amplification effect of resonance energy transfer coupling with $K_2S_2O_8$ - H_2O_2 dual coreactants. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 899, p. 115697, 2021.
- LU, D.; ZHANG, G.; WAN, Z. Visible-light-driven g- C_3N_4 /Ti³⁺-TiO₂ photocatalyst co-exposed {001} and {101} facets and its enhanced photocatalytic activities for organic pollutant degradation and Cr(VI) reduction. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 358, p. 223–230, 2015.
- LV, Z. Y.; MEI, L. P.; CHEN, W. Y.; FENG, J. J.; CHEN, J. Y.; WANG, A. J. Shaped-controlled electrosynthesis of gold nanodendrites for highly selective and sensitive SERS detection of formaldehyde. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 201, p. 92–99, 2014.
- MA, S.; ZHANG, Q.; ZHU, J.; SHI, H.; ZHANG, K.; SHEN, Y. Rational engineering of Ag-doped reduced graphene oxide as electrochemical sensor for trace mercury ions monitoring. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 345, p. 130383, 2021.
- MAKUŁA, P.; PACIA, M.; MACYK, W. How to correctly determine the band gap energy of modified semiconductor photocatalysts based on uv-vis spectra. **Journal of Physical Chemistry Letters**, Washington, v. 9, n. 23, p. 6814–6817, 2018.
- MAO, L.; XUE, X.; XU, X.; WEN, W.; CHEN, M. M.; ZHANG, X.; WANG, S. Heterostructured CuO-g- C_3N_4 nanocomposites as a highly efficient photocathode for photoelectrochemical aflatoxin B1 sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 329, p. 129146, 2021.
- MARTINS, T. S.; BOTT NETO, J. L.; MACHADO, S. A. S.; OLIVEIRA, O. N. Label-free electrochemical immunosensor made with tree-like gold dendrites for monitoring 25-hydroxyvitamin D3 metabolite. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 14, n. 27, p. 31455–31462, 2022.
- MARTINS, T. S.; BOTT NETO, J. L.; OLIVEIRA, O. N.; MACHADO, S. A. S. A sandwich-type electrochemical immunosensor based on Au-rGO composite for CA15-3 tumor marker detection. **Microchimica Acta**, Wien, v. 189, n. 1, p. 38, 2022.
- MARTINS, T. S.; BOTT NETO, J. L.; OLIVEIRA JR, O. N.; MACHADO, S. A. S. S.; OLIVEIRA, O. N.; MACHADO, S. A. S. S. Paper-based electrochemical sensors with reduced graphene nanoribbons for simultaneous detection of sulfamethoxazole and trimethoprim in water samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 882, p. 114985, 2021.
- MARTINS, T. S.; BOTT NETO, J. L.; RAYMUNDO PEREIRA, P. A.; TICIANELLI, E. A.; MACHADO, S. A. S. An electrochemical furosemide sensor based on pencil graphite surface modified with polymer film Ni-salen and Ni(OH)₂/C nanoparticles. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Lausanne, v. 276, n. May, p. 378–387, 2018.
- MATERÓN, E. M.; WONG, A.; FREITAS, T. A.; FARIA, R. C.; OLIVEIRA, O. N. A sensitive electrochemical detection of metronidazole in synthetic serum and urine samples using low-cost screen-printed electrodes modified with reduced graphene oxide and C60. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 646–652, 2021.

MINATO, Y.; DAWADI, S.; KORDUS, S. L.; SIVANANDAM, A.; ALDRICH, C. C.; BAUGHN, A. D. Mutual potentiation drives synergy between trimethoprim and sulfamethoxazole. **Nature Communications**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2021.

MOCÁK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G.; BOND, A. M. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 69, n. 2, p. 297–328, 1997.

MOHAMED, A. A.; SALMI, Z.; DAHOUMANE, S. A.; MEKKI, A.; CARBONNIER, B.; CHEHIMI, M. M. Functionalization of nanomaterials with aryldiazonium salts. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 225, p. 16–36, 2015.

MOHAMED, N. M.; BASHIRI, R.; CHONG, F. K.; SUFIAN, S.; KAKOOEI, S. Photoelectrochemical behavior of bimetallic Cu–Ni and monometallic Cu, Ni doped TiO₂ for hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 40, n. 40, p. 14031–14038, 2015.

MORRIS, A.; LUNDGREN, J. D.; MASUR, H.; WALZER, P. D.; HANSON, D. L.; FREDERICK, T.; HUANG, L.; BEARD, C. B.; KAPLAN, J. E. Current epidemiology of pneumocystis pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 10, p. 1713–1720, 2004.

NUNES, M.; MOURA, C.; HILLMAN, A. R.; FREIRE, C. Multicolour electrochromic film based on a TiO₂@poly[Ni(salen)] nanocomposite with excellent electrochemical stability. **Langmuir**, Washington, v. 33, n. 27, p. 6826–6837, 2017.

PARK, J.; KIM, M.; KIM, W.; JO, S.; KIM, W.; KIM, C.; PARK, H.; LEE, W.; PARK, J. Ultrasensitive detection of 25-hydroxy vitamin D₃ in real saliva using sandwich-type electrochemical aptasensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 355, p. 131239, 2022.

PUMERA, M.; AMBROSI, A.; BONANNI, A.; CHNG, E. L. K.; POH, H. L. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 954–965, 2010.

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

RAMASUBBU, V.; KUMAR, P. R.; MOTHI, E. M.; KARUPPASAMY, K.; KIM, H. S.; MAIYALAGAN, T.; SHAJAN, X. S. Highly interconnected porous TiO₂-Ni-MOF composite aerogel photoanodes for high power conversion efficiency in quasi-solid dye-sensitized solar cells. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 496, p. 143646, 2019.

RANA, S.; KAUR, A.; BHARTI, A.; SINGH, S.; BHATNAGAR, A.; PRABHAKAR, N. Electrochemical detection of hepcidin based on spiegelmer and MoS₂NF-GNR@AuNPs as sensing platform. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1181, p. 338863, 2021.

RASHID, J. I. A.; KANNAN, V.; AHMAD, M. H.; MON, A. A.; TAUFIK, S.; MISKON, A.; ONG, K. K.; YUSOF, N. A. An electrochemical sensor based on gold nanoparticles-functionalized reduced graphene oxide screen printed electrode for the detection of pyocyanin biomarker in Pseudomonas aeruginosa infection. **Materials Science and Engineering: C**, Amsterdam, v. 120, p. 111625, 2021.

- RAYMUNDO PEREIRA, P. A.; DE OLIVEIRA PEDRO, R.; CARR, O.; MELENDEZ, M. E.; GOBBI, A. L.; HELENA DE OLIVEIRA PIAZZETTA, M.; CARVALHO, A. L.; REIS, R. M.; MIRANDA, P. B.; OLIVEIRA, O. N. Influence of the molecular orientation and ionization of self-assembled monolayers in biosensors: application to genosensors of prostate cancer antigen 3. **The Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 125, n. 1, p. 498–506, 2020.
- REN, Y.; LI, J.; YU, J. Enhanced electrochemical performance of TiO₂ by Ti³⁺ doping using a facile solvothermal method as anode materials for lithium-ion batteries. **Electrochimica Acta**, Kidlington, v. 138, p. 41–47, 2014.
- RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, Kidlington, v. 84, p. 74–83, 2012.
- ROCHA, D. P.; ATAIDE, V. N.; DE SIERVO, A.; GONÇALVES, J. M.; MUÑOZ, R. A. A.; PAIXÃO, T. R. L. C.; ANGNES, L. Reagentless and sub-minute laser-scribing treatment to produce enhanced disposable electrochemical sensors via additive manufacture. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 425, p. 130594, 2021.
- ROCHA, D. S.; DUARTE, L. C.; SILVA-NETO, H. A.; CHAGAS, C. L. S.; SANTANA, M. H. P.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; COLTRO, W. K. T. Sandpaper-based electrochemical devices assembled on a reusable 3D-printed holder to detect date rape drug in beverages. **Talanta**, Amsterdam, v. 232, p. 122408, 2021.
- ROMANHOLO, P. V. V.; RAZZINO, C. A.; RAYMUNDO PEREIRA, P. A.; PRADO, T. M.; MACHADO, S. A. S.; SGOBBI, L. F. Biomimetic electrochemical sensors: new horizons and challenges in biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 185, p. 113242, 2021.
- RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL, V.; SEMPIONATTO, J. R.; VARGAS, E.; BAILEY, E.; MAY, J.; BULBARELLO, A.; DÜSTERLOH, A.; MATUSHESKI, N.; WANG, J. Decentralized vitamin C & D dual biosensor chip: Toward personalized immune system support. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 194, p. 113590, 2021.
- SANGILI, A.; KALYANI, T.; CHEN, S. M.; NANDA, A.; JANA, S. K. Label-free electrochemical immunosensor based on one-step electrochemical deposition of aAuNP-rGO nanocomposites for detection of endometriosis marker ca 125. **ACS Applied Bio Materials**, Washington, v. 3, n. 11, p. 7620–7630, 2020.
- SANTOS ANDRADE, L.; CARDOZO ROCHA FILHO, R.; BEZERRA CASS, Q.; FATIBELLO FILHO, O. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, Milton, v. 2, n. 4, p. 402–407, 2010.
- SAVATEEV, A.; PRONKIN, S.; WILLINGER, M. G.; ANTONIETTI, M.; DONTSOVA, D. Towards organic zeolites and inclusion catalysts: heptazine imide salts can exchange metal cations in the solid state. **Chemistry - An Asian Journal**, Weinheim, v. 12, n. 13, p. 1517–1522, 2017.
- SHEKARI, Z.; ZARE, H. R.; FALAHATI, A. Dual assaying of breast cancer biomarkers by using a sandwich-type electrochemical aptasensor based on a gold nanoparticles–3D graphene hydrogel nanocomposite and redox probes labeled aptamers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 332, p. 129515, 2021.

- SHEN, J.; HU, Y.; SHI, M.; LU, X.; QIN, C.; LI, C.; YE, M. Fast and facile preparation of graphene oxide and reduced graphene oxide nanoplatelets. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 21, n. 15, p. 3514–3520, 2009.
- SHI, H.; GE, S.; WANG, Y.; GAO, C.; YU, J. Wide-spectrum-responsive paper-supported photoelectrochemical sensing platform based on black phosphorus-sensitized TiO_2 . **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 11, n. 44, p. 41062–41068, 2019.
- SI, Y.; SAMULSKI, E. T. Exfoliated graphene separated by platinum nanoparticles. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 20, n. 21, p. 6792–6797, 2008.
- SIBER, G. R.; GORHAM, C. C.; ERICSON, J. F.; SMITH, A. L. Pharmacokinetics of intravenous trimethoprim-sulfamethoxazole in children and adults with normal and impaired renal function. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 4, n. 2, p. 566–578, 1982.
- SIBUG-TORRES, S. M.; GO, L. P.; CASTILLO, V. C. G.; PAUCO, J. L. R.; ENRIQUEZ, E. P. Fully integrated 3D-printed electrochemical cell with a modified inkjet-printed Ag electrode for voltammetric nitrate analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1160, p. 338430, 2021.
- SIEW, Q. Y.; PANG, E. L.; LOH, H. S.; TAN, M. T. T. Highly sensitive and specific graphene/ TiO_2 impedimetric immunosensor based on plant-derived tetravalent envelope glycoprotein domain III (EDIII) probe antigen for dengue diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 176, p. 112895, 2021.
- SIMÕES, M.; BARANTON, S.; COUTANCEAU, C. Electro-oxidation of glycerol at Pd based nanocatalysts for an application in alkaline fuel cells for chemicals and energy cogeneration. **Applied Catalysis B: environmental**, Amsterdam, v. 93, n. 3–4, p. 354–362, 2010.
- SMART, A.; CREW, A.; PEMBERTON, R.; HUGHES, G.; DORAN, O.; HART, J. P. Screen-printed carbon based biosensors and their applications in agri-food safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 127, p. 115898, 2020.
- SMILACK, J. D. Trimethoprim-sulfamethoxazole. **Mayo Clinic Proceedings**, New York, v. 74, n. 7, p. 730–734, 1999.
- SONG, J.; YANG, J.; ZENG, J.; TAN, J.; ZHANG, L. Graphite oxide film-modified electrode as an electrochemical sensor for acetaminophen. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 155, n. 1, p. 220–225, 2011.
- SRISOMBAT, L.; JAMISON, A. C.; LEE, T. R. Stability: A key issue for self-assembled monolayers on gold as thin-film coatings and nanoparticle protectants. **Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v. 390, n. 1–3, p. 1–19, 2011.
- STANKOVICH, S.; DIKIN, D. A.; PINER, R. D.; KOHLHAAS, K. A.; KLEINHAMMES, A.; JIA, Y.; WU, Y.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. **Carbon**, Kidlington, v. 45, n. 7, p. 1558–1565, 2007.
- SU, W. Y.; WANG, S. M.; CHENG, S. H. Electrochemically pretreated screen-printed carbon electrodes for the simultaneous determination of aminophenol isomers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 651, n. 2, p. 166–172, 2011.

SUN, B. W.; YU, H. Y.; YANG, Y. J.; LI, H. J.; ZHAI, C. Y.; QIAN, D. J.; CHEN, M. New complete assignment of X-ray powder diffraction patterns in graphitic carbon nitride using discrete Fourier transform and direct experimental evidence. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Milton, v. 19, n. 38, p. 26072–26084, 2017.

SZYMANSKA, B.; LUKASZEWSKI, Z.; HERMANOWICZ-SZAMATOWICZ, K.; GORODKIEWICZ, E. An immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen by surface plasmon resonance imaging. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 609, p. 113964, 2020.

THANGAMANI, G. J.; PASHA, S. K. K. Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles reinforced polyvinyl formal (PVF) nanocomposites as chemiresistive gas sensor for sulfur dioxide (SO₂) monitoring. **Chemosphere**, Oxford, v. 275, p. 129960, 2021.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification International union of pure and applied chemistry: physical chemistry division, commission i.7 (biophysical chemistry); analytical chemistry division, commission v.5 (electroanalytical). **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001.

THOMAS, A. G.; JACKMAN, M. J.; WAGSTAFFE, M.; RADTKE, H.; SYRES, K.; ADELL, J.; LÉVY, A.; MARTSINOVICH, N. Adsorption studies of p -aminobenzoic acid on the anatase TiO₂ (101) Surface. **Langmuir**, Washington, v. 30, n. 41, p. 12306–12314, 2014.

TIAN, Y.; ZHOU, F.; ZHAN, S.; YANG, Y.; LIU, Y.; HE, Q. Mechanisms on the sterilization performance of fluorocarbon resin composite coatings enhanced by g-C₃N₄/TiO₂. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 353–362, 2017.

VARGAS, E.; TEYMOURIAN, H.; TEHRANI, F.; EKSIN, E.; SÁNCHEZ-TIRADO, E.; WARREN, P.; ERDEM, A.; DASSAU, E.; WANG, J. Enzymatic/immunoassay dual-biomarker sensing chip: towards decentralized insulin/glucose detection. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 58, n. 19, p. 6376–6379, 2019.

VILLALONGA, A.; ESTABIEL, I.; PÉREZ-CALABUIG, A. M.; MAYOL, B.; PARRADO, C.; VILLALONGA, R. Amperometric aptasensor with sandwich-type architecture for troponin I based on carboxyethylsilanetriol-modified graphene oxide coated electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 183, p. 113203, 2021.

WANG, C. C.; CHOU, P. H.; YU, Y. H.; KEI, C. C. Deposition of Ni nanoparticles on black TiO₂ nanowire arrays for photoelectrochemical water splitting by atomic layer deposition. **Electrochimica Acta**, Kidlington, v. 284, p. 211–219, 2018.

WANG, H.; ZHANG, B.; TANG, Y.; WANG, C.; ZHAO, F.; ZENG, B. Recent advances in bismuth oxyhalide-based functional materials for photoelectrochemical sensing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 131, p. 116020, 2020.

WANG, J.; LIU, Z. Recent advances in two-dimensional layered materials for photoelectrochemical sensing. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 133, p. 116089, 2020.

WANG, J.; WANG, X.; TANG, H.; GAO, Z.; HE, S.; LI, J.; HAN, S. Ultrasensitive electrochemical detection of tumor cells based on multiple layer CdS quantum dots-functionalized polystyrene microspheres and graphene oxide – polyaniline composite. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 100, n. July 2017, p. 1–7, 2018.

WANG, Q.; WU, X.; ZHANG, L. Designed of bifunctional Z-scheme $\text{CuSnO}_3/\text{Cu}_2\text{O}$ heterojunctions film for photoelectrochemical catalytic reduction and ultrasensitive sensing nitrobenzene. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 361, p. 398–407, 2019.

WANG, S. C.; CHANG, K. S.; YUAN, C. J. Enhancement of electrochemical properties of screen-printed carbon electrodes by oxygen plasma treatment. **Electrochimica Acta**, Kidlington, v. 54, n. 21, p. 4937–4943, 2009.

WANG, Y. Z.; ZHAO, W.; DAI, P. P.; LU, H. J.; XU, J. J.; PAN, J.; CHEN, H. Y. Spatial-resolved electrochemiluminescence ratiometry based on bipolar electrode for bioanalysis. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 86, p. 683–689, 2016.

WEI, Q.; WANG, C.; LI, P.; WU, T.; YANG, N.; WANG, X.; WANG, Y.; LI, C. $\text{ZnS}/\text{C}/\text{MoS}_2$ nanocomposite derived from metal–organic framework for high-performance photo-electrochemical immunosensing of carcinoembryonic antigen. **Small**, Weinheim, v. 15, n. 48, p. 1902086, 2019.

WELCH, N. G.; SCOBLE, J. A.; MUIR, B. W.; PIGRAM, P. J. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (review). **Biointerphases**, Melville, v. 12, n. 2, p. 02D301, 2017.

WU, Y.; XUE, P.; KANG, Y.; HUI, K. M. Paper-based microfluidic electrochemical immunodevice integrated with nanobioprobes onto graphene film for ultrasensitive multiplexed detection of cancer biomarkers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, n. 18, p. 8661–8668, 2013.

XIA, Y. M.; XIA, M.; ZHAO, Y.; LI, M. Y.; OU, X.; GAO, W. W. Photocatalytic electrochemical sensor based on three-dimensional graphene nanocomposites for the ultrasensitive detection of CYFRA21-1 gene. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 166, p. 106245, 2021.

XU, Y.; BAI, H.; LU, G.; LI, C.; SHI, G. Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 130, n. 18, p. 5856–5857, 2008.

YANG, M.; ZHANG, X.; GUO, C.; CHENG, X.; ZHU, C.; XU, Y.; MAJOR, Z.; HUO, L. Resistive room temperature DMA gas sensor based on the forest-like unusual n-type PANI/ TiO_2 nanocomposites. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 342, p. 130067, 2021.

YANG, Y.; YAN, W.; WANG, X.; YU, L.; ZHANG, J.; BAI, B.; GUO, C.; FAN, S. Development of a molecularly imprinted photoelectrochemical sensing platform based on $\text{NH}_2\text{-MIL-125}(\text{Ti})\text{-TiO}_2$ composite for the sensitive and selective determination of oxtetracycline. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 177, p. 113000, 2021.

YANG, Y.; ZHONG, Z.; LIU, H.; ZHU, T.; WU, J.; LI, M.; WANG, D. Double-layer nanogold and double-strand dna-modified electrode for electrochemical immunoassay of cancer antigen 15-3. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 20, n. 24, p. 2621–2628, 2008.

YAO, L.; XU, J.; SHI, M.; HUANG, Y.; FANG, L.; ZHAO, S.; CHEN, Z. F.; LIANG, H. Polydopamine nanoparticle-based multicolor proximity immunoassays for ultrasensitive, multiplexed analysis of proteins using isothermal quadratic amplification. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 282, p. 626–635, 2019.

YAO, Z.; JIA, F.; TIAN, S.; LI, C.; JIANG, Z.; BAI, X. Microporous ni-doped TiO_2 film photocatalyst by plasma electrolytic oxidation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 2, n. 9, p. 2617–2622, 2010.

- YATES, N. D. J.; FASCIONE, M. A.; PARKIN, A. Methodologies for “wiring” redox proteins/enzymes to electrode surfaces. **Chemistry - A European Journal**, Weinheim, v. 24, n. 47, p. 12164–12182, 2018.
- YIN, S.; HOSSAIN, M. N.; LI, Y.; SUN, C.; KRAATZ, H.-B. Development of a novel electrochemical aptasensor based on catalytic hairpin assembly and DNA tetrahedron for the detection of 25-hydroxyvitamin D3. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 354, p. 131217, 2022.
- YIN, S.; LI, Y.; HOSSAIN, M. N.; SUN, C.; KRAATZ, H. B. Electrochemical detection of 25-hydroxyvitamin D3 using an oligonucleotide aptasensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 340, p. 129945, 2021.
- YIN, Z.; ZHU, L.; LV, Z.; LI, M.; TANG, D. Persistent luminescence nanorods-based autofluorescence-free biosensor for prostate-specific antigen detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 233, p. 122563, 2021.
- YU, S. Y.; ZHANG, L.; ZHU, L. B.; GAO, Y.; FAN, G. C.; HAN, D. M.; CHEN, G.; ZHAO, W. W. Bismuth-containing semiconductors for photoelectrochemical sensing and biosensing. **Coordination Chemistry Reviews**, Lausanne, v. 393, p. 9–20, 2019.
- YUE, X.; LI, Z.; ZHAO, S. A new electrochemical sensor for simultaneous detection of sulfamethoxazole and trimethoprim antibiotics based on graphene and ZnO nanorods modified glassy carbon electrode. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 159, n. April, p. 105440, 2020.
- ZANG, Y.; LEI, J.; JU, H. Principles and applications of photoelectrochemical sensing strategies based on biofunctionalized nanostructures. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 96, n. January, p. 8–16, 2017.
- ZHAN, S.; PAN, Y.; GAO, Z. F.; LOU, X.; XIA, F. Biological and chemical sensing applications based on special wettable surfaces. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 108, p. 183–194, 2018.
- ZHANG, C.; PING, J.; YING, Y. Evaluation of trans-resveratrol level in grape wine using laser-induced porous graphene-based electrochemical sensor. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 714, p. 136687, 2020.
- ZHANG, M.; HU, X.; MEI, L.; ZHANG, L.; WANG, X.; LIAO, X.; QIAO, X.; HONG, C. PSA detection electrochemical immunosensor based on MOF-235 nanomaterial adsorption aggregation signal amplification strategy. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 171, p. 106870, 2021.
- ZHANG, W.; GUO, H.; SUN, H.; ZENG, R. Constructing ternary polyaniline-graphene-TiO₂ hybrids with enhanced photoelectrochemical performance in photo-generated cathodic protection. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 410, p. 547–556, 2017.
- ZHANG, Y.; FENG, D.; XU, Y.; YIN, Z.; DOU, W.; HABIBA, U. E.; PAN, C.; ZHANG, Z.; MOU, H.; DENG, H.; MI, X.; DAI, N. DNA-based functionalization of two-dimensional MoS₂ FET biosensor for ultrasensitive detection of PSA. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 548, p. 149169, 2021.
- ZHANG, Y.; LIU, G.; YU, S.; ZHANG, J.; TANG, Y.; LI, P.; REN, Y. Kinetics and interfacial thermodynamics of the pH-related sorption of tetrabromobisphenol a onto multiwalled carbon nanotubes. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 6, n. 23, p. 20968–20977, 2014.

ZHAO, B.; MIAO, P.; HU, Z.; ZHANG, X.; GENG, X.; CHEN, Y.; FENG, L. Signal-on electrochemical aptasensors with different target-induced conformations for prostate specific antigen detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1152, p. 338282, 2021.

ZHAO, C.; DAI, X.; YAO, T.; CHEN, W.; WANG, X.; WANG, J.; YANG, J.; WEI, S.; WU, Y.; LI, Y. Ionic exchange of metal-organic frameworks to access single nickel sites for efficient electroreduction of CO₂. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 139, n. 24, p. 8078–8081, 2017.

ZHAO, L.-Z.; FU, Y.-Z.; REN, S.-W.; CAO, J.-T.; LIU, Y.-M. A novel chemiluminescence imaging immunosensor for prostate specific antigen detection based on a multiple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 171, p. 112729, 2021.

ZHAO, W. W.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Photoelectrochemical immunoassays. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 90, n. 1, p. 615–627, 2017.

ZHAO, Y.-Y.; LUO, H.; GE, Q.; LIU, M.; TAO, Z.; CONG, H. An ultrasensitive photoelectrochemical sensor with layer-by-layer assembly of chiral multifarene[3,2,1] and g-C₃N₄ quantum dots for enantio recognition towards thyroxine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Lausanne, v. 336, p. 129750, 2021.

ZHENG, W.; ZHAO, M.; LIU, W.; YU, S.; NIU, L.; LI, G.; LI, H.; LIU, W. Electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer/reduced graphene oxide composite for simultaneous determination of uric acid and tyrosine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 813, p. 75–82, 2018.

ZHENG, Y.; ZHAO, L.; MA, Z. pH responsive label-assisted click chemistry triggered sensitivity amplification for ultrasensitive electrochemical detection of carbohydrate antigen 24-2. **Biosensors and Bioelectronics**, Kidlington, v. 115, p. 30–36, 2018.

ZHONG, H.; ZHAO, C.; CHEN, J.; CHEN, M.; LUO, T.; TANG, W.; LIU, J. Electrochemical immunosensor with surface-confined probe for sensitive and reagentless detection of breast cancer biomarker. **RSC Advances**, Milton, v. 10, n. 38, p. 22291–22296, 2020.

ZHOU, H.; DING, K.; LI, B.; WANG, H.; ZHANG, N.; LIU, J. Proximity binding induced nucleic acid cascade amplification strategy for ultrasensitive homogeneous detection of PSA. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1186, p. 339123, 2021.

ZHU, Q.; LI, C.; CHANG, H.; JIANG, M.; SUN, X.; JING, W.; HUANG, H.; HUANG, D.; KONG, L.; CHEN, Z.; SANG, F.; ZHANG, X. A label-free photoelectrochemical immunosensor for prostate specific antigen detection based on Ag₂S sensitized Ag/AgBr/BiOBr heterojunction by in-situ growth method. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 142, p. 107928, 2021.