

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMILY YAMAGUTTI WATANABE

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DESCARTÁVEIS A BASE DE CARBONO  
PARA DETERMINAÇÃO DE MELATONINA E COLESTEROL

CURITIBA

2022

EMILY YAMAGUTTI WATANABE

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DESCARTÁVEIS A BASE DE CARBONO  
PARA DETERMINAÇÃO DE MELATONINA E COLESTEROL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

Coorientadora: Dra. Ava Gevaerd

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Watanabe, Emily Yamagutti

Desenvolvimento de eletrodos descartáveis a base de carbono para determinação de melatonina e colesterol / Emily Yamagutti Watanabe. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini.

Coorientadora: Dra. Ava Gevaerd.

1. Eletrodos. 2. Grafite. 3. Voltametria. 4. Colesterol. 5. Melatonina. I. Bergamini, Márcio Fernando. II. Gevaerd, Ava. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA 40001016026P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EMILY YAMAGUTTI WATANABE** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS DESCATÁVEIS A BASE DE CARBONO PARA DETERMINAÇÃO DE MELATONINA E COLESTEROL**, sob orientação do Prof. Dr. MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Maio de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/05/2022 08:43:46.0

MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/05/2022 15:37:11.0

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/05/2022 11:27:25.0

REGINA MASSAKO TAKEUCHI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA)

---

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: [cpgquim@ufpr.br](mailto:cpgquim@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 187745

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 187745

*Foi o tempo que perdeste com tua rosa que fez tua rosa tão importante*

**Antoine de Saint-Exupéry**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à vida e por tudo o que ela me proporcionou e proporciona durante todo esse tempo.

Aos meus pais, Sandra Norie Yamagutti Watanabe e Kougin Watanabe por todos os sacrifícios que fizeram para que eu tivesse uma educação de qualidade e por todo amor, dedicação e ensinamentos que me deram ao longo de toda a vida. Amo muito vocês!

Ao meu orientador professor Márcio Fernando Bergamini e ao professor Luiz Humberto Marcolino Jr. pela oportunidade que me deram lá atrás, em 2015 quando eu ainda não sabia muito bem o que estava fazendo no curso de química, por terem me recebido e ensinado tantas coisas nas aulas, durante todos os anos de iniciação científica e mestrado e durante a convivência do dia a dia. Minha imensa gratidão!

À minha co-orientadora Ava Gevaerd pelos inúmeros relatórios corrigidos, ser minha companhia nas noites no laboratório, por todo o conhecimento e dedicação. Sou muito grata e te admiro muito.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Gilberto Abate e Regina Massako Takeuchi, por todas as contribuições, pela gentileza, pelo aceite em avaliar tão prontamente e por aceitarem a ser membros da banca novamente e avaliar essa dissertação. Muito obrigada!

A todos os professores e professoras da UFPR que tive oportunidade de conhecer e cujos esforços contribuíram em muito para minha formação.

A todas as pessoas, colegas e amigos que me acolheram no LabSense desde o início até hoje, por todos aqueles que passaram e deixaram algum conhecimento, alguma história, muitos abraços, inúmeras risadas e muitos churrascos.

Ao grupo de pós-graduandos bonitos que estão comigo desde o início da graduação, lá em 2014, Caroline, Renaldo e André, sem vocês com certeza nada teria valido a pena. Muito obrigada pelos almoços, pelas idas ao shopping, pelas comemorações de aniversário e fim de ano, enfim muito obrigada por fazerem parte da minha vida e compartilhar todos os momentos de alegria e frustrações.

À Carol e à Duda por ter sido parte desse trio durante tanto tempo, obrigada por todos os momentos de alegria e descontração, pelas conversas, desabafos e tantas memórias divertidas, principalmente em relação à Duda.

Às minhas amigas de Cornélio Procópio, Karla e Maria Izabela, sinto muita

falta da convivência diária, mas fico muito feliz quando nos reencontramos e conversamos sobre a vida como se nós nunca tivéssemos ficado anos sem se falar. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao Mateus, meu marido, por fazer parte de tudo, desde o momento que nos conhecemos, por todos os momentos felizes, por acompanhar meu crescimento, e principalmente por aguentar meu mau-humor, meus choros e desesperos. Se você está comigo até hoje e ainda não desistiu dessa Emily com várias personalidades e ansiedades, só tenho que te agradecer por ter me apoiado e deixado eu me apoiar em você para tudo, principalmente quando o mundo parecia cinza e monótono. Te amo!

Aos meus sogros, Flávia e João Carlos, só tenho que agradecer o acolhimento, por tudo o que fizeram por mim e por me fazer sentir parte da família por todos esses anos e agora por cuidar da minha filha.

À Laura Izumi, meu maior presente e o amor da minha vida, que surgiu tão de repente e veio me mostrar que não existe amor maior do que o de mãe, que me ensina todos os dias alguma coisa nova e me presenteia com seus sorrisos.

Aos órgãos de fomento, CAPES, pela concessão da bolsa que me permitiu desenvolver este trabalho, com suas extensões e licença maternidade.

E por fim, mas não menos importante a todos que participaram da minha vida diretamente ou indiretamente e contribuíram nessa jornada.



## RESUMO

**Desenvolvimento de eletrodos descartáveis a base de carbono para determinação de melatonina e colesterol.** Neste trabalho foram desenvolvidos eletrodos de baixo custo empregando tintas *lab-made* de carbono. As tintas condutoras foram preparadas com pó de grafite e esmalte de unha homogeneizadas em uma mistura de solventes (acetona/acetato de etila). Foram investigadas duas formas diferentes de preparação de eletrodos, a serigrafia convencional (SPE) e por imersão (DWE). Os SPE e os DWE foram utilizados na detecção de melatonina e colesterol, respectivamente. Os eletrodos preparados por serigrafia (SPE) não modificados foram avaliados para a determinação de melatonina de forma direta empregando a voltametria de onda quadrada. Utilizando as condições experimentais otimizadas (frequência de 50 Hz, amplitude de potencial de 75 mV e incremento de potencial de 10 mV) foi obtida uma faixa de resposta linear de 0,25 a 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 25,9  $\text{nmol L}^{-1}$  e 83,3  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectivamente. A determinação de melatonina em amostras fortificadas de saliva e urina artificiais apresentou valores de recuperação que variaram de 96,6 a 104,0%. Eletrodos preparados por imersão (DWE) foram modificados com íons  $\text{Ni}^{2+}$  e empregados na determinação amperométrica de colesterol. A resposta amperométrica é baseada no par redox níquel (Ni(II)/Ni(III)). Esse eletrodo foi acoplado como detector a um sistema microfluídico e empregando as condições otimizadas (faixa de varredura de 0,0 a 0,7 V, concentração de KOH de 0,05  $\text{mol L}^{-1}$ , número de ciclos para formação do par redox de 25 ciclos, potencial de detecção de 0,55 V, volume de injeção de 2,0  $\mu\text{L}$ ) foi observada uma faixa de resposta linear (LDR) de 0,10 a 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 0,083  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,277  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, em amostra fortificada de plasma comercial humano com valores de recuperação que variaram de 89 a 107%.

Palavras-chave: eletrodos impressos; grafite; dispositivo eletroanalítico; voltametria; colesterol; melatonina.



## ABSTRACT

**Development of disposable carbon electrodes for cholesterol and melatonin detection.** In this work, low-cost electrodes were developed using carbon lab-made inks. Conductive inks were prepared with graphite powder and nail polish homogenized in a solvent mixture (acetone/ethyl acetate). Two different methods of electrode preparation were investigated, conventional screen-printing (SPE) and immersion (DWE). SPE and DWE were used to detect melatonin and cholesterol, respectively. The unmodified screen-printed electrodes (SPE) were evaluated for direct melatonin determination using square wave voltammetry. Using the optimized experimental conditions (frequency of 50 Hz, potential amplitude of 75 mV and potential step of 10 mV) it was obtained a linear response range from 0.25 to 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 25.9  $\text{nmol L}^{-1}$  and 83.3  $\text{nmol L}^{-1}$ , respectively. The determination of melatonin in fortified samples of artificial saliva and urine showed 96.6 to 104.0% recovery values. Electrodes prepared by immersion (DWE) were modified with  $\text{Ni}^{2+}$  ions and used in the amperometric determination of cholesterol. The amperometric response is based on the nickel redox pair (Ni(II)/Ni(III)). The electrode was coupled as a detector to a microfluidic system and using optimized conditions (scanning range from 0.0 to 0.7 V, KOH concentration of 0.05  $\text{mol L}^{-1}$ , number of cycles for the formation of the redox pair of 25 cycles, detection potential of 0.55 V, injection volume of 2.0  $\mu\text{L}$ ) a linear response range (LDR) from 0.10 to 50.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  was observed, detection limit (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 0.083  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 0.277  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively, in a spiked sample of commercial human plasma with 89 to 107% recovery values.

Keywords: printed electrodes; graphite; electroanalytical device; voltammetry; cholesterol; melatonin.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- CE - Contraeletrodo (do inglês, Counterelectrode)
- COL - Colesterol
- CV - Voltametria Cíclica (do inglês, Cyclic Voltammetry)
- DWE - Eletrodo de trabalho por imersão (do inglês, Dunkin Working Electrode)
- EIS - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês, Electrochemical Impedance Spectroscopy)
- $E_p$  - Potencial de pico
- $I_p$  - Corrente de pico
- $k^0$  - Constante cinética de transferência eletrônica
- LOD - Limite de detecção
- LOQ - Limite de quantificação
- SEM - Microscopia eletrônica de varredura (do inglês, Scanning Electronic Microscopy)
- MT - Melatonina
- POC - Point-of-care
- $R_{tc}$  - Resistência de transferência de carga
- $R_s$  - Resistência da solução
- RE - Eletrodo de referência (do inglês, Reference electrode)
- SD - Desvio padrão (do inglês, Standard Deviation)
- SPE - Eletrodo impresso por serigrafia (do inglês, Screen-Printed Electrode)
- SWV - Voltametria de onda quadrada (do inglês, Square Wave Voltammetry)
- $W_{1/2}$  - Largura de pico de meia onda
- WE - Eletrodo de trabalho (do inglês, Working Electrode)
- $Z_w$  - Impedância de Warburg
- $\mu$ TED - Dispositivo microfluídico de fios têxteis (do inglês, Micro Thread Electroanalytical Device)
- $v$  - Velocidade de varredura
- $\Psi$  - Parâmetro cinético adimensional
- $\Delta E_p$  - Variação entre os valores de potencial de pico de oxidação e de potencial de redução

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Lista de reagentes e materiais e sua procedência.....	34
TABELA 2. Proporção da composição da tinta condutora para o DWE e SPE .....	39
TABELA 3. Parâmetros avaliados para a construção do SPE .....	50
TABELA 4. Comparação com outros métodos eletroanalíticos empregando sensores não-enzimáticos para determinação de melatonina .....	57
TABELA 5. Resultados obtidos para análise por adição e recuperação em diferentes diluições (1:1 e 1:10) em amostras artificiais de urina e de saliva para n = 3 .....	59
TABELA 6. Variação de $I_{pa}$ , $\Delta E_p$ , $R_{ct}$ , $\Psi$ e $k_0$ de acordo com a proporção de esmalte/grafite.....	62
TABELA 7. Parâmetros avaliados para a construção do DWE .....	65
TABELA 8. Comparação entre diferentes trabalhos reportados de sensores e biossensores para determinação de colesterol .....	74
TABELA 9. Resultados obtidos para o estudo de espécies concomitantes na determinação de colesterol .....	77
TABELA 10. Resultados obtidos para a análise de amostra fortificada de plasma (n = 5).....	78

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. ESQUEMA das principais partes do eletrodo impresso composto de eletrodo de trabalho (WE), contraeletrodo (CE) e eletrodo de referência (RE) com camada isolante para delimitação de superfície.....21
- FIGURA 2. Esquema demonstrativo da técnica de serigrafia .....22
- FIGURA 3. Esquema representativo das etapas dos eletrodos impressos por serigrafia (A-D) e eletrodo impresso pronto (E) .....23
- FIGURA 4. Sistema  $\mu$ TED e seus principais componentes.....26
- FIGURA 5. Fórmula estrutural da melatonina. ....27
- FIGURA 6. Fórmula estrutural do A) colesterol e B) colest-4-en-3-ona. ....30
- FIGURA 7. Esquema ilustrativo das etapas de confecção dos eletrodos desde a A) Desenho do molde, B) Corte do molde em adesivo vinílico, C) Abrasão do substrato plástico, D) Etapas de impressão com colagem do adesivo, cobertura com camada de tinta condutora, remoção do adesivo e delimitação da área do eletrodo e E) aparência do eletrodo pronto na cartela e individual.....35
- FIGURA 8. Esquema ilustrativo de confecção passo a passo dos dunk-electrodes desde a 1) aquisição dos substratos plásticos, 2) etapa com e sem abrasão, 3) recorte nas dimensões desejadas, 4) recobrimento com a tinta condutora por meio de mergulho e secagem ao ar, 5) recorte de área para remoção de irregularidades e 6) delimitação da área do eletrodo em contato com as soluções com adesivo vinílico .37
- FIGURA 9. Vista A) superior e B) lateral do SPE.....42
- FIGURA 10. Montagem do sistema microfluídico composto de três eletrodos. Em A) Vista superior e B) vista lateral do Ni/ DWE acoplado ao sistema microfluídico. C) Modelos de DWE pronto para uso .....46
- FIGURA 11. A)  $\Delta I_p$  e  $\Delta E_p$  obtido para diferentes composições da tinta condutora com uma camada em solução de ferricianeto de potássio  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ . B)  $\Delta I_p$  e  $\Delta R_{CT}$  para diferentes proporções da tinta condutora com uma camada em solução de ferricianeto de potássio em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , frequência de 100khz a 10 mhz, amplitude de 0,01 V C)  $\Delta I_p$  e  $\Delta E_p$  obtido para diferentes número de camadas na proporção de 70:30 esmalte:grafite em solução de ferricianeto de potássio  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ , D)  $\Delta I_p$  e  $\Delta R_{CT}$  para diferentes número de camadas na proporção de 70:30 esmalte:grafite em solução de ferricianeto de potássio em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , frequência de 100khz a 10 mhz, amplitude de 0,01 V.....49
- FIGURA 12. Imagem representativa obtida por microscopia eletrônica de varredura dos SPE em diferentes ampliações. Ampliações em a)100x, b)500x e c) 1000x.....50
- FIGURA 13. a) Perfil voltamétrico dos processos de oxidação da melatonina em janela de potencial de 0,0 a 1,0 V na concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão de

melatonina,  $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$  b) Perfil da voltametria de onda quadrada (SWV) nas mesmas condições c) Reação simplificada da oxidação da melatonina ..... 51

FIGURA 14. A) Perfil de SWV do processo de oxidação da MT em janela de potencial de 0,0 a 1,0 V em diferentes valores de pH (2,0 a 7,0) na concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão de MT,  $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$  B) GRÁFICO de corrente e potencial de oxidação da MT em função dos valores de pH com valor de slope obtido de potencial vs pH ..... 52

FIGURA 15. A) Gráfico de corrente por potencial referente a MT em janela de potencial de 0,0 a 1,0 V, pH 5,0, concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de padrão de mt em diferentes velocidades de varredura. ( $v = 10, 25, 50, 75, 100, 150 \text{ mV s}^{-1}$ ), B) Gráfico de corrente de pico vs velocidade de varredura ..... 53

FIGURA 16. Estudo de parâmetros da SWV na presença de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de MT em tampão fosfato pH 5,0 em A) variação da corrente de pico e largura de potencial de meia-altura ( $W_{1/2}$ ) obtida proporcionalmente a frequência de aplicação de pulsos de 5 a 100 Hz,  $a = 75 \text{ mV}$ ,  $E = 10 \text{ mV}$  B) Estudo de corrente e largura de  $W_{1/2}$  obtida proporcionalmente a amplitude de pulso de 5 a 100 mV,  $E = 10 \text{ mV}$ ,  $f = 50 \text{ Hz}$  C) Variação de corrente e largura de  $W_{1/2}$  em função do incremento de potencial de 1 a 10 mV,  $f = 50 \text{ Hz}$ ,  $E = 10 \text{ mV}$  ..... 54

FIGURA 17. A. Construção da curva analítica de melatonina nas concentrações de 0,25–75,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  b) curva de calibração correspondente ( $n = 3$ ). Condições experimentais:  $f = 50 \text{ Hz}$ ;  $\Delta E_A = 75 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_S = 10 \text{ mV}$ . ..... 56

FIGURA 18. Gráficos em barra para a) Repetibilidade de sinal para medidas consecutivas em um mesmo eletrodo.  $C_{mt} = 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão fosfato pH 5,0 e b) Reprodutibilidade de sinal utilizando eletrodos diferentes de lotes variados ( $n = 6$ ).  $C_{mt} = 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão fosfato pH 5,0. .... 57

FIGURA 19. A) Voltamogramas de Onda Quadrada na presença de melatonina mais espécies concomitantes B) Gráfico de variação média de corrente no estudo de interferência de matriz.  $C_{MT} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $f = 75 \text{ Hz}$ ;  $\Delta E_P = 50 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_S = 10 \text{ mV}$ ; Tampão fosfato pH = 5,0. .... 58

FIGURA 20. a) Voltamogramas da variação de  $i_{pa}$  e  $\Delta E_p$  variando as proporções de esmalte na presença de ferricianeto de potássio  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 0,25 \text{ V s}^{-1}$ . b) Variação de  $i_p$  e  $E_p$  em função da proporção de esmalte ..... 60

FIGURA 21. a) Diagrama de Nyquist para cada proporção de tinta condutora, de 10% a 50%. Inset: Circuito elétrico de Randles, na qual  $R_s$  é a resistência ôhmica,  $C_{dl}$  é a capacitância de dupla camada,  $R_{ct}$  é a resistência a transferência de carga e  $Z_w$  é impedância de transferência de massa ou Warburg b) Comparação da  $i_p$  e  $R_{ct}$  para cada composição de tinta condutora em meio de solução de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de ferricianeto de potássio em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , frequência de 100khz a 10 mhz, amplitude de 0,01 V. .... 61

FIGURA 22. Gráfico de variação da deposição da massa de tinta condutora no suporte plástico na presença e ausência de abrasão prévia da superfície para diferentes números de camadas de tinta ..... 63

FIGURA 32 Gráfico de variação da massa de tinta depositada em eletrodos (n = 3) de 1 a 10 camadas.....	64
FIGURA 25. Voltametria cíclica de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $v = 0,25 \text{ mV s}^{-1}$ em diferentes eletrodos, variando-se de 1 a 10 camadas de tinta condutora por eletrodo. detalhe: ampliação do perfil voltamétrico para eletrodos de 1 e 2 camadas. b) Variação da corrente de pico e potencial em relação ao número de camadas.....	65
FIGURA 26. Imagem representativa obtida por microscopia eletrônica de varredura dos DWE otimizado. Ampliações em a)100x, b)500x e c) 1000x.....	66
FIGURA 27. Perfil voltamétrico do Ni(II)/Ni(III) em DWE na ausência (– preto) e presença (– verde) de colesterol $10,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , $V = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ . Insert: Correção de linha base de faixa de corrente de 0,2 a 0,7 V evidenciando a oxidação de Ni(III) em preto e oxidação de Ni(III) e colesterol em verde. ....	67
FIGURA 28. Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na oxidação do colesterol. 68	
FIGURA 29. a) Voltamogramas do DWE na presença de $\text{Ni(OH)}_2/\text{NiOOH}$ de 1 a 35 ciclos $v = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ , KOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ .....	69
FIGURA 30. A) Voltametria cíclica do Ni/DWE em KOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , $v = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ . B) sinais transientes obtidos por amperometria de pulso pela injeção de padrão de colesterol na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em triplicata nos potenciais de oxidação de 0,50, 0,55, 0,60, 0,65 e 0,70 V.....	70
FIGURA 31. A) Voltamograma de Ni/ DWE em KOH (–) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , (–) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e (–) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de padrão de colesterol, $v = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ B) Gráfico de $I_{pa}$ vs concentração de KOH em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de padrão de colesterol e em outro eixo $E_{pa}$ vs concentração de KOH nas mesmas condições para a mesma concentração de padrão. ....	71
FIGURA 32. A) Sinais transientes referente a injeção de alíquotas na concentração de $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de colesterol solubilizadas em KOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (n = 5) em $E = 0,55\text{V}$ e em ordem crescente de volume de injeção ( $0,5 \mu\text{L}$ , $1,0 \mu\text{L}$ , $1,5 \mu\text{L}$ , $2,0 \mu\text{L}$ e $2,5 \mu\text{L}$ ). B) Resposta amperométrica (●) e frequência analítica (■) em função do volume de injeção de colesterol. Injeção de alíquotas de $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de colesterol solubilizadas em KOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (n = 5) em $E_{aplicado} = 0,55 \text{ V}$ .....	72
FIGURA 33. Cronoamperograma com sinais transientes da curva analítica de colesterol com concentrações variando de $1,0 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em KOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . Detalhe: Curva de calibração correspondente diferenciando corrente de ida (A-F) e de volta (f-A).....	73
FIGURA 34. a) Sinais transientes da injeção de padrão de colesterol $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e b) Variação de corrente média dada em porcentagem.....	74
FIGURA 35. Corrente média para 3 injeções de 10 eletrodos diferentes na mesma concentração de colesterol.....	75

FIGURA 36. A) Sinais transientes relativos ao colesterol ( $C_{col} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e as espécies presentes na matriz de plasma sanguíneo, AA, AU, Dopa, Cys, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Glu ( $C_{conc.} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). B) Variação de corrente relativa na presença das espécies presentes na matriz de plasma sanguíneo, respectivamente. .... 76

FIGURA 37. Sinais transientes de padrão de colesterol preparado em KOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> a)  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , b)  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , c)  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , d)  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , e)  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e f)  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com adição no meio de plasma diluído em KOH (S1) e plasma fortificado com padrão de colesterol (S2) e diluído (1:500) ..... 77



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 ELETRODOS IMPRESSOS E DISPOSITIVOS MINIATURIZADOS .....	19
1.2 MICROFLUÍDICA .....	24
1.3 BIOMOLÉCULAS .....	27
1.3.1 Melatonina .....	27
1.3.2 Colesterol .....	29
2. OBJETIVOS .....	33
2.1 GERAL .....	33
2.2 ESPECÍFICOS .....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	34
3.2 CONFECÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS PREPARADOS POR SERIGRAFIA (SILK-SCREEN) – SCREEN PRINTED ELECTRODES (SPE) .....	35
3.3 CONFECÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO PREPARADOS POR IMERSÃO – <i>DUNKIN WORKING ELECTRODES</i> (DWE).....	36
3.4 PREPARO DAS TINTAS CONDUTORAS .....	38
3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA TINTA CONDUTORA DOS ELETRODOS PREPARADOS POR IMERSÃO – <i>DUNK-ELECTRODES</i> (DWE) E POR SERIGRAFIA ( <i>SILK-SCREEN</i> ) – <i>SCREEN PRINTED ELECTRODES</i> (SPE) .	39
3.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.....	39
3.6.1 Medidas voltamétricas da tinta condutora dos eletrodos preparados por imersão – <i>DUNKIN WORKIN ELECTRODES</i> (DWE) e por serigrafia ( <i>silk-screen</i> ) – <i>SCREEN PRINTED ELECTRODES</i> (SPE).....	39
3.6.2 Parâmetros otimizados da tinta condutora .....	40
3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MELATONINA UTILIZANDO SPE .....	40
3.7.1 Avaliação do SPE como plataforma de detecção de melatonina .....	40
3.7.2 Estudo de pH do eletrólito suporte e padrão .....	40
3.7.3 Estudo da natureza do processo .....	41
3.7.4 Estudo dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada.....	41
3.7.5 Obtenção da curva analítica e parâmetros de mérito analítico.....	41

3.7.6 Avaliação do método por estudo de adição e recuperação e efeito de concomitantes .....	42
3.8 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EMPREGANDO <i>DUNKIN WORKING-ELECTRODES</i> (DWE) MODIFICADO COM NÍQUEL EM PLATAFORMA MICROFLUÍDICA .....	43
3.8.1 Avaliação do Ni/DWE como eletrodo de trabalho para determinação de colesterol .....	43
3.8.2 Estudo da concentração de hidróxido de potássio .....	43
3.8.3 Estudo de estabilidade do par redox .....	43
3.8.4 Estudo do potencial de oxidação do colesterol .....	43
3.8.5 Modelagem e impressão do $\mu$ TED .....	44
3.8.6 Avaliação do volume de injeção e frequência analítica .....	44
3.8.7 Construção e montagem do sistema microfluídico .....	44
3.8.8 Obtenção da curva analítica e parâmetros de mérito .....	46
3.8.9 Avaliação do método por estudo de adição e recuperação e efeito de concomitantes .....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS .....	48
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS POR SERIGRAFIA (SPE .....	48
4.2.1 Caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos por serigrafia (SPE)...	48
4.2.2 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura do SPE .	50
4.2.3 Desenvolvimento de método eletroanalítico para determinação de melatonina utilizando SPE como plataforma de detecção .....	51
4.2.4 Desempenho analítico, efeito de concomitantes e aplicação. ....	55
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABAHO PREPARADOS POR IMERSÃO (DWE) .....	60
4.3.1 Caracterização eletroquímica dos eletrodos de trabalho preparados por imersão (DWE) .....	60
4.3.2 Avaliação de parâmetros físicos dos eletrodos DWE .....	63
4.3.3 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura do DWE	66
4.3.4 Desenvolvimento de metodologia não-enzimática para detecção de colesterol	

empregando DWE modificado com níquel em sistema microfluídico .....	66
4.3.5 Desempenho analítico, efeito de concomitantes e aplicação. ....	72
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ELETRODOS IMPRESSOS E DISPOSITIVOS MINIATURIZADOS

Sensores estão presentes nas mais diversas aplicações do dia a dia, como a medição de temperatura ou do nível de glicose presente no sangue, sendo que sua utilização é de grande importância na área de pesquisa, medicina, agricultura, indústria e outros ramos. A definição de sensor é bastante ampla, sendo difícil definir de uma só maneira devido a sua grande quantidade de aplicações, mas pode-se dizer que os sensores são dispositivos que respondem a um estímulo, como calor, luz, som, ou movimento e transmitem um sinal resultante como forma de medir a alteração da propriedade intrínseca do material constituinte. Nesse contexto, existem os sensores eletroquímicos, que funcionam como dispositivos capazes de fornecer informações sobre a espécie de interesse, através da medida de alguma propriedade elétrica causada pela interação dessa espécie com um sítio de reconhecimento, cujo eletrodo é utilizado como transdutor do sinal<sup>1-3</sup>.

A medida desse sinal pode ser feita por diferentes técnicas eletroquímicas, sendo de interface ou de *bulk* (solução como um todo), utilizando um controle de potencial ou de corrente, como voltamétricos e amperométricos, pela leitura de potencial interfacial sem a aplicação de uma corrente (potenciométricos), pela aplicação de um sinal alternado (impedimétricos), ou pela medida da condutividade iônica de espécies em uma solução (condutométricos). Desse modo, a busca por análises rápidas, baixos limites de detecção e quantificação, elevada sensibilidade, pequeno consumo de amostras, fácil manuseio e baixo custo são alguns dos principais objetivos ao se desenvolver sensores eletroquímicos. Um dos aspectos mais interessantes aliados aos sensores eletroquímicos é a miniaturização, pois possibilita explorar a construção de eletrodos em dimensões reduzidas, tornando possível seu acoplamento em diferentes sistemas de análise miniaturizados e portáteis, como os do tipo *point-of-care* (POC)<sup>4-6</sup>, *lab-on-a-chip* (LOC)<sup>7,8</sup> e/ou sistemas microfluídicos<sup>9,10</sup>.

O desenvolvimento de eletrodos impressos descartáveis<sup>11-13</sup> tem oferecido um sistema de eletrodos projetados com grande simplicidade, economia e emprego de materiais mais flexíveis, sendo dispositivos na forma de um único arranjo de eletrodos, no qual os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência se encontram no

mesmo suporte em tamanho bastante reduzido. Essa possibilidade de miniaturização e o fato de ser descartável torna este tipo de eletrodo bastante versátil, principalmente para ser aplicado em análises em que a quantidade de amostra é diminuta (alguns microlitros<sup>14-18</sup>).

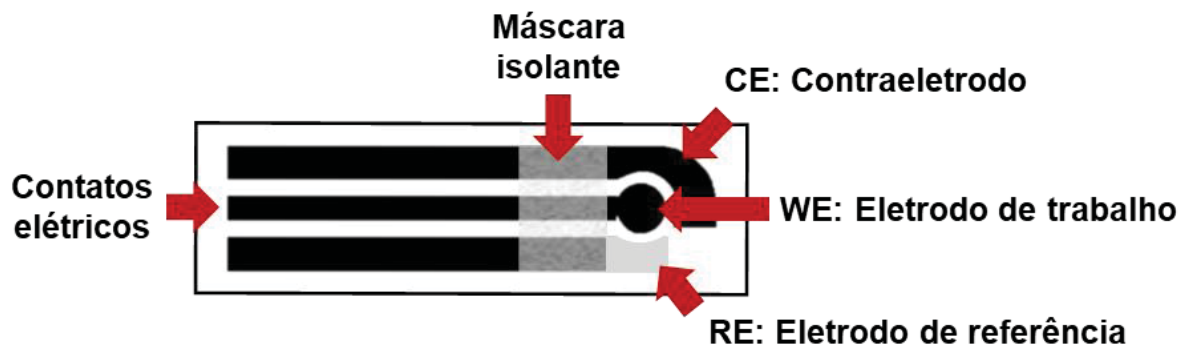
Desse modo, os eletrodos miniaturizados têm sido amplamente empregados como uma alternativa interessante aos eletrodos convencionais, pois esta substituição apresenta a vantagem de oferecer sistemas mais simples, menores e com arranjo de eletrodos mais compactos. Aliado ao fato de serem descartáveis, oferecem simplicidade no desenvolvimento de sensores portáteis, podendo ser utilizados por pessoas não especializadas<sup>2</sup>. Além disso, grande interesse surge na possibilidade de acréscimo à versatilidade dos eletrodos impressos com a modificação de sua superfície, proporcionando maior sensibilidade e seletividade para medidas de uma gama de analitos em amostras dos mais variados interesses<sup>19-24</sup>.

A utilização de diversos materiais permite a obtenção de diferentes configurações, sendo que o desenvolvimento e a construção do eletrodo miniaturizado levam em consideração três pontos importantes:

- **Substrato:** podem ser utilizados materiais diversos como materiais cerâmicos<sup>25</sup>, vidro, papel<sup>26-28</sup>, plástico<sup>29-32</sup> e materiais recicláveis<sup>13</sup>, ao qual será depositada a tinta condutora;
- **Composição da tinta ou camada condutora:** existem diversos tipos de materiais, nanomateriais e compósitos a base de carbono<sup>33-35</sup>, ouro<sup>36</sup> ou prata<sup>37,38</sup> com ou sem aglutinante a ser utilizado nesta etapa;
- **Estratégias de impressão:** é a maneira com que a fase condutora será transferida para o substrato, sendo as estratégias de *screen-printing*<sup>39-43</sup> as mais comumente aplicadas como impressão por *inkjet*, *silk-screen*, e mais recentemente a impressão 3D<sup>44-46</sup>.

Em eletrodos impressos ou SPEs (do inglês, *Screen-Printed Electrodes*), primeiro é depositado um filme condutor sobre um suporte inerte, e posteriormente uma segunda camada de material isolante elétrico é impressa sobre esse suporte. A camada isolante é responsável pela definição de uma área de contato elétrico, o qual está interligado à área superficial ativa do eletrodo na extremidade. A FIGURA 1 exemplifica a estrutura final de um eletrodo impresso.

FIGURA 1. ESQUEMA DAS PRINCIPAIS PARTES DO ELETRODO IMPRESSO COMPOSTO DE ELETRODO DE TRABALHO (WE), CONTRAELETRODO (CE) E ELETRODO DE REFERÊNCIA (RE) COM CAMADA ISOLANTE PARA DELIMITAÇÃO DE SUPERFÍCIE



FONTE: a autora

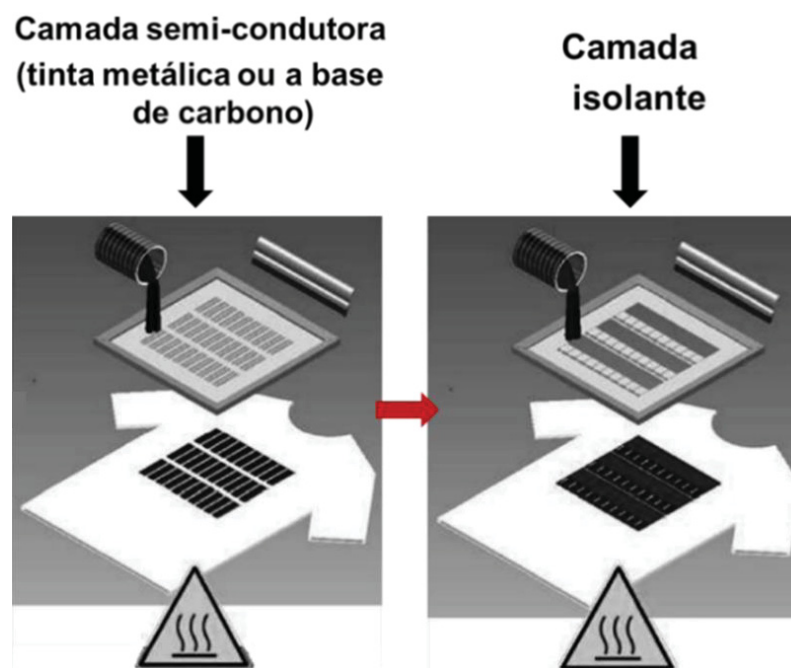
Essa versatilidade dos eletrodos impressos serviu como incentivo para a busca e desenvolvimento de novas possibilidades de construção. Eletrodos impressos comerciais produzidos por impressoras do tipo *inkjet* (do inglês, jato de tinta), desenvolvidas para este fim, permitem a preparação de dispositivos compostos, por exemplo, de eletrodo de trabalho e contra eletrodo revestidos de grafite, e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência (RE). Um exemplo é o eletrodo impresso Kanichi reportado por Banks e colaboradores<sup>47</sup> onde o conjunto de eletrodos foi feito a partir de *stencil* e da impressora microDEK 1760RS (DEK, Weymouth, Reino Unido UK). As etapas consistem na deposição de tintas de carbono grafite (para impressão dos eletrodos de trabalho (WE) e contra eletrodo (CE), tinta composta por Ag/AgCl (RE) e tinta dielétrica comercial sobre um substrato de poliéster. Embora a impressão seja de baixo custo devido a quantidade de eletrodos que podem ser fabricados em uma única batelada, a maior desvantagem nesse processo se encontra no investimento inicial para aquisição da impressora que apresenta um custo bastante elevado e das tintas comerciais que também são de alto custo.

Com isso há grande interesse pela busca de outras metodologias para a obtenção dos eletrodos miniaturizados, combinando diferentes materiais e estratégias de impressão na construção e caracterização desses SPEs.

A técnica de *silk-screen* (do inglês "tela de seda"), bastante difundida para estampar objetos (camisetas, canecas, entre outros), é um processo de impressão 2D relativamente simples que não exige equipamentos sofisticados e caros, podendo ser realizado em locais de pouco espaço<sup>42</sup>. O princípio básico do processo *silk-screen*, também chamado de serigrafia (do grego "escrita em seda"), é a impressão de uma

figura em uma superfície através de uma tela. Esta tela, ou matriz, é um tecido de *nylon* esticado e preso a um quadro de madeira, o qual possui uma trama fina que permite a passagem da tinta. No caso de eletrodos impressos, um filme condutor é depositado sobre um suporte inerte, e posteriormente uma segunda camada de um material isolante elétrico é impresso sobre o esse suporte, a camada isolante é responsável pela definição de uma área de contato elétrico interligado a área superficial ativa do eletrodo em outra extremidade. A FIGURA 2 mostra, de forma estilizada, as etapas envolvidas no processo de impressão por serigrafia.

FIGURA 2. ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA TÉCNICA DE SERIGRAFIA

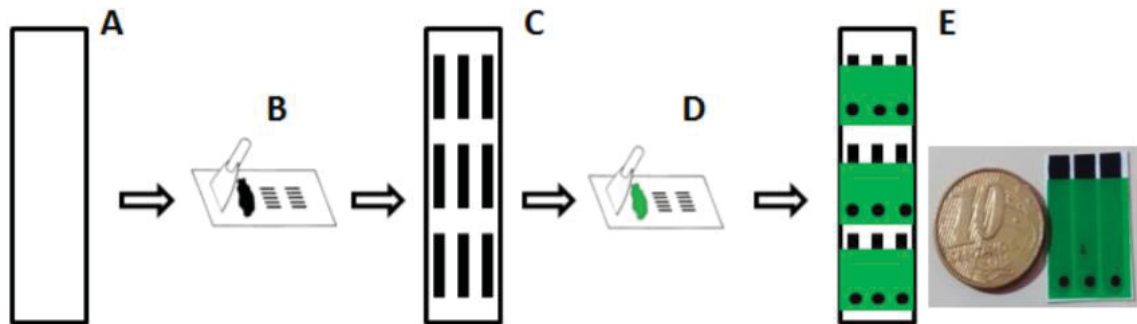


FONTE: a autora

Santos e colaboradores<sup>48</sup> desenvolveram uma pesquisa utilizando a serigrafia para construção de eletrodos impressos com negro de fumo, como um condutor alternativo e acetato de celulose, como aglutinante. A dispersão dos componentes em uma mistura de acetona e ciclohexanona, como base da tinta condutora, permitiu a impressão em suporte de PVC como pode ser visto na FIGURA 3. O arranjo completo de eletrodos foi utilizado na determinação de íons  $Pb^{2+}$  e  $Cd^{2+}$  em água de torneira e de ácido ascórbico em amostras comerciais de vitamina C efervescente e mostrou excelentes resultados.



FIGURA 3. ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DOS ELETRODOS IMPRESSOS POR SERIGRAFIA (A-D) E ELETRODO IMPRESSO PRONTO (E)



FONTE: Adaptada de SANTOS (2013)<sup>48</sup>

Em virtude da simplicidade em se produzir os eletrodos impressos, são encontradas diversas marcas comerciais de eletrodos impressos por serigrafia, como DropSens<sup>®</sup>, Zensor<sup>®</sup> e BVT<sup>®</sup>, que fazem uso de diversos tipos de tinta condutora (baseados em carbono, ouro, prata, platina ou nanotubos de carbono) para as mais diversas aplicações com pequenos volumes de amostra (microvolumes). Porém a grande dificuldade nesses tipos de eletrodos se encontra na reprodutibilidade de resposta, de acordo com as variações dos lotes em que são produzidos.

O desenvolvimento de diferentes estratégias de impressão e materiais utilizados varia de acordo com a disponibilidade de investimento e facilidade de obtenção de materiais para a customização dos eletrodos e embora tenha um custo elevado como já mencionado anteriormente, a produção em grande escala traz um ótimo custo-benefício na produção dos eletrodos. Devido à simplicidade de preparação e a possibilidade de customização dos eletrodos impressos, muitos grupos de pesquisa passaram a investir na construção de eletrodo impressos do tipo *lab-made* explorando a impressão 2D e utilizando diferentes materiais condutores e modificadores.

No processo de confecção dos eletrodos, a camada condutora é de extrema importância, e esta é feita utilizando tintas condutoras comerciais ou de tintas caseiras, também chamada de *Home Made Inks* (HMI). Em geral, as tintas são materiais compósitos constituídos por um componente de elevada condutividade, um aglutinante responsável por transformar a mistura em tinta e um solvente para modular a viscosidade necessária<sup>33,49-51</sup>. Tendo em vista as vantagens dos materiais carbonáceos em geral<sup>52</sup>, como a excelente condutividade elétrica, atividade eletrocatalítica, relativa inércia e estabilidade eletroquímica em grandes janelas de

potencial, possibilidade de funcionalização e ancoramento de grupos que diminuem a hidrofobicidade, materiais como grafite, negro de fumo ou grafeno possuem potencial para serem utilizados em tintas condutoras.

Pradela-Filho e colaboradores<sup>53</sup> reportaram uma tinta condutora para a fabricação de eletrodos de trabalho utilizando uma mistura de grafite em pó, esmalte de unha e acetona em diversas proporções. Como demonstração de uso, foi feita a investigação da dopamina como analito, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, em que foi obtida uma curva analítica com faixa linear de concentração de 30 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r^2 = 0,995$ ), limites de detecção e quantificação de 5,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 17,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Prado e colaboradores<sup>54</sup> desenvolveram uma tinta condutora de Ag/AgCl com baixa temperatura de cura para aplicação em como pseudo-referência em sensores eletroquímicos. Primeiro foi feito o eletrodo a base de uma tinta condutora de grafite comercial em substrato de PET, feita a cura a 90 °C por trinta minutos e então o eletrodo de referência foi pintado com a tinta a base de prata, curada a 90 °C por 10 minutos. Após as caracterizações foi demonstrado seu uso com a determinação de carbendazim como analito, sendo o sensor proposto apresentando faixa linear de resposta de 0,25 a 1,48  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de 0,10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Franco e colaboradores<sup>55</sup> descreveram uma tinta condutora a base de água, carboximetilcelulose e grafeno, sendo uma estratégia *eco-friendly* uma vez que a tinta proposta não utiliza solventes orgânicos em sua composição, apresentando resistividade de  $1,8 \times 10^{-2} \Omega$ , compatível para uso em sistemas eletrônicos. Além disso pôde ser observado uma boa homogeneidade e espessura da tinta após a impressão do eletrodo de 200  $\mu\text{m}$ . Foram demonstrados sua potencialidade na aplicação de sensores termoresistivos e piezoresistivos.

## 1.2 MICROFLUÍDICA

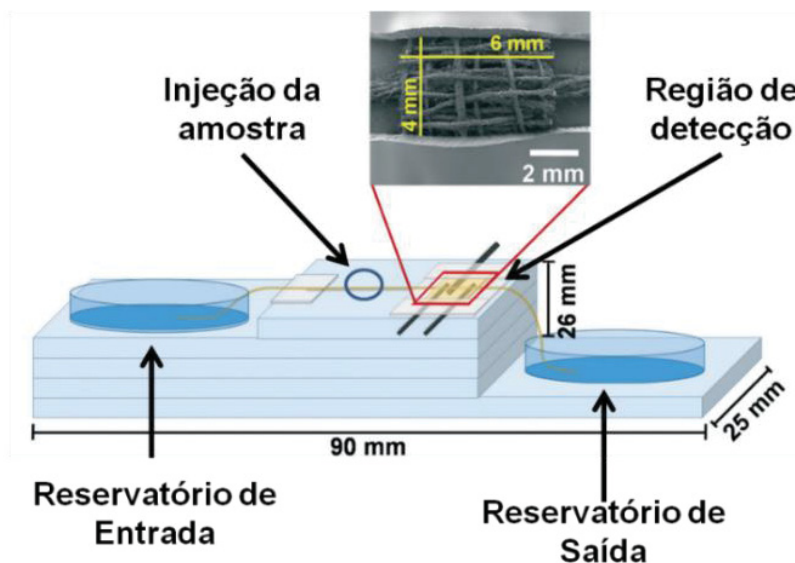
O desenvolvimento de eletrodos impressos de baixo custo em dimensões reduzidas permite sua combinação com diversas abordagens analíticas, dentre elas, os sistemas microfluídicos. A microfluídica pode ser definida como a ciência e engenharia de sistemas com dimensões micrométricas, na qual o comportamento dos fluídos difere da teoria tradicional para domínios macroscópicos<sup>10</sup>. Pode ser explorada

para uma variedade de aplicações científicas e tecnológicas e, por esse motivo, há a necessidade de maior discussão sobre os efeitos desse escalonamento.

Os primeiros dispositivos microfluídicos foram fabricados utilizando materiais como silício/vidro, devido a estabilidade química e mecânica, no entanto, era necessária a construção de canais micrométricos, uma etapa bastante trabalhosa e complexa. Assim, foi aberto o espaço para utilização de outros materiais como elastômeros ou polímeros como polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxano (PDMS) e poliestireno devido a possibilidade de impressão desses canais, apresentar rigidez, transparência óptica, biocompatibilidade e permeabilidade a gases, o que facilita o trabalho com sistemas celulares<sup>56</sup>.

Com a vinda de novas tecnologias após a virada do século, outros dispositivos começaram a ser desenvolvidos também em que se destacam a microfluídica em gotas ou *droplet microfluidics*<sup>57</sup>, dispositivos analíticos em papel<sup>27</sup> e dispositivos que atuam como órgãos artificiais, os *organ-on-a-chip*<sup>58</sup>. Tais dispositivos têm sido utilizados em diversas aplicações nas áreas de pesquisa química, biológica e médica, mostrando um grande potencial devido às suas características como miniaturização, portabilidade, baixo custo de fabricação, baixo consumo de amostras e reagentes, detecções com alta resolução e sensibilidade em curtos tempos de análises.

Como forma de combinar essas características, Agustini e colaboradores<sup>59</sup> desenvolveram um dispositivo microfluídico de baixo custo, utilizando placas de vidro como material base para a construção do suporte e fios de algodão, proveniente de gaze utilizada para fins médicos, que atuam como canais fluídicos promovendo um fluxo passivo de soluções por ação da capilaridade e gravidade. Esse dispositivo foi denominado de  $\mu$ TED (*micro Thread Electrochemical Device* - FIGURA 4), e foi utilizado para determinação de acetaminofeno e diclofenaco com detecção por amperometria de múltiplos pulsos.

FIGURA 4. SISTEMA  $\mu$ TED E SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES

FONTES: Adaptado de AGUSTINI<sup>59</sup>

A solução carreadora entra nos microcanais do dispositivo através do reservatório de entrada e é transportada devido a ação capilar e diferença de altura entre os reservatórios, com isso não é necessário o uso de bombas para o transporte da solução desde a entrada até a saída. A injeção da amostra (2,0  $\mu$ L) ocorre anteriormente à região de detecção o qual é transportado juntamente com o eletrólito de suporte (também utilizado como solução carreadora) para a região de detecção (arranjo de eletrodos), onde ocorre a reação redox das espécies de interesse. Em seguida, o eletrólito suporte e a amostra migram para o reservatório de saída. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) encontrado para o acetaminofeno e diclofenaco foram de  $1,4 \times 10^{-6}$  e  $4,7 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. A frequência analítica foi de 45 injeções por hora e o custo de aproximadamente R\$1,40 por dispositivo.

Outros trabalhos foram desenvolvidos a partir deste dispositivo, sendo modificado seu material base de placas de vidro para utilização de polímeros, como ABS, em sua construção, sendo sua estrutura impressa por uma impressora 3D<sup>60-63</sup>.

Do tema escolhido, o foco principal é o desenvolvimento de eletrodos impressos por *silk-screen*, acoplados a sistemas miniaturizados com detecção eletroquímica. E devido a essa possibilidade de miniaturização e uso de pequenas quantidades de amostra, a escolha dos analitos se deu principalmente a essas

características, pois a análise em fluídos biológicos possui grandes dificuldades devido a quantidade e qualidade de amostra que é obtida.

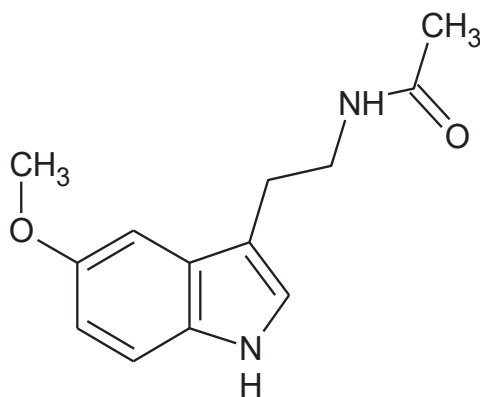
### 1.3 BIOMOLÉCULAS

#### 1.3.1 Melatonina

A melatonina, FIGURA 5, também conhecida como “hormônio do sono”, é produzida em diversos tecidos e células biológicas, mas principalmente secretada pelo cérebro através da glândula pineal e formada a partir da molécula de serotonina, atuando como reguladora de respostas fisiológicas como o sono, depressão, ansiedade e estresse oxidativo devido as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias<sup>64-66</sup>. Além disso, esse hormônio interage com diversas proteínas, como as transportadoras e as enzimáticas, por exemplo, atuando em processos biológicos importantes como a indução a apoptose celular e na manutenção do sistema autoimune.

Os processos envolvendo a melatonina são de extrema relevância, uma vez que a imunidade está diretamente ligada ao combate de infecções, evita o estresse oxidativo e desencadeia rapidamente respostas aos processos inflamatórios. Existem diversos relatos na literatura da associação de baixos níveis de melatonina no organismo com uma maior suscetibilidade às infecções virais ou bacterianas, exemplo das síndromes respiratórias (como a Influenza ou a SARS-CoV-2)<sup>64,67</sup>

FIGURA 5. FÓRMULA ESTRUTURAL DA MELATONINA.



FONTE: a autora

Seus valores de referência variam durante o dia, sendo menores pela manhã, pois sua liberação pela glândula pineal ocorre no período da noite, como forma de “preparar” o corpo para o descanso, atingindo a concentração máxima entre 3 e 4 horas da manhã. Uma faixa normal a ser considerada varia entre 18,5 e 0,180 pg mL<sup>-1</sup> no sangue e de 2,4 a 83,6 pg mL<sup>-1</sup> na saliva<sup>68</sup>. Nesse sentido existe um estudo publicado por Walch e colaboradores<sup>69</sup> que indica que o brasileiro, em média, tende a dormir tarde (por volta de 23:40h) e acordar cedo (por volta de 07:10h), o que leva a alterações no relógio biológico e uma forma de melhorar a qualidade de sono se encontra na busca do aumento de consumo de melatonina, seja através de uma alimentação rica nesse hormônio (presente em diversas frutas, legumes, cereais, carnes na ordem de ng g<sup>-1</sup>)<sup>70</sup> ou então na forma de suplementação alimentar<sup>71</sup>.

A principal função da melatonina se encontra na regulação do sono, seja no ajuste do ritmo circadiano, ou seja seu ciclo biológico no período de aproximadamente 24 horas, diminuição dos efeitos de *jet lag*, melhorar a qualidade de sono de pessoas com dificuldades para dormir ou em casos de insônia, mas também são reportados na literatura outros estudos como o uso da melatonina no alívio de enxaquecas, inibição no desenvolvimento de tumores, tratamento de delírios, diminuição no uso de drogas psicoativas<sup>72-74</sup> entre outros. De acordo com a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>70</sup>, o uso da melatonina foi liberado na forma de suplementos alimentares no Brasil em 2021 para pessoas maiores de 19 anos, com um limite máximo de consumo diário estabelecido de 0,21 mg<sup>71</sup>, embora ainda não estejam comprovados os benefícios associados ao consumo de suplementos alimentares à base de melatonina. Com essa abordagem é importante ter o conhecimento dos níveis de melatonina nas formulações dos suplementos, quanto a quantidade presente no organismo, sendo que a detecção no corpo humano, pode ser feita em fluidos biológicos como sangue, urina ou saliva em um “Teste de Curva Melatonina”<sup>75</sup>, que consiste em um ensaio que avalia o ritmo circadiano da melatonina.

A detecção pode ser feita através de análise cromatográfica<sup>76</sup>, imunoenaios<sup>77</sup>, fluorescência<sup>78</sup> e por sensores eletroquímicos<sup>79-81</sup> em fluidos biológicos, como a saliva. Duan e colaboradores<sup>82</sup> utilizaram como plataforma um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanofibras de carbono decorado com liga de FeCo, explorando a atividade eletrocatalítica da liga metálica, em que os modificadores foram sintetizados e caracterizados por voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) observando que o processo de reação é controlado principalmente

por difusão. Como parâmetros de mérito, foi obtido um LOD de  $0,027 \mu\text{mol L}^{-1}$  e uma faixa linear de  $0,05$  a  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r^2 = 0,992$ ), o sensor apresentou boa reprodutibilidade e permaneceu estável quando foi utilizado após 28 dias, perdendo 6,8% de resposta.

Kumar e colaboradores<sup>83</sup> reportaram um SPE modificado com um material compósito para determinação simultânea de melatonina e triptofano, sendo a plataforma de detecção caracterizada com CV e EIS, e a detecção feita por voltametria de onda quadrada (SWV). O sensor apresentou boa reprodutibilidade de resposta, com RSD de 2,23%, LOD de  $0,0972 \mu\text{mol L}^{-1}$  e faixa linear de  $0,5$  a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  para determinação de melatonina em amostras artificiais de urina e tabletes de suplemento alimentar.

Como já citado, várias consequências estão relacionadas a falta e ao uso incomum do hormônio no organismo, por isso a importância de seu monitoramento para o qual é proposto utilizar os eletrodos impressos desenvolvidos no projeto como forma de detecção rápida e simples e com menores limites de detecção.

### 1.3.2 Colesterol

O colesterol (FIGURA 6-A) é uma biomolécula que possui grande interesse em ser monitorada, já que alguns problemas de saúde são relacionados ao acúmulo dessa espécie no organismo, ou seja, sua presença em grande quantidade. Assim como as elevadas quantidades, baixas quantidades de colesterol no organismo também levam a problemas, uma vez que o colesterol é precursor de diversas espécies importantes para o bom funcionamento do corpo, como hormônios esteroides, produzidos em gônadas e glândulas adrenais, bem como da vitamina D<sup>84</sup>.

O colesterol total abrange outras formas lipídicas como HDL ou “colesterol bom” (lipoproteína de alta densidade, do inglês, *high-density lipoprotein*) e LDL ou “colesterol ruim” (lipoproteína de baixa densidade, do inglês *low-density lipoprotein*), dos mais conhecidos. Os limites considerados normais variam de acordo com diversos fatores, como hereditariedade, raça, sexo e faixa etária; de acordo com a *U.S. National Library of Medicine*:<sup>85</sup>

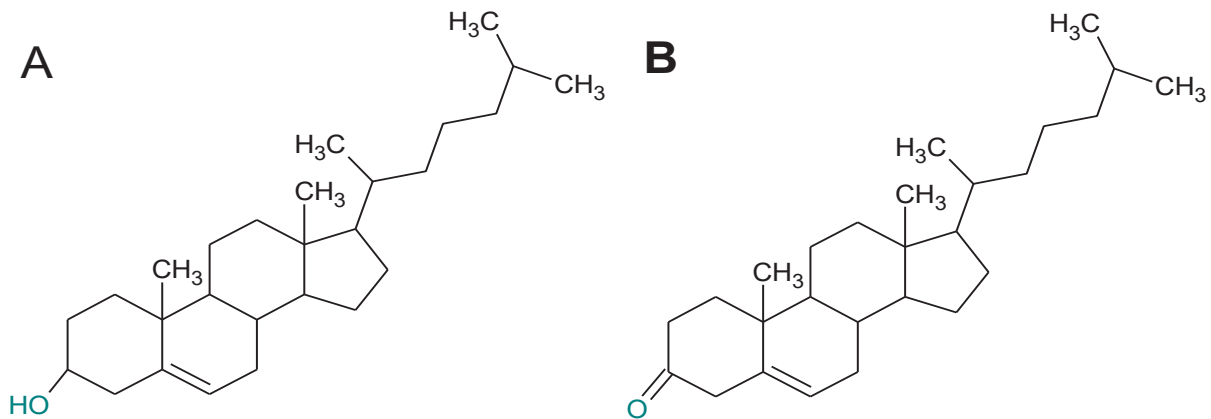
- Para qualquer pessoa até a idade de 19 anos, o colesterol total deve ser menor que 170 mg/dL, sendo HDL superior a 45 mg/dL e LDL inferior a 100 mg/dL.



- Para homens e mulheres com idade de 20 anos ou mais os níveis de colesterol total variam entre 125mg/dL e 200 mg/dL, sendo HDL superior a 40 mg/dL para homens e superior a 50 mg/dL para mulheres e LDL inferior a 100 mg/dL para ambos.

Fatores externos também afetam os níveis de colesterol no organismo, ligados principalmente a alimentação e consumo de produtos com gordura saturada, pois o colesterol é uma molécula lipofílica e tende a se acumular em tecidos adiposos na forma de LDL, que acarreta o sobrepeso, que se somado a pouca atividade física e alimentação não equilibrada pode levar a uma série de doenças como obesidade, aterosclerose, doenças coronárias e problemas hormonais.

FIGURA 6. FÓRMULA ESTRUTURAL DO A) COLESTEROL E B) COLEST-4-EN-3-ONA.



FONTE: a autora

Portanto, a busca por novas metodologias, com uso de menores quantidades de amostra, sendo as coletas de amostra menos invasivas para os pacientes e testes que tenham diagnóstico rápido e de fácil acesso para que haja o conhecimento dos níveis de colesterol no organismo são necessárias e de grande importância. Os trabalhos mais comumente reportados pela literatura são de biossensores que fazem o uso de enzima, a colesterol-oxidase (ChOx) que atua de forma seletiva ao colesterol, oxidando-o a colest-4-en-3-ona (fórmula estrutural na FIGURA 6-B), sendo quantificado o peróxido de hidrogênio formado <sup>86-92</sup> como na reação 1.



Um exemplo de determinação de colesterol empregando um biossensor é o descrito por Salazar e colaboradores <sup>93</sup>. Os autores realizaram a modificação de um eletrodo impresso comercial da DropSens<sup>®</sup> em três etapas: i) a eletrodeposição de

azul da Prússia na superfície do eletrodo de trabalho ii) seguida da adição de nanotubos de carbono funcionalizados e da iii) eletrodeposição de um filme fino de polidopamina modificado com a enzima colesterol-oxidase (ChOx). O biossensor foi avaliado por amperometria convencional fornecendo LOD de  $11,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e faixa linear de resposta de  $36,6$  a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Como detector amperométrico em um sistema em fluxo (FIA), o mesmo biossensor, mostrou duas regiões lineares com LOD de  $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e faixas lineares de  $5$  a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $100$  a  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Assim os autores apresentaram a possibilidade de determinação de colesterol em amostras biológicas sem interferência de matriz.

Uma grande variedade de dispositivos encontrados na literatura são de biossensores enzimáticos devido à alta seletividade da análise. Entretanto o uso de enzimas tem algumas desvantagens como o aumento do custo, além de serem moléculas sensíveis a degradação/desnaturação e necessitarem de um meio controlado de análise como pH, temperatura e concentração. Uma alternativa aos biossensores são os sensores não-enzimáticos que usam espécies reativas que auxiliam na catálise oxidativa do colesterol e de outras espécies como a glucose. Normalmente, esses sensores têm vantagens como o menor custo e facilidade operacional.

Khaliq e colaboradores<sup>94</sup> descreveram o desenvolvimento de um sensor não-enzimático baseado em nanotubos de óxido de titânio decorado com nanopartículas (NPs) de  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Os autores avaliaram a resposta por amperometria em amostra de soro sanguíneo, comparando com a resposta de um biossensor comercial, concluindo que o sensor proposto pode ser utilizado para detecção de colesterol em amostras clínicas. Os parâmetros de mérito reportados foram LOD igual a  $0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tempo de resposta de 5 segundos e faixa linear de  $24,4$  a  $622 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $r^2 = 0,998$ ).

Outras espécies, além do cobre, apresentam característica semelhantes de atividade eletrocatalítica, atuando como mediadores redox. Nesse sentido, o níquel é um excelente candidato para a detecção não-enzimática de colesterol, pois se destaca pelas diferentes possibilidades de estruturas, baixo custo comparado a metais nobres, estabilidade do seu par redox  $\text{Ni(II)/Ni(III)}$  em meio alcalino e boa reprodutibilidade de resultados. Além disso, o níquel foi bastante explorado no laboratório de pesquisa devido a sua potencialidade para detecção não-enzimática de glucose<sup>60,62</sup>, sendo que muitos trabalhos relatam essa aplicação há várias décadas<sup>95-99</sup>.

Devido a todas as informações anteriormente apresentadas, justifica-se esse trabalho o desenvolvimento do tema escolhido, sendo o foco principal o desenvolvimento de eletrodos impressos por *silk-screen*, acoplados a sistemas miniaturizados com detecção eletroquímica. E devido a essa possibilidade de miniaturização e uso de pequenas quantidades de amostra, a escolha dos analitos, melatonina e colesterol, se deu principalmente a essas características, pois a análise em fluídos biológicos possui grandes dificuldades devido a quantidade e característica da amostra que é obtida. Desse modo, é feita a proposta de avaliar a potencialidade de duas plataformas diferentes desenvolvidas durante o período do mestrado para a determinação de melatonina por método direto e de colesterol em um sistema microfluídico, desenvolvido no laboratório de pesquisa através de técnicas voltamétricas e amperométricas, bem como mostrar o desenvolvimento e caracterização dessas plataformas de detecção.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Construir eletrodos impressos por serigrafia e imersão empregando tintas *labmade*, avaliar o comportamento eletroquímico desses eletrodos e aplicar esses dispositivos como detectores em sistemas convencionais e microfluídicos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- i) Planejar a construção do eletrodo impresso, considerando o formato e área dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar;
- ii) Estudar e otimizar estratégias de impressão da tinta condutora sobre o suporte (plástico);
- iii) Investigar o comportamento eletroquímico, por voltametria e impedância, empregando uma sonda (íons ferricianeto) para verificar o desempenho dos eletrodos construídos;
- iv) Caracterizar os eletrodos empregando técnicas como a microscopia eletrônica de varredura (SEM);
- v) Avaliar o potencial analítico do eletrodo impresso, em sistema convencional e sistema microfluídico, para determinação de melatonina e colesterol em amostras biológicas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Todos os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram de grau analítico e sem etapa de purificação prévia. Os reagentes foram pesados em balança analítica Mettler Toledo, Modelo AL204, com precisão de  $\pm 0,1$  mg. As diluições foram feitas em água destilada e purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore (resistividade maior que 18,2 M $\Omega$ cm) e as medidas de pH das soluções foram realizadas em pHmetro Metrohm, Modelo 780, com eletrodo combinado de vidro (Ag/AgCl KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>). As caracterizações eletroquímicas e impedimétricas foram feitas em potenciostato-galvanostato ( $\mu$ Autolab Tipo III) e módulo FRA32. As impressões 3D do sistema microfluídico foram feitas pela impressora impressora GTMax3D printer - Graber i3 model (Americana – SP, Brasil) e os moldes utilizados na impressão dos eletrodos foram recortados pela máquina de recorte Silhouette Cameo 3, gerenciado pelo software Silhoutte Studio. Outros materiais utilizados na construção dos eletrodos, nas caracterizações eletroquímicas e avaliações dos analitos encontram-se na TABELA 1.

TABELA 1. LISTA DE REAGENTES E MATERIAIS E SUA PROCEDÊNCIA

Reagentes e materiais	Procedência
Acetato de etila	Prudenquímica®
Acetato de níquel P.A.	Carlo Erba®
Acetona P.A.	VETEC®
Ácido clorídrico P.A.	VETEC®
Ácido fosfórico P.A.	Dinâmica®
Capas de encadernação (PP e PVC)	-
Cloreto de potássio P.A.	Neon
Colesterol (pureza $\geq 98\%$ (m/m))	Sigma-Aldrich®
Di-hidrogeno fosfato de potássio P.A.	Merck®
Esmalte de unha incolor	Risque®
Ferricianeto de potássio P.A.	Synth®
Fita mágica	Scotch 3M®
Gaze	Cremer
Grafite em pó	Fischer®
Hidrogeno fosfato de potássio P.A.	Synth®
Hidróxido de potássio P.A.	Carlo Erba®

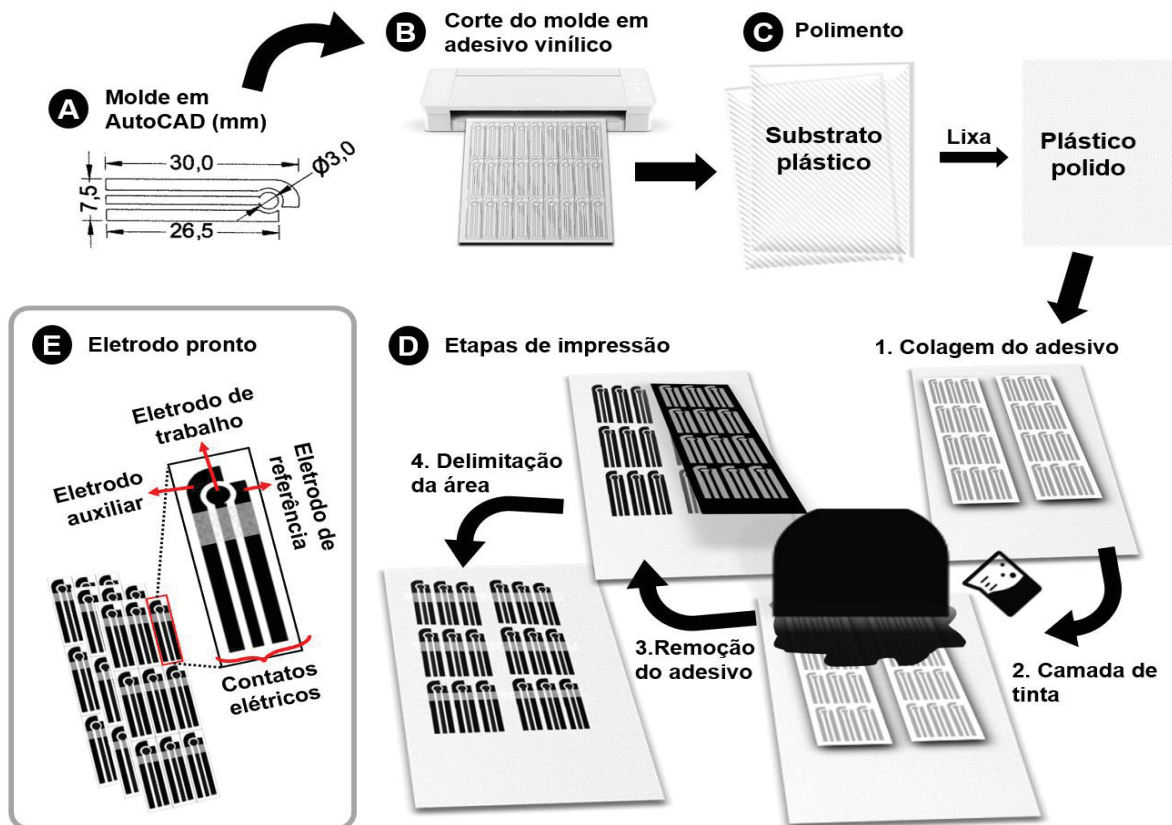
Tabela continua na próxima página

Isopropanol P.A.	VE TEC®
Lixa grão 100 e grão 220	Dexter
Melatonina (pureza ≥98% (m/m))	Sigma-Aldrich®
Metanol P.A.	Synth®
Mixer – misturador de tintas e pigmentos	Dermia
Papel adesivo de vinil	Avery Dennison
Plasma humano AB masculino	Sigma-Aldrich®

### 3.2 CONFECÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS PREPARADOS POR SERIGRAFIA (SILK-SCREEN) – SCREEN PRINTED ELECTRODES (SPE)

Para a impressão deste tipo de conjunto de eletrodos foi testada a serigrafia, utilizando como substrato folhas plásticas de encadernação e um adesivo vinílico como molde ou *stencil*, sendo que um esquema ilustrativo das etapas envolvidas na impressão é apresentado na FIGURA 7.

FIGURA 7. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DE CONFECÇÃO DOS ELETRODOS DESDE A A) DESENHO DO MOLDE, B) CORTE DO MOLDE EM ADESIVO VINÍLICO, C) ABRASÃO DO SUBSTRATO PLÁSTICO, D) ETAPAS DE IMPRESSÃO COM COLAGEM DO ADESIVO, COBERTURA COM CAMADA DE TINTA CONDUTORA, REMOÇÃO DO ADESIVO E DELIMITAÇÃO DA ÁREA DO ELETRODO E E) APARÊNCIA DO ELETRODO PRONTO NA CARTELA E INDIVIDUAL



FONTE: a autora

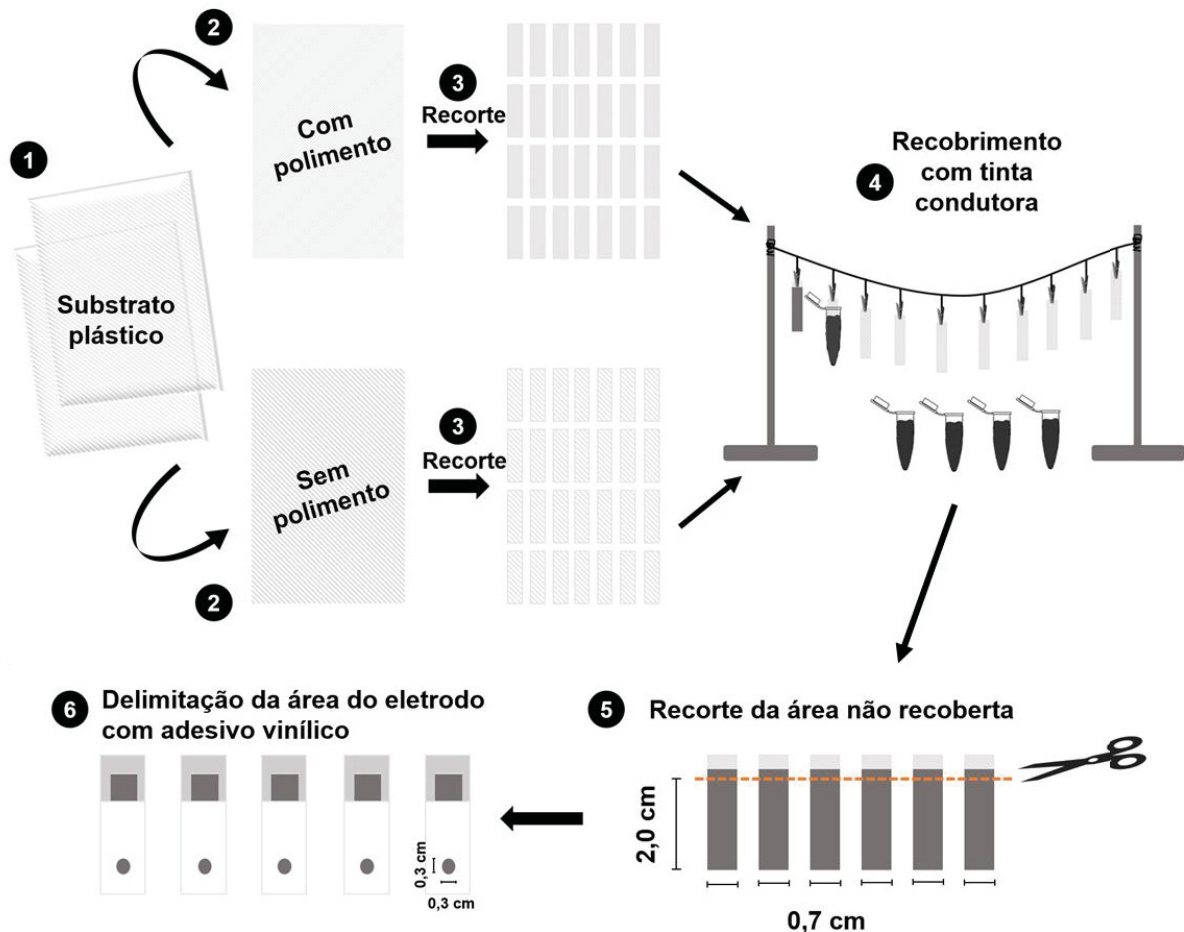
O método de impressão de serigrafia faz o uso de um molde para a delimitação da área impressa, conforme discutido anteriormente. O modelo dos eletrodos foi feito utilizando uma impressora de recorte, ao qual o molde para a impressão foi preparado utilizando um software de desenho – AutoCAD® 2019 *Free Student* (Autodesk Inc., San Rafael, USA). Este desenho indicado na FIGURA 7-A, foi dimensionado e importado como DXF (sigla do inglês, *Drawing Exchange Format*) que é um arquivo de intercâmbio para modelos de CAD para o software Silhouette Studio® da máquina de recorte e então recortados em adesivo vinílico, o qual foi utilizado como molde, indicado pela FIGURA 7-B. O substrato plástico (capas de encadernação) foi lixado (FIGURA 7-C) para melhor aderência, limpo com isopropanol para remoção de resíduos, fixado na bancada com fita adesiva e então foi colado o molde adesivo em sua superfície. Em seguida, a FIGURA 7-D mostra as etapas de impressão, sendo que a tinta foi vertida sobre o molde e arrastada sobre a superfície com auxílio de uma espátula. O molde foi retirado antes de a tinta secar completamente, e então deixado por 12 horas em temperatura ambiente para secagem completa. Após a secagem, foi feita a delimitação da área com auxílio de uma fita adesiva sobre os contatos e então cortados individualmente, como indicado na FIGURA 7-E. Como esse eletrodo apresenta contatos elétricos de eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência, algumas bateladas receberam uma camada de tinta condutora de Ag/AgCl apenas no eletrodo utilizado como referência, para que pudesse ser avaliada sua potencialidade como pseudoeletrodo de referência.

### 3.3 CONFECÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO PREPARADOS POR IMERSÃO – *DUNKIN WORKING ELECTRODES* (DWE)

Para a confecção dos eletrodos foi testado o método de mergulho e secagem ao ar em temperatura ambiente, sendo que a FIGURA 8 a seguir indica passo a passo como foi feita a confecção dos eletrodos DWE.



FIGURA 8. ESQUEMA ILUSTRATIVO DE CONFEÇÃO PASSO A PASSO DOS DUNK-ELECTRODES DESDE A 1) AQUISIÇÃO DOS SUBSTRATOS PLÁSTICOS, 2) ETAPA COM E SEM ABRASÃO, 3) RECORTE NAS DIMENSÕES DESEJADAS, 4) RECOBRIMENTO COM A TINTA CONDUTORA POR MEIO DE MERGULHO E SECAGEM AO AR, 5) RECORTE DE ÁREA PARA REMOÇÃO DE IRREGULARIDADES E 6) DELIMITAÇÃO DA ÁREA DO ELETRODO EM CONTATO COM AS SOLUÇÕES COM ADESIVO VINÍLICO



FONTE: a autora

Para a confecção deste eletrodo foram utilizados como substrato, folhas plásticas de encadernação que seguiram duas rotas: uma com abrasão prévia e outra sem abrasão para avaliar a melhor fixação da tinta condutora. Em seguida, as folhas foram medidas e cortadas nas dimensões de 0,7 x 3,0 cm, limpas em isopropanol, com suas massas aferidas antes de receberem a camada de tinta, a qual foi preparada em um frasco de 2,0 mL, dos componentes da tinta devidamente pesadas e homogêneas. Os suportes plásticos foram presos com auxílio de pregadores em um varal. O plástico foi mergulhado no interior dos frascos contendo a tinta na vertical e retirado cuidadosamente mantendo a verticalidade para evitar o acúmulo de tinta na ponta do material e deixado secar ao ar. Para os eletrodos com mais de uma camada, foram feitos intervalos de 20 minutos entre uma camada e outra para que fossem



secos antes da próxima camada. Por fim, os eletrodos foram deixados para serem completamente secos por 12 horas em temperatura ambiente, na qual foram novamente pesados para ser obtida a quantidade em massa de tinta depositada no material plástico através do cálculo da variação de massa.

Após as etapas de fabricação, 1,0 cm de comprimento foi cortado do eletrodo reduzindo as dimensões para 0,7 x 2,0 cm para remoção de irregularidades (do lado que ficou em contato com os pregadores). Para utilizar o eletrodo foi necessário fazer uma delimitação da área com o adesivo vinílico, deixando uma área conhecida de 0,09 cm<sup>2</sup> e uma área oposta sem o adesivo como contato elétrico. A delimitação foi feita com auxílio de adesivo vinílico à prova d'água e um furador de papel de formato redondo (0,3 x 0,3 cm).

Depois de construídos eletrodos em bateladas para cada proporção investigada, o desempenho voltamétrico do dispositivo foi avaliado em meio a sonda eletroquímica de ferricianeto de potássio em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a fim de verificar a melhor proporção da tinta condutora e a reprodutibilidade de resposta para os eletrodos construídos.

### 3.4 PREPARO DAS TINTAS CONDUTORAS

As tintas condutoras dos eletrodos impressos foram preparadas no próprio laboratório de pesquisa tendo como base os componentes principais: grafite (fase condutora), esmalte de unha (fase aglutinante) e solvente (acetona ou acetato de etila). Foram variadas as proporções fase condutora e fase aglutinante, variando-se também a quantidade de solvente quanto a viscosidade desejada da tinta condutora para cada tipo de impressão. Os componentes foram pesados em proporção previamente definida e homogeneizados com a ajuda do solvente e um misturador elétrico durante um minuto. A TABELA 2 mostra as condições estudadas para o preparo da tinta.

TABELA 2. Proporção da composição da tinta condutora para o DWE e SPE

	Proporção esmalte/grafite (%)	DWE	SPE	
		Acetato de etila / acetona ( $\mu\text{L}$ )	Acetato de etila ( $\mu\text{L}$ )	
Tinta condutora / 100 mg	10/90	300	50	100
	20/80			
	30/70			
	40/60			
	50/50			

FONTE: a autora

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA TINTA CONDUTORA DOS ELETRODOS PREPARADOS POR IMERSÃO – *DUNK-ELECTRODES* (DWE) E POR SERIGRAFIA (*SILK-SCREEN*) – *SCREEN PRINTED ELECTRODES* (SPE)

Para a caracterização da tinta condutora, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) para a avaliação das características morfológicas dos sistemas desenvolvidos. As micrografias foram obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varredura de Alta Resolução FEI, modelo Quanta 450 (Hillsboro, Oregon, USA), com fonte de elétrons FEG (*field emission gun*), aceleração de voltagem entre 10 V e 30 kV, e resolução de 1 nm (Centro de Microscopia Eletrônica, CME-UFPR).

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

#### 3.6.1 Medidas voltamétricas da tinta condutora dos eletrodos preparados por imersão – *DUNKIN WORKIN ELECTRODES* (DWE) e por serigrafia (*silk-screen*) – *SCREEN PRINTED ELECTRODES* (SPE)

Depois de construídos eletrodos em bateladas para cada proporção investigada, em ambas as estratégias de impressão, o desempenho voltamétrico do dispositivo foi avaliado em solução de cloreto de potássio  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de ferricianeto de potássio ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ )  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  como sonda eletroquímica. As

medidas foram feitas através de varreduras pela técnica de voltametria cíclica (CV) na faixa de potencial de -0,2 a 1,0 V vs Ag/AgCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>, com velocidade de varredura de 0,100 V s<sup>-1</sup> e as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram obtidas pelo módulo FRA32 em uma faixa de frequência de 100 kHz a 1mHz, com amplitude de 0,010 V. Os resultados obtidos foram tratados em *notebook* utilizando o software OriginPro® 8.5. Antes de todas as medidas, todos os eletrodos construídos foram submetidos à uma limpeza/ativação da superfície por meio de um tratamento eletroquímico em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>, no intervalo de potencial de -1,0 a 1,0 V com velocidade de varredura de 0,100 V s<sup>-1</sup> durante 15 ciclos.

### 3.6.2 Parâmetros otimizados da tinta condutora

Medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para avaliar e definir as melhores condições de preparo dos eletrodos. Os valores de potencial de pico, corrente de pico e resistência de transferência de carga da sonda eletroquímica foram utilizados para avaliar a melhor proporção de esmalte:grafite na tinta condutora, o número de camadas com melhor sinal de resposta e verificar se a variação de massa de tinta depositada interferiria na reprodutibilidade de resposta para os eletrodos construídos.

## 3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MELATONINA UTILIZANDO SPE

### 3.7.1 Avaliação do SPE como plataforma de detecção de melatonina

A potencialidade do SPE foi avaliada frente ao hormônio melatonina (MT) empregando a determinação direta, por meio da técnica de voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Para os estudos de otimização da metodologia analítica, realizou-se as medidas em triplicatas para cada parâmetro e monitorou-se os valores de intensidades de correntes

### 3.7.2 Estudo de pH do eletrólito suporte e padrão

Foram preparadas soluções de tampão fosfato a partir de ácido fosfórico e

fosfato de potássio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo as soluções ajustadas na faixa de pH 2,0 a 7,0, com hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e utilizadas na diluição do padrão MT. O melhor valor determinado de pH foi em decorrência do maior valor de corrente de pico medido.

### 3.7.3 Estudo da natureza do processo

Através da CV foram feitas medidas em diferentes velocidades de varredura, de 5 a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Na qual foi avaliada a intensidade de corrente obtida em relação a velocidade de varredura para o estudo da natureza do processo para MT utilizando solução de concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão fosfato pH 5,0, no intervalo de potencial de -0,5 a 1,4 V (vs. Ag/AgCl KCl  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ).

### 3.7.4 Estudo dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada

Foram avaliados e otimizados os parâmetros da técnica de SWV de maneira a obter o melhor sinal de corrente para a determinação de MT, sendo então avaliados a frequência (f) de 5 a 100 Hz, a amplitude de potencial ( $E_A$ ) variando de 5 a 100 mV e o incremento de potencial ( $E_s$ ) que variou de 1 a 10 mV. Os valores escolhidos foram monitorados quanto a intensidade de corrente e potencial de largura de meia onda ( $W_{1/2}$ ).

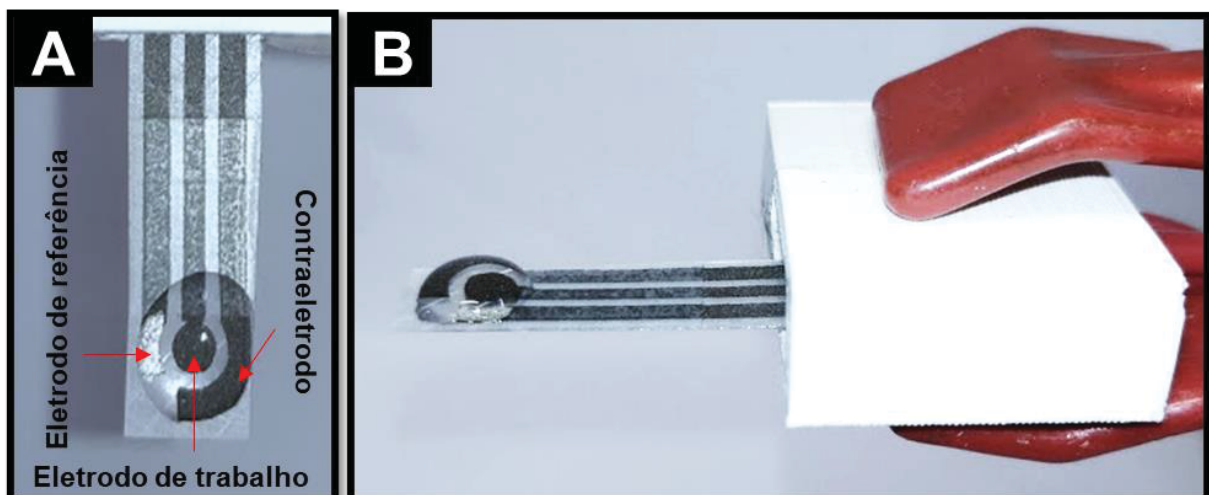
### 3.7.5 Obtenção da curva analítica e parâmetros de mérito analítico

A solução estoque de MT  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , foi preparada pela dissolução de uma quantidade do hormônio em metanol, estocada e mantida sob refrigeração até sua utilização. Diluições até as concentrações desejadas na faixa de  $0,25$  a  $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , foram realizadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque, e guardadas sob refrigeração ( $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) até a utilização. O comportamento voltamétrico do hormônio foi avaliado através das técnicas de CV e SWV, no intervalo de potencial de -0,5 a 1,4 V (versus Ag/AgCl KCl  $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), a fim de avaliar os processos faradaicos referentes a MT, na concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Com isso foram obtidos parâmetros de mérito analítico (limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade analítica) e realizados os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade de detecção.

### 3.7.6 Avaliação do método por estudo de adição e recuperação e efeito de concomitantes

A fim de avaliar o método para determinação de MT foi feito o estudo do analito na presença de outros compostos que podem estar presentes e atuar como possíveis interferentes, assim foi avaliada sua resposta na presença de cortisol (CORT), glicose (GLU), ureia (UR) e estradiol (ET) na mesma concentração de melatonina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Para o estudo de adição e recuperação, foi adicionado  $1,5 \mu\text{L}$  de MT  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  em frascos de  $1,5 \text{ mL}$  contendo a amostra de urina artificial, sendo o protocolo sugerido por Sarigul<sup>100</sup> ( $0,1700 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $1,487 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ ,  $2,450 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $7,791 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$ ,  $249,750 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ,  $30,953 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{KCl}$ ,  $30,053 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $1,663$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $23,667$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $4,389 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $18,667 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $4,667 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e saliva separadamente, e feito a diluição 1:1 e 1:10 em tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 5,0. Essas soluções foram diluídas em tampão fosfato pH 5,0 (1:1 e 1:10) e sua quantificação foi feita pelo método de curva de calibração externa, através da técnica de SWV, sendo adicionada um volume de amostra/ponto da curva de  $100 \mu\text{L}$  na superfície do eletrodo como pode ser visto na FIGURA 9.

FIGURA 9. VISTA A) SUPERIOR E B) LATERAL DO SPE.



FONTE: a autora

### 3.8 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ELETROANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL EMPREGANDO *DUNKIN WORKING-ELECTRODES* (DWE) MODIFICADO COM NÍQUEL EM PLATAFORMA MICROFLUÍDICA

#### 3.8.1 Avaliação do Ni/DWE como eletrodo de trabalho para determinação de colesterol

Para a determinação de colesterol (COL) foi empregada uma estratégia não-enzimática a partir da modificação do DWE com íons níquel por CV em meio alcalino posteriormente o Ni/DW foi acoplado a uma plataforma microfluídica para detecção dos seus sinais transientes por meio de cronoamperometria. Para os estudos de otimização da metodologia analítica, realizou-se as medidas em triplicatas para cada parâmetro e foram monitorados os valores de intensidades de correntes.

#### 3.8.2 Estudo da concentração de hidróxido de potássio

Para o estudo de concentração de solução de hidróxido de potássio (KOH) para formação do par redox, foi preparada uma solução de KOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e realizada diluições da solução estoque para as concentrações de  $0,01$ ,  $0,05$  e  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em  $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ , monitorando os valores de corrente e deslocamento de potencial.

#### 3.8.3 Estudo de estabilidade do par redox

Para o estudo de estabilidade de formação do par redox na superfície do eletrodo foram feitas varreduras por voltametria cíclica na velocidade de varredura de  $0,050 \text{ V s}^{-1}$  em meio de KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e monitorada a intensidade de corrente de 1 a 35 ciclos.

#### 3.8.4 Estudo do potencial de oxidação do colesterol

Após a obtenção da melhor condição de formação do par redox de níquel foi feito o estudo de potencial a ser aplicado no eletrodo de trabalho durante a cronoamperometria, nas quais foram aplicados potenciais de  $0,50$ , a  $0,70 \text{ V}$  e

avaliadas as intensidades de corrente obtidas.

### 3.8.5 Modelagem e impressão do $\mu$ TED

O  $\mu$ TED utilizado neste trabalho sofreu algumas adaptações comparado ao sistema original proposto por Agustini e colaboradores<sup>59</sup>. A plataforma foi impressa em ABS (acrilonitrilo-butadieno-estireno) por meio da impressora GTMax3D printer com tamanho de camada de 0,15 mm e densidade de preenchimento 3. Foram adicionados dois suportes cilíndricos ocios no reservatório de entrada e de saída, sendo um para o eletrodo de referência e outro para o eletrodo auxiliar miniaturizados, respectivamente. Além disso para facilitar a troca do eletrodo de trabalho sem precisar retirar o canal microfluídico de fios têxteis, foi impressa uma peça móvel que pudesse ser encaixada e desencaixada de forma a facilitar esse processo.

### 3.8.6 Avaliação do volume de injeção e frequência analítica

Para a injeção de alíquotas no sistema microfluídico foi feito um estudo de volume de injeção de 0,5 a 2,5  $\mu$ L, sendo avaliadas as intensidades de corrente obtidas e a frequência analítica de injeções desde a obtenção do sinal amperométrico e o tempo de limpeza entre cada injeção.

### 3.8.7 Construção e montagem do sistema microfluídico

A modificação do DWE e seu acoplamento ao sistema microfluídico foram feitas em uma sequência de etapas, nas quais foram adaptadas de trabalhos anteriores do grupo<sup>60,62</sup>:

- (1)** O DWE foi submetido a 10 ciclos em voltametria cíclica de -1,0 a 1,0 V vs Ag/AgCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> ( $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ ) na presença de KOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> sendo uma etapa de ativação dos grupos carbônicos da superfície e melhora na transferência de elétrons.
- (2)** Em seguida foi feita a pré-concentração em circuito aberto de íons níquel adicionando-se um volume de 4,0  $\mu$ L de Ni<sup>2+</sup> 0,5 mol L<sup>-1</sup> com auxílio de micropipeta e deixado por 1 minuto. A solução de níquel 0,5 mol L<sup>-1</sup> utilizada foi preparada dissolvendo-se o acetato de níquel em água destilada, com auxílio de banho ultrassônico por 30 minutos. Após seu preparo, a solução foi guardada sob

refrigeração (4 °C) até sua utilização. O eletrodo foi enxaguado com água destilada e colocado em meio de KOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> em um béquer de 5,0 mL e submetido a varredura ( $v = 0,25 \text{ V s}^{-1}$ ) por voltametria cíclica de 0,0 a 0,7 V vs Ag/AgCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> para promover a formação do oxi-hidróxido de níquel (NiOOH) durante 25 ciclos.

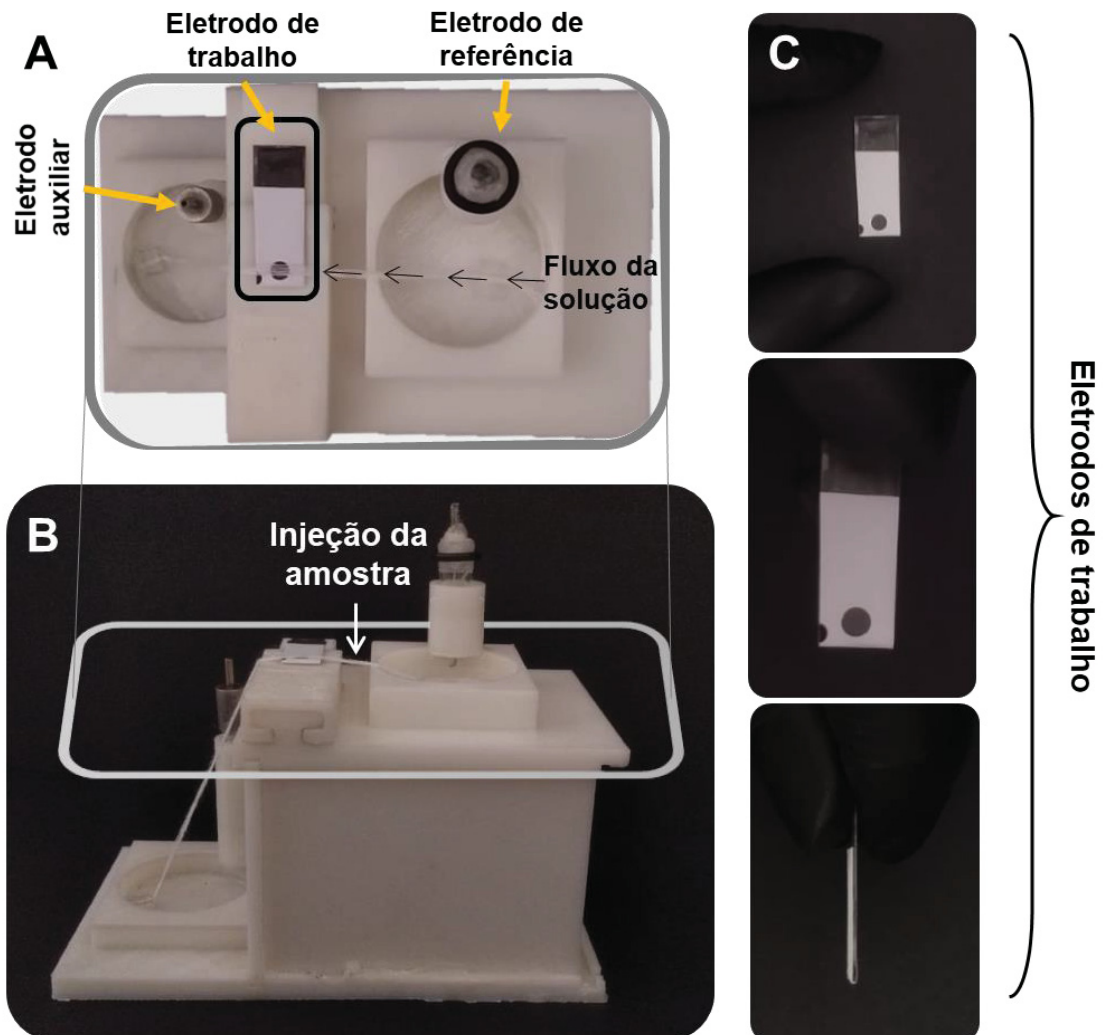
**(3)** O DWE foi acoplado ao  $\mu$ TED e as medidas amperométricas foram realizadas utilizando KOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte (solução transportadora) em um potencial aplicado de 0,55 V. Alíquotas de 2,0  $\mu$ L da solução com o analito foram injetadas com auxílio de uma micropipeta diretamente na zona de injeção do canal microfluídico.

**(4)** Etapa de limpeza do canal microfluídico através do fluxo da solução transportadora realizada por capilaridade na qual o sinal amperométrico retorna a linha base e então uma nova injeção seja adicionada.

A FIGURA 10 mostra o sistema microfluídico montado e indicados a localização dos eletrodos o fluxo da solução transportadora do poço de entrada para o poço de saída na FIGURA 10-A vista de cima, a região de injeção de amostra na FIGURA 10-B com vista lateral e diferentes eletrodos de trabalho prontos para uso na FIGURA 10-C.



FIGURA 10. MONTAGEM DO SISTEMA MICROFLUÍDICO COMPOSTO DE TRÊS ELETRODOS. EM A) VISTA SUPERIOR E B) VISTA LATERAL DO NI/ DWE ACOPLADO AO SISTEMA MICROFLUÍDICO. C) MODELOS DE DWE PRONTO PARA USO



FONTE: a autora

### 3.8.8 Obtenção da curva analítica e parâmetros de mérito

A solução estoque de padrão de COL  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pesando-se o padrão em um balão volumétrico de  $2,0 \text{ mL}$  e solubilizado em metanol com auxílio de banho ultrassônico. A solução estoque foi transferida para um frasco de vidro e conservada em refrigerador ( $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até sua utilização. A obtenção da curva analítica foi feita a partir da diluição da solução estoque, fazendo-se diluições sucessivas de  $1,0 \times 10^{-3}$  até  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de hidróxido de potássio  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Com isso foram obtidos parâmetros de mérito analítico (limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade analítica) e feito os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade de detecção.

### 3.8.9 Avaliação do método por estudo de adição e recuperação e efeito de concomitantes

Para avaliar sua resposta frente a outros compostos presentes no plasma foi feito um estudo de efeito de concomitantes com o padrão de colesterol na presença de diversos componentes, como glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, cisteína e peróxido de hidrogênio, sendo o concomitante adicionado na concentração  $1,0 \times 10^{-5}$ , na solução contendo o colesterol ( $C_{COL} = 5,0 \times 10^{-6}$ ) em KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  e avaliada a intensidade de sinal obtida. Para validação do método, foi feita a fortificação de amostras de plasma, pegando-se alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  de amostra com COL até a concentração final de  $5,17 \text{ mmol L}^{-1}$  (aproximadamente  $200 \text{ mg dL}^{-1}$  de colesterol total). A solução foi diluída em KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (1:200 e 1:500) e sua quantificação foi feita pelo método de curva de calibração externa, através da técnica de cronoamperometria.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS

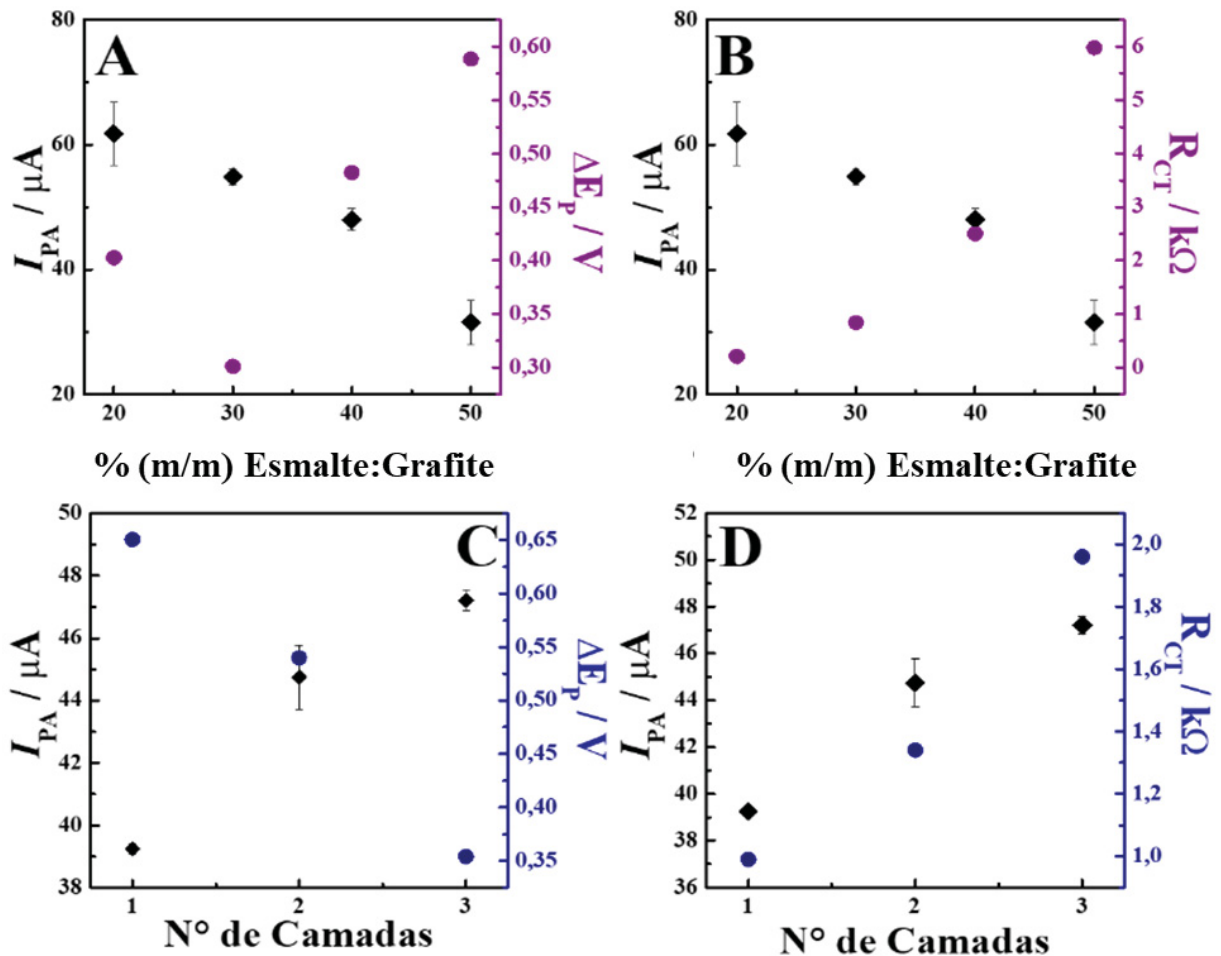
A tinta condutora empregada na impressão dos eletrodos foi baseada em Pradela-Filho e colaboradores<sup>53</sup>, que descreveram a obtenção de uma tinta condutora a base de esmalte e grafite para a construção de eletrodos impressos. Da mesma maneira, nesse trabalho foi desenvolvida uma tinta condutora, também com esmalte e grafite, com algumas modificações em relação ao solvente e ao volume de solvente utilizado, por cada 1,0 g de tinta, como observada na Tabela 2 anteriormente. As técnicas de CV e EIS foram utilizadas para avaliar o comportamento da molécula sonda frente aos parâmetros avaliados como a proporção de esmalte/grafite e número de camadas para ambas as formas de deposição de tinta condutora (DWE e SPE). Também foram feitas as otimizações da proporção de esmalte e grafite (% m/m) e o número de camadas dos eletrodos, sendo monitorados os valores de intensidade de corrente e resistência de transferência de carga.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS POR SERIGRAFIA (SPE)

#### 4.2.1 Caracterização eletroquímica dos eletrodos impressos por serigrafia (SPE)

De forma a avaliar o desempenho eletroquímico dos SPEs, foram feitas medidas voltamétricas por CV, obtendo-se valores para  $I_{pa}$  e  $\Delta E_p$ , e por EIS, proporcionou-se determinar os valores de  $R_{ct}$ , cujos resultados são mostrados na FIGURA 11.

FIGURA 11. A)  $\Delta I_p$  E  $\Delta E_p$  OBTIDO PARA DIFERENTES COMPOSIÇÕES DA TINTA CONDUTORA COM UMA CAMADA EM SOLUÇÃO DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $V = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ . B)  $\Delta I_p$  E  $\Delta R_{CT}$  PARA DIFERENTES PROPORÇÕES DA TINTA CONDUTORA COM UMA CAMADA EM SOLUÇÃO DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , FREQUÊNCIA DE 100kHz A 10 mHz, AMPLITUDE DE 0,01 V C) )  $\Delta I_p$  E  $\Delta E_p$  OBTIDO PARA DIFERENTES NÚMERO DE CAMADAS NA PROPORÇÃO DE 70:30 ESMALTE:GRAFITE EM SOLUÇÃO DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$ , D)  $\Delta I_p$  E  $\Delta R_{CT}$  PARA DIFERENTES NÚMERO DE CAMADAS NA PROPORÇÃO DE 70:30 ESMALTE:GRAFITE EM SOLUÇÃO DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , FREQUÊNCIA DE 100kHz A 10 mHz, AMPLITUDE DE 0,01 V.



FONTE: a autora

Pode ser visto nas FIGURA 11-A e FIGURA 11-B, que os valores de  $I_p$  tendem a diminuir e os valores de  $R_{ct}$  tendem a aumentar com o aumento da proporção de esmalte, diminuindo o desempenho da tinta condutora com o aumento da fase aglutinante, sendo assim escolhida a proporção de 30:70 (%m/m esmalte:grafite). Embora a proporção de 20:80 (esmalte:grafite) tenha apresentado bons resultados de corrente de pico e resistência a transferência de carga, os eletrodos construídos com essa tinta apresentaram baixa resistência mecânica, sendo uma tinta quebradiça quando seca.

Outro aspecto avaliado foi em relação ao número de camadas de tinta condutora sobre o mesmo suporte. Para o número de camadas, que podem ser vistas nas FIGURA 11-C e FIGURA 11-D, foi escolhido aplicar 1 camada de tinta condutora, uma vez que o SPE apresentou bons resultados aliados a uma boa resistência mecânica. Os SPE construídos com 2 ou 3 camadas apresentaram resultados superiores, porém novamente com baixa resistência mecânica, apresentando-se muito quebradiços ou alta dificuldade de homogeneização (possivelmente pela remoção da camada de tinta assim que feita uma nova camada). E de forma análoga ao DWE foi feita uma abrasão prévia do substrato para melhor aderência da tinta condutora após sua deposição. A TABELA 3 resume os parâmetros avaliados e otimizados na construção dos eletrodos impressos por serigrafia.

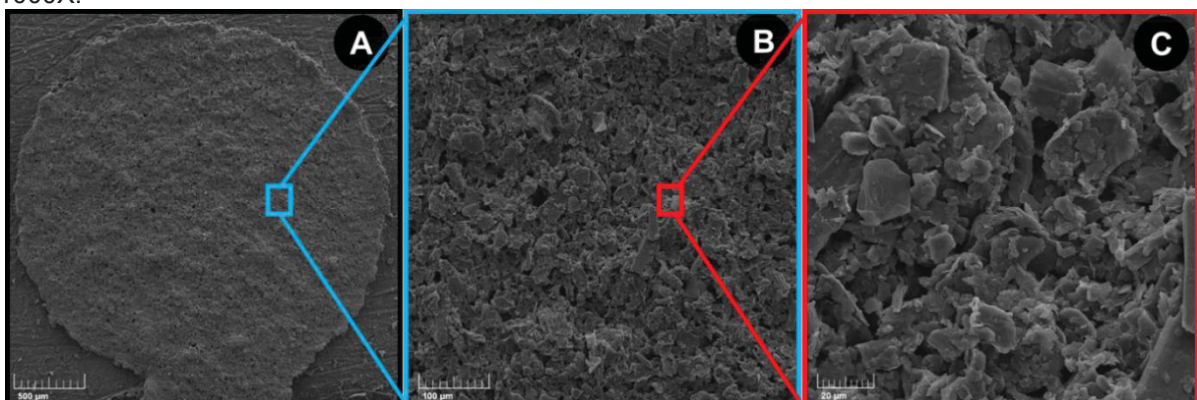
TABELA 3. PARÂMETROS AVALIADOS PARA A CONSTRUÇÃO DO SPE

Parâmetros Avaliados	Faixa / 100 mg de tinta	Parâmetros Otimizados
Abrasão do suporte	Sem - com	Com
Composição	50 – 90% de grafite	70% de grafite
Número de camadas	1 – 3 camadas	1 camada
Volume de solvente	50 – 100 $\mu$ L	50 $\mu$ L

#### 4.2.2 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura do SPE

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura na caracterização da superfície do SPE para verificar a dispersão da tinta condutora a fim de avaliar o recobrimento da superfície do eletrodo. As imagens podem ser vistas na FIGURA 12.

FIGURA 12. IMAGEM REPRESENTATIVA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS SPE EM DIFERENTES AMPLIAÇÕES. AMPLIAÇÕES EM A)100X, B)500X E C) 1000X.



FONTE: a autora

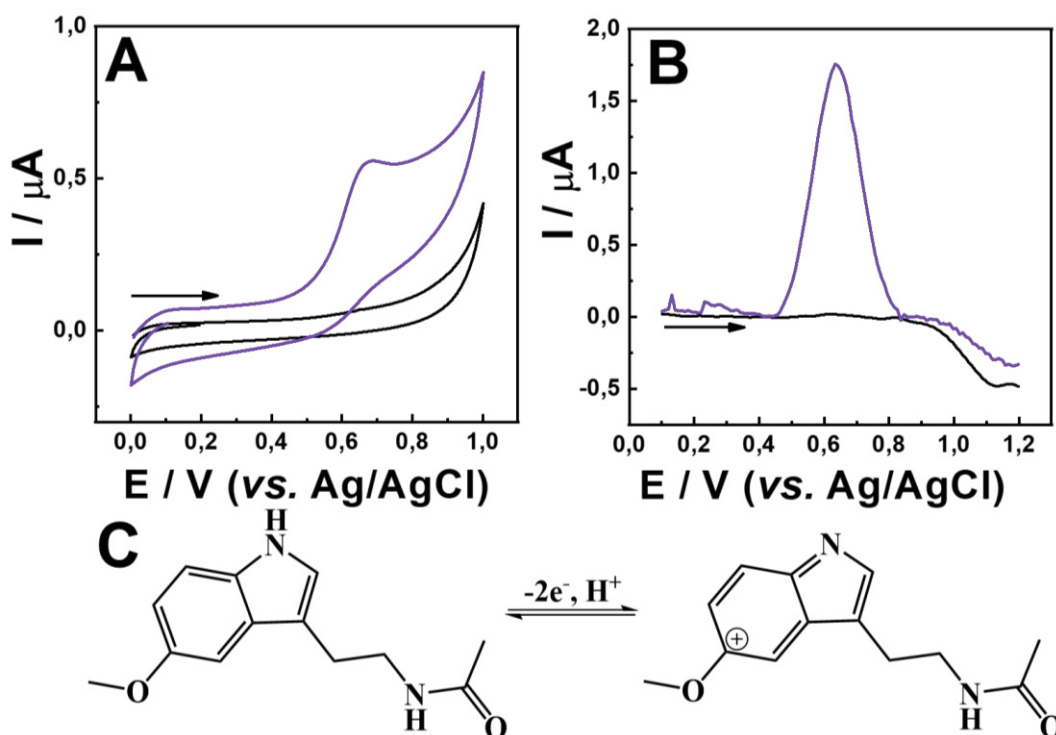
Foi possível observar que há um recobrimento superficial adequado

mostrando uma distribuição homogênea do material condutor sobre o substrato. Assim, é possível concluir que a estratégia empregada proporcionou a produção de eletrodos com cobertura adequada.

#### 4.2.3 Desenvolvimento de método eletroanalítico para determinação de melatonina utilizando SPE como plataforma de detecção

A fim de avaliar o comportamento voltamétrico da MT sobre os SPE, foram realizadas medidas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada na ausência e na presença do hormônio. Os resultados estão apresentados na FIGURA 13.

FIGURA 13. A) PERFIL VOLTAMÉTRICO DOS PROCESSOS DE OXIDAÇÃO DA MELATONINA EM JANELA DE POTENCIAL DE 0,0 A 1,0 V NA CONCENTRAÇÃO DE  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  DE PADRÃO DE MELATONINA,  $V = 0,050 \text{ V s}^{-1}$  B) PERFIL DA VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (SWV) NAS MESMAS CONDIÇÕES C) REAÇÃO SIMPLIFICADA DA OXIDAÇÃO DA MELATONINA



FONTE: a autora

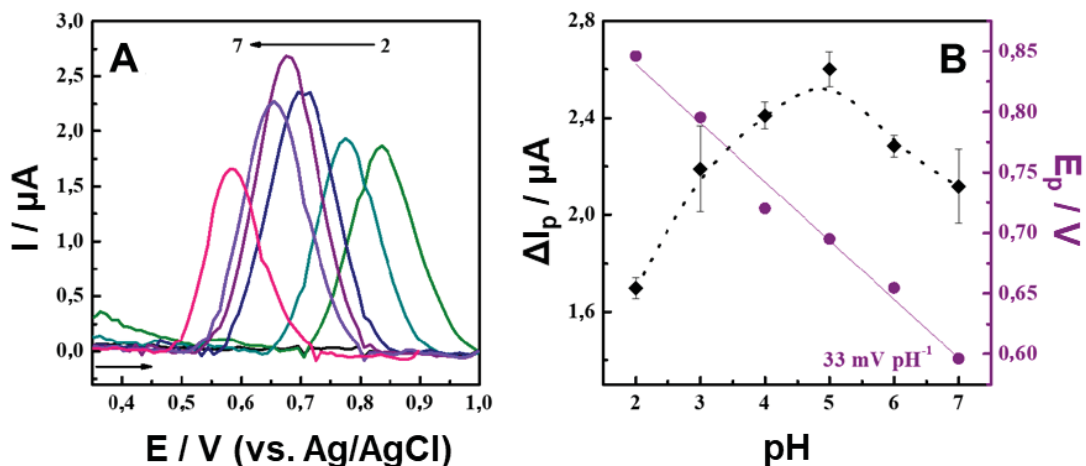
As medidas de SWV e EIS foram realizadas na presença de melatonina utilizando eletrodos *lab-made* a fim de comparar sua performance eletroquímica frente a oxidação da melatonina vista na FIGURA 13. Pelo voltamograma na FIGURA 13-A é possível observar um potencial de pico anódico em 0,62 V que é um valor similar a

outros reportados na literatura, como descrito por Kumar e colaboradores<sup>83</sup>, que observaram um pico anódico em 0,65 V e por Camargo et al<sup>80</sup>, que encontraram um valor de pico anódico de 0,70 V. O deslocamento de potencial de pico para valores menos positivos não afeta significativamente a seletividade da resposta eletroquímica uma vez que os sinais faradaicos foram obtidos em uma faixa de potencial similar e com sensibilidade similares.

É importante salientar que a voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica voltamétrica pulsada que apresenta vantagem de potencializar o sinal faradaico, pois a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso, sendo feita a subtração da corrente capacitiva que é obtida na primeira corrente. Como consequência disso, é possível observar uma corrente de pico com intensidade aproximadamente três vezes maior que a obtida por voltametria cíclica. Assim, para fins analíticos, a SWV foi utilizada para escolher as condições experimentais a serem empregadas na determinação de melatonina.

Foi realizado um estudo a fim de verificar a influência exercida sobre a resposta do sensor quando há variação do pH da solução que compõe o eletrólito, bem como a solução do padrão de MT. Para o estudo foram preparadas soluções tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup>, no intervalo de pH de 2,0 a 7,0, as quais foram empregadas para preparar as soluções de MT, 1,0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, e os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 14.

FIGURA 14. A) PERFIL DE SWV DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DA MT EM JANELA DE POTENCIAL DE 0,0 A 1,0 V EM DIFERENTES VALORES DE pH (2,0 A 7,0) NA CONCENTRAÇÃO DE 1,0 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> DE PADRÃO DE MT, N = 50,0 mV s<sup>-1</sup> B) GRÁFICO DE CORRENTE E POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DA MT EM FUNÇÃO DOS VALORES DE pH COM VALOR DE SLOPE OBTIDO DE POTENCIAL VS pH



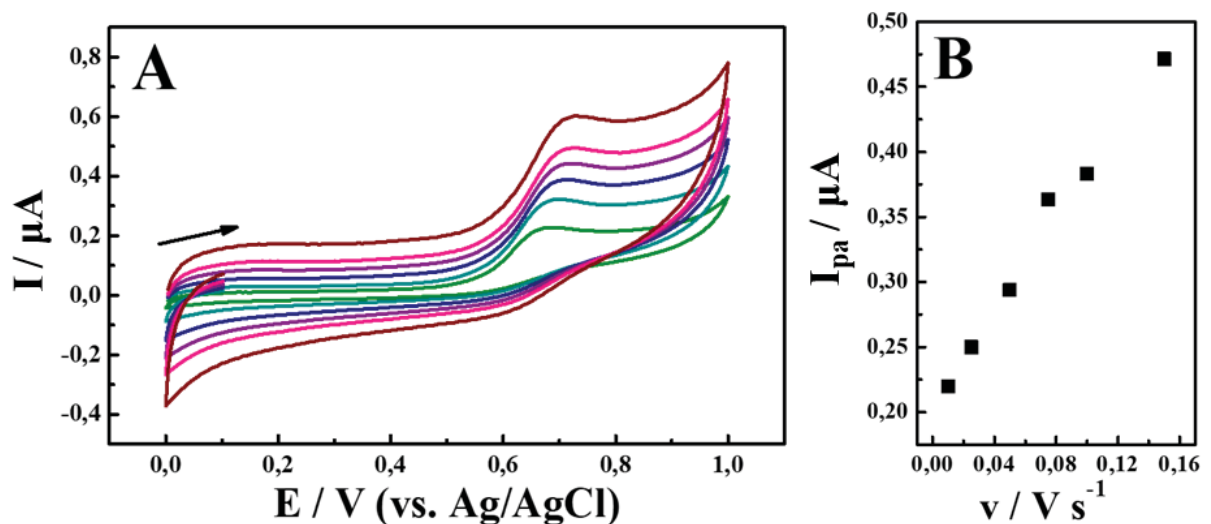
FONTE: a autora



A partir dos voltamogramas da FIGURA 14-A é possível observar um máximo de corrente para o pH 5,0 e um decréscimo de corrente é observado com o aumento dos valores de pH, até pH 7,0. Com base no mecanismo de oxidação descrito na literatura para MT, é esperado que em valores mais elevados de pH ocorra um deslocamento de  $E_p$  sugerindo uma oxidação facilitada nessas condições<sup>83</sup>. A FIGURA 14-B mostra a variação do  $E_{PA}$  vs. pH, na qual foi feita a regressão linear e obtida a seguinte equação:  $E_{PA} / V = -0,033 \text{ pH} + 0,823$ . Esses resultados mostraram que o potencial de oxidação desloca para um valor menos positivo com o aumento do pH, em consequência de a desprotonação ser facilitada em valores mais elevados de pH. A inclinação da curva apresentou valor de  $33,0 \text{ mV pH}^{-1}$  em que sugere uma transferência desigual entre elétrons e prótons<sup>81</sup>, sendo sugerida por Radi e colaboradores<sup>101</sup>, dois elétrons e um próton durante a oxidação da MT.

Em seguida, foi realizado o estudo do efeito da variação da velocidade de varredura no potencial de pico de oxidação e corrente de pico da MT. A FIGURA 15 mostra os resultados obtidos.

FIGURA 15. A) GRÁFICO DE CORRENTE POR POTENCIAL REFERENTE A MT EM JANELA DE POTENCIAL DE 0,0 A 1,0 V, pH 5,0, CONCENTRAÇÃO DE  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  DE PADRÃO DE MT EM DIFERENTES VELOCIDADES DE VARREDURA. (N = 10, 25, 50, 75, 100, 150  $\text{mV s}^{-1}$ ), B) GRÁFICO DE CORRENTE DE PICO VS VELOCIDADE DE VARREDURA



FONTE: a autora

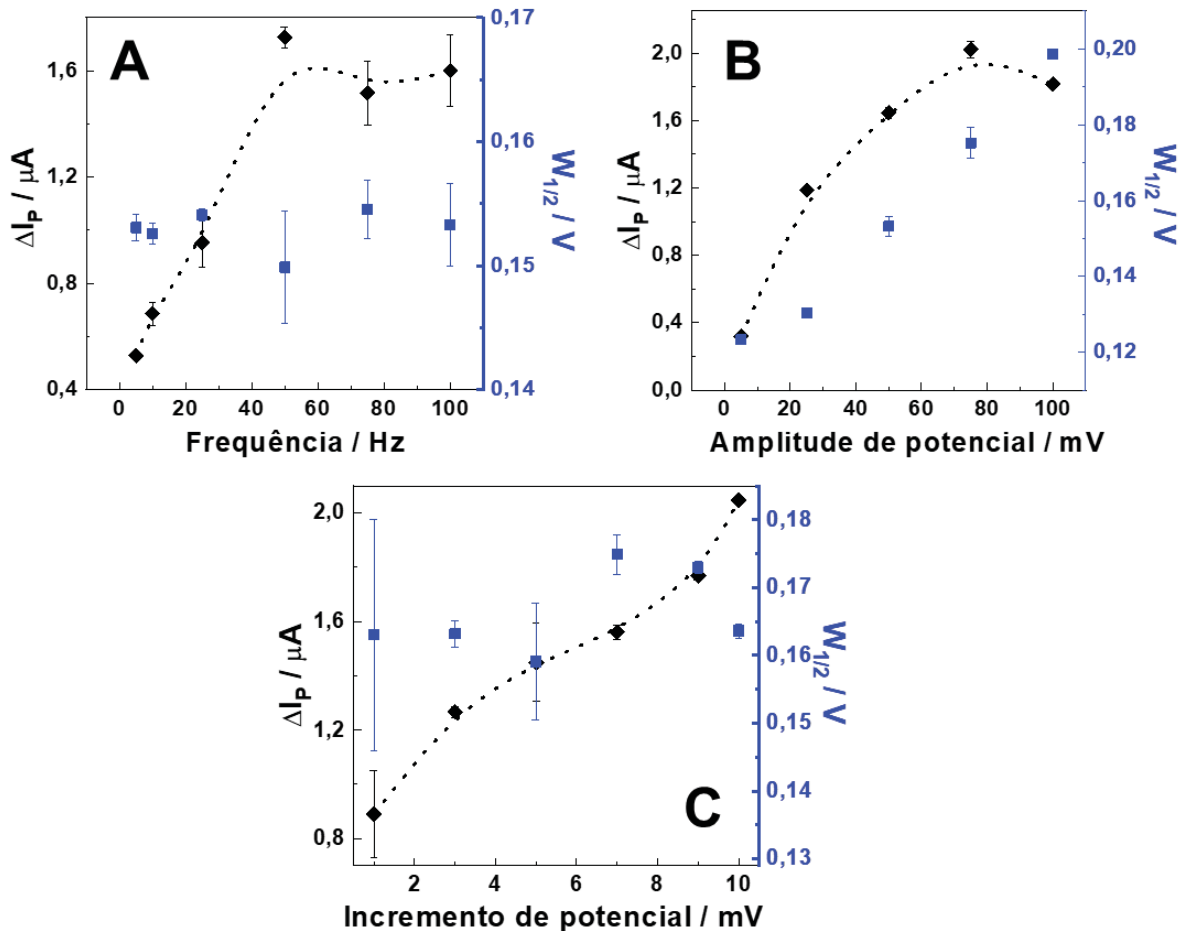
A partir do gráfico na FIGURA 15-B, é notado que há uma dependência linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura ( $I_{PA} = 0,927 v + 0,101$ ,  $R^2 = 0,993$ ), com o transporte de massa controlado por difusão como fator limitante do sistema,



como esperado para o sistema <sup>101,102</sup>.

Os parâmetros da técnica foram otimizados para a obtenção do melhor desempenho sinal obtido em relação a MT utilizando a SWV. Desse modo, foram avaliados a frequência de pulsos que é responsável pela magnitude do sinal analítico, e conseqüentemente na sensibilidade do método, a amplitude de pulso a qual se relaciona com a seletividade do método devido a pulsos maiores levarem ao aumento da largura do pico e o incremento de potencial que se relaciona com a sensibilidade, sendo que valores maiores podem aumentar o sinal obtido, porém aumentar a largura do pico<sup>103</sup>. Os resultados obtidos para a frequência, amplitude de pulso e incremento de potencial são apresentados na FIGURA 16.

FIGURA 16. ESTUDO DE PARÂMETROS DA SWV NA PRESENÇA DE  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> DE MT EM TAMPÃO FOSFATO pH 5,0 EM A) VARIÇÃO DA CORRENTE DE PICO E LARGURA DE POTENCIAL DE MEIA-ALTURA ( $W_{1/2}$ ) OBTIDA PROPORCIONALMENTE A FREQUÊNCIA DE APLICAÇÃO DE PULSOS DE 5 A 100 Hz, A = 75 mV, E = 10 mV B) ESTUDO DE CORRENTE E LARGURA DE  $W_{1/2}$  OBTIDA PROPORCIONALMENTE A AMPLITUDE DE PULSO DE 5 A 100 mV, E = 10 mV, f = 50 Hz C) VARIÇÃO DE CORRENTE E LARGURA DE  $W_{1/2}$  EM FUNÇÃO DO INCREMENTO DE POTENCIAL DE 1 A 10 mV, f = 50 Hz, E = 10 mV



FONTE: a autora

O primeiro parâmetro otimizado foi da frequência, em que é possível observar pela FIGURA 16-A que houve aumento da corrente de pico com seu aumento até o valor de 50 Hz, seguido de um decréscimo de corrente. A frequência está diretamente relacionada com a velocidade em que as ondas de pulso são aplicadas e varridas. Assim, quanto maior o valor da frequência, maior a velocidade de varredura<sup>103</sup>. No outro eixo do gráfico, é mostrado a largura da meia altura, para cada frequência, na qual não apresentou variação significativa da largura obtida, assim foi escolhida a frequência de 50 Hz como valor mais adequado.

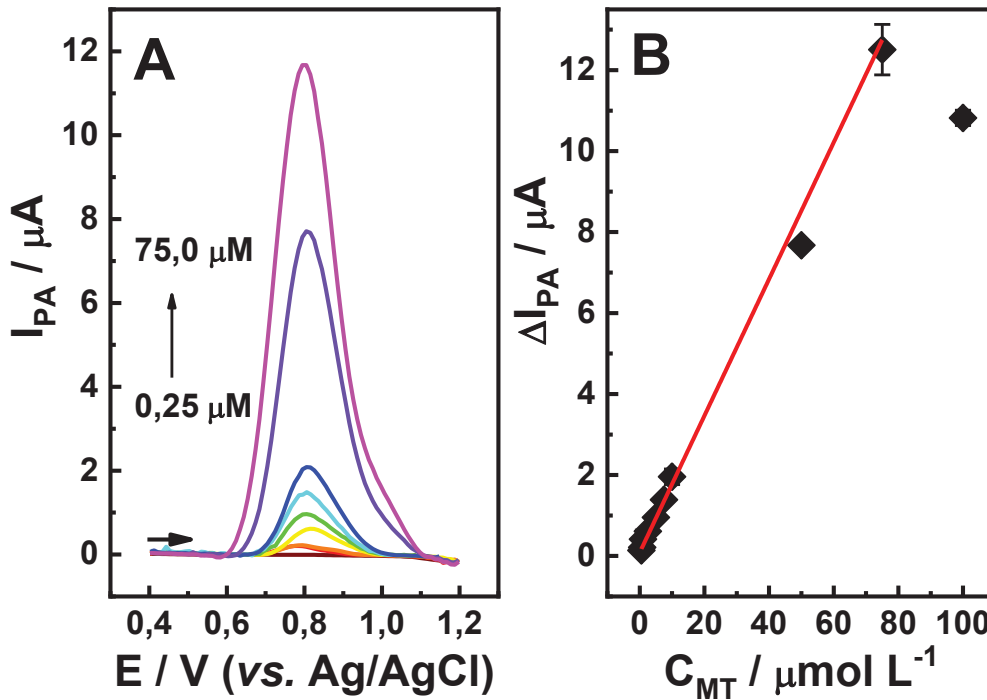
Em seguida foi estudado o parâmetro de amplitude de pulso. Em processos irreversíveis é observado que ocorre a melhora da sensibilidade analítica aumentando-se o valor desse parâmetro. Pela FIGURA 16-B é possível observar um aumento crescente de corrente até 75 mV seguida pela diminuição de corrente, sendo assim escolhido a amplitude de 75 mV como valor mais adequado.

Para o parâmetro do incremento de potencial, os valores de corrente obtidos são apresentados na FIGURA 16-C e é possível perceber que a corrente aumenta com o incremento de potencial, e que não houve variação significativa da largura de pico, com isso um maior valor de incremento pode ser utilizado sem perda de resolução de sinal, sendo assim escolhido o incremento de 10 mV.

#### 4.2.4 Desempenho analítico, efeito de concomitantes e aplicação.

Com todos os parâmetros da metodologia proposta já definidos foi possível obter os sinais analíticos para a construção da curva analítica (FIGURA 17) para a melatonina empregando o SPE como eletrodo de trabalho, além da obtenção dos parâmetros de mérito analítico.

FIGURA 17. A. CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DE MELATONINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,25–75,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  B) CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE ( $n = 3$ ). CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS:  $F = 50 \text{ Hz}$ ;  $\Delta E_A = 75 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_S = 10 \text{ mV}$ .



FONTE: a autora

É possível perceber que há um aumento de corrente linear em função do aumento da concentração de melatonina adicionada em uma faixa estudada de 0,25 – 75,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  observando queda de sinal para o ponto seguinte em rosa (100,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), sendo a faixa linear de resposta entre 0,25 – 75,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Com a regressão linear da curva foi possível obter a equação da reta, sendo esta,  $I (\mu A) = 0,168C (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,0869$ , com boa correlação linear ( $R^2 = 0,99$ ) e boa sensibilidade analítica ( $0,168 \mu A L \mu\text{mol}^{-1}$ ). Para os cálculos de limite de detecção (LOD) foi utilizado a razão de três vezes o desvio da prova em branco pela sensibilidade e limite de quantificação (LOQ) sendo a razão de dez vezes a estimativa do desvio da prova em branco pela sensibilidade<sup>104</sup>, sendo obtido um valor de LOD de 25,9  $\text{nmol L}^{-1}$  e LOQ de 83,3  $\text{nmol L}^{-1}$ .

A fins de comparação com outras metodologias de sensores não-enzimáticos encontradas na literatura, a TABELA 4 apresenta a comparação com diferentes metodologias reportadas.

TABELA 4. COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS ELETROANALÍTICOS EMPREGANDO SENSORES NÃO-ENZIMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MELATONINA

Eletrodo	Amostra	Sensibilidade analítica $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	Faixa linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD $\text{nmol L}^{-1}$	Ref
FeCo@CNFs/GCE	Plasma – Cápsulas	0,022	0,05 – 250,0	2,7	79
AHNS:PdNPs:ErGO/GCE	Urina – Cápsulas	0,12	5 – 100,0	90,0	81
GPT/WPE	Saliva – Urina	0,0583	0,8 – 100,0	32,5	80
MagNPs/Cdots/GCE	-	0,38	0,05 – 13,5	4,4	105
SnO <sub>2</sub> -Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @rGO/CPE	Plasma – Cápsulas	-	0,02 – 6,0	4,1	103
SPE	Saliva – Urina	0,168	0,25 – 75	25,9	Este trabalho

**FeCo@CNFs/GCE:** arranjo de nanofibras de carbono decorado com liga de FeCo

**AHNS:PdNPs:ErGO/GCE:** eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito polimérico de NPs de Pd

**GPT/WPE:** eletrodo de carbono vítreo e eletrodos de papel à prova d'água

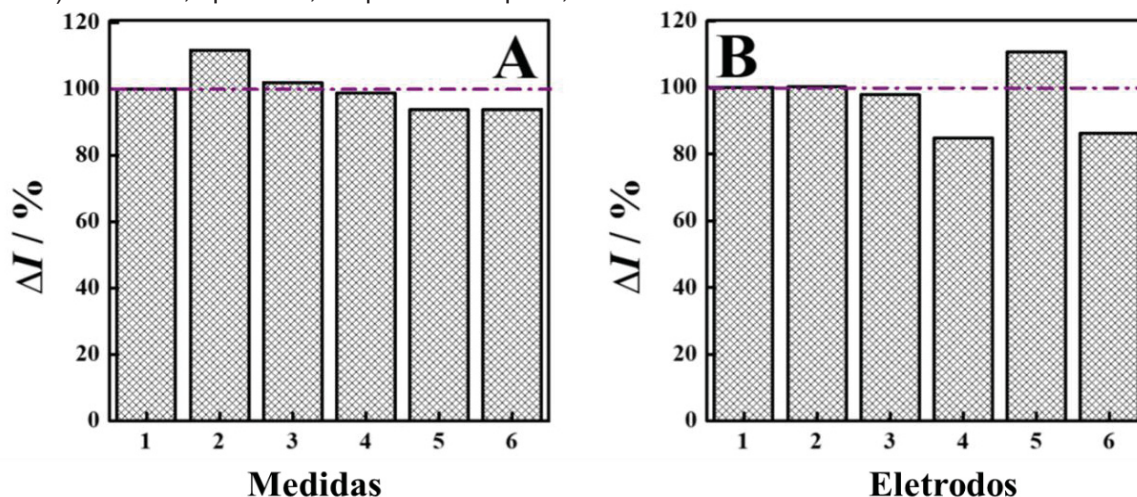
**MagNPs/Cdots/GCE:** eletrodo de carbono vítreo modificado com *quantum dots* de carbono e nanopartículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**SnO<sub>2</sub>-Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@rGO/CPE:** eletrodo de pasta de carbono modificado com óxido de grafeno e decorado com NP de SnO<sub>2</sub>-Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

O sensor proposto é o mais simples quando comparado a outros reportados na literatura<sup>79–81,105,106</sup> utilizando o eletrodo sem modificação e mesmo assim foram obtidos valores intermediários de faixa linear e limite de detecção e sensibilidade analítica.

Para avaliar a similaridade de resposta do sensor proposto, foram feitos estudos de repetibilidade e reprodutibilidade que podem ser vistos na FIGURA 18.

FIGURA 18. GRÁFICOS EM BARRA PARA A) REPETIBILIDADE DE SINAL PARA MEDIDAS CONSECUTIVAS EM UM MESMO ELETRODO.  $C_{MT} = 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , TAMPÃO FOSFATO pH 5,0 E B) REPRODUTIBILIDADE DE SINAL UTILIZANDO ELETRODOS DIFERENTES DE LOTES VARIADOS (N = 6).  $C_{MT} = 10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão fosfato pH 5,0.

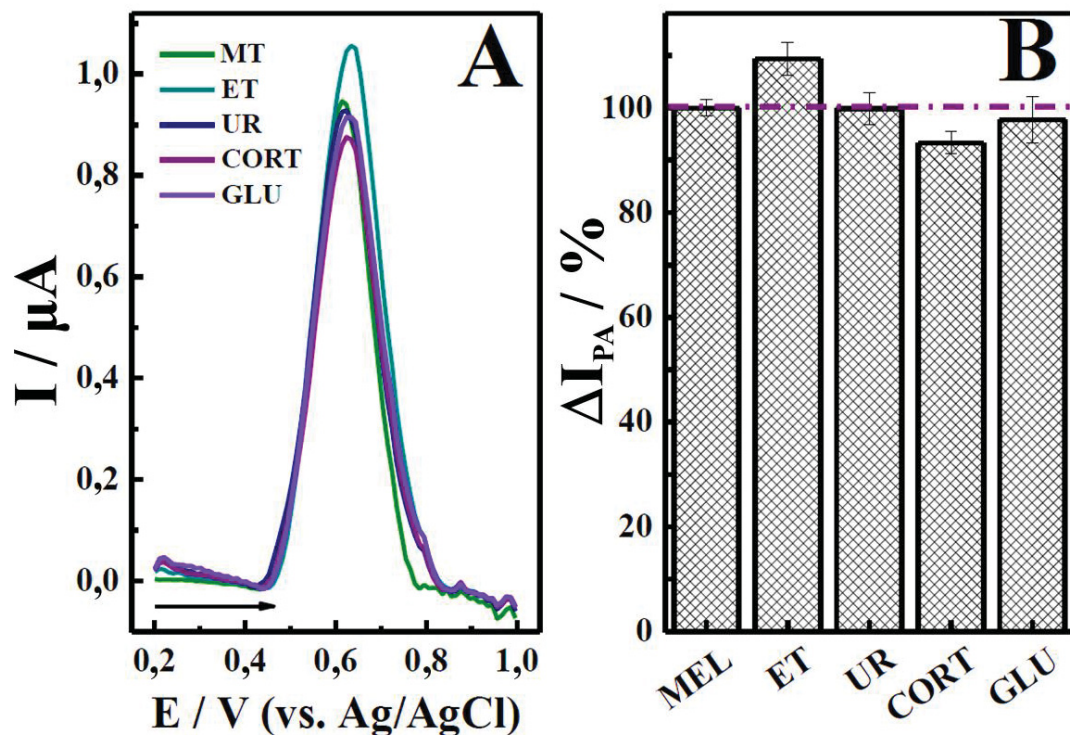


FONTE: a autora

Para o estudo de repetibilidade foram feitas 6 medidas consecutivas utilizando o mesmo eletrodo, enquanto para o estudo de reprodutibilidade foram feitas medidas em 6 eletrodos de diferentes bateladas na presença de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de melatonina para ambos os estudos. O desvio padrão relativo foi de 2,4 e 12,0%, respectivamente, o que indica que mesmo variando os eletrodos foi possível obter sinais precisos, sendo assim uma resposta satisfatória para o sensor proposto.

Além disso foi avaliada a resposta voltamétrica de MT na presença de espécies concomitantes na amostra como cortisol (CORT), glicose (GLU), ureia (UR) e estradiol (ET) na mesma concentração de melatonina ( $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Na FIGURA 19 são apresentados os resultados deste estudo.

FIGURA 19. A) VOLTAMOGRAMAS DE ONDA QUADRADA NA PRESENÇA DE MELATONINA MAIS ESPÉCIES CONCOMITANTES B) GRÁFICO DE VARIAÇÃO MÉDIA DE CORRENTE NO ESTUDO DE INTERFERÊNCIA DE MATRIZ.  $C_{\text{MT}} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $F = 75 \text{ Hz}$ ;  $\Delta E_{\text{P}} = 50 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_{\text{s}} = 10 \text{ mV}$ ; TAMPÃO FOSFATO pH = 5,0.



FONTE: a autora

A partir das variações de corrente obtidas para a melatonina na presença dessas espécies, pode-se observar que não houve variação significativa, sendo assim possível afirmar que as espécies concomitantes na matriz não causam interferência no sinal da MT, em igual concentração a de MT.

Como forma de avaliar o método, foi feita a fortificação de saliva e urina artificial com padrão de melatonina, diluídas em tampão fosfato pH 5,0 em dois níveis (1:2 e 1:10) para ambas as amostras. Os resultados podem ser vistos na TABELA 5.

TABELA 5. RESULTADOS OBTIDOS PARA ANÁLISE POR ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO EM DIFERENTES DILUIÇÕES (1:1 E 1:10) EM AMOSTRAS ARTIFICIAIS DE URINA E DE SALIVA PARA  $n = 3$

Amostra	Diluição	$C_{\text{diluição}} / \mu\text{mol L}^{-1}$	Rec / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Rec / %
Urina	1:1	5,00	$5,20 \pm 0,04$	104,0
	1:10	1,00	$1,02 \pm 0,03$	102,4
Saliva	1:1	5,00	$4,80 \pm 0,08$	95,6
	1:10	1,00	$1,01 \pm 0,02$	101,2

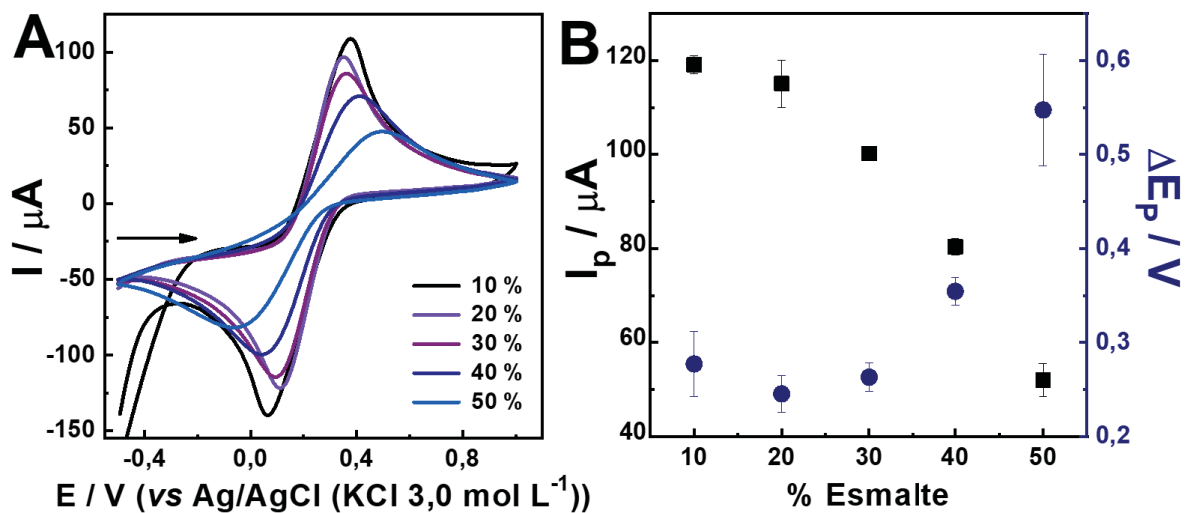
Foram fortificadas amostras de saliva e urina artificiais com alíquotas de 1,5 mL de cada amostra com MT até a concentração final de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Os valores recuperados após a diluição apresentaram variação de 95,6 a 104,0%, indicando que o sensor proposto foi capaz de fazer quantificação do analito proposto em diferentes tipos de amostras.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO PREPARADOS POR IMERSÃO (DWE)

#### 4.3.1 Caracterização eletroquímica dos eletrodos de trabalho preparados por imersão (DWE)

Esse estudo foi feito por CV na presença de íons ferricianeto, o qual apresenta comportamento eletroquímico bem estabelecido, sendo empregado como sonda eletroquímica para avaliar o desempenho dos eletrodos construídos. Os voltamogramas obtidos para os eletrodos construídos com tintas de diferentes composições estão demonstrados na FIGURA 20.

FIGURA 20. A) VOLTAMOGRAMAS DA VARIAÇÃO DE  $I_{PA}$  E  $\Delta E_p$  VARIANDO AS PROPORÇÕES DE ESMALTE NA PRESENÇA DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $v = 0,25 \text{ V s}^{-1}$ . B) VARIAÇÃO DE  $I_p$  E  $E_p$  EM FUNÇÃO DA PROPORÇÃO DE ESMALTE



FONTE: a autora

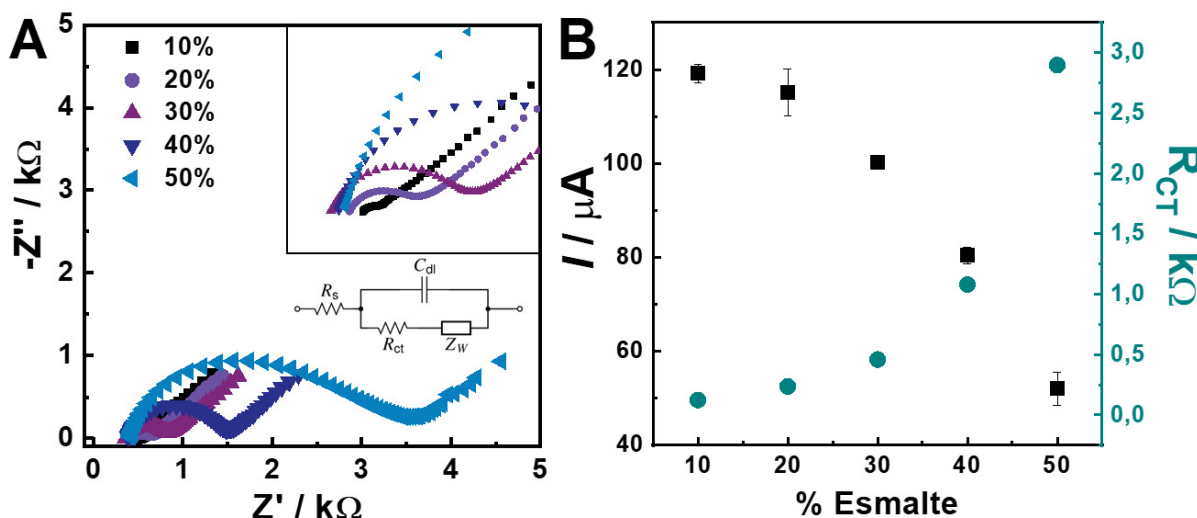
Na FIGURA 20-A é observada uma diminuição nas correntes de pico anódica e catódica conforme aumenta a proporção do esmalte, o que comprova o efeito condutor do grafite e isolante do esmalte na composição da tinta. No gráfico da FIGURA 20-B pode ser visto os valores médios de  $\Delta E_p$  e  $I_p$  anódica para cada proporção de tinta referentes aos voltamogramas da FIGURA 20-A. Além disso também é observado o deslocamento do  $E_p$  tanto de oxidação e de redução, aumentando a diferença entre os picos. A partir do valor de  $\Delta E_p$  pode ser calculado a



constante cinética heterogênea de transferência eletrônica ( $k^0$ ) utilizada como indicativo da performance do eletrodo através da velocidade de transferência eletrônica entre a espécie eletroativa e a superfície do eletrodo. Os valores de  $k^0$  podem ser vistos na TABELA 6 e apresentaram valores concordantes com o trabalho de Randviir<sup>107</sup> para diferentes eletrodos impressos.

Outra caracterização eletroquímica empregada foi a EIS, utilizada para caracterizar o processos envolvidos na interface eletrodo-solução para cada proporção de tinta condutora estudada. A FIGURA 21-A e FIGURA 21-B mostram os diagramas de Nyquist e o gráficos com os valores obtidos para cada composição, respectivamente.

FIGURA 21. A) DIAGRAMA DE NYQUIST PARA CADA PROPORÇÃO DE TINTA CONDUTORA, DE 10% A 50%. INSERT: CIRCUITO ELÉTRICO DE Randles, NA QUAL  $R_s$  É A RESISTÊNCIA ÔHMICA,  $C_{dl}$  É A CAPACITÂNCIA DE DUPLA CAMADA,  $R_{ct}$  É A RESISTÊNCIA A TRANSFERÊNCIA DE CARGA E  $Z_w$  É IMPEDÂNCIA DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA OU WARBURG B) COMPARAÇÃO DA  $I_p$  E  $R_{ct}$  PARA CADA COMPOSIÇÃO DE TINTA CONDUTORA EM MEIO DE SOLUÇÃO DE  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , FREQUÊNCIA DE 100kHz A 10 mHz, AMPLITUDE DE 0,01 V.



FONTE: a autora

Para cada composição de tinta foi avaliado o comportamento impedimétrico a partir de um circuito de Randles, sendo que em regiões de altas frequências, a impedância é associada ao controle cinético e se aproxima da resistência ôhmica ( $R_\Omega$ ), referente a resistência da solução ( $R_s$ ), pois nessa condição o capacitor ( $C_{dl}$ ) atua como condutor e não é carregado. Conforme se avança para regiões de baixa frequência, o capacitor começa a carregar, e a impedância passa a ser medida pela combinação de duas resistências, a  $R_s$  e a  $R_{ct}$  (resistência a transferência de carga),



além disso para frequências ainda menores pode ser observada a impedância de Warburg ( $Z_w$ ) que é associada a transferência de massa pela difusão da sonda avaliada na superfície eletródica<sup>108</sup>.

Assim, pode-se observar na FIGURA 21-A que, para eletrodos com maior quantidade de grafite em sua composição o diagrama possui uma maior contribuição de  $Z_w$ , indicado pela reta em 45° logo após de um pequeno semicírculo, e conforme ocorre o aumento da proporção de esmalte da tinta condutora, há um aumento do diâmetro do semicírculo, indicando que a  $R_{ct}$  da tinta aumenta, ou seja aumenta a polarização na interface eletrodo/solução. Comparando-se os valores de  $R_{ct}$  com os valores de  $I_p$  da sonda eletroquímica, é observado que são inversamente proporcionais. Assim, pode-se inferir que uma melhor performance foi observada nos SPEs com maiores concentrações de grafite em sua composição, sendo escolhido os eletrodos compostos de 20/80 (esmalte:grafite) como a composição com melhor desempenho. Eletrodos com maior porcentagem de grafite apresentaram-se mais quebradiços embora com resultados semelhantes e eletrodos com menores porcentagem de grafite tiveram desempenhos inferiores quando comparados. Os valores de  $I_p$  e  $R_{ct}$  podem ser vistos na TABELA 6, assim como outros parâmetros obtidos. No trabalho de Andreotti e colaboradores<sup>109</sup> foi observado valor semelhante de separação entre picos anódico e catódico de 242 mV, quando comparado ao eletrodo com proporção de 20/80 (esmalte:grafite) em sua composição. Já no trabalho de Silva e colaboradores<sup>34</sup> foi observada uma melhor intensidade de corrente de pico e um perfil mais simétrico nas reações redox para a sonda avaliada nos eletrodos com maior porcentagem do material carbonáceo em sua composição.k

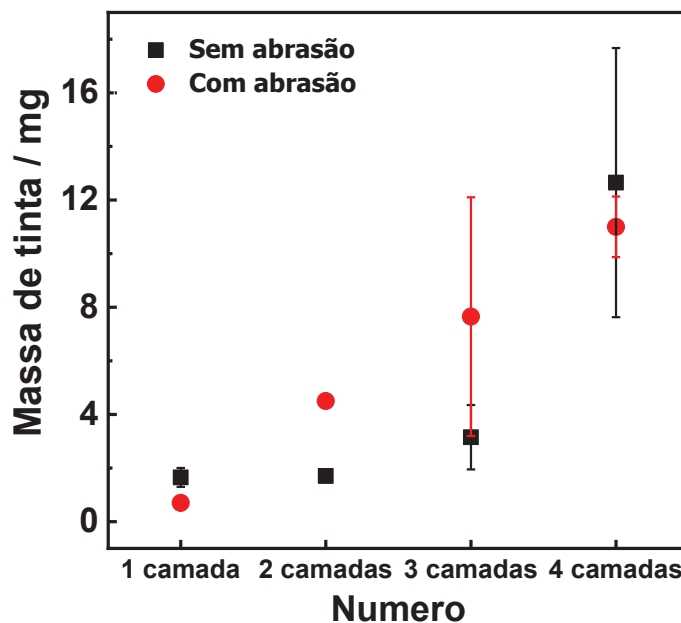
TABELA 6. VARIACÃO DE  $I_{pa}$ ,  $\Delta E_p$ ,  $R_{ct}$ ,  $\Psi$  E  $k_0$  DE ACORDO COM A PROPORÇÃO DE ESMALTE/GRAFITE

Esm/Graf / %	$I_{pa}$ / $\mu A$	$R_{ct}$ / $k\Omega$	$\Delta E_p$ / mV	$\Psi$	$k_0$
10/90	119,1	0,1236	277	0,05475	$2,64 \times 10^{-4}$
20/80	115,1	0,2366	245	0,07164	$3,45 \times 10^{-4}$
30/70	100,2	0,4594	263	0,06116	$2,95 \times 10^{-4}$
40/60	80,38	1,0806	354	0,03626	$1,75 \times 10^{-4}$
50/50	52,01	2,8977	547	--	--

#### 4.3.2 Avaliação de parâmetros físicos dos eletrodos DWE

O estudo de abrasão do suporte foi necessário por ter sido observado nos primeiros testes que a aderência da tinta não tinha sido eficaz. Na FIGURA 22-A é apresentada a variação de massa por camada de tinta na presença e ausência de abrasão (lixando a superfície lisa do suporte).

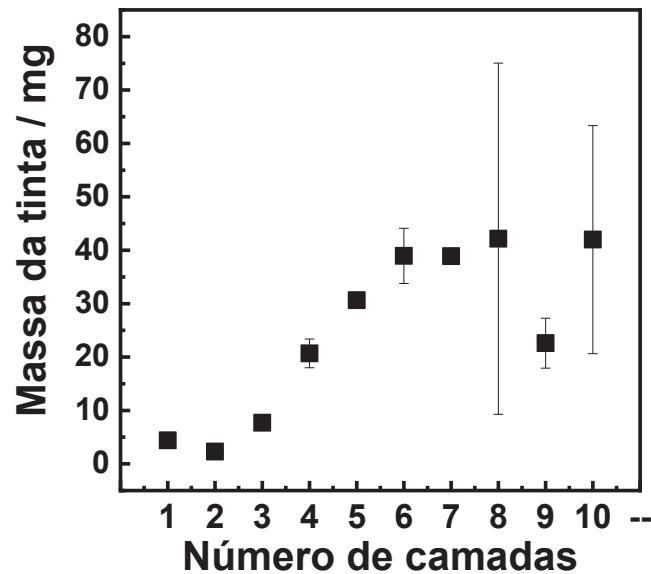
FIGURA 22. GRÁFICO DE VARIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO DA MASSA DE TINTA CONDUTORA NO SUPORTE PLÁSTICO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE ABRASÃO PRÉVIA DA SUPERFÍCIE PARA DIFERENTES NÚMEROS DE CAMADAS DE TINTA



FONTE: a autora

Foi feita uma batelada sem abrasão e outra com abrasão para este estudo. Na FIGURA 22 não é vista variação significativa da massa de tinta depositada na superfície para uma camada, mas conforme se aumenta o número de camadas, o valor médio do eletrodo com abrasão se apresentou maior para duas e três camadas e com quatro camadas se mostrou com uma variação de massa menor, o que pode indicar que a variação de massa depositada independe da abrasão. Porém, ao se manusear o eletrodo já seco, a tinta depositada na superfície teve uma melhor aderência para aqueles que receberam a abrasão. Com isso foi decidido utilizar uma abrasão do suporte plástico antes da deposição da tinta.

FIGURA 2332 GRÁFICO DE VARIAÇÃO DA MASSA DE TINTA DEPOSITADA EM ELETRODOS (n = 3) DE 1 A 10 CAMADAS

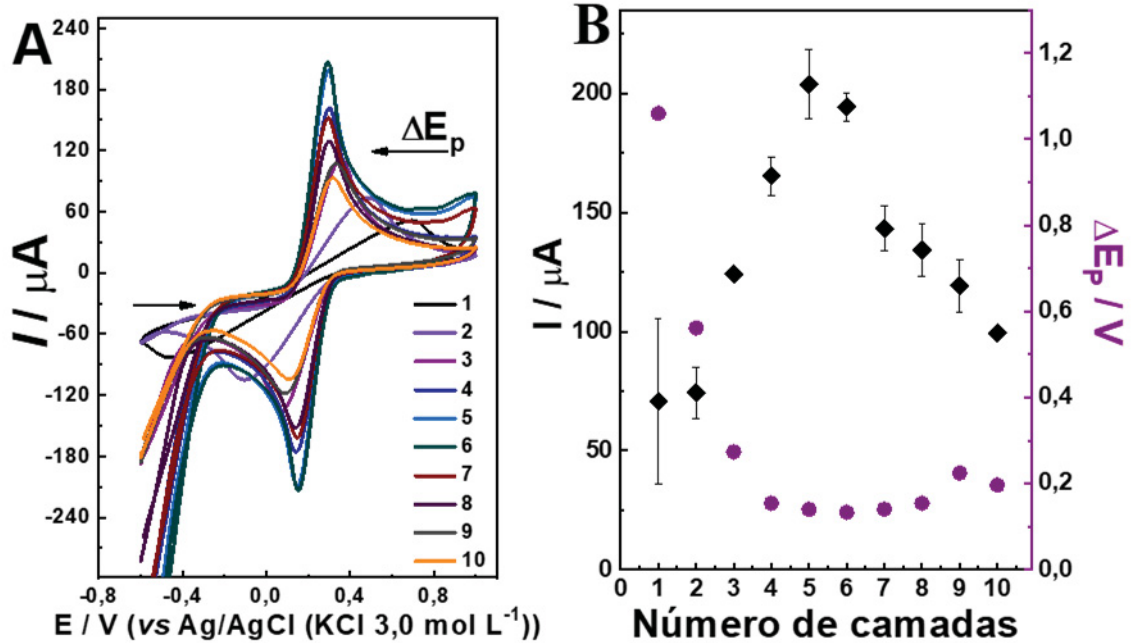


FONTE: a autora

A FIGURA 23 mostra a variação de massa de tinta por camada, em miligramas, que foi depositado na superfície do material plástico. Foram feitas diversas quantidades de tintas para cada eletrodo para evitar que faltasse tinta e evitar que um eletrodo recebesse uma tinta diferente entre camadas o que deixaria sua composição irregular. Foi feita previamente a pesagem do plástico, pesado depois de seco e calculado o  $\Delta m_{\text{tinta condutora}}$ . Entre 1 e 3 camadas não foi verificada uma mudança significativa na massa depositada, após o isso o valor aumenta até 5 camadas e depois começa a ser observado uma grande variação na quantidade em massa que foi depositada como pode ser visto para 8 a 10 camadas.

Observando os resultados do estudo de massa depositada por camada, foi avaliado o comportamento de cada eletrodo empregando a técnica de voltametria cíclica utilizando ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica. A FIGURA 24-A mostra os perfis de voltametria cíclica para cada eletrodo de 1 a 10 camadas e a FIGURA 24-B mostra a magnitude da corrente de pico e o deslocamento de potencial de pico obtidos pela voltametria cíclica.

FIGURA 24. VOLTAMETRIA CÍCLICA DE  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO EM KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\nu = 0,25 \text{ mV s}^{-1}$  EM DIFERENTES ELETRODOS, VARIANDO-SE DE 1 A 10 CAMADAS DE TINTA CONDUTORA POR ELETRODO. DETALHE: AMPLIAÇÃO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO PARA ELETRODOS DE 1 E 2 CAMADAS. B) VARIAÇÃO DA CORRENTE DE PICO E POTENCIAL EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CAMADAS



FONTE: a autora

Foi observado um aumento na corrente de pico anódica do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  para os eletrodos que receberam até cinco camadas. A partir de 6 camadas, é observada a diminuição da corrente, este fator pode estar relacionado ao eletrodo se tornar mais quebradiço com o aumento das camadas de tinta, e assim perder parte do material condutor em seu manuseio, e por consequência diminuição da  $I_p$  coletada. Portanto, escolheu-se o número de 5 camadas, como valor ótimo para os estudos seguintes.

Na TABELA 7 é apresentado um resumo dos parâmetros avaliados e otimizados para o DWE.

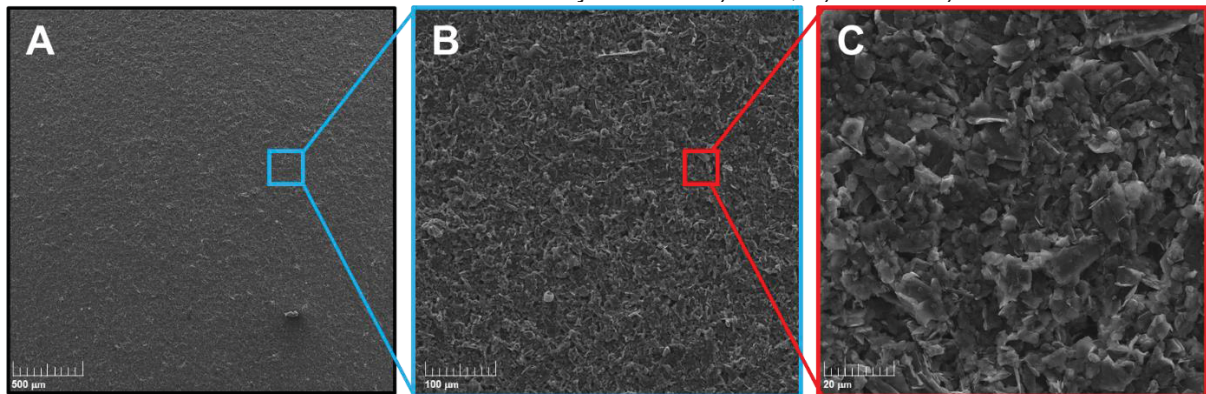
TABELA 7. PARÂMETROS AVALIADOS PARA A CONSTRUÇÃO DO DWE

Parâmetros Avaliados	Faixa / 100 mg de tinta	Parâmetros Otimizados
Abrasão do suporte	Sem/Com	Com
Composição	50 – 90% de grafite	80% de grafite
Número de camadas	1 – 10 camadas	5 camadas
Tipo de solvente	Acetato de etila e acetona	Acetato de etila

#### 4.3.3 Caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura do DWE

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura na caracterização da superfície do DWE para verificar a dispersão da tinta condutora sobre o substrato plástico e as imagens estão demonstradas na FIGURA 25.

FIGURA 25. IMAGEM REPRESENTATIVA OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS DWE OTIMIZADO. AMPLIAÇÕES EM A) 100X, B) 500X E C) 1000X



FONTE: a autora

Pode ser observada uma boa homogeneização da tinta condutora com essa estratégia de impressão, apresentando excelente recobrimento para o DWE otimizado (80% de grafite em sua composição). Nas imagens com maior ampliação é possível observar todo o recobrimento do suporte pelo compósito grafite/esmalte, com sólidos dos dois materiais, sem uma separação ou desagregação do compósito.

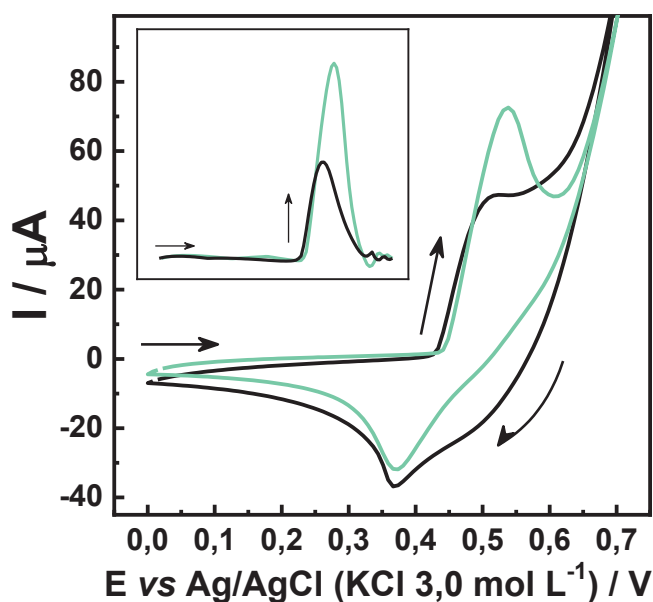
#### 4.3.4 Desenvolvimento de metodologia não-enzimática para detecção de colesterol empregando DWE modificado com níquel em sistema microfluídico

O comportamento voltamétrico do sistema proposto foi inicialmente estudado por CV e para fins analíticos foi empregada a amperometria, sendo a CV utilizada para formação do par redox da espécie catalítica e observar o perfil da reação de oxidação química pelo mediador redox. Já a amperometria foi utilizada avaliando-se a relação entre concentração adicionada e sinal de corrente obtido de forma proporcional, sendo otimizado parâmetros relacionados ao par redox e ao sistema microfluídico para melhor obtenção da curva analítica, e assim ser possível aplicar o estudo de adição e recuperação em amostra de plasma sanguíneo.

Como avaliação inicial para a determinação do colesterol, foi empregada uma

metodologia não-enzimática fazendo-se a catálise através de um mediador redox utilizando o DWE. Foi realizado um pré-tratamento do eletrodo em meio alcalino, para um melhor ancoramento de íons  $\text{Ni}^{2+}$ , e posteriormente, sob condições adequadas, formação do par  $\text{Ni(II)/Ni(III)}$ , como descrito na metodologia (seção 3.8.7). Esta estratégia foi adotada devido as excelentes propriedades electrocatalíticas do  $\text{Ni(III)}$ , que foi amplamente empregado como um modificador de eletrodos, promovendo a eletro-oxidação catalítica do analito, a partir do par redox  $\text{Ni(II)/Ni(III)}$ , que permite a determinação não-enzimática de diversas espécies <sup>110–112</sup>. O perfil voltamétrico obtido está representado na FIGURA 26 na presença e ausência de colesterol.

FIGURA 26. PERFIL VOLTAMÉTRICO DO  $\text{Ni(II)/Ni(III)}$  EM DWE NA AUSÊNCIA (– PRETO) E PRESENÇA (– VERDE) DE COLESTEROL  $10,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $V = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ . INSERT: CORREÇÃO DE LINHA BASE DE FAIXA DE CORRENTE DE 0,2 A 0,7 V EVIDENCIANDO A OXIDAÇÃO DE  $\text{Ni(III)}$  EM PRETO E OXIDAÇÃO DE  $\text{Ni(III)}$  E COLESTEROL EM VERDE.

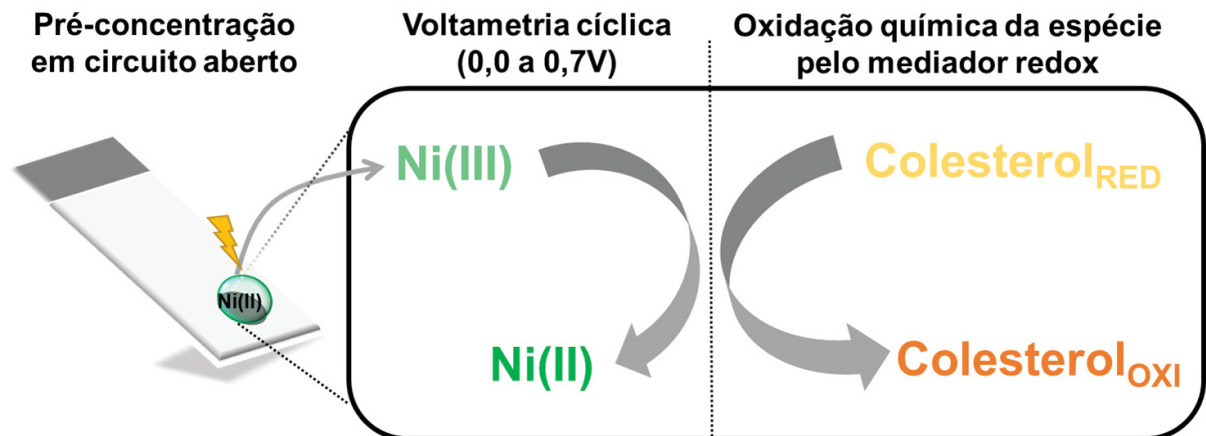


FONTE: a autora

Na FIGURA 26 pode ser visto em preto o voltamograma cíclico do eletrodo contendo íons  $\text{Ni(II)}$  previamente adsorvidos na superfície do eletrodo de trabalho. Há na varredura direta a formação de  $\text{NiOOH}$  ( $\text{Ni(III)}$ ) próximo a 0,55 V e, na varredura reversa, é observada a respectiva redução próxima a 0,35 V levando a formação de  $\text{Ni(OH)}_2$ . Em verde o voltamograma cíclico do mesmo eletrodo com a presença do colesterol, onde pode ser observado pelo *insert* da FIGURA 26 um aumento da corrente de oxidação de aproximadamente duas vezes. Além disso, ocorre a diminuição na corrente do processo de redução, evidenciando a formação de  $\text{Ni(OH)}_2$ ,

que é consumido para a formação de seu par, Ni(III) para catalisar novamente a oxidação do colesterol. A FIGURA 27 mostra um esquema ilustrativo de como a reação catalítica sugerida deve ocorrer na superfície do SPE.

FIGURA 27. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DO COLESTEROL



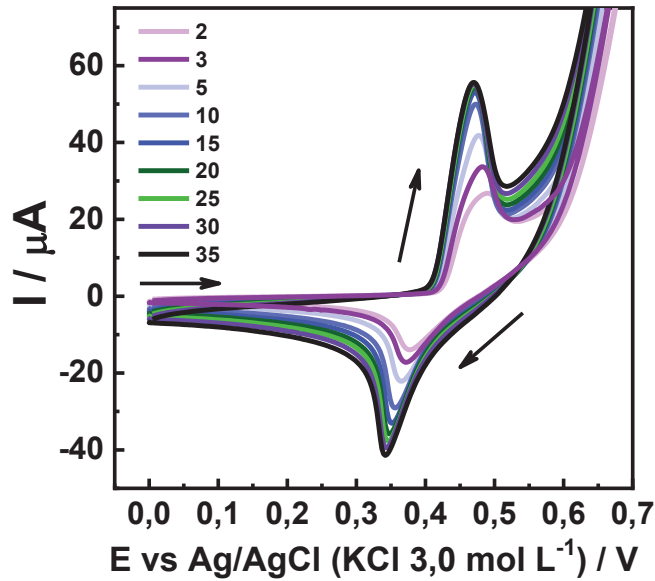
FONTE: a autora

Inicialmente, o Ni(III) é formado na etapa eletroquímica através da CV, em seguida, já no sistema microfluídico, é empregada a cronoamperometria em um potencial fixo na região próxima ao pico de oxidação do níquel, em 0,55 V, em que a espécie reativa está presente para catalisar a oxidação do analito e então, ocorra seu consumo da superfície do eletrodo de trabalho, gerando um sinal transiente. Contudo, esse potencial aplicado ainda é suficiente para reoxidar a espécie catalítica de Ni(II) para Ni(III), podendo ser novamente utilizada para a catálise de uma próxima injeção da amostra.

Um estudo foi realizado para avaliar o número de ciclos necessários para a formação do par Ni(II)/Ni(III) na superfície do DWE até atingir a estabilidade. A FIGURA 28 mostra os voltamogramas obtidos.



FIGURA 28. A) VOLTAMOGRAMAS DO DWE NA PRESENÇA DE  $\text{Ni}(\text{OH})_2/\text{NiOOH}$  DE 1 A 35 CICLOS  $V = 0,025 \text{ V s}^{-1}$ ,  $\text{KOH } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$



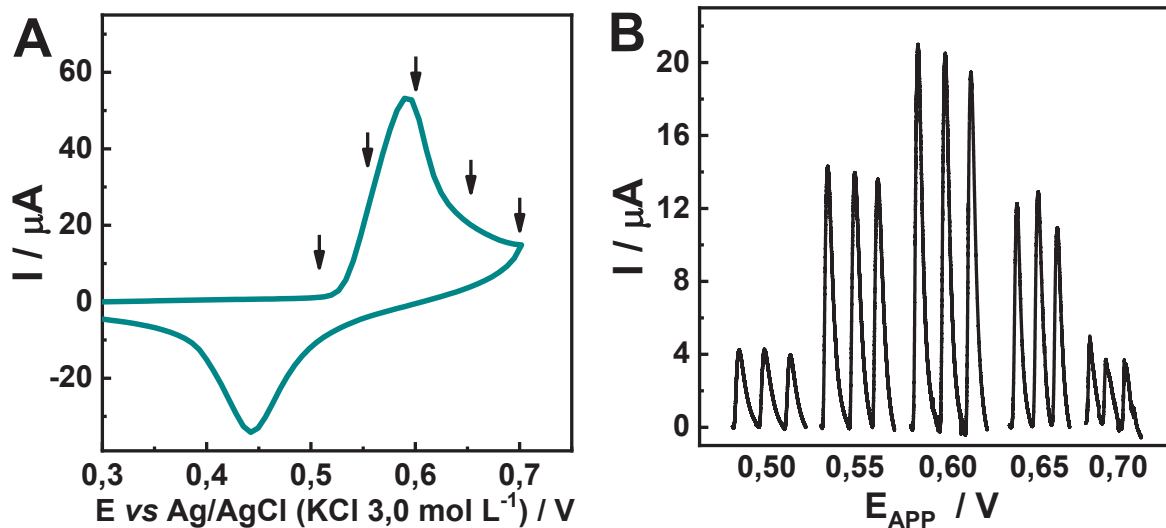
FONTE: a autora

Foram efetuadas 35 varreduras por voltametria cíclica, na qual pode-se observar um crescimento na corrente de pico anódico, em que com o acréscimo de cada varredura, ocorre uma formação maior do par  $\text{Ni}(\text{II})/\text{Ni}(\text{III})$ , uma vez que mais íons níquel estão disponíveis para essa reação eletroquímica em meio alcalino. O valor atinge um patamar em 25 ciclos, sendo que a partir dele tem-se uma estabilização da corrente até o término, em 35 ciclos. Sendo assim, em decorrência da estabilidade foi escolhido utilizar 25 ciclos como quantidade suficiente para formação do par para modificar o DWE com níquel.

Em seguida, foi realizado o estudo de potencial através de amperometria para escolha do melhor potencial de oxidação do colesterol pelo par redox  $\text{Ni}(\text{II})/\text{Ni}(\text{III})$  em meio alcalino, que é apresentado na FIGURA 29.



FIGURA 29. A) VOLTAMETRIA CÍCLICA DO NI/DWE EM KOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, V = 0,025 V s<sup>-1</sup>. B) SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS POR AMPEROMETRIA DE PELA INJEÇÃO DE PADRÃO DE COLESTEROL NA CONCENTRAÇÃO DE 1,0X10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> EM TRIPLICATA NOS POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE 0,50, 0,55, 0,60, 0,65 E 0,70 V

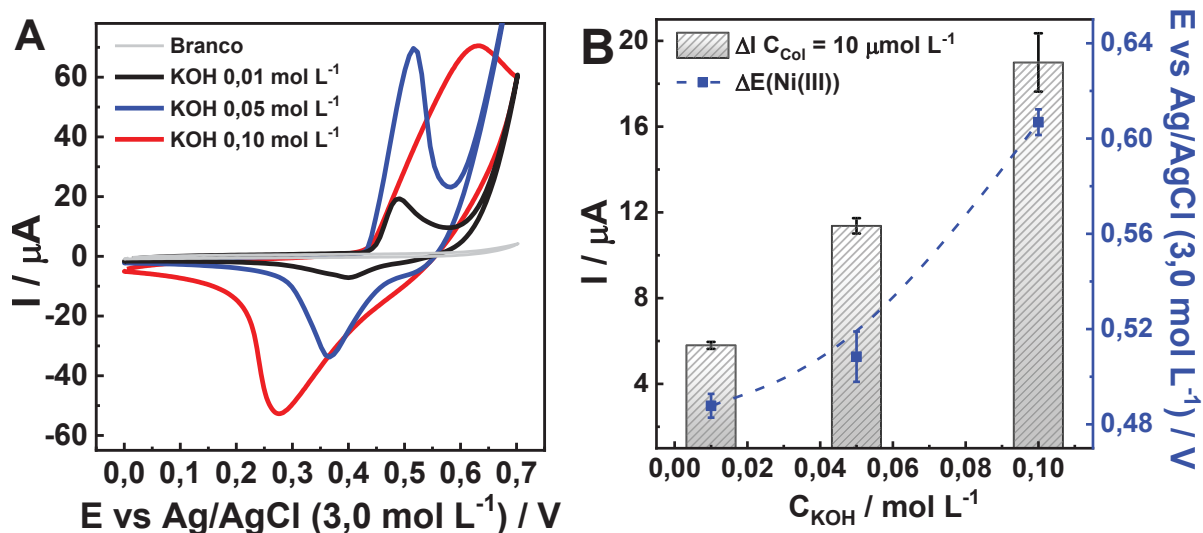


FONTE: a autora

Primeiramente pode ser observada na FIGURA 29-A, o perfil do par redox de níquel. O Ni/ DWE foi acoplado ao  $\mu$ TED e foram feitas adições de alíquotas de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em triplicata, indicada pela FIGURA 29-B. Pode-se observar um aumento da corrente até o potencial de 0,60 V, seguida da diminuição para potenciais mais positivos. Desse modo, o potencial de 0,60 V é suficiente para que a espécie reativa, Ni(III), reaja com o colesterol para uma espécie oxidada, sendo consumida e formando a espécie Ni(II). Como o valor de potencial ainda é alto o suficiente, ocorre novamente a formação da espécie catalítica e possibilita a reação de oxidação o colesterol acontecer novamente<sup>96,113</sup>.

Outro estudo realizado foi da concentração do eletrólito suporte (KOH) utilizado na diluição das soluções padrão de colesterol e como solução transportadora que passa através do canal microfluídico. As medidas foram feitas nas concentrações de 0,01 mol L<sup>-1</sup>, 0,05 mol L<sup>-1</sup> e 0,10 mol L<sup>-1</sup> como pode ser visto na FIGURA 30.

FIGURA 30. A) VOLTAMOGRAMA DE NI/ DWE EM KOH (—) 0,01 mol L<sup>-1</sup>, (—) 0,05 mol L<sup>-1</sup> E (—) 0,10 mol L<sup>-1</sup> NA PRESENÇA DE 1,0 X 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> DE PADRÃO DE COLESTEROL, V = 0,025 V s<sup>-1</sup> B) GRÁFICO DE I<sub>PA</sub> VS CONCENTRAÇÃO DE KOH EM 0,01 mol L<sup>-1</sup>, 0,05 mol L<sup>-1</sup> E 0,1 mol L<sup>-1</sup> NA PRESENÇA DE 1,0 X 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> DE PADRÃO DE COLESTEROL E EM OUTRO EIXO E<sub>PA</sub> VS CONCENTRAÇÃO DE KOH NAS MESMAS CONDIÇÕES PARA A MESMA CONCENTRAÇÃO DE PADRÃO.

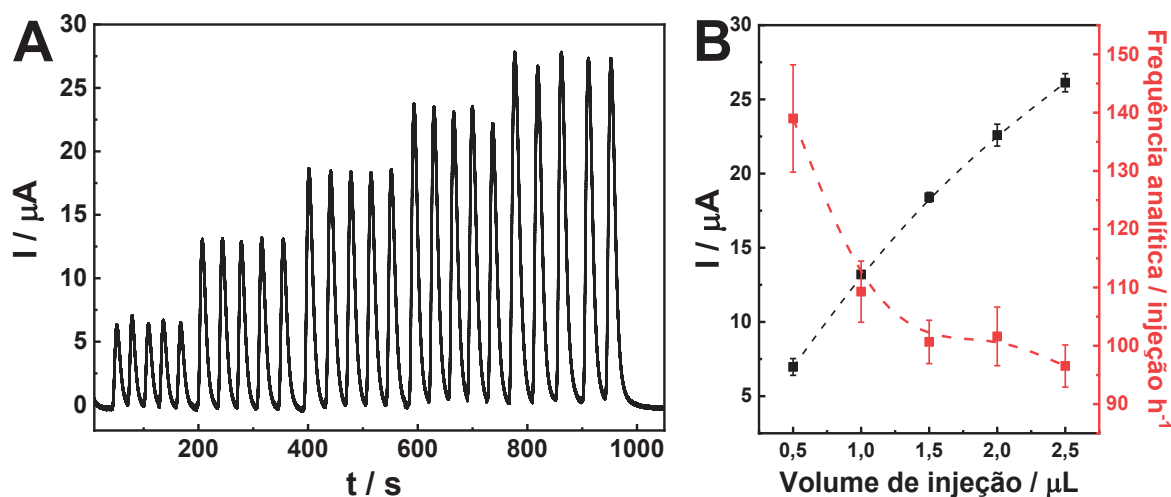


FONTE: a autora

O estudo da concentração de hidróxido de potássio foi importante ser realizado devido ao par redox possuir excelentes atividades eletrocatalíticas em meio alcalino, podendo assim ser observado um incremento de corrente com o aumento da concentração de KOH, como visto na FIGURA 30-B. Apesar disso, com o aumento da concentração foi observado um deslocamento do pico de oxidação do Ni(III), de 0,49 para 0,61 V (FIGURA 30-A), sendo observado também a formação de bolhas na superfície do eletrodo, provavelmente de oxigênio, durante a varredura. Com o aumento de corrente na região do pico e deslocamento do E<sub>p</sub>, os sinais transientes durante a amperometria tiveram um aumento de ruído, dificultando diferenciar o sinal amperométrico da amostra em relação a linha base devido às bolhas. Assim, a concentração do eletrólito escolhida foi de 0,05 mol L<sup>-1</sup> para formação do par redox da espécie catalítica.

Após as otimizações do eletrólito e potencial de oxidação foi feito o estudo de volume de injeção no sistema microfluídico para verificar sua influência na resposta amperométrica e na frequência analítica. O volume das amostras injetadas foi variado de 0,5 a 2,5 μL, sendo os resultados apresentados na FIGURA 31.

FIGURA 31. A) SINAIS TRANSIENTES REFERENTE A INJEÇÃO DE ALÍQUOTAS NA CONCENTRAÇÃO DE  $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  DE COLESTEROL SOLUBILIZADAS EM KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ( $n = 5$ ) EM  $E = 0,55\text{V}$  E EM ORDEM CRESCENTE DE VOLUME DE INJEÇÃO ( $0,5 \mu\text{L}$ ,  $1,0 \mu\text{L}$ ,  $1,5 \mu\text{L}$ ,  $2,0 \mu\text{L}$  E  $2,5 \mu\text{L}$ ). B) RESPOSTA AMPEROMÉTRICA (●) E FREQUÊNCIA ANALÍTICA (■) EM FUNÇÃO DO VOLUME DE INJEÇÃO DE COLESTEROL. INJEÇÃO DE ALÍQUOTAS DE  $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  DE COLESTEROL SOLUBILIZADAS EM KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  ( $n = 5$ ) EM  $E_{\text{APLICADO}} = 0,55 \text{ V}$



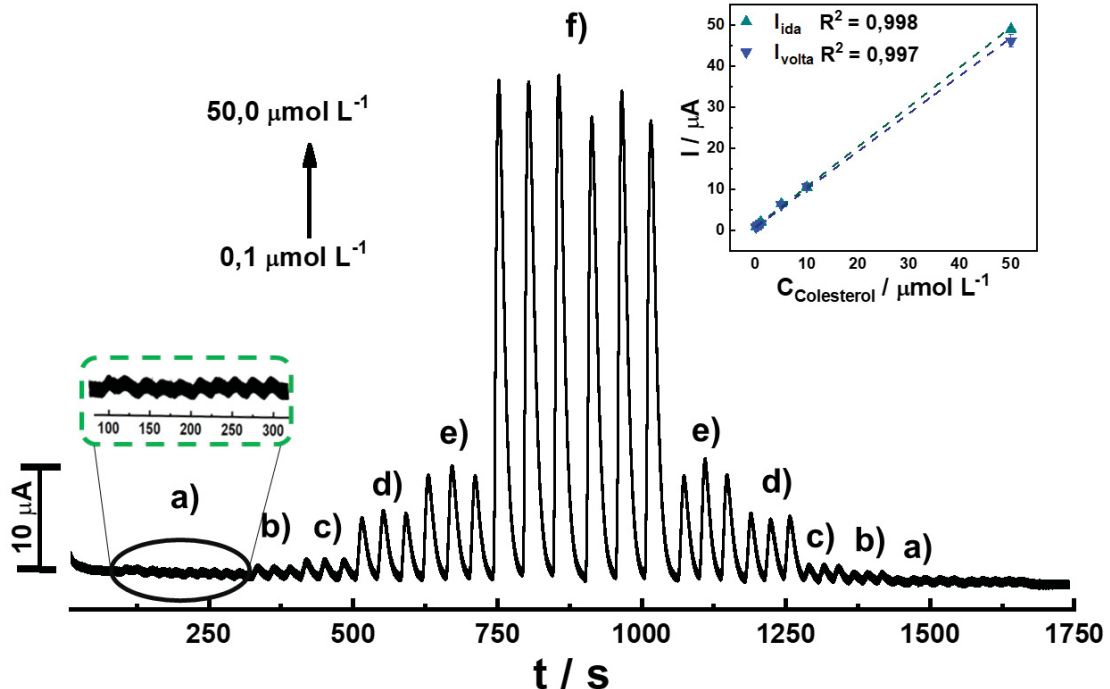
FONTE: a autora

Pela FIGURA 31 pode ser observado um aumento no valor de corrente conforme se aumenta o volume de injeção até o valor de  $2,5 \mu\text{L}$ , após esse volume observa-se que há uma menor precisão na resposta amperométrica devido provavelmente a saturação do canal microfluídico ao transportar a solução com possíveis vazamentos devido ao aumento de solução transportada pelos fios de algodão. Além disso, a frequência analítica é inversamente proporcional ao volume de injeção, devido a necessidade de um maior tempo de limpeza entre cada injeção que foi necessário para evitar a sobreposição dos sinais transientes. Com isso, foi escolhido trabalhar com o volume de injeção de  $2,0 \mu\text{L}$ , que se apresentou adequado e com frequência analítica de aproximadamente 100 injeções/hora.

#### 4.3.5 Desempenho analítico, efeito de concomitantes e aplicação.

Depois de escolhidas as melhores condições relacionadas ao sistema, foi feita a construção de uma curva analítica empregando a amperometria, fazendo uso de todas as condições anteriormente otimizadas. A FIGURA 32 mostra os sinais transientes obtidos com a injeção de diferentes concentrações de colesterol bem como a curva analítica.

FIGURA 32. CRONOAMPEROGRAMA COM SINAIS TRANSIENTES DA CURVA ANALÍTICA DE COLESTEROL COM CONCENTRAÇÕES VARIANDO DE  $1,0 \times 10^{-7}$  A  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  EM KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ . DETALHE: CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE DIFERENCIANDO CORRENTE DE IDA (A-F) E DE VOLTA (F-A)



FONTE: a autora

O sistema microfluídico foi montado e as adições foram feitas em ordem crescente e decrescente de concentração em triplicata (cada sinal transiente corresponde a uma adição independente), variando de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , que foi definida como faixa linear através da obtenção de uma correlação linear,  $R^2 = 0,998$ , com a equação da reta correspondente a  $I(\mu\text{A}) = 0,10 + 0,97 C_{\text{colesterol}}(\mu\text{mol L}^{-1})$ . Para os cálculos de limite de detecção (LOD) foi usada a expressão  $\text{LOD} = 3\text{SD}/b$  e para o limite de quantificação (LOQ) foi usada  $\text{LOQ} = 10\text{SD}/b$ <sup>104</sup>. Sendo SD o desvio padrão de 5 medidas consecutivas da prova em branco e b o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica. Com os dados da equação da reta foi possível calcular valores de LOD, LOQ e sensibilidade de  $0,083 \text{ nmol L}^{-1}$ ,  $0,277 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $0,98 \mu\text{A L} \mu\text{mol}^{-1}$ , respectivamente. Com a análise da TABELA 8, nota-se que os resultados obtidos para o sistema microfluídico com eletrodos *lab-made* para determinação não-enzimática de colesterol mostra que foram atingidos valores baixos de LOD, condizentes com a literatura, e a faixa linear, apesar de não tão extensa, inicia-se em um valor menor que todos os outros trabalhos.

TABELA 8. COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE SENSORES E BIOSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL

(Bio)Sensor	Método	Faixa Linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref
<b>CHER&amp;CHOD/AuNPs/SPE</b>	Voltametria de onda quadrada com redissolução anódica	5,0 – 5000 $\mu\text{g/mL}$	3,0 $\mu\text{g/mL}$	88
<b>ChOx/MoS<sub>2</sub>-AuNPs/GCE</b>	Amperometria	0,5 – 48	0,26	91
<b>Pt/Pan/ChOx</b>	Amperometria	10 – 100	-	92
<b>Cu<sub>2</sub>O-TNT</b>	Amperometria	24,4 – 622	0,05	94
<b>Ni/DWE</b>	Amperometria em fluxo	0,1 – 50	0,083	Este trabalho

Colesterol Estearase e Colesterol Oxidase/NPs de ouro/eletrodo impresso

(CHER&CHOD/AuNPs/SPE);

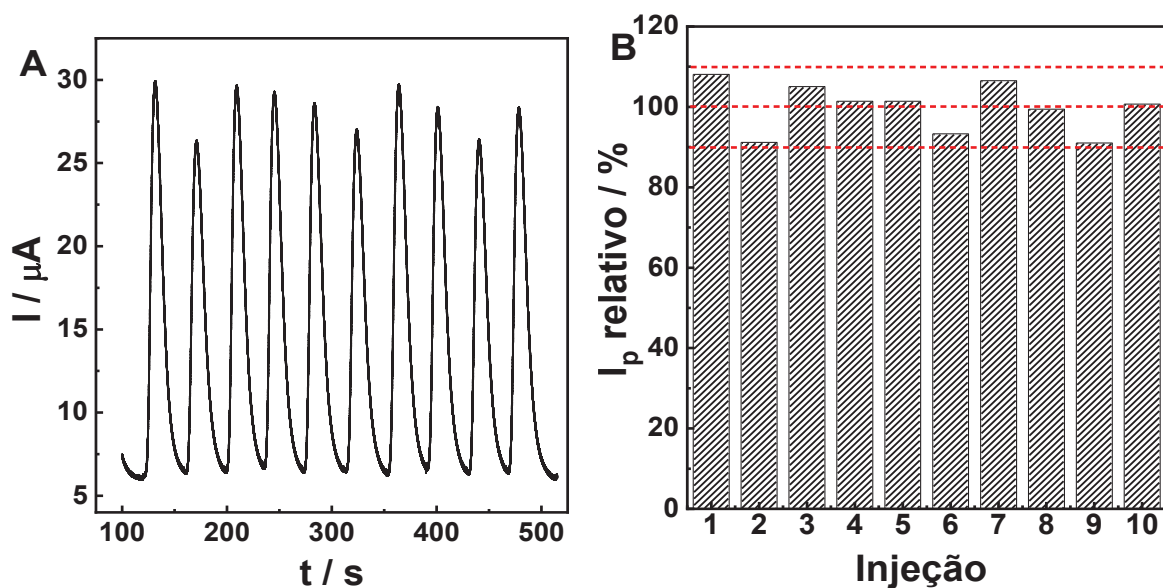
Colesterol Oxidase/Dissulfeto de Molibdênio-NPs de ouro/Eletrodo de carbono vítreo

(ChOx/MoS<sub>2</sub>-AuNPs/GCE);

Platina/Polianilina/Colesterol Oxidase (Pt/Pan/ChOx);

Óxido de cobre Nanotubos de óxido de titânio (Cu<sub>2</sub>O-TNT).

Após a obtenção da curva analítica, foi feito um estudo de repetibilidade de injeção, na qual foram feitas dez injeções consecutivas de 2,0  $\mu\text{L}$  de solução padrão de colesterol na concentração de  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . A seguir é mostrada a FIGURA 33-A os sinais transientes e na FIGURA 33-B a variação média de corrente.

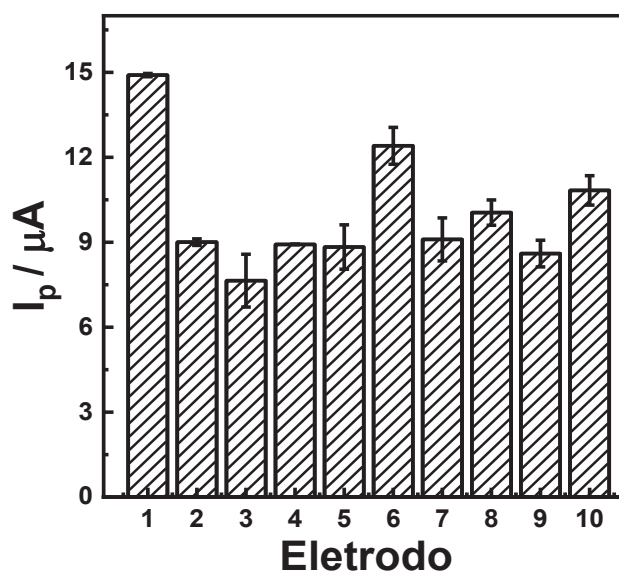
FIGURA 33. A) SINAIS TRANSIENTES DA INJEÇÃO DE PADRÃO DE COLESTEROL  $5,0 \times 10^{-5} \text{ MOL L}^{-1}$  E B) VARIAÇÃO DE CORRENTE MÉDIA DADA EM PORCENTAGEM

FONTE: a autora

A partir dos resultados obtidos é possível verificar que os sinais transientes

mostraram variações pequenas para sucessivas injeções, apresentando RSD de 6,24%, o que indica boa estabilidade do eletrodo e fluxo de solução adequado no sistema microfluídico. Em seguida foi feito o estudo de reprodutibilidade dos eletrodos (FIGURA 34), em que foram empregados 10 eletrodos diferentes, com injeções de 2,0  $\mu\text{L}$ , em triplicata, de uma solução padrão na concentração de  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de colesterol.

FIGURA 34. CORRENTE MÉDIA PARA 3 INJEÇÕES DE 10 ELETRODOS DIFERENTES NA MESMA CONCENTRAÇÃO DE COLESTEROL



FONTE: a autora

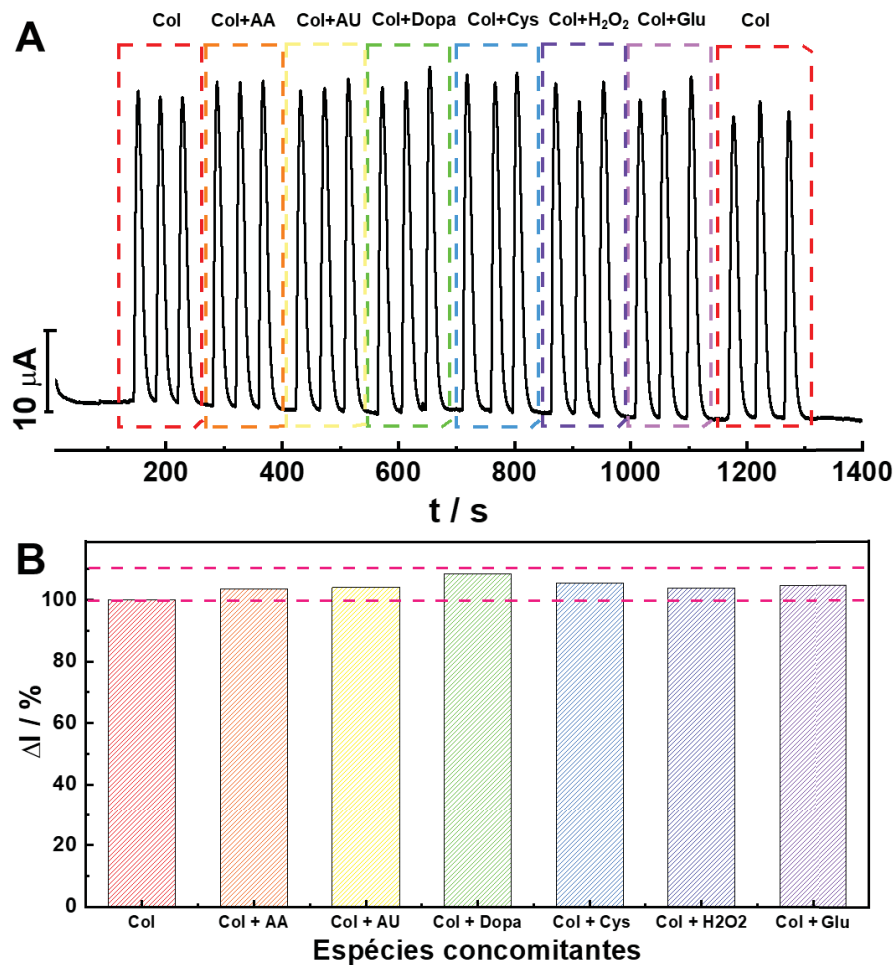
O estudo foi feito em triplicata utilizando diferentes eletrodos ( $n = 10$ ) escolhidos aleatoriamente. As correntes dos sinais transientes foram medidas e foi calculado o valor médio. Pode-se observar que os eletrodos apresentaram sinais de resposta variados e a diferença no valor médio de corrente obtida se deve provavelmente a lotes diferentes de eletrodos, sendo assim necessário uma calibração de cada eletrodo para realização da determinação. Uma vez feita essa calibração ou normalização, será possível fazer sua utilização sem maiores problemas.

A fins de aplicação como sensor eletroquímico, foi feito um estudo de adição e recuperação utilizando plasma fortificado com padrão de colesterol e feito diluições para que fosse possível fazer sua detecção na curva analítica obtida.

Primeiramente foi avaliada a resposta da espécie catalítica diante de possíveis espécies interferentes que se encontram presentes no sangue, como ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) dopamina (DOPA), cisteína (CYS), peróxido de

hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e glicose (GLU). Foram feitas adições consecutivas de padrão de colesterol, do possível interferente e por fim mais uma adição apenas do padrão de colesterol, sendo a concentração do possível interferente duas vezes mais concentrado do que o analito vista na FIGURA 35.

FIGURA 35. A) SINAIS TRANSIENTES RELATIVOS AO COLESTEROL ( $C_{\text{COL}} = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) E AS ESPÉCIES PRESENTES NA MATRIZ DE PLASMA SANGUÍNEO, AA, AU, DOPA, CYS,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , GLU ( $C_{\text{CONC.}} = 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). B) VARIÇÃO DE CORRENTE RELATIVA NA PRESENÇA DAS ESPÉCIES PRESENTES NA MATRIZ DE PLASMA SANGUÍNEO, RESPECTIVAMENTE.



FONTE: a autora

Como a variação de corrente relativa obtida foi menor que 10%, pode-se inferir que essas espécies não atuam como interferentes para o colesterol em plasma comercial conforme FIGURA 35. Além disso, esse mesmo estudo foi feito para igual e menor concentração entre colesterol e as possíveis espécies interferentes, sendo observado novamente variação menor que 10%, indicando que o sistema pode ser utilizado na determinação de colesterol. Os valores médios de porcentagem de

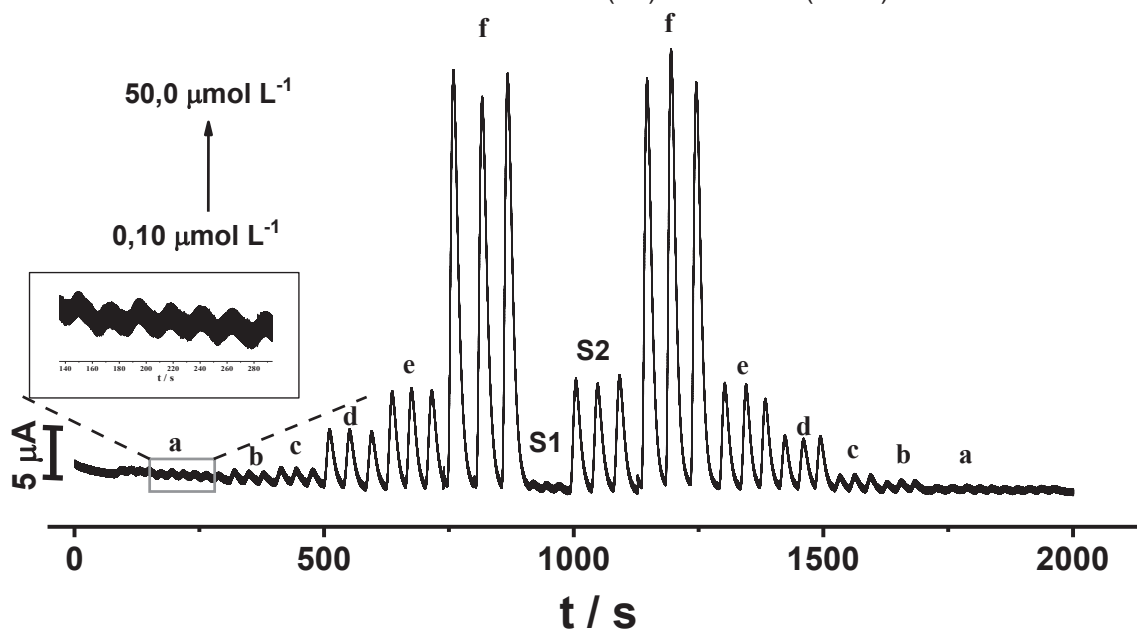
corrente para 3 injeções consecutivas estão dispostos na TABELA 9.

TABELA 9. RESULTADOS OBTIDOS PARA O ESTUDO DE ESPÉCIES CONCOMITANTES NA DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL

$C_{\text{COL}} / \text{mol L}^{-1}$	Interferente	AA	AU	Dopa	Cys	$\text{H}_2\text{O}_2$	Glu
	$C_{\text{int}} / \text{mol L}^{-1}$	% da variação de corrente (I) em função da $C_{\text{col}}$					
$5,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	-9,61	-3,73	-5,18	-1,12	-7,75	-2,34
	$5,0 \times 10^{-6}$	5,77	-0,389	-0,246	-0,606	3,25	5,77
	$1,0 \times 10^{-5}$	3,70	4,12	8,48	5,57	3,91	4,73

Visando verificar o desempenho do sistema microfluídico para determinação do analito em amostras de plasma foram realizadas medidas contendo padrão de colesterol em amostras de plasma sanguíneo enriquecido vista na FIGURA 36.

FIGURA 36. SINAIS TRANSIENTES DE PADRÃO DE COLESTEROL PREPARADO EM KOH  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  A)  $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , B)  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , C)  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , D)  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , E)  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  E F)  $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  COM ADIÇÃO NO MEIO DE PLASMA DILUÍDO EM KOH (S1) E PLASMA FORTIFICADO COM PADRÃO DE COLESTEROL (S2) E DILUÍDO (1:500)



FONTE: a autora

A partir dos resultados mostrados na FIGURA 36 foi possível obter a curva analítica correspondente  $I / \mu\text{A} = 9,93 \times 10^{-7} + 0,97C_{\text{col}} / \mu\text{mol L}^{-1}$  e calcular os valores



de adição e recuperação na presença de plasma comercial (S1) e plasma comercial fortificado com padrão de colesterol (S2). Esses resultados foram compilados e estão apresentados na TABELA 10.

TABELA 10. RESULTADOS OBTIDOS PARA A ANÁLISE DE AMOSTRA FORTIFICADA DE PLASMA (n = 5)

<b>Amostra</b>	<b>Diluição</b>	<b>C<sub>COL AD.</sub> / mmol L<sup>-1</sup></b>	<b>C<sub>COL REC.</sub> / mmol L<sup>-1</sup></b>	<b>REC / %</b>
<b>Plasma</b>	1:200	5,17	5,3 ±0,5	98 ±9
	1:500		5,3 ± 0,2	96 ±4

É possível observar que os resultados obtidos para 5 diferentes curvas de adição e recuperação apresentaram um desvio padrão relativo menor que 10%, variando de 92 a 99 % o que sugere um desempenho satisfatório para o sistema proposto na determinação de colesterol em amostras de plasma sanguíneo, uma vez que o plasma é uma matriz complexa e não foi feito nenhum tipo de tratamento prévio da amostra, utilizando apenas a diluição. O estudo de adição e recuperação também foi feito para valor de diluição de 1:200, apresentando valores de recuperação que variou de 89 a 107%.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Foi possível construir os eletrodos miniaturizados empregando reagentes e materiais de baixo custo como esmalte de unha, grafite em pó e folhas plásticas. As duas diferentes estratégias avaliadas, impressão por serigrafia convencional (SPE) e por imersão (DWE), levaram a construção de eletrodos versáteis e de baixo custo. As tintas condutoras *labmade* preparadas com custo de aproximadamente R\$ 0,15 por eletrodo para o DWE e para o SPE com um custo um pouco maior devido ao uso da máquina de recorte, de aproximadamente, R\$ 0,25 por eletrodo, mas ainda sendo de baixo custo quando comparado a eletrodos comerciais. Esses resultados evidenciam ambas as estratégias de construção de eletrodos como simples, de fácil execução e de baixo custo. Após seu preparo, os eletrodos foram avaliados eletroquimicamente e demonstraram grande potencialidade na aplicação como sensores eletroquímicos miniaturizados, tanto na forma convencional como detector amperométrico acoplado a um sistema microfluídico. Esses eletrodos foram empregados para determinação de melatonina (SPE) e colesterol (DWE modificado) em amostras enriquecidas. Assim, essas plataformas exibem grande potencial para determinação direta ou como suporte para construção de superfícies modificadas para uso em sistemas do tipo *point-of-care*, aplicado em análises diárias de forma rápida e menos invasivas. Usando o SPE foi possível fazer a determinação de melatonina em amostras de saliva e urina artificiais utilizando a voltametria de onda quadrada. Sob as condições experimentais otimizadas foi possível obter as figuras de mérito analítico comparáveis a outros trabalhos reportados na literatura. Os eletrodos construídos por imersão (DWE) foram empregados em uma metodologia não-enzimática para detecção do colesterol. Nesse sentido, a plataforma mostrou-se uma excelente superfície de modificação para ancorar íons níquel, que atua como um mediador redox na oxidação química do analito. O uso de um sistema microfluídico, o eletrodo proposto e a detecção amperométrica permitiu a obtenção de parâmetros de mérito (LOD, LOQ, sensibilidade e faixa linear) adequados para aplicar o sensor em amostras fortificadas de plasma demonstrando sua potencialidade.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SKOOG, WEST, HOLLER & CROUCH. *Fundamentos de Química Analítica*. (Editora Thomson, 2006).
2. Musa, A. M., Kiely, J., Luxton, R. & Honeychurch, K. C. Recent progress in screen-printed electrochemical sensors and biosensors for the detection of estrogens. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **139**, (2021).
3. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* **16**, 121–131 (2001).
4. Choi, S. Powering point-of-care diagnostic devices. *Biotechnology Advances* **34**, 321–330 (2016).
5. Jung, W., Han, J., Choi, J. W. & Ahn, C. H. Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies. *Microelectronic Engineering* **132**, 46–57 (2015).
6. Manmana, Y., Kubo, T. & Otsuka, K. Recent developments of point-of-care (POC) testing platform for biomolecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **135**, 116160 (2021).
7. Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. v. & Delamarche, E. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectronic Engineering* **132**, 156–175 (2015).
8. Sengupta, J. & Hussain, C. M. Graphene and its derivatives for Analytical Lab on Chip platforms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **114**, 326–337 (2019).
9. Convery, N. & Gadegaard, N. 30 Years of Microfluidics. *Micro and Nano Engineering* **2**, 76–91 (2019).
10. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 368–373 (2006).
11. Couto, R. A. S., Lima, J. L. F. C. & Quinaz, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta* **146**, 801–814 (2016).
12. Arduini, F. *et al.* Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**, 114–126 (2016).
13. Moro, G. *et al.* Disposable electrodes from waste materials and renewable sources for (bio)electroanalytical applications. *Biosensors and Bioelectronics* **146**, 956–5663 (2019).
14. Rawlinson, S., McLister, A., Kanyong, P. & Davis, J. Rapid determination of salicylic acid at screen printed electrodes. *Microchemical Journal* **137**, 71–77 (2018).

15. Khairy, M., Ayoub, H. A. & Banks, C. E. Non-enzymatic electrochemical platform for parathion pesticide sensing based on nanometer-sized nickel oxide modified screen-printed electrodes. *Food Chemistry* **255**, 104–111 (2018).
16. Khairy, M., Mahmoud, B. G. & Banks, C. E. Simultaneous determination of codeine and its co-formulated drugs acetaminophen and caffeine by utilising cerium oxide nanoparticles modified screen-printed electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **259**, 142–154 (2018).
17. Couto, R. A. S., Lima, J. L. F. C. & Quinaz, M. B. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta* **146**, 801–814 (2016).
18. Arduini, F. *et al.* Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **79**, 114–126 (2016).
19. Istamboulie, G. *et al.* Screen-printed poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT): A new electrochemical mediator for acetylcholinesterase-based biosensors. *Talanta* **82**, 957–961 (2010).
20. Ri, K., Kim, S., Paek, H., Hong, C. & Jon, M. Determination of sulfide at screen-printed electrode modified with ferricyanide-doped partially quaternized poly (4-vinylpyridine). *Journal of Electroanalytical Chemistry* 113540 (2019) doi:10.1016/J.JELECHEM.2019.113540.
21. Cerrato-Alvarez, M., Miró-Rodríguez, C. & Pinilla-Gil, E. A passive sampling – voltammetric detection approach based on screen-printed electrodes modified with indigotrisulfonate for the determination of ozone in ambient air. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **273**, 735–741 (2018).
22. Thivya, P., Ramya, R. & Wilson, J. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/taurine biocomposite on screen printed electrode: Non-enzymatic cholesterol biosensor. *Microchemical Journal* **157**, (2020).
23. Li, M., Li, Y. T., Li, D. W. & Long, Y. T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. *Analytica Chimica Acta* **734**, 31–44 (2012).
24. Gevaerd, A., Banks, C. E., Bergamini, M. F. & Marcolino-Junior, L. H. Graphene Quantum Dots Modified Screen-printed Electrodes as Electroanalytical Sensing Platform for Diethylstilbestrol. *Electroanalysis* **31**, 838–843 (2019).
25. Rohani, T., Zia Mohammadi, S., Gholamhosein Zadeh, N. & Bagher Askari, M. A novel carbon ceramic electrode modified by Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles coated with aptamer-immobilized polydopamine: An effective label-free aptasensor for sensitive detection of diclofenac. *Microchemical Journal* **166**, 106274 (2021).
26. Torul, H. *et al.* Disposable electrochemical flow cell with paper-based electrode assemble. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **891**, 115268 (2021).
27. Yetisen, A. K., Akram, M. S. & Lowe, C. R. Paper-based microfluidic point-of-

- care diagnostic devices. *Lab on a Chip* **13**, 2210–2251 (2013).
28. Lu, Q. *et al.* Flexible paper-based Ni-MOF composite/AuNPs/CNTs film electrode for HIV DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics* **184**, 113229 (2021).
29. Wang, W. *et al.* Disposable plastic electrode for electrochemical determination of total chromium and hexavalent chromium. (2017) doi:10.1016/j.jelechem.2017.04.016.
30. Marsilia, M. & Susmel, S. Free-standing Plastic electrodes: Formulation, electrochemical characterization and application to dopamine detection. *Sensors and Actuators B* **255**, 1087–1096 (2018).
31. Shi, L. *et al.* An inkjet printed Ag electrode fabricated on plastic substrate with a chemical sintering approach for the electrochemical sensing of hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators B* **256**, 938–945 (2018).
32. Figueredo, F. *et al.* Plastic electrode decorated with polyhedral anion tetrabutylammonium octamolybdate  $[N(C_4H_9)_4]_4Mo_8O_{26}$  for nM phosphate electrochemical detection. (2021) doi:10.1016/j.aca.2021.338469.
33. Kasim, N. F. A., W Idris, W. F., Abdullah, A. H., Yusoh, K. & Ismail, Z. The preparation of graphene ink from the exfoliation of graphite in pullulan, chitosan and alginate for strain-sensitive paper. *International Journal of Biological Macromolecules* **153**, 1211–1219 (2020).
34. da Silva, E. M., de Oliveira, G. C., de Siqueira, A. B., Terezo, A. J. & Castilho, M. Development of a composite electrode based on graphite and polycaprolactone for the determination of antihypertensive drugs. *Microchemical Journal* **158**, 105228 (2020).
35. Htwe, Y. Z. N. & Mariatti, M. Printed graphene and hybrid conductive inks for flexible, stretchable, and wearable electronics: Progress, opportunities, and challenges. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **7**, (2022).
36. Cui, W. *et al.* Gold nanoparticle ink suitable for electric-conductive pattern fabrication using in ink-jet printing technology. *Physicochem. Eng. Aspects* **358**, 35–41 (2010).
37. Liu, Z., Su, Y. & Varahramyan, K. Inkjet-printed silver conductors using silver nitrate ink and their electrical contacts with conducting polymers. doi:10.1016/j.tsf.2004.11.077.
38. Oliveira, A. E. F., Pereira, A. C., de Resende, M. A. C. & Ferreira, L. F. Synthesis of a silver nanoparticle ink for fabrication of reference electrodes. *Talanta Open* **5**, 100085 (2022).
39. Cinti, S. *et al.* Cholesterol biosensor based on inkjet-printed Prussian blue nanoparticle-modified screen-printed electrodes. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **221**, 187–190 (2015).
40. Li, M., Li, Y.-T., Li, D.-W. & Long, Y.-T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. *Analytica Chimica*

*Acta* **734**, 31–44 (2012).

41. Morrin, A., Killard, A. J. & Smyth, M. R. Electrochemical characterization of commercial and home-made screen-printed carbon electrodes. *Analytical Letters* **36**, 2021–2039 (2003).
42. Nascimento, V. B. & Angnes, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen.” *Quimica Nova* **21**, 614–629 (1998).
43. Mohamed, H. M. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 82 1–11 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.010> (2016).
44. Cardoso, R. M. *et al.* 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. *Analytica Chimica Acta* **1033**, 49–57 (2018).
45. Contreras-Naranjo, J. E., Perez-Gonzalez, V. H., Mata-Gómez, M. A. & Aguilar, O. 3D-printed hybrid-carbon-based electrodes for electroanalytical sensing applications. *Electrochemistry Communications* **130**, 107098 (2021).
46. Martins, G. *et al.* 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. *Analytica Chimica Acta* **1147**, 30–37 (2021).
47. Rana, S., Mittal, S. K., Singh, N., Singh, J. & Banks, C. E. Schiff base modified screen printed electrode for selective determination of aluminium(III) at trace level. *Sensors and Actuators B: Chemical* **239**, 17–27 (2017).
48. Santos, S. M. V. dos. Construção e avaliação de eletrodos por serigrafia empregando negro de fumo como material condutor. *Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba* 33–36 (2013).
49. Chu, Z., Peng, J. & Jin, W. Advanced nanomaterial inks for screen-printed chemical sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical* vol. 243 919–926 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.12.022> (2017).
50. Li, W. *et al.* The rise of conductive copper inks: challenges and perspectives. *Applied Materials Today* **18**, 100451 (2020).
51. Garate, O. *et al.* Waterborne carbon nanotube ink for the preparation of electrodes with applications in electrocatalysis and enzymatic biosensing. *Materials Research Bulletin* **106**, 137–143 (2018).
52. Villarreal, C. C., Pham, T., Ramnani, P. & Mulchandani, A. Carbon allotropes as sensors for environmental monitoring. *Current Opinion in Electrochemistry* **3**, 106–113 (2017).
53. Pradela-Filho, L. A., Araújo, D. A. G., Takeuchi, R. M. & Santos, A. L. Nail polish and carbon powder: An attractive mixture to prepare paper-based electrodes. *Electrochimica Acta* **258**, 786–792 (2017).
54. Martimiano do Prado, T., Gomes da Silva Catunda, L., Souza Correa, D. & Antonio Spinola Machado, S. Homemade Silver/Silver chloride ink with low curing temperature for screen-printed electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **915**,



116316 (2022).

55. Franco, M. *et al.* Water-Based Graphene Inks for All-Printed Temperature and Deformation Sensors. (2020) doi:10.1021/acsaelm.0c00508.
56. Preetam, S. *et al.* Emergence of microfluidics for next generation biomedical devices The attention in lab-on-a-chip devices with their potent application in medical engineering. (2022) doi:10.1016/j.biosx.2022.100106.
57. Shang, L., Cheng, Y. & Zhao, Y. Emerging Droplet Microfluidics. *Chemical Reviews* **117**, 7964–8040 (2017).
58. Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nature Biotechnology* **32**, 760–772 (2014).
59. Agustini, D., Bergamini, M. F. & Marcolino-Junior, L. H. Characterization and optimization of low cost microfluidic thread based electroanalytical device for micro flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta* **951**, 108–115 (2017).
60. Oliveira, M. C. *et al.* Nonenzymatic sensor for determination of glucose in blood plasma based on nickel oxyhydroxide in a microfluidic system of cotton thread. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **840**, 153–159 (2019).
61. Ochiai, L. M. *et al.* Electroanalytical thread-device for estriol determination using screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical* **241**, 978–984 (2017).
62. Kalinke, C. *et al.* Green method for glucose determination using microfluidic device with a non-enzymatic sensor based on nickel oxyhydroxide supported at activated biochar. *Talanta* **200**, 518–525 (2019).
63. Carneiro, E. A. *et al.* 3D-printed Microfluidic Device Based on Cotton Threads for Amperometric Estimation of Antioxidants in Wine Samples. *Electroanalysis* **30**, 101–108 (2018).
64. Tarocco, A. *et al.* Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. doi:10.1038/s41419-019-1556-7.
65. Sundberg, I. *et al.* Daytime melatonin levels in saliva are associated with inflammatory markers and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology* **112**, (2020).
66. Yu, G. M., Kubota, H., Okita, M. & Maeda, T. The anti-inflammatory and antioxidant effects of melatonin on LPS-stimulated bovine mammary epithelial cells. *PLoS ONE* **12**, 1–17 (2017).
67. Juybari, K. B., Hossein Pourhanifeh, M., Hosseinzadeh, A., Hemati, K. & Mehrzadi, S. Melatonin potentials against viral infections including COVID-19: Current evidence and new findings. (2020) doi:10.1016/j.virusres.2020.198108.
68. Kennaway, D. J. A critical review of melatonin assays: Past and present. *Journal of Pineal Research* **67**, e12572 (2019).
69. Walch, O. J., Cochran, A. & Forger, D. B. A global quantification of “normal”

sleep schedules using smartphone data. *Science Advances* **2**, e1501705 (2016).

70. Gerência-Geral de Alimentos. *Análise de informações sobre segurança e eficácia da melatonina*. [https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/proposta-de-consulta-publica-inclui-a-melatonina-como-constituente-autorizado/analise-da-seguranca-e-eficacia-da-melatonina\\_versao-para-publicacao.pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/proposta-de-consulta-publica-inclui-a-melatonina-como-constituente-autorizado/analise-da-seguranca-e-eficacia-da-melatonina_versao-para-publicacao.pdf) (2020).

71. ANVISA. Anvisa autoriza melatonina na forma de suplemento alimentar. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-autoriza-a-melatonina-na-forma-de-suplemento-alimentar> acesso em 10-11-2021.

72. Wang, X. *et al.* Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer in vivo. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **117**, (2019).

73. Lewandowska, K. *et al.* The role of melatonin and melatonin receptor agonist in the prevention of sleep disturbances and delirium in intensive care unit – a clinical review. *Sleep Medicine* **69**, 127–134 (2020).

74. Tarocco, A. *et al.* Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. doi:10.1038/s41419-019-1556-7.

75. Lewy, A. J., Ahmed, S., Jackson, J. M. L. & Sack, R. L. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiology International* **9**, 380–392 (1992).

76. Martins, L. G., Khalil, N. M. & Mainardes, R. M. Application of a validated HPLC-PDA method for the determination of melatonin content and its release from poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **7**, 388–393 (2017).

77. Li, Y. & Cassone, V. M. A simple, specific high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of melatonin in cell culture medium. *International Immunopharmacology* **28**, 230–234 (2015).

78. Li, X. *et al.* A melatonin-based targetable fluorescent probe activated by hydrogen peroxide for tumor cells screening. *Sensors and Actuators B: Chemical* **353**, (2022).

79. Duan, D., Ding, Y., Li, L. & Ma, G. Rapid quantitative detection of melatonin by electrochemical sensor based on carbon nanofibers embedded with FeCo alloy nanoparticles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 114422 (2020) doi:10.1016/j.jelechem.2020.114422.

80. Camargo, J. R. *et al.* Waterproof paper as a new substrate to construct a disposable sensor for the electrochemical determination of paracetamol and melatonin. *Talanta* **208**, 120458 (2020).

81. Kumar, N., Rosy & Goyal, R. N. Nanopalladium grained polymer nanocomposite based sensor for the sensitive determination of Melatonin. *Electrochimica Acta* **211**, 18–26 (2016).

82. Duan, D., Ding, Y., Li, L. & Ma, G. Rapid quantitative detection of melatonin by



electrochemical sensor based on carbon nanofibers embedded with FeCo alloy nanoparticles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 114422 (2020) doi:10.1016/j.jelechem.2020.114422.

83. Kumar, N. & Goyal, R. N. Simultaneous determination of melatonin and 5-hydroxytryptophan at the disposable poly-(melamine)/poly-(o-aminophenol) composite modified screen printed sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **874**, 114458 (2020).

84. Dinh, T. & Thompson, L. *Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination. Encyclopedia of Food and Health* (Elsevier Ltd., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00150-1.

85. Cholesterol Levels: What You Need to Know. <https://medlineplus.gov/cholesterollevelswhatyouneedtoknow.html>. Acesso em 18-08-2021.

86. Dervisevic, M., Çevik, E., Şenel, M., Nergiz, C. & Abasiyanik, M. F. Amperometric cholesterol biosensor based on reconstituted cholesterol oxidase on boronic acid functional conducting polymers. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **776**, 18–24 (2016).

87. Huang, Y. *et al.* Graphene and Au NPs co-mediated enzymatic silver deposition for the ultrasensitive electrochemical detection of cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics* **102**, 560–567 (2018).

88. Huang, Y. *et al.* Ultrasensitive cholesterol biosensor based on enzymatic silver deposition on gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode. *Materials Science and Engineering C* **77**, 1–8 (2017).

89. Kaur, G., Tomar, M. & Gupta, V. Development of a microfluidic electrochemical biosensor: Prospect for point-of-care cholesterol monitoring. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **261**, 460–466 (2018).

90. Lee, Y. J., Eom, K. S., Shin, K. S., Kang, J. Y. & Lee, S. H. Enzyme-loaded paper combined impedimetric sensor for the determination of the low-level of cholesterol in saliva. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **271**, 73–81 (2018).

91. Lin, X., Ni, Y. & Kokot, S. Electrochemical cholesterol sensor based on cholesterol oxidase and MoS<sub>2</sub>-AuNPs modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **233**, 100–106 (2016).

92. Wang, H. & Mu, S. Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **56**, 22–30 (1999).

93. Salazar, P., Martín, M. & González-Mora, J. L. In situ electrodeposition of cholesterol oxidase-modified polydopamine thin film on nanostructured screen printed electrodes for free cholesterol determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **837**, 191–199 (2019).

94. Khaliq, N. *et al.* Development of non-enzymatic cholesterol bio-sensor based on TiO<sub>2</sub> nanotubes decorated with Cu<sub>2</sub>O nanoparticles. *Sensors and Actuators, B:*

*Chemical* **302**, (2020).

95. Wei, H. *et al.* Dendritic core-shell copper-nickel alloy@metal oxide for efficient non-enzymatic glucose detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* **337**, 129687 (2021).
96. Njoko, N. *et al.* Bioelectrocatalysis and surface analysis of gold coated with nickel oxide/hydroxide and glucose oxidase towards detection of glucose. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **190**, 110981 (2020).
97. Rinaldi, A. L., Bonetto, M. C., Sobral, S. & Carballo, R. Evaluation of the synergistic effects of a novel organic-inorganic nickel hybrid nanocomposite as electrocatalyst toward glucose oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **863**, 114039 (2020).
98. Bach, L. G., Thi, M. L. N., Bui, Q. B. & Nhac-Vu, H. T. Hierarchical cobalt nanorods shelled with nickel oxide vertically attached 3D architecture as non-binder and free-standing sensor for sensitive non-enzymatic glucose detection. *Materials Research Bulletin* **118**, 110504 (2019).
99. Shen, Z. *et al.* Highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on nickel nanoparticle-attapulgitite-reduced graphene oxide-modified glassy carbon electrode. *Talanta* **159**, 194–199 (2016).
100. Sarigul, N., Korkmaz, F. & Kurultak, İ. A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. doi:10.1038/s41598-019-56693-4.
101. Radi, A. & Bekhiet, G. E. Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **45**, 275–279 (1998).
102. Babaei, A., Taheri, A. R. & Khani Farahani, I. Nanomolar simultaneous determination of levodopa and melatonin at a new cobalt hydroxide nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes composite modified carbon ionic liquid electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **183**, 265–272 (2013).
103. Souza, D. de *et al.* Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Quimica Nova* **26**, 81–89 (2003).
104. Miller N. J.; Miller, J. C. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 6ª edição, Harlow, Pearson, (2010).
105. Cincotto, F. H. *et al.* A nano-magnetic electrochemical sensor for the determination of mood disorder related substances. *RSC Advances* **8**, 14040–14047 (2018).
106. Zeinali, H., Bagheri, H., Monsef-Khoshhesab, Z., Khoshsafar, H. & Hajian, A. Nanomolar simultaneous determination of tryptophan and melatonin by a new ionic liquid carbon paste electrode modified with SnO<sub>2</sub>-Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@rGO nanocomposite. *Materials Science and Engineering C* **71**, 386–394 (2017).
107. Randviir, E. P. A cross examination of electron transfer rate constants for carbon screen-printed electrodes using Electrochemical Impedance Spectroscopy and cyclic voltammetry. *Electrochimica Acta* **286**, 179–186 (2018).

108. Lasia, A. *Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications* vol. 9781461489337 (Springer New York, 2014).
109. de Araujo Andreotti, I. A. *et al.* Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **840**, 109–116 (2019).
110. Miao, Y. *et al.* Electrocatalysis and electroanalysis of nickel, its oxides, hydroxides and oxyhydroxides toward small molecules. *Biosensors and Bioelectronics* vol. 53 428–439 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.10.008> (2014).
111. Hall, D. S., Lockwood, D. J., Bock, C. & MacDougall, B. R. Nickel hydroxides and related materials: a review of their structures, synthesis and properties. *Proceedings Royal Society A* **471**, 0792 (2014).
112. Fleischmann, M., Korinek, K. & Pletcher, D. The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **31**, 39–49 (1971).
113. Miao, Y. *et al.* Electrocatalysis and electroanalysis of nickel, its oxides, hydroxides and oxyhydroxides toward small molecules. *Biosensors and Bioelectronics* **53**, 428–439 (2014).