

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA ZANICOSKI MOSCARDI

CONSTRUÇÃO DE PLATAFORMA MULTIPLEX BASEADA EM ELETRODOS
IMPRESSOS DE CARBONO E APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE
SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, CARBENDAZIM E GLICOSE

CURITIBA

2024

ANA PAULA ZANICOSKI MOSCARDI

CONSTRUÇÃO DE PLATAFORMA MULTIPLEX BASEADA EM ELETRODOS
IMPRESSOS DE CARBONO E APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE
SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, CARBENDAZIM E GLICOSE

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.

Data de Admissão: 01/03/2022

Orientador: Prof. Dr. Márcio F. Bergamini

Co-Orientadores: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Jr

Dr. Luís Marcos Cerdeira Ferreira

CURITIBA

2024

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

Moscardi, Ana Paula Zanicoski

Construção de plataforma multiplex baseada em eletrodos impressos de carbono e aplicação no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a determinação de ácido ascórbico, carbendazim e glicose / Ana Paula Zanicoski Moscardi. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Márcio F. Bergamini

Coorientador: Luiz H. Marcolino Jr

Coorientador: Luís Marcos Cerdeira Ferreira

1. Vitamina C. 2. Glicose. 3. Eletrodos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Bergamini, Márcio F.. IV. Marcolino Jr, Luiz H. V. Ferreira, Luís Marcos Cerdeira. VI. Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029

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 **ANA PAULA ZANICOSKI MOSCARDI** intitulada: **Construção de plataforma multiplex baseada em eletrodos impressos de carbono e aplicação no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a determinação de ácido ascórbico, carbendazim e glicose**, 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, 01 de Março de 2024.

Assinatura Eletrônica

04/03/2024 10:10:13.0

MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/03/2024 10:09:22.0

GILBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/04/2024 12:39:35.0

AVA GEVAERD

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho à minha querida nona
Amélia Possas Moscardi (in memoriam),
que sempre torceu pela minha felicidade.*

AGRADECIMENTOS

Aos professores Márcio Fernando Bergamini e Dr. Luiz Humberto Marcolino-Jr pela orientação e oportunidades concedidas durante minha presença no LabSense. Expresso meu agradecimento ao coorientador, Dr. Luís Cerdeira, pela orientação constante e pelo suporte diário no laboratório. Sou muito grata por todos os aprendizados adquiridos.

Agradeço também à Dra. Ava Gevaerd e ao Prof. Dr. Frederico L. F. Soares pelas significativas contribuições feitas durante meu exame de qualificação. À banca de defesa, composta novamente pela Dra. Ava Gevaerd e pelo Prof. Dr. Gilberto Abate, agradeço pela gentileza e pela participação no processo.

Aos amigos do LabSense, cujo apoio foi crucial para que eu alcançasse a conclusão do mestrado, agradeço imensamente por toda a ajuda e amizade construídas ao longo desse percurso.

À minha família, em especial meus pais, que são as pessoas mais importantes para mim, por sempre acreditarem no meu potencial, me incentivarem e investirem na minha educação. Obrigado por serem os melhores pais que eu poderia ter e por me trazerem calma e paz nos momentos de angústia.

Ao órgão de fomento, CAPES, agradeço pela concessão da bolsa que viabilizou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Química da UFPR, agradeço pela estrutura que tem contribuído para minha formação desde 2015, assim como pela oportunidade de cultivar valiosas amizades ao longo desse período.

Por fim, mas não menos importante, à UFPR, pelo acolhimento ao longo dos anos e pelos ensinamentos de vida que vão além dos conhecimentos técnicos proporcionados. Muito obrigada!

O senhor... Mire e veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou.

João Guimarães Rosa

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um dispositivo multiplex, integrando eletrodos impressos de baixo custo preparados com tintas lab-made de carbono para a determinação de ácido ascórbico, glicose e carbendazim em amostra de suco comercial. As tintas condutoras empregadas para a preparação dos eletrodos foram formuladas a partir da combinação de pó de grafite e esmalte de unha, homogeneizadas com acetato de etila. A demonstração da versatilidade dessa abordagem inclui a integração de três tipos distintos de eletrodos, um convencional não modificado para determinação direta de ácido ascórbico, um biossensor para quantificação de glicose e eletrodo modificado para detecção de carbendazim. Esses eletrodos foram construídos em uma plataforma única, todos derivados de uma superfície eletródica comum. A avaliação dos eletrodos convencionais envolveu a determinação direta de ácido ascórbico empregando voltametria cíclica, apontando parâmetros analíticos, como uma região linear de resposta entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, sensibilidade de $3,55 \mu\text{A L mmol}^{-1}$, e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de $0,712 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $2,37 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A construção do biossensor para determinação de glicose, consistiu na associação da enzima glicose oxidase, imobilizada sobre um eletrodo impresso modificado com hexacianoferrato de ferro (azul da Prússia), que atua como mediador redox. Esse sistema permitiu a determinação indireta da glicose utilizando a técnica de amperometria em potencial de $-0,3 \text{ V vs. (Ag/AgCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl)}$. Nessas condições, foram obtidos uma faixa de resposta linear entre $0,10$ e $2,50 \text{ mmol L}^{-1}$, com LOD de $8,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e LOQ de $28,30 \mu\text{mol L}^{-1}$. A terceira metodologia empregada para a construção dos eletrodos impressos consistiu na modificação com hidróxidos duplos delaminados (dHDLs). Esse modificador foi adicionado diretamente à tinta condutora, e posterior empregado para na determinação do fungicida carbendazim. Os parâmetros analíticos foram obtidos através da técnica de voltametria de onda quadrada, a qual permitiu a obtenção de uma região linear para a detecção de carbendazim na faixa de concentração entre $1,0$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com sensibilidade de $0,168 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ e LOD e LOQ de $66,63$ e $222,11 \text{ nmol L}^{-1}$, respectivamente. A metodologia proposta foi aplicada na determinação de ácido ascórbico, glicose e carbendazim em suco de laranja comercial, utilizando uma diluição comum de 250 vezes. Os valores médios de recuperação para ácido ascórbico, glicose e carbendazim na amostra de suco de laranja foram muito próximos a 100%, demonstrando a versatilidade da plataforma proposta.

Palavras-chave: eletrodos impressos; dispositivo eletroquímico multiplex; ácido ascórbico; glicose; carbendazim.

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a cost effective multiplex device using custom-made carbon inks, aiming to print low-cost screen-printed electrodes. The device was designed for the simultaneous determination of ascorbic acid, glucose, and carbendazim in a commercial juice sample. The conductive inks employed for electrode fabrication were formulated by blending graphite powder and nail polish, homogenized with ethyl acetate. The versatility of this method was shown through the use of three different electrode types: an unmodified conventional electrode for direct determination of ascorbic acid, a biosensor for quantifying glucose, and a modified electrode for detecting carbendazim. These electrodes were constructed on a single platform, all derived from a common electrode surface. The assessment of conventional electrodes included the direct determination of ascorbic acid using cyclic voltammetry. The obtained analytical parameters indicated a linear response range from $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ to $1.0\ \text{mmol L}^{-1}$, a sensitivity of $3.55\ \mu\text{A L mmol}^{-1}$, and detection (LOD) and quantification (LOQ) limits of $0.712\ \mu\text{mol L}^{-1}$ and $2.37\ \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The biosensor, for glucose determination, was constructed by immobilizing glucose oxidase enzyme on a iron hexacyanoferrate (Prussian blue) modified electrode, which acts as a redox mediator. This system enabled the indirect determination of glucose using the amperometry technique at a potential of $-0.3\ \text{V}$ vs. (Ag/AgCl $3.0\ \text{mol L}^{-1}$ KCl). Under these conditions, a linear response range between 0.10 and $2.50\ \text{mmol L}^{-1}$ was obtained, with LOD of $8.50\ \mu\text{mol L}^{-1}$ and LOQ of $28.30\ \mu\text{mol L}^{-1}$. The third methodology employed for the construction of printed electrodes involved the modification with delaminated double layer hydroxides (dHDLs). This modifier was directly incorporated into the conductive ink and subsequently utilized for the detecting the fungicide carbendazim. Analytical parameters were derived from data obtained through square wave voltammetry, and shown linear response of current and concentration ranging from 1.0 to $10.0\ \mu\text{mol L}^{-1}$, with sensitivity of $0.168\ \mu\text{A L }\mu\text{mol}^{-1}$ and LOD and LOQ of 66.63 and $222.11\ \text{nmol L}^{-1}$, respectively. The proposed methodology was applied to measure ascorbic acid, glucose, and carbendazim concentrations in commercial orange juice, using a common 250-fold dilution. The average recovery values for ascorbic acid, glucose, and carbendazim in the orange juice sample were very close to 100%, demonstrating the versatility of the proposed platform.

Keywords: screen-printed electrodes; multiplex electrochemical device; ascorbic acid; glucose; carbendazim.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AA - Ácido Ascórbico

AM – Amperometria

AP - Azul da Prússia

BP - Branco da Prússia

BR - Britton Robinson

BSA - Albumina de soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

CBZ - Carbendazim

CTAB - Brometo de cetrimônio

CV - Voltametria cíclica (do inglês, *Cyclic Voltammetry*)

dHDL - Hidróxido duplo delaminado

DPV - Voltametria de pulso diferencial (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*)

EIS - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy*)

E_{pa} - Potencial de pico anódico

E_{pc} - Potencial de pico catódico

GLI - Glicose

GOx - Glicose Oxidase

HDL - Hidróxidos Duplos Lamelares

HMI - Tintas caseiras (do inglês, *Home Made Inks*)

I_{pa} - Corrente de pico anódico

I_{pc} - Corrente de pico catódico

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

LSV - Voltametria de varredura linear (do inglês, *Linear Sweep Voltammetry*)

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PVC - Policloreto de vinila

R_{ct} - Resistência à transferência de carga

RNS - Espécies Reativas De Nitrogênio (do inglês, *Reactive Nitrogen Species*)

ROS - Espécies Reativas De Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

RSD - Desvio-padrão relativo (do inglês, *Relative Standard Deviation*)

SPE - Eletrodos impressos (do inglês, *Screen-Printed Electrodes*)

SWV - Voltametria de onda quadrada (do inglês, *Square-Wave Voltammetry*)

VB - Verde de Berlim

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LISTA DE REAGENTES E SUA PROCEDÊNCIA.....	37
TABELA 2 - TIPOS DE TRATAMENTO ELETROQUIMICO AVALIADOS E SUAS RESPECTIVAS CONDIÇÕES ELETROQUÍMICAS.	44
TABELA 3 - REAGENTES UTILIZADOS EM CADA ALTERAÇÃO DA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.	46
TABELA 4 - TIPOS DIFERENTES DE SUBSTRATOS AVALIADOS E SUAS RESPECTIVAS NOMENCLATURAS.	49
TABELA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE AA.....	69
TABELA 6 - COMPARATIVO DE SENSIBILIDADE E VALOR DE CORRENTE ELÉTRICA PARA A MENOR CONCENTRAÇÃO DE GLI.....	75
TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE ELETRODOS IMPRESSOS MODIFICADOS COM AZUL DA PRÚSSIA PARA DETERMINAÇÃO DE GLI.	80
TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE CBZ.	88
TABELA 9 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO DO AA EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO.	91
TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE CURVAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLI: COM E SEM AMOSTRA, DESTACANDO SUAS RESPECTIVAS SENSIBILIDADES.	92
TABELA 11 - RECUPERAÇÃO DE GLI EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO.	93
TABELA 12- RECUPERAÇÃO DO AA, GLI E CBZ EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO NA DILUIÇÃO OTIMIZADA DE 250 VEZES.....	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MULTIPLEX COLORIMÉTRICO. GRUPOS FUNCIONAIS IMOBILIZADOS NAS ZONAS DE DETECÇÃO NA DETECÇÃO DE METAIS PESADOS.	20
FIGURA 2 - ELETRODOS IMPRESSOS EM PAPEL POR MEIO DA TÉCNICA DE SERIGRAFIA PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	21
FIGURA 3 - CÉLULA ELETROQUÍMICA IMPRESSA EM 3D PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DA COVID-19.	22
FIGURA 4 - ILUSTRAÇÃO DE UM SPE.	24
FIGURA 5 - ETAPAS GERAIS EMPREGADAS NA PREPARAÇÃO DO MULTIPLEX. (A) RECORTE DA MÁSCARA ADESIVA; (B) IMPRESSÃO DA TINTA CONDUTORA E DE PRATA; (C) SPE PRONTO COM ESQUEMA ILUSTRATIVO DE APLICAÇÃO.	26
FIGURA 6 - ESTRUTURA MOLECULAR DO AA.....	28
FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DA GLI.....	30
FIGURA 8 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CBZ.....	32
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DOS HDLS DE ZN/AL E Na_2SO_4	34
FIGURA 10 - FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS (A) ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DA CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS POR SERIGRAFIA. (B) CARTELA COM CINCO ELETRODOS IMPRESSOS PRONTO E SEU TAMANHO RELATIVO A UMA MOEDA DE R\$1,00.	39
FIGURA 11 - ETAPAS DE IMPRESSÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX.	41
FIGURA 12 - DISPOSITIVO MULTIPLEX. A) MULTIPLEX PRONTO. B) MULTIPLEX COM 100 μL DE SOLUÇÃO $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol L^{-1} . C) MULTIPLEX CONECTADO A CAIXA MULTICANAL.	42
FIGURA 13 - ÁREA GEOMÉTRICA OBTIDA POR CADA SUBSTRATO APÓS A SECAGEM DA TINTA CONDUTORA.....	50
FIGURA 14 - CORRENTE DE PICO ANÓDICO COM OS SUBSTRATOS SEM TRATAMENTO (N=18) E CORRENTE PARA CADA SUBSTRATO TRATADO AVALIADO (N=3). B) VARIAÇÃO DO ΔE DOS PICOS EM RELAÇÃO AOS TIPOS DE SUBSTRATOS ESTUDADOS COM E SEM A APLICAÇÃO DO TRATAMENTO (N=3).....	51

FIGURA 15 - A) PERFIL DO VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DA Sonda ELETROQUÍMICA. ONDE, I_{PA} = SINAL DE CORRENTE ELÉTRICA REFERENTE AO PROCESSO DE OXIDAÇÃO, I_{PC} = SINAL DE CORRENTE REFERENTE AO PROCESSO DE REDUÇÃO E ΔE = DIFERENÇA DE POTENCIAL. B) COMPARATIVO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DO ELETRODO SEM TRATAMENTO E APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS SUPERFICIAIS PARA O SUBSTRATO FOSCO (2).....	52
FIGURA 16 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS USANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ COMO Sonda ELETROQUÍMICA (5 mmol L^{-1} EM KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$) APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO ELETROQUÍMICO EM SOLUÇÃO DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DE $NaOH$. A) DIFERENTES QUANTIDADES DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS. B) DIFERENTES FAIXAS DE POTENCIAL DE VARREDURA (SENTIDO POSITIVO E NEGATIVO). C) POTENCIAL FIXADO EM $-1,5 \text{ V}$ EM DIFERENTES TEMPOS. D) POTENCIAL FIXADO EM $+1,5 \text{ V}$ EM DIFERENTES TEMPOS.	53
FIGURA 17 - DEPENDÊNCIA LINEAR DAS CORRENTE DE PICO EM FUNÇÃO DA RAIZ QUADRADA DA VELOCIDADE DE VARREDURA. (A) RETAS PRETAS E VERMELHAS REPRESENTAM OS PICOS DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO, RESPECTIVAMENTE, PARA ELETRODOS QUE NÃO RECEBERAM TRATAMENTO ELETROQUÍMICO. (B) RETAS PRETAS E VERMELHAS REPRESENTAM OS PICOS DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO, RESPECTIVAMENTE, PARA ELETRODOS APÓS O TRATAMENTO ELETROQUÍMICO.....	55
FIGURA 18 - IMAGENS REPRESENTATIVAS OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ELETRODOS IMPRESSOS. (A) SEM TRATAMENTO. (B) APÓS TRATAMENTO ELETROQUÍMICO.	56
FIGURA 19 - IMAGEM OBTIDA COM MICROSCÓPIO DIGITAL PARA OBTENÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO. GOTA DE 20 mL DE ÁGUA DEIONIZADA SOB A SUPERFÍCIE DO ELETRODO 1 ANTES E APÓS O TRATAMENTO ELETROQUÍMICO OTIMIZADO.....	58
FIGURA 20 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICA RELATIVAS PARA O $K_3[Fe(CN)_6]$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ EM KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ COMO ELETRÓLITO SUPORTE PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E REPRODUTIBILIDADE (B) ($N=10$).	59

FIGURA 21 - (A) VOLTAMOGRAMAS DA VARIAÇÃO DE DENSIDADE DE CORRENTE (J) PARA DIFERENTES ELETRODOS IMPRESSOS NA PRESENÇA DE $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L ⁻¹ EM KCl 0,1 mol L ⁻¹ . (B) VARIAÇÃO DE ΔE DOS PICOS EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ELETRODOS IMPRESSOS ESTUDADOS.	60
FIGURA 22 - DIAGRAMA DE NYQUIST PARA CADA ELETRODO AVALIADO NA PRESENÇA DE $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L ⁻¹ EM KCl 0,1 mol L ⁻¹ . DETALHE: CIRCUITO ELÉTRICO DE Randles, NA QUAL R_s É A RESISTÊNCIA DO ELETRÓLITO, R_{ct} É A RESISTÊNCIA A TRANSFERÊNCIA DE CARGA, Z IMPEDÂNCIA WARBURG E C_{dl} É A CAPACITÂNCIA DE DUPLA CAMADA. 61	61
FIGURA 23 - VOLTAMOGRAMAS COMPARATIVOS DE ELETRODOS SEM TRATAMENTO EMPREGANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ COMO Sonda eletroquímica (5 mmol L ⁻¹ EM KNO_3 0,1 mol L ⁻¹), VARIANDO OS ELETRODOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS.	63
FIGURA 24 - VOLTAMOGRAMAS DOS TRÊS ELETRODOS DE TRABALHO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX APÓS TRATAMENTO ELETROQUÍMICO UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ COMO Sonda eletroquímica (5 mmol L ⁻¹ EM KNO_3 0,1 mol L ⁻¹), QUANDO PLUGADOS INDIVIDUALMENTE NO CONTROLADOR ANALÓGICO E SIMULTANEAMENTE.	64
FIGURA 25 - PERFIL VOLTAMÉTRICO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DO AA NA CONCENTRAÇÃO DE 0,25 mmol L ⁻¹ . VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s ⁻¹ . ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETADO pH 5,0.....	66
FIGURA 26 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO AA A ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO E DE HIDRÓLISE DESTA ÚLTIMA AO ÁCIDO 2,3-DICETOGULÔNICO.....	66
FIGURA 27 - (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS DE 10 μ mol L ⁻¹ A 1,0 mmol L ⁻¹ DE AA. (B) AMPLIAÇÃO DE 10 mmol L ⁻¹ A 0,25 mmol L ⁻¹ . VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s ⁻¹ . ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETADO pH 5,0.	67
FIGURA 28 - CURVA ANALÍTICA DO AA OBTIDA POR CV COM FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE 10 μ mol L ⁻¹ A 1,0 mmol L ⁻¹ (N = 5).....	68
FIGURA 29 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA O AA 0,5 mmol L ⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.	70

FIGURA 30 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS A PARTIR DA SOLUÇÃO PREPARADA PARA ELETRODEPOSIÇÃO DO AZUL DA PRÚSSIA (15 CICLOS). (B) VOLTAMOGRAMA DO 15º CICLO DO FILME DE AZUL DA PRÚSSIA. B.P: BRANCO DA PRÚSSIA. A.P: AZUL DA PRÚSSIA. V.B: VERDE DE BERLIM...	71
FIGURA 31 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS NA DETERMINAÇÃO DE GLI EMPREGANDO UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO.....	72
FIGURA 32 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS APENAS NO ELETRÓLITO SUPORTE (1:10 TAMPÃO ACETATO pH 5,5 E SOLUÇÃO DE Na_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹) E APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE 1 E 2 mmol L ⁻¹ DE H_2O_2 . VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s ⁻¹	73
FIGURA 33 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS APENAS NO ELETRÓLITO SUPORTE (1:10 TAMPÃO ACETATO pH 5,5 E Na_2SO_4 0,1 mol L ⁻¹) E APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE 10 E 20 mmol L ⁻¹ DE GLI. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s ⁻¹	74
FIGURA 34 - IMAGENS REPRESENTATIVAS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO BIOSSENSOR. (A, B E C) CRISTAIS DE AZUL DA PRÚSSIA SOBRE A SUPERFÍCIE ELETROQUÍMICA. (D, E E F) FILME POLIMÉRICO COM ENZIMA SOBRE O FILME DE AZUL DA PRÚSSIA.	76
FIGURA 35 - (A) CRONOAMPEROGRAMAS OBTIDOS NA FAIXA DE 0,1 mol L ⁻¹ A 4,0 mmol L ⁻¹ DE GLI, COM POTENCIAL APLICADO DE -0,3 V. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 5,0. (B) CURVA ANALÍTICA CORRESPONDENTE (N=5).....	77
FIGURA 36 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA A GLI 2,0 mmol L ⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	78
FIGURA 37 - (A) AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA FAIXA DE 0,1 mmol L ⁻¹ A 2,5 mmol L ⁻¹ DE GLI, COM POTENCIAL APLICADO DE -0,3 V. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 5,0. (B) CURVA ANALÍTICA CORRESPONDENTE (N=3).....	78
FIGURA 38 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA A GLI 1,0 mmol L ⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	79
FIGURA 39 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM ELETRODOS IMPRESSOS NÃO MODIFICADO NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE 10 μmol	

L ⁻¹ DE CBZ. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s ⁻¹ . ELETRÓLITO SUPORTE: 1:10 TAMPÃO ACETADO pH 5,5 E Na ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	81
FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CBZ NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO IMPRESSO.....	82
FIGURA 41 - IMAGENS DE MET OBTIDAS DO dHDL: (A), (B), (C), (D), (E) E (F), NAS AMPLIAÇÕES DE 5, 10, 50, 30, 20 E 30KX RESPECTIVAMENTE.	83
FIGURA 42 - INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDAS PARA O CBZ EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE HDL. ELETRÓLITO SUPORTE: 1:10 TAMPÃO BR pH 7,0 E Na ₂ SO ₄ 0,1 mol L ⁻¹	85
FIGURA 43 - VOLTAMOGRAMAS DE SWV (A) E INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDAS PARA O CBZ EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES VALORES DE pH DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E LEITURA COM VALOR DE SLOPE OBTIDO DE POTENCIAL <i>1</i> /S pH (B) (N=3).	86
FIGURA 44 - (A) VOLTAMOGRAMAS DE SWV OBTIDOS NA FAIXA DE 1,0 µmol L ⁻¹ A 10,0 µmol L ⁻¹ DE CBZ, APÓS PRÉ – CONCENTRAÇÃO DE 2 MINUTOS. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 5,0. (B) CURVA ANALÍTICA CORRESPONDENTE.	87
FIGURA 45 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA O CBZ 7,5 µmol L ⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	89
FIGURA 46 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO CONSTRUÍDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA MATRIZ DE SUCO DE LARANJA DE MARCA COMERCIAL PARA AA.	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 SISTEMAS DE DETECÇÃO MULTIPLEXADOS	19
1.2 ELETRODOS IMPRESSOS	23
1.3 ANALITOS	28
1.3.1 Ácido Ascórbico	28
1.3.2 Glicose	30
1.3.3 Carbendazim.....	32
1.4 HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES (HDL)	34
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVOS GERAIS	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 REAGENTES.....	37
3.2 DELAMINAÇÃO DO HDL Zn/Al	38
3.3 ELETRODOS IMPRESSOS CONSTRUÍDOS POR SERIGRAFIA.....	38
3.3.1 Preparação das Tintas Condutoras	38
3.3.2 Preparação das Tintas Condutoras Modificadas.....	38
3.3.3 Confecção do Eletrodo Impresso	39
3.3.4 Confecção do Eletrodo Impresso Modificado com HDL	40
3.3.5 Confecção do Sistema Multiplex.....	40
3.4 CARACTERIZAÇÕES.....	42
3.4.1 Caracterização por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET).....	42
3.4.2 Medidas de Ângulo de Contato	43
3.4.3 Medidas Eletroquímicas.....	43
3.4.3.1 Tratamento Eletroquímico da Superfície dos Eletrodos Impressos	43

3.5 AVALIAÇÃO DO ELETRODO CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	44
3.5.1 Medidas Eletroquímicas para detecção de Ácido Ascórbico.....	44
3.6 AVALIAÇÃO DO BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE GLICOSE	45
3.6.1 Formação do Filme de Azul da Prússia.....	45
3.6.2 Imobilização do Enzima Glicose Oxidase.....	45
3.6.2.1 Estudo da alteração da metodologia na imobilização do Enzima Glicose Oxidase	45
3.6.3 Potencialidade para detecção de H ₂ O ₂ e Glicose	46
3.6.4 Curva Analítica para detecção indireta de Glicose	46
3.7 AVALIAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO COM dHDL PARA DETECÇÃO DE CARBENDAZIM.....	46
3.7.1 Potencialidade de detecção do eletrodo impresso para Carbendazim.....	47
3.7.2 Avaliação da proporção de modificador e tempo de pré concentração.....	47
3.7.3 Estudo de pH do eletrólito suporte e padrão.....	47
3.7.4 Curva Analítica para detecção de Carbendazim	47
3.8 PREPARO DE AMOSTRA DE SUCO DE LARANJA.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	49
4.1.1 Avaliação do Substrato para Impressão dos Eletrodos	49
4.1.2 Avaliação de Diferentes Tratamentos Eletroquímicos	52
4.1.4 Comparação com Eletrodos Impressos Comerciais.....	60
4.2 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS PREPARADOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	65
4.2.1 Perfil Voltamétrico e desempenho analítico na determinação de Ácido Ascórbico	65
4.3 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE.....	70
4.3.1 Formação do Filme de Azul da Prússia.....	70
4.3.2 Avaliação do eletrodo impresso com Azul da Prússia na detecção do H ₂ O ₂	72
4.3.3 Potencialidade Analítica para a Detecção de Glicose	74

4.3.4 Desempenho Analítico na determinação de Glicose.....	77
4.4 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS COM dHDL Zn/Al PARA DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM	81
4.4.1 Perfil Voltamétrico do Carbendazim	81
4.4.2 Caracterização do dHDL.....	83
4.4.3 Potencialidade Analítica dos Eletrodos Impressos Modificados com HDL Zn/Al.....	84
4.4.4 Estudo de pH de pré-concentração e leitura	86
4.4.5 Desempenho Analítico para determinação do Carbendazim.....	87
4.5 ESTUDOS SOBRE O EFEITO DE MATRIZ E AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AA, GLI E CBZ EM AMOSTRAS DE SUCO DE LARANJA	89
5 CONCLUSÃO.....	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1 INTRODUÇÃO

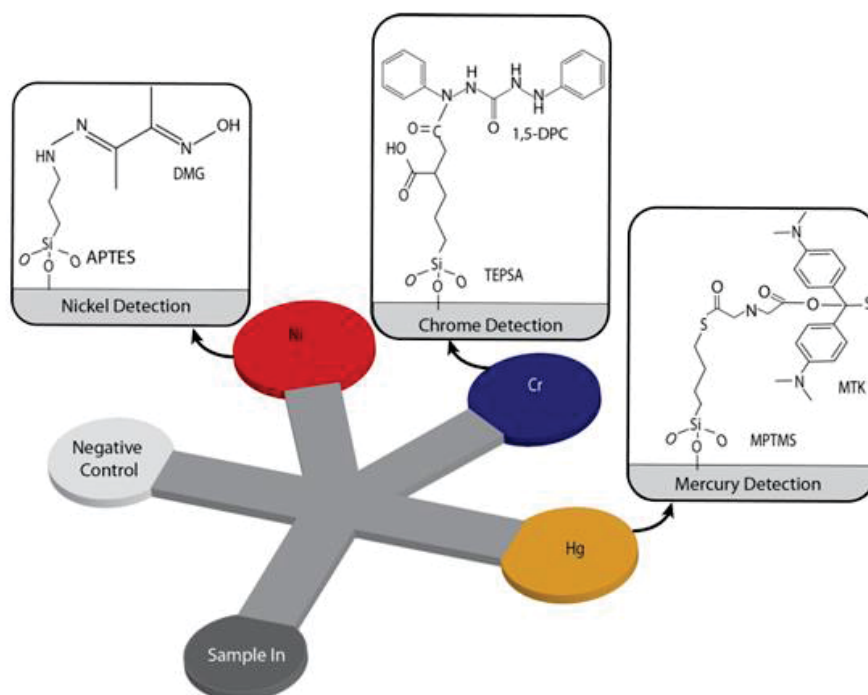
1.1 SISTEMAS DE DETECÇÃO MULTIPLEXADOS

Análises químicas, de modo geral, desempenham um papel importante na sociedade moderna. Nesse sentido, a tomada de decisões mediada por uma ferramenta analítica proporciona maior assertividade em diversos campos. A definição de um diagnóstico médico, a liberação ou embargo de lotes de produção de alimentos ou mesmo a investigação da qualidade da água, são exemplos básicos do cotidiano. Entretanto, o crescente desenvolvimento social sobrecarrega laboratórios de análises, gerando uma demanda por testes mais rápidos, simples e de baixo custo para a população¹. Sob esta óptica, nos últimos anos vem crescendo a tendência na criação de novos dispositivos analíticos miniaturizados e descartáveis, que viabilizem a portabilidade para o usuário e o desenvolvimento de metodologias rápidas sem perda de eficiência, a fim de descentralizar as análises e garantir acessibilidade². Tendo isso em vista, um exemplo de ferramenta que atende essa demanda são o uso de dispositivos multiplexados.

Os dispositivos multiplexados são ferramentas que permitem em uma única plataforma, conseguem obter sinais analíticos associados a diferentes componentes presentes na amostra. Essa medida pode ocorrer de forma simultânea ou sequencial, permitindo a análise de múltiplos analitos em um único compartimento. Com a implementação desses dispositivos, observa-se uma significativa redução no tempo de análise, bem como no volume de amostra e reagentes envolvidos, contribuindo para atender às demandas por testes mais eficientes e acessíveis³.

Diferentes técnicas derivadas da química analítica podem ser empregadas no desenvolvimento de metodologias que utilizam sensores multiplex para a detecção dos analitos, como por exemplo, o uso de sensores multiplex para detecção de metais tóxicos em amostras de águas⁴⁻⁶. O método colorimétrico descrito por Devadhasan et al.⁴ foi empregado para a detecção simultânea de íons Ni(II), Cr(VI) e Hg(II) em amostras de água, utilizando um dispositivo multiplex preparado em papel cromatográfico (FIGURA 1).

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MULTIPLEX COLORIMÉTRICO. GRUPOS FUNCIONAIS IMOBILIZADOS NAS ZONAS DE DETECÇÃO NA DETECÇÃO DE METAIS PESADOS.



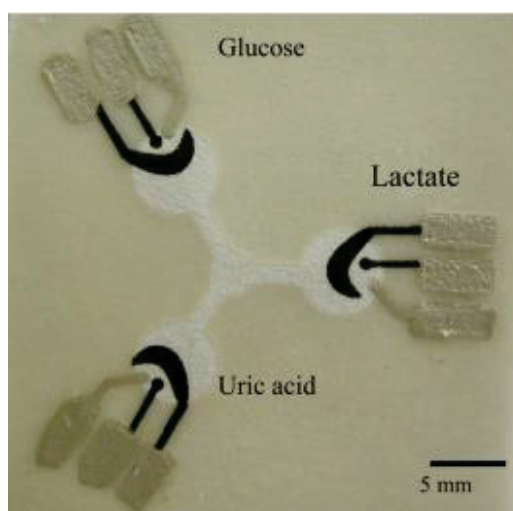
FONTE: Adaptação de Devadhasan et al.⁴

Nesse dispositivo, os reagentes seletivos são impregnados em papel em diferentes regiões, a amostra é adicionada ao suporte e, por capilaridade, é levada até o local da reação. Cada zona de detecção foi funcionalizada com uma espécie que reage para formar um composto colorido que permite a determinação colorimétrica dos metais em avaliação. No processo de detecção, a amostra de água, previamente enriquecida com padrões dos analitos, percorreu um caminho através do canal hidrofílico até atingir a zona de detecção, onde formou um complexo de íons metálicos. A correlação entre concentração e escala de cor foi realizada, e os resultados foram comparados com as soluções padrão por meio do software ImageJ.

O uso de estratégias eletroquímicas de detecção também é explorado na literatura e apresenta grande potencial de aplicação para diversos fins. O estudo conduzido por Dungchai et al.⁷ resultou no desenvolvimento de um dispositivo microfluídico multiplex eletroquímico em papel, que permitiu a determinação simultânea de glicose, lactato e ácido úrico em amostras biológicas. Este sistema utilizou enzimas específicas (glicose oxidase, lactato oxidase e urease) para promover a detecção dos analitos. Os eletrodos de trabalho do

dispositivo foram impressos por meio da técnica de serigrafia, empregando tinta de carbono modificada com azul da Prússia, que desempenhou papel de mediador redox na detecção de H_2O_2 , produto gerado nessas reações enzimáticas. Cada eletrodo de trabalho possuiu um eletrodo auxiliar de carbono e um eletrodo de referência de prata, conforme exemplificado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - ELETRODOS IMPRESSOS EM PAPEL POR MEIO DA TÉCNICA DE SERIGRAFIA PARA DETECÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

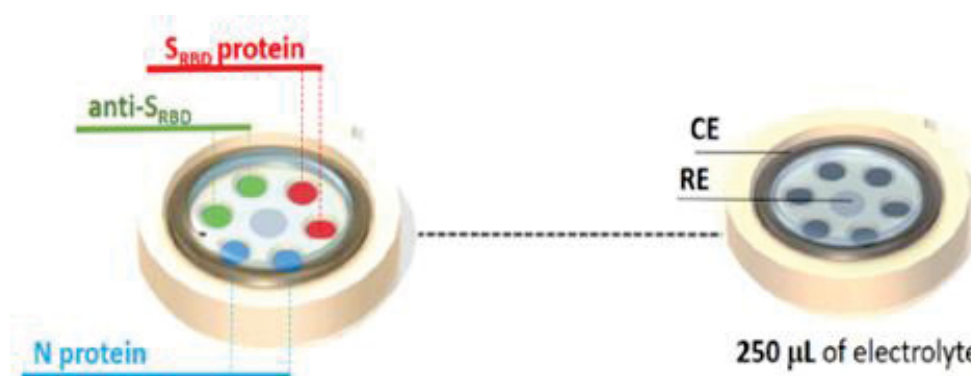


FONTE: Adaptação de Dungchai et al.⁷

Uma vez aplicadas as enzimas em sua respectiva zona de detecção, o papel foi deixado para secar naturalmente por 10 minutos. O processo de detecção foi iniciado com a adição de 5 μ L de solução padrão ou de amostra, direcionados para as respectivas zonas de teste, onde ocorrem reações enzimáticas independentes. Demonstrando a viabilidade do uso de dispositivos multiplexados em diagnósticos médicos.

Além da combinação dos aspectos microfluídicos do papel e a detecção eletroquímica, outros sistemas vêm sendo propostos com configurações diferentes. No trabalho reportado por Morawski et al.⁸ os pesquisadores desenvolveram uma célula eletroquímica completa, de pequeno volume, em um dispositivo multiplexado 3D para a detecção de três biomarcadores associados a COVID – 19 (proteínas N, proteína S_{RBD} e anti-S_{RBD}) em saliva e soro. Pela FIGURA 3 observa-se o esquema representativo do dispositivo desenvolvido.

FIGURA 3 - CÉLULA ELETROQUÍMICA IMPRESSA EM 3D PARA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DA COVID-19.



FONTE: Adaptação de Morawski et al.⁸

O sistema apresentado explora a impressão 3D como estratégia principal para construção completa do dispositivo. A fabricação dos eletrodos de trabalho 3D foi conduzida utilizando um filamento condutivo de ácido polilático/negro de fumo, sendo posteriormente modificado com óxido de grafeno para facilitar a ligação de proteínas. A técnica de voltametria cíclica foi empregada para explorar o comportamento eletroquímico do sistema multiplex.

Adicionalmente, é relevante destacar que amostras das mais variadas origens demandam a determinação de diversos analitos como parâmetros de qualidade, assim, os sensores multiplexados podem desempenhar um papel crucial nessas análises. Dentre os interesses podemos citar a indústria de alimentos. Essa relevância decorre da importância significativa para a saúde da população, uma vez que o estado de saúde está diretamente ligado à qualidade alimentar que uma determinada comunidade recebe. A capacidade desses sensores de realizar a detecção de múltiplos analitos em amostras alimentares é fundamental para assegurar a identificação eficiente de potenciais contaminantes ou componentes indesejados, contribuindo assim para a garantia da segurança alimentar e, por conseguinte, para a preservação da saúde pública.

Um exemplo amplamente utilizado é em detecções rápidas, especialmente em cenários de campo, destinadas à identificação de pesticidas em amostras suscetíveis a contaminação. Um estudo conduzido por Wang et al.⁹ descreveu o desenvolvimento de uma plataforma eletroquímica baseada na abordagem multiplex para a detecção simultânea de profenofos (PFF) e diazinon (DZN) em vegetais, como repolho e couve-chinesa, utilizando um eletrodo de carbono vítreo. A construção desse dispositivo se deu através do uso de

aptâmeros, fragmentos de DNA com alta capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade para os alvos selecionados, neste caso, PFF e DZN. Poudyal et al¹⁰ descreveram a construção de um dispositivo eletroquímico multiplex para a detecção de pesticidas, Glifosato (Glyp) e Clorpirifos (Chlp), também em matrizes alimentares. A plataforma de detecção de dois alvos, baseada em imunoensaio, foi construída utilizando anticorpos específicos para o Glifosato de um lado e anticorpos para o Clorpirifos do outro em eletrodos de ouro. Para além dos pesticidas, existem estudos que exploram a abordagem multiplex na detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite e peixes¹¹, bem como na identificação de micotoxinas em amostras de milho^{12,13}.

Esses estudos evidenciam a versatilidade proporcionada pela plataforma multiplex, permitindo a construção de diferentes sensores mediante a incorporação de diversas estratégias de detecção. Considerando as amplas aplicações potenciais para os analitos, abrangendo áreas como diagnósticos, alimentos, fármacos e meio ambiente, conforme enfatizado ao longo deste texto, o desenvolvimento de dispositivos multiplexados pode ser concretizado por meio de diversas estratégias construtivas em plataformas 2D e 3D, que podem variar desde arranjos mais simples até os mais sofisticados e elaborados¹⁴.

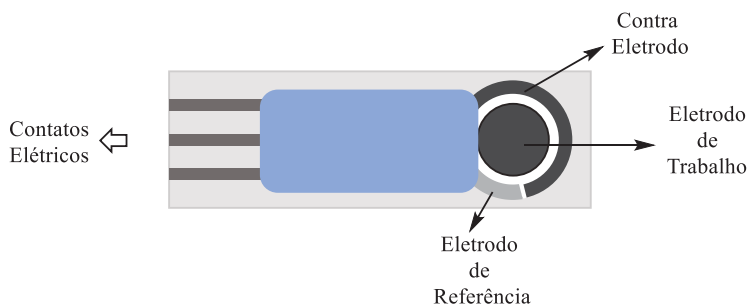
Nesse contexto, considerando essas possibilidades, os eletrodos impressos (SPE, do inglês screen-printed electrodes) surgem como uma escolha vantajosa no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos multiplex, uma vez que atendem a requisitos como miniaturização do sistema, descartabilidade e ainda oferecem alto desempenho eletroanalítico, além de um custo de produção geralmente mais baixo.

1.2 ELETRODOS IMPRESSOS

Os SPEs, em termos gerais, são constituídos por um conjunto de eletrodos que possibilita seu uso como uma célula eletroquímica miniaturizada. Neste dispositivo, o eletrodo de trabalho, referência e contra-eletrodo são impressos na mesma base em um arranjo bidimensional, conforme ilustrado na FIGURA 4. Essa abordagem representa uma proposta economicamente e ambientalmente mais sustentável em comparação com os dispositivos convencionais, os quais empregam células eletroquímicas tradicionais compostas por três eletrodos distintos e separados. A vantagem dessa nova abordagem está na significativa redução no consumo de amostra/reagente, resultando na minimização dos

resíduos gerados e descartados. Além disso, ela evita custos adicionais associados ao uso de maiores volumes de materiais, alinhando-se às demandas de sistemas multiplexados.

FIGURA 4 - ILUSTRAÇÃO DE UM SPE.



FONTE: A autora.

Comercialmente, são encontradas diversas marcas comerciais de eletrodos impressos, como DropSens® e BVT®, com diferentes possibilidades de plataforma e eletrodos, que variam de acordo com o tipo de tinta condutora empregada na confecção (baseadas em carbono, ouro, prata, platina, entre outros), além de possibilitarem a modificação química de suas superfícies. Essa diversidade de possibilidades garante versatilidade de aplicação, uma vez que permite modular a superfície de trabalho de acordo com a necessidade/demanda.

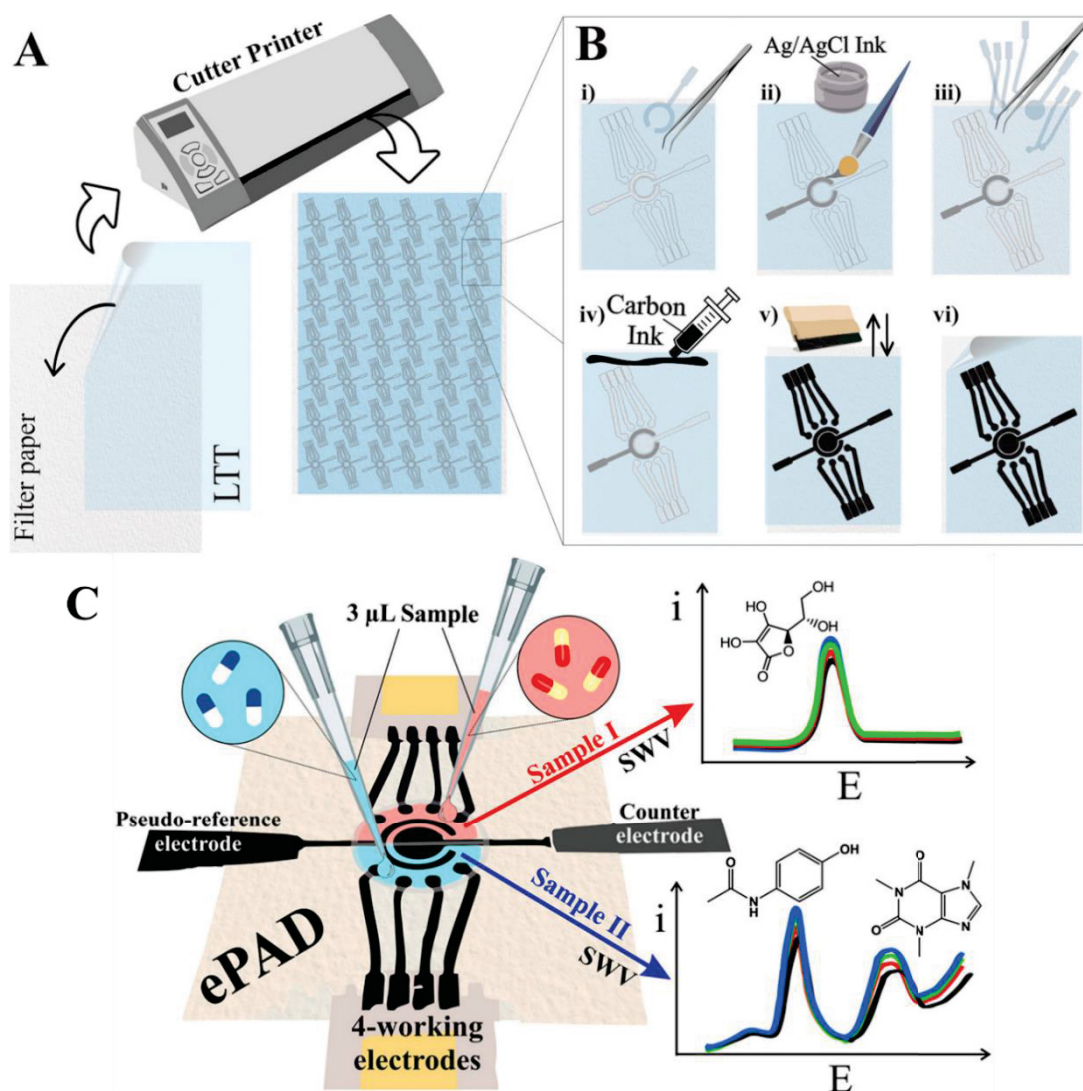
Diante da facilidade de construção e do desempenho que esses eletrodos fornecem, muitos grupos de pesquisa passaram a direcionar estudos visando a construção de SPEs do tipo *lab-made*, com o intuito de reduzir custo e aumentar as possibilidades de novos dispositivos, com diferentes tipos de tintas e modificadores. Em geral, a construção desses eletrodos é realizada através de técnicas de impressão, como por exemplo, através da impressão por microcontato¹⁵, litografia¹⁶, impressão por jato de tinta^{17,18} ou serigrafia¹⁹, sendo esta última técnica também conhecida como “*silk-screen*”. Trata-se de um processo de impressão 2D originalmente utilizada como técnica de impressão de telas em tecidos. O mecanismo da serigrafia consiste no arraste de uma fina camada de tinta com o auxílio de uma espátula sob um estêncil (ou máscara) que permite a passagem de tinta para um substrato abaixo dela.

Dentro das particularidades da construção de eletrodos por serigrafia, alguns fatores mostram-se decisivos para um processo de impressão apropriado e reproduzível: o substrato onde será depositada a tinta, por exemplo, deve apresentar rugosidade apropriada para incorporação da tinta em sua superfície e ser economicamente viável, sendo os suportes mais

comumente empregados o cerâmico, vidro, papel e/ou plástico. A tinta, por sua vez, deve apresentar algumas propriedades básicas para aplicação, como alta condutividade elétrica, viscosidade adequada para o processo de impressão, além de baixo custo e facilidade de manuseio. Baseado nisso, tintas obtidas à base de carbono são as mais empregadas na preparação dos SPEs¹⁹. Comercialmente, existe uma gama de tintas à base de carbono disponíveis.

Oliveira et al.²⁰ utilizam essas tintas de carbono comerciais no desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico em papel (ePAD) para determinações multiplexadas de paracetamol (PAR), cafeína (CAF) e ácido ascórbico (AA) em medicamentos (FIGURA 5). O sistema era composto por dois compartimentos de células eletroquímicas (CE), separados por barreiras hidrofóbicas de cera, e eletrodos serigrafados (SPEs) depositados diretamente sobre a superfície do papel de filtro. No ePAD, cada célula eletroquímica contém uma matriz de 4 eletrodos de trabalho, permitindo até 4 replicatas em uma única medição. Ambas as CEs compartilham um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar, permitindo a análise simultânea de múltiplos analitos. Sendo que o PAR e CAF foram detectados em uma amostra usando uma CE, e AA foi detectado, em uma amostra diferente, na outra CE, ambos sem modificações químicas nos eletrodos de trabalho.

FIGURA 5 - ETAPAS GERAIS EMPREGADAS NA PREPARAÇÃO DO MULTIPLEX. (A) RECORTE DA MÁSCARA ADESIVA; (B) IMPRESSÃO DA TINTA CONDUTORA E DE PRATA; (C) SPE PRONTO COM ESQUEMA ILUSTRATIVO DE APLICAÇÃO.



FONTE: Adaptação de Oliveira et al.²⁰

Apesar de muito úteis, as tintas condutoras comerciais apresentam algumas limitações, como o custo elevado, dificuldade de compra/importação e sigilo dos componentes presentes na tinta. Tentando contornar as desvantagens do uso de tintas condutoras comerciais, as tintas condutoras caseiras ou *homemade inks* (HMIs) são uma alternativa atrativa para a confecção dos eletrodos impressos².

Santos et al.² reportaram a construção e o uso de eletrodos impressos utilizando uma metodologia simples baseada em serigrafia. Os materiais empregados para a preparação das tintas foram o negro de fumo e o acetato de celulose. A melhor composição foi encontrada para eletrodos impressos preparados com 75% (m/m) de negro de fumo, 25%

(m/m) de acetato de celulose e uma mistura de acetona e ciclohexanona. Os dispositivos foram empregados na determinação cronoamperométrica de ácido ascórbico e de íons chumbo e cádmio utilizando a voltametria de redissolução anódica. Os autores obtiveram um LOD de $0,31 \mu\text{mol L}^{-1}$ e desvios relativos inferiores a 1,9 % para a determinação de ácido ascórbico e faixas lineares de resposta de 0,8 a $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,0 a $63 \mu\text{mol L}^{-1}$ para íons cádmio e chumbo, respectivamente. Os eletrodos desenvolvidos para quantificação de íons chumbo e cádmio apresentaram faixa de resposta dentro dos limites estipulados pela resolução do CONAMA 430/2011 para lançamento de efluentes.

Dessa forma, ao combinar a técnica de impressão por serigrafia com o uso de tintas caseiras, é possível obter uma metodologia de impressão de baixo custo. Além das vantagens econômicas, essa técnica oferece versatilidade para o design de células eletroquímicas, permitindo a criação de eletrodos com diversas formas, tamanhos e arranjos. Essa flexibilidade é especialmente útil na construção de sistemas multiplex. Utilizando a serigrafia, é possível produzir eletrodos personalizados para diferentes aplicações, adaptando-se às necessidades específicas de cada experimento ou dispositivo eletroquímico.

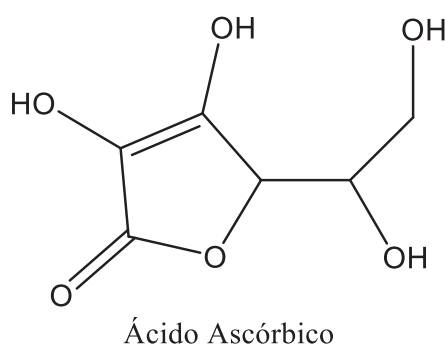
Nessa perspectiva, o principal objetivo deste trabalho é desenvolver uma estratégia para a fabricação de eletrodos impressos à base de carbono, produzidos a partir de tintas condutoras *lab-made*, visando a criação de um dispositivo multiplex por meio da integração desses eletrodos em uma única plataforma. A proposta abrange o desenvolvimento de um sistema versátil que inclui um eletrodo convencional (com tinta à base de esmalte/grafite), um eletrodo para aplicação de biossensor e um eletrodo utilizando a tinta condutora *lab-made* com adição de um modificador. Este modelo integra três eletrodos de trabalho distintos, cada um com características específicas para o analito correspondente, além de eletrodos de referência e auxiliar, essenciais para a formação de uma cela eletroquímica completa, delimitados por uma máscara hidrofóbica. Para explorar a potencialidade analítica do dispositivo proposto, serão empregados diferentes analitos, tais como ácido ascórbico (AA) para o eletrodo convencional, glicose (GLI) para o biossensor e o fungicida carbendazim (CBZ) para o eletrodo modificado. Essa seleção diversificada de analitos torna-se particularmente relevante para estudos em alimentos, dada a presença comum de antioxidantes, açúcares e possíveis contaminantes, sendo o suco de laranja uma amostra plausível para avaliação. Essa abordagem promissora permitirá a produção de dispositivos portáteis, de baixo custo e capazes de determinar múltiplos analitos em uma única plataforma.

1.3 ANALITOS

1.3.1 Ácido Ascórbico

O AA (FIGURA 6) também usualmente conhecido como vitamina C é encontrado naturalmente em uma ampla gama de frutas, vegetais e legumes²¹. O AA é uma molécula hidrossolúvel, sendo facilmente eliminada e pouco armazenada pelo organismo humano. Além disso, não é sintetizado no corpo humano devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, que tem que o papel de transformar a GLI do sangue em AA²².

FIGURA 6 - ESTRUTURA MOLECULAR DO AA.



Fonte: A autora.

A vitamina C é um potente antioxidante pois atua na neutralização dos radicais livres, espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo os derivados do oxigênio e do nitrogênio a classe mais significativa de radicais gerados em sistemas vivos²³. As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e de nitrogênio (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Species*) são produzidas principalmente pelos mecanismos celulares e, quando em excesso, podem causar danos ao organismo. No entanto, existem outros fatores que aumentam a produção desses radicais livres, como poluição, radiação UV, alimentação inadequada, obesidade, inflamações, entre outros. Esses radicais livres em excesso podem levar ao desenvolvimento de doenças graves, como o câncer²⁴.

Devido a estes fatores a suplementação desse nutriente através de alimentos, sucos e suplementos vitamínicos é importante para o funcionamento e manutenção do organismo²⁵. No Brasil, a ingestão diária recomendada (IDR) regulamentada pela ANVISA é de 45, 55 e 70 mg para adultos, gestantes e lactantes, respectivamente²⁶. De acordo com estudos na

literatura, níveis de AA abaixo de 3 mg L⁻¹ ou 17 mmol L⁻¹ indicam deficiência no organismo, enquanto valores acima de 6 mg L⁻¹ ou 34 mmol L⁻¹ são considerados satisfatórios^{27,28}. Nos laudos laboratoriais do Brasil, a faixa de referência comumente encontrada de AA no sangue é de 4,6 a 15,0 mg L⁻¹ ^{29,30}. Assim, o monitoramento desse composto, em amostras alimentícias, suplementos vitamínicos e fluidos biológicos, é essencial para garantir que a ingestão desse nutriente esteja adequada, a fim de evitar problemas oriundos da deficiência de vitamina C.

Várias técnicas estão disponíveis para determinação do antioxidante, como cromatografia³¹, espectrometria^{32,33} e fluorescência^{34,35}. No contexto da avaliação de AA em sucos e preparados, a Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), uma das principais autoridades internacionais na padronização de métodos analíticos para alimentos e bebidas, recomenda a titulação com o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol, conhecido como reagente de Tillmans³⁶. No entanto, esse método enfrenta alguns desafios, uma vez que se baseia em titulações clássicas. Um desses desafios é a definição do ponto final da titulação, frequentemente determinada visualmente pelo analista. Essa abordagem pode resultar em sérios erros de precisão e exatidão do método, especialmente em casos envolvendo amostras de intensa coloração. Além disso, esse procedimento requer o uso de grandes volumes de reagentes, o que não é apenas economicamente custoso, mas também prejudicial ao meio ambiente.

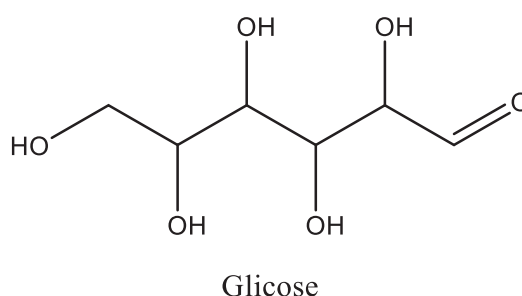
Nesse sentido, a adoção de métodos eletroanalíticos para a determinação do AA se mostra como uma alternativa viável, em virtude da simplicidade na determinação eletroquímica desse antioxidante. Além da praticidade no processo analítico, essa abordagem oferece resultados rápidos e confiáveis e a instrumentação da técnica desempenha um papel importante na minimização de problemas relacionados à precisão e exatidão frequentemente encontrados nos métodos clássicos.

Em resumo, a determinação eletroquímica do AA se destaca como uma abordagem interessante e amplamente adotada para quantificar esse antioxidante com rapidez, baixo custo, facilidade de uso e alta sensibilidade. A utilização de sensores eletroquímicos proporciona informações sobre os níveis de AA em diversas amostras, desempenhando um papel fundamental no monitoramento da ingestão adequada de vitamina C e na prevenção de deficiências nutricionais.

1.3.2 Glicose

A glicose (GLI), também chamada de dextrose, é um carboidrato simples do tipo monossacarídeo (FIGURA 7), e representa a principal fonte de energia dos seres vivos, sendo um dos principais produtos da fotossíntese e responsável por iniciar o processo de respiração celular em seres procariontes e eucariontes³⁷.

FIGURA 7 - ESTRUTURA MOLECULAR DA GLI.



Fonte: A autora

Em organismo humanos, a GLI é majoritariamente obtida por meio da alimentação, e sua quantidade no sangue (glicemia) é regulada pela ação de dois hormônios que agem de maneira contrária: a insulina e o glucagon. A insulina é o hormônio produzido pelo pâncreas e responsável por regular os níveis de GLI no sangue e facilitar a entrada da GLI nas células, para que ela seja utilizada como fonte de energia e mantenha o equilíbrio metabólico do organismo³⁸. O glucagon, no entanto, apresenta uma ação contrária, atua permitindo que a reserva de GLI seja quebrada (glicogênio) e os seus níveis no sangue aumentem³⁹.

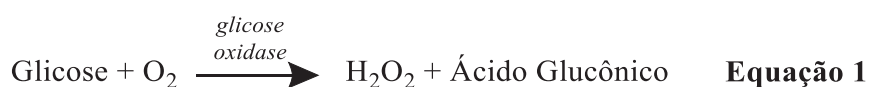
Apesar da sua importância para o fornecimento de energia, uma dieta com alta ingestão desse carboidrato pode acarretar no desenvolvimento de doenças, como a diabetes *mellitus*, que vem sendo apontada como uma das doenças que mais crescem nos últimos anos⁴⁰. Dessa forma, o monitoramento dos níveis desse açúcar tanto no sangue como em alimentos é importante para o controle e prevenção de doenças associadas a uma alta taxa de GLI no organismo. Nesse contexto, o uso de sensores eletroquímicos se torna uma alternativa bastante atraente, pois consegue conciliar aspectos como baixo custo, portabilidade e resultados precisos⁴¹⁻⁴³.

Tradicionalmente, o automonitoramento, ou triagem, é realizado através de um glicosímetro, que se utiliza de um método eletroquímico para detecção enzimática da GLI. O dispositivo apresenta facilidade de manuseio e entrega de resultados confiáveis e rápidos

sem a necessidade de recorrer a laboratórios de análises. A mesma abordagem pode ser transposta para detecção em alimentos.

Como o processo de oxidação eletroquímica da GLI não ocorre em condições brandas de potencial, sua detecção pode ser realizada através de métodos enzimáticos ou não enzimáticos. Os métodos não enzimáticos consistem obrigatoriamente na utilização de mediadores redox, que atuam catalisando a oxidação da GLI, em condições de menores valores de potencial. Um exemplo dessa abordagem consiste na utilização de um sistema catalítico envolvendo níquel em meio básico para formação de espécies Ni^{3+} que são capazes de oxidar a GLI⁴¹. Os dispositivos enzimáticos utilizam enzimas específicas para GLI, como a glicose oxidase (GOx) e a glicose desidrogenase, que conferem alta sensibilidade e seletividade aos sensores. A GOx catalisa a oxidação da GLI utilizando oxigênio, enquanto a glicose desidrogenase usa coenzimas específicas sem necessidade de oxigênio na reação.

Os sensores baseados na reação de conversão da GLI pela enzima GOx apresentam um processo que resulta na produção de ácido glucônico e, simultaneamente, a redução do oxigênio gera peróxido de hidrogênio, conforme demonstrado **Equação (1)**⁴⁴. Devido aos desafios da determinação direta da GLI, a detecção pode ser realizada de maneira indireta, através do consumo de oxigênio ou pela detecção do peróxido de hidrogênio produzido. Nesse caso, atuando como um biossensor de primeira geração.



Quando o monitoramento é feito através do peróxido, sua detecção ocorre em potenciais próximos de -0,5 V vs (Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl). Nesse potencial, a possibilidade de interferência devido à espécies concomitantes advindas da matriz, que contenha GLI, é alta, podendo acarretar em problemas na análise⁴⁵. Nesse sentido, o uso de mediadores redox na superfície desses eletrodos, em associação sinérgica com a enzima, é uma estratégia empregada para reduzir a possibilidade de interferência de outras espécies. Destaque para o hexacianoferrato de ferro (azul da Prússia), o qual é empregado com a finalidade de mediar a redução de peróxido de hidrogênio. O mediador possui uma fórmula molecular de $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e os centros metálicos de Fe(II) e Fe(III) são capazes de mediar e/ou catalisar reações redox, em especial H_2O_2 . Nesse contexto, o azul da Prússia é usado

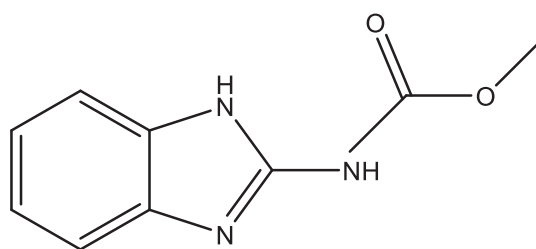
como mediador redox seletivo para detectar o peróxido gerado na oxidação da GLI, permitindo prever, de maneira indireta, a concentração de GLI.

Diversos trabalhos relatam o desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para a determinação enzimática de GLI utilizando o azul da Prússia como mediador redox⁴⁶⁻⁴⁸. A obtenção do complexo pode ser realizada por diferentes rotas sintéticas^{49,50}. Outra forma amplamente utilizada é através da síntese eletroquímica, na qual o filme de azul da Prússia pode ser formado eletroquimicamente por meio de diferentes técnicas de eletrodeposição, como voltametria cíclica⁵¹, galvanostática⁵² e potenciostática⁵³, mostrando-se uma alternativa consolidada para monitoramento de GLI através dos pares redox branco/azul da Prússia.

1.3.3 Carbendazim

O carbendazim (CBZ), metil-2-benzimidazólio-carbamato (FIGURA 8), faz parte dos fungicidas sistêmicos do grupo dos benzimidazóis e apresentaram grande destaque na agricultura a partir da década de 1960. No Brasil, os benzimidazóis são aplicados em culturas de algodão (sementes), citros (folhas), feijão (sementes e folhas), soja (sementes e folhas), trigo (folhas) e numa grande variedade de frutas e vegetais⁵⁴. Dentre essas culturas, uma das que mais se destaca no estado do Paraná é a cultura de laranja, ocupando atualmente o terceiro lugar na produção nacional, de acordo com dados do IBGE⁵⁵.

FIGURA 8 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CBZ.



Carbendazim

Fonte: A autora.

O CBZ é um fungicida que atua inibindo proteínas específicas, conhecidas como α e β tubulinas, responsáveis pela formação do citoesqueleto dos fungos. O citoesqueleto é uma

estrutura fundamental para a manutenção celular, desempenhando um papel essencial na divisão celular. Quando essas proteínas são inibidas, a divisão celular é impedida, resultando em células fúngicas multinucleadas e, eventualmente, levando o fungo à morte⁵⁴. O fungicida apresenta classificação toxicológica de nível III, considerado moderadamente tóxico, apresentando potencialidade carcinogênica⁵⁶.

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos PARA⁵⁷, estabelecia como limite máximo de resíduos (LMR) 2 mg kg⁻¹. Em conformidade, a Organização Mundial da Saúde (OMS) determinava um LMR de 5 mg kg⁻¹⁵⁸. Entretanto, em junho do ano de 2022, a ANVISA⁵⁹ determinou a suspensão cautelar da importação, fabricação, comercialização e distribuição do ingrediente ativo CBZ, até a conclusão da reavaliação toxicológica do ativo. A decisão foi norteada pelos resultados de estudos de mutagenicidade *in vivo*, realizados em células germinativas de mamíferos. A conclusão do estudo acarretou na classificação do CBZ como presumidamente mutagênico para células germinativas humanas (Categoria 1B)⁶⁰.

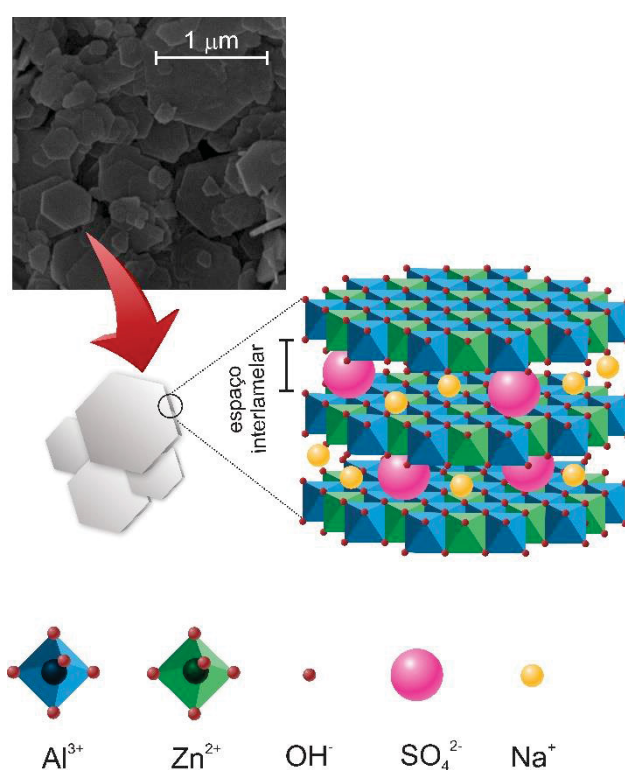
Devido a proibição e ao uso desse ativo de maneira ilícita, a fiscalização desse fungicida se torna ainda mais crucial. O monitoramento e a detecção de CBZ pode ser realizada por diversos métodos, como a cromatografia líquida de alta eficiência⁶¹, espectroscopia de fluorescência molecular^{62,63}, espectroscopia UV-Vis⁶⁴ e métodos eletroquímicos⁶⁵⁻⁶⁸. Entre as técnicas mencionadas, os sensores eletroquímicos destacam-se por sua acessibilidade, simplicidade técnica e custo reduzido, proporcionando análises simples, sensíveis e rápidas, muitas vezes dispensando etapas de tratamento de amostras. Como o CBZ é um analito eletroativo, que apresenta processo de oxidação irreversível em condições de velocidade de varredura não muito rápidas e muito bem reportado na literatura, o uso das técnicas eletroquímicas se torna adequada para sua determinação.

Devido à toxicidade do CBZ e sua proibição de uso subsequente, a presença desse composto em amostras contaminadas deve resultar em concentrações baixas, tornando necessário o emprego de métodos analíticos altamente sensíveis. Uma estratégia eficaz para a melhoria abrangente do desempenho do sensor na detecção de CBZ é a modificação do eletrodo. Essa abordagem implica alterações na superfície do eletrodo para aprimorar suas propriedades físicas ou químicas. Essas modificações podem incluir a incorporação de materiais específicos, aplicação de tratamentos químicos ou utilização de revestimentos, todos destinados a otimizar o desempenho do eletrodo em aplicações⁶⁹.

1.4 HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES (HDL)

O uso de hidróxidos duplos lamelares (HDL) vem sendo reportado na literatura como um material com diferentes aplicações^{70,71}. Os HDLs como os representados na FIGURA 9, fazem parte de uma classe de materiais inorgânicos que possuem uma estrutura lamelar composta por camadas de hidróxidos metálicos e que apresentam fórmula geral $[M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2](A^{n-})_{x/n} \cdot yH_2O$, onde M^{3+} e M^{2+} representam cátions passíveis de ocuparem sítios octaédricos e A^{n-} corresponde a um ânion de carga n^{-} .

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DOS HDLS DE ZN/AL E Na_2SO_4 .



Fonte: A autora, adaptado de Goh et al.⁷³.

Esse material pode amplificar a detecção do fungicida devido sua adsorção à superfície do material. A maioria dos trabalhos que utilizam os HDLs como modificadores de eletrodo, destacam sua capacidade como material adsorvente, majoritariamente via interações eletrostáticas, permitindo promover a pré-concentração espontânea do analito alvo^{74,75}.

Tcheumi et al.⁷⁶ desenvolveram um sensor eletroquímico para a determinação do herbicida isoproturon, um poluente perigoso amplamente utilizado na agricultura, cujos

resíduos são distribuídos no ambiente aquoso por meio do escoamento superficial e lixiviação do solo. O dispositivo foi criado através da modificação de um eletrodo de pasta de carbono com HDL/NiAl. Por meio de um estudo sobre a proporção do modificador na pasta de carbono, foram exploradas composições variando de 2,5% a 15% (m/m) do material. Observou-se que, entre os valores de 2,5% a 10%, houve um aumento na corrente elétrica à medida que mais HDL era adicionado à pasta, atingindo o valor máximo de corrente com 10% (m/m), seguido de uma diminuição do sinal para maiores concentrações do modificador na pasta. Esse aumento na corrente elétrica está associado ao incremento no número de sítios de adsorção, que aumentam na interface eletrodo-solução. Já a redução do sinal elétrico observado em valores acima de 10% (m/m) ocorre devido ao fato de que os LDHs são materiais fracamente condutores, o que compromete a condutividade do eletrodo. Após as otimizações, o desempenho analítico do eletrodo modificado com HDL foi comparado ao eletrodo de pasta de carbono não modificado, revelando um aumento de 2,6 vezes no sinal do herbicida após etapa de pré concentração, destacando sua contribuição na detecção de poluentes.

Além do uso dos HDL na sua forma integra, esse material pode ainda ser esfoliado em solventes adequados devido às fracas forças de interação entre as lamelas. Essa delaminação do material resulta em um aumento significativo de sua área superficial, proporcionando uma maior capacidade de adsorção do material⁷⁷. A delaminação na fase líquida é a maneira mais prática de obter lamelas 2D a partir de materiais lamelares. Nesse procedimento, o material lamelar é disperso em um solvente, geralmente orgânico, cujo tamanho molecular é suficientemente pequeno para intercalar entre as lamelas. A delaminação acontece após a intercalação de moléculas desse solvente, o que resulta no aumento da distância interlamelar. Esse processo enfraquece a adesão entre as lamelas, diminuindo, por consequência, a barreira de energia para a delaminação.⁷⁸.

Nesse contexto, a detecção eletroquímica do CBZ, utilizando eletrodos impressos modificados com HDLs de Zn/Al submetido a processo de delaminação (dHDL), se apresenta como uma metodologia interessante, viável e promissora.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Construir um sistema multiplex empregando eletrodos impressos preparados por serigrafia utilizando tintas caseiras (*Home Made Inks* (HMI)) para quantificação de ácido ascórbico (AA), glicose (GLI) e carbendazim (CBZ) em amostras de sucos de laranja.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar a tinta condutora a ser empregada no substrato (PVC) para confecção do eletrodo impresso;
2. Construir e caracterizar eletrodos impressos, considerando o formato, o processo de impressão, a morfologia e o comportamento eletroquímico;
3. Investigar o comportamento eletroquímico, por voltametria, empregando uma sonda redox (íons ferricianeto) para verificar o desempenho dos eletrodos construídos;
4. Planejar e construir um sistema multiplex, considerando a disposição dos eletrodos e o processo de impressão; verificar o desempenho do multiplex, utilizando uma caixa multicanal;
5. Preparar a tinta condutora modificada com dHDL para ser empregada no substrato (PVC) para confecção do eletrodo impresso modificado para detecção do CBZ;
6. Avaliar a capacidade de imobilização de biomoléculas (enzima GOx) na superfície dos SPE para o desenvolvimento de biossensores;
7. Desenvolver e aplicar método analítico para a determinação de AA e GLI e CBZ em amostras de sucos naturais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os materiais utilizados na construção dos eletrodos, nas caracterizações eletroquímicas e avaliações dos analitos se encontram na TABELA 1.

TABELA 1 - LISTA DE REAGENTES E SUA PROCEDÊNCIA.

Reagente	Procedência	Grau de Pureza
Acetado de Sódio	Êxodo Científica®	P.A.
Acetato de etila	Synth®	P.A.
Ácido Ascórbico	Impex®	P.A.
Ácido Bórico	Dinâmica®	P.A.
Ácido Clorídrico	J.T.Baker®	36,5 – 38%
Ácido Fosfórico	Synth®	85%
Adesivo Vinílico	Imprimax®	-
Albumina do soro bovino	Cedido pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP)	-
Brometo de Cetrimônio (CTAB)	Êxodo Científica®	-
Carbendazim	Sigma-Aldrich®	97%
Cloreto de Ferro	Synth®	P.A.
Cloreto de Potássio	Êxodo Científica®	P.A.
Esmalte de unha	Risque®	-
Etanol	Êxodo Científica®	P.A.
Ferricianeto de Potássio	Vetec®	P.A.
Formamida	BioPack®	P.A.
Glicose oxidase (de <i>Aspergillus niger</i>)	Tokio Chemical Industry Co.	77 u/mg
Glutaraldeído	Sigma-Aldrich®	25%
Grafite em pó	Fisher Scientific®	-
HDL – Zn/Al	Sintetizado pelo LAQMA	-
Hidróxido de Sódio	Neon®	P.A.
Impressora 2D (Silhoutte Cameo 3)	Silhoutte®	-

Microscopio Digital	NovaDigital®	-
Nafion®	Sigma-Aldrich®	5%
Nitrato de Potássio	Êxodo Científica®	P.A
Perclorato de Sódio	Dinâmica®	P.A.
PVC fosco (0,6 mm de espessura)	Actos®	-
Silicone	Cascola®	-
Suco de Laranja	Marca Comercial	-

3.2 DELAMINAÇÃO DO HDL Zn/Al

As amostras de HDL de Zn/Al (intercalado com Na_2SO_4) foi fornecido pelo prof. Dr. Fernando Wypych, do laboratório Química de Materiais Avançados (LAQMA). A delaminação do HDL foi adaptada com base no método relatado por Perez-Barrado et al.⁷⁹. As amostras foram dispersas em formamida a uma concentração de 1 mg mL^{-1} . O processo de delaminação foi conduzido em um banho de ultrassom à temperatura ambiente, com ciclos de 60 minutos de ultrassonicação seguidos de 50 minutos em repouso. Foram realizados oito ciclos para obtenção do material delaminado. Por fim, o material separado por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos seguido de secagem à 60°C , em estufa.

3.3 ELETRODOS IMPRESSOS CONSTRUÍDOS POR SERIGRAFIA

3.3.1 Preparação das Tintas Condutoras

A tinta condutora utilizada (*homemade ink - HMI*), foi preparada no laboratório de pesquisa seguindo a metodologia descrita e otimizada por Gevaerd et al⁸⁰. Essa metodologia envolve a confecção da tinta condutora utilizando grafite, esmalte de unha incolor e acetato de etila. Conforme relatado, a proporção entre grafite e esmalte foi de 70% para grafite e 30% para esmalte (em massa). Para produzir 1,00 g de tinta, determinou-se que a quantidade ideal de acetato de etila foi de 700 μL , a fim de se obter a viscosidade desejada.

3.3.2 Preparação das Tintas Condutoras Modificadas

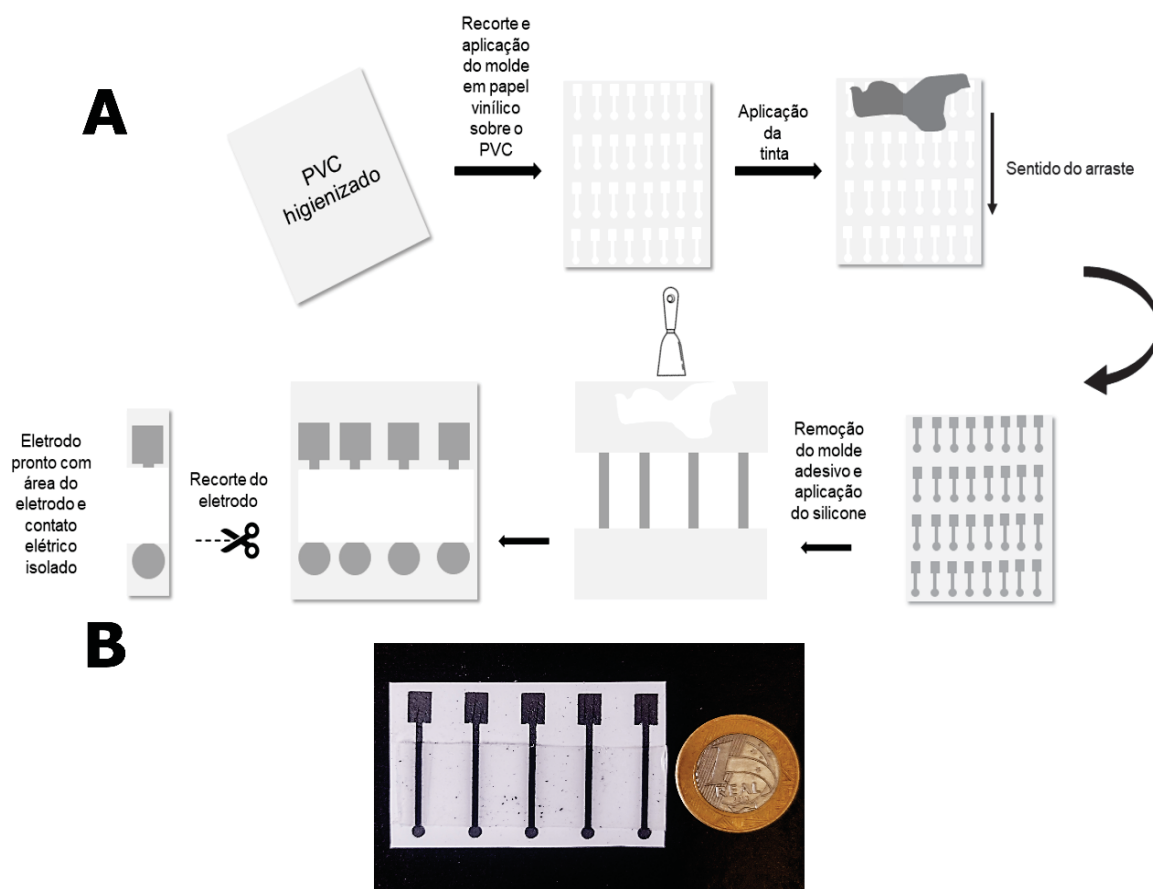
A modificação da tinta condutora foi realizada utilizando tanto o HDL Zn/Al íntegro como o HDL Zn/Al delaminado (dHDL). Diferentes proporções de dHDL (5%, 10% e 15%)

foram estudadas. A massa correspondente ao modificador foi subtraída da proporção de grafite (70% - x%) e a proporção de esmalte foi mantida em 30%. Para o HDL Zn/Al íntegro, foi estudada uma proporção de 15% do modificador, 55% de grafite e 30% de esmalte. Para produzir 1,00 g de tinta, determinou-se que a quantidade ideal de acetato de etila é de 700 μL , a fim de obter a viscosidade desejada.

3.3.3 Confeção do Eletrodo Impresso

A fabricação de eletrodos impressos envolve várias etapas que resultam em um dispositivo completo para uso como sensor eletroquímico. Nesse sentido, as etapas envolvidas no processo de construção dos sensores reportados nesse trabalho estão apresentadas na FIGURA 10.

FIGURA 10 - FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS (A) ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS ETAPAS DA CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS IMPRESSOS POR SERIGRAFIA. (B) CARTELA COM CINCO ELETRODOS IMPRESSOS PRONTO E SEU TAMANHO RELATIVO A UMA MOEDA DE R\$1,00.



FONTE: A autora

A primeira etapa da confecção dos eletrodos envolveu o recorte das máscaras adesivas. Utilizou-se a impressora de recorte Silhouette Cameo 3 e o molde para a impressão foi preparado com o auxílio do software de desenho Silhouette Studio® 4.4 (Silhouette America Inc, USA). Após a impressão, em adesivo vinílico com espessura de 0,12 mm, os negativos da impressão foram removidos. Em seguida, foi realizado o preparo do substrato (folha de PVC) lavando-o com água e sabão neutro, utilizando uma esponja suave para evitar ranhuras em sua superfície. Após a lavagem e secagem, aplicou-se álcool etílico em toda a placa de PVC como etapa final de higienização.

Neste projeto, foram avaliados dois tipos de substratos à base de PVC, um com superfície fosca e outro com superfície brilhante. Após a limpeza, o molde impresso foi colado na folha e a tinta produzida foi vertida sobre o PVC e espalhada com o auxílio de uma espátula, formando uma fina camada sobre o substrato. Antes de secar completamente, o molde de adesivo vinílico foi removido. Para delimitar a área do eletrodo de trabalho, isolou-se o eletrodo com silicone neutro, que foi aplicado na placa da mesma forma que a tinta, deixando livre a área do eletrodo de trabalho e o contato elétrico. Após a secagem completa do silicone, os eletrodos foram recortados individualmente e embalados a vácuo para armazenamento.

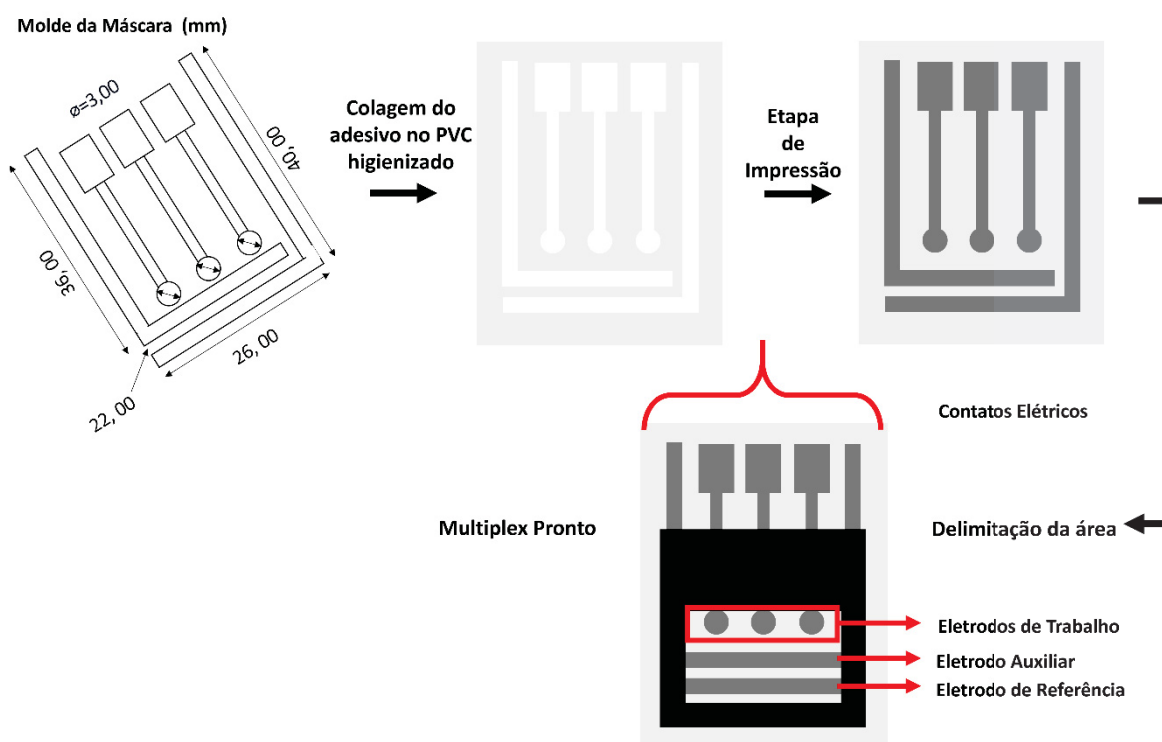
3.3.4 Confecção do Eletrodo Impresso Modificado com HDL

A etapa de impressão dos eletrodos modificados seguiu uma abordagem semelhante à descrita anteriormente, porém foi dividida em duas partes distintas. Na primeira, procedeu-se com a impressão da região de contato dos eletrodos, utilizando tinta convencional. Na segunda etapa, focou-se na impressão da região circular do eletrodo, também conhecida como área de trabalho, empregando a tinta modificada. Por fim, o isolamento da área seguiu da mesma maneira com o uso do silicone neutro.

3.3.5 Confecção do Sistema Multiplex

A montagem do sistema multiplex foi realizada de forma semelhante às impressões mencionadas anteriormente. Após a criação de um molde apropriado, o processo seguiu as mesmas etapas de impressão, as quais estão resumidamente apresentadas na FIGURA 11.

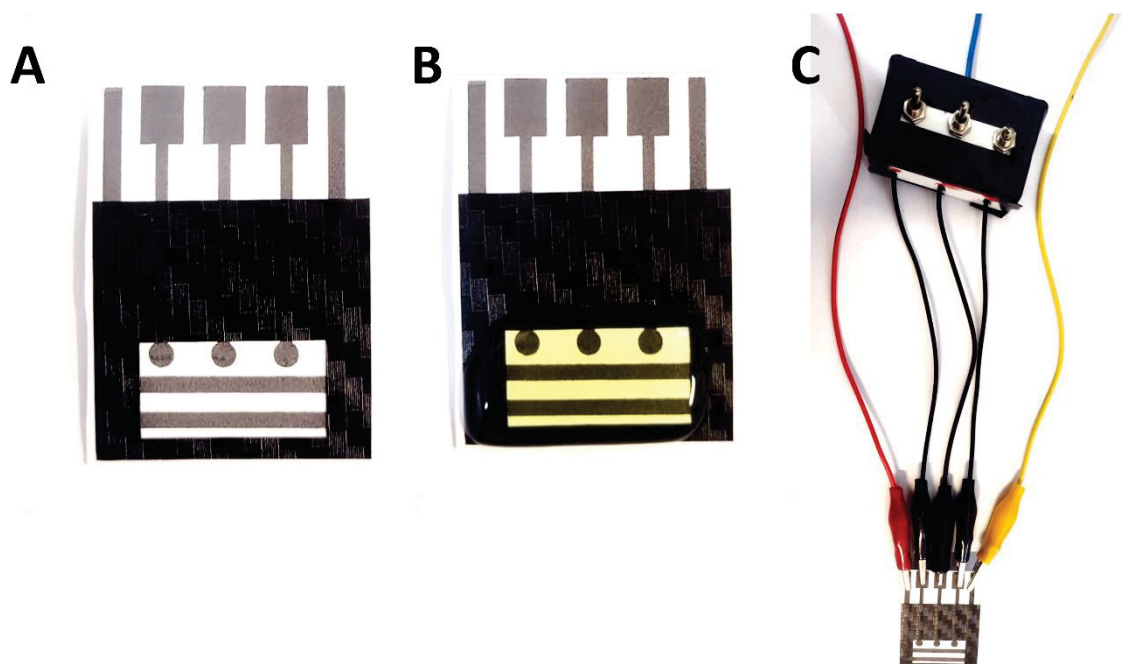
FIGURA 11 - ETAPAS DE IMPRESSÃO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX.



FONTE: A Autora.

Após a conclusão da impressão do dispositivo, as medidas eletroquímicas foram conduzidas com o auxílio de um controlador analógico para estabelecer o contato elétrico entre os eletrodos do multiplex e o potenciostato. A utilização do controlador analógico facilitou a seleção dos eletrodos de trabalho, permitindo uma aplicação de potencial única ou simultânea entre os eletrodos. Esse arranjo está ilustrado na FIGURA 12.

FIGURA 12 - DISPOSITIVO MULTIPLEX. A) MULTIPLEX PRONTO. B) MULTIPLEX COM 100 μL DE SOLUÇÃO $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol L^{-1} . C) MULTIPLEX CONECTADO A CAIXA MULTICANAL.



FONTE: A autora.

3.4 CARACTERIZAÇÕES

3.4.1 Caracterização por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de Transmissão (MET)

Para a caracterização da tinta condutora, foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 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 100 V e 30 kV, e resolução de 1 nm.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) realizadas no microscópio JEOL, modelo JEM 1200, do centro de microscopia eletrônica da UFPR. As imagens foram obtidas com ampliação de 5 kx, 10 kx, 20 kx 30 kx e 50 kx. O material foi previamente disperso em água e adicionado ao porta amostras do MET – grid.

3.4.2 Medidas de Ângulo de Contato

Para a medida do ângulo de contato, foi utilizada uma caixa de papelão para criar um ambiente escuro e as imagens foram capturadas utilizando um microscópio digital da marca NovaDigital®. Nos testes, adicionou-se 20 μL de água destilada sobre a região do eletrodo de trabalho, e o ângulo de contato foi mensurado utilizando a ferramenta "Contact Angle" do programa ImageJ.

3.4.3 Medidas Eletroquímicas

As caracterizações eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato-galvanostato do tipo $\mu\text{Autolab}$ Tipo III, controlado pelo software NOVA 2.1.3. Na caracterização e otimização dos eletrodos, empregou-se eletrodos impressos individuais, associados a um eletrodo de referência externo (Ag/AgCl 3,0 mol L^{-1} KCl) e um eletrodo auxiliar de platina, dispostos em uma cela eletroquímica de 10 mL. Os resultados obtidos foram processados utilizando o software OriginPro® 8.5. O desempenho eletroquímico do dispositivo foi avaliado por meio de CV, na faixa de potencial de -0,5 V a 0,8 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . A solução utilizada como sonda eletroquímica consistiu em $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na concentração de 5,0 mmol L^{-1} e KCl 0,1 mol L^{-1} , como eletrólito suporte.

As medidas de EIS foram realizadas com parâmetros instrumentais de frequência variando de 0,05 Hz a 100 kHz, potencial equivalente ao potencial de meia onda da sonda eletroquímica ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1}) e 10 mV de amplitude de potencial.

3.4.3.1 Tratamento Eletroquímico da Superfície dos Eletrodos Impressos

Para avaliar potenciais melhorias no desempenho eletroquímico mediante o tratamento da superfície do eletrodo por ciclagem em NaOH 0,1 mol L^{-1} , foram realizados estudos sob diversas condições de tratamento, conforme detalhado na TABELA 2.

TABELA 2 - TIPOS DE TRATAMENTO ELETROQUÍMICO AVALIADOS E SUAS RESPECTIVAS CONDIÇÕES ELETROQUÍMICAS.

Tratamento	Aplicação de Potencial / V	Quantidade de Ciclos	Tempo de aplicação de potencial / s
CV	-1,5 a 1,5 V	5, 10, 15 e 20	-
CV Anódica	0 a 1,5 V	15	-
CV Catódica	-1,5 a 0 V	15	-
Amperometria Anódica	+1,5 V	-	30, 60 e 90
Amperometria Catódica	-1,5 V	-	30, 60 e 90

Depois da etapa de tratamento, os parâmetros da corrente de pico anódica, corrente de fundo capacitiva e a variação de potencial de pico (ΔE) da sonda eletroquímica $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ foram utilizados como indicadores para avaliar a eficácia das diferentes condições de tratamento.

3.5 AVALIAÇÃO DO ELETRODO CONVENCIONAL PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

3.5.1 Medidas Eletroquímicas para detecção de Ácido Ascórbico

A potencialidade do eletrodo impresso foi avaliada em relação ao AA por meio da aplicação da técnica de CV, através de análises diretas. O intervalo de potencial utilizado foi de -0,2 a 1,0 V (vs. Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl), com taxa de varredura de 50 mV s⁻¹ com o objetivo de examinar os processos faradâicos associados ao AA em uma concentração de 0,25 mmol L⁻¹ em solução de eletrólito suporte tampão acetato pH 5,0. A curva analítica feita por CV utilizou os mesmos parâmetros instrumentais e foi obtida a partir de adições crescente de AA que variaram entre 10 µmol L⁻¹ a 0,25 mmol L⁻¹.

3.6 AVALIAÇÃO DO BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE GLICOSE

3.6.1 Formação do Filme de Azul da Prússia.

A formação do filme de azul da Prússia sobre a superfície do eletrodo foi feita por via eletroquímica conforme reportada por Lowinsohn⁸¹. A eletrodeposição foi realizada por CV a partir de varreduras consecutivas de potencial, na região de -0,50 a 1,3 V, com velocidade de 50 mV s⁻¹ durante 15 ciclos em uma solução contendo 0,6 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆], 0,6 mmol L⁻¹ de FeCl₃, 0,1 mol L⁻¹ de KCl e CTAB 1,0 mmol L⁻¹, em pH de aproximadamente de 1,7.

3.6.2 Imobilização do Enzima Glicose Oxidase

A imobilização da enzima GOx sobre a superfície do eletrodo foi realizada por reação de ligação cruzada, cuja metodologia foi adaptada do artigo reportado por Ricci et al⁸². Para o preparo de 150 µL da mistura, foram combinados 20 µL de glutaraldeído (2,5% v/v diluído em água) e 30 µL de Nafion (5% v/v em etanol) com 100 µL de uma solução contendo 40 mg de BSA e 10 mg de enzima, previamente solubilizados em 1,0 mL de tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ + KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5.

Em seguida, 5 µL da mistura foram adicionados à área do eletrodo de trabalho e seco 45 minutos à temperatura ambiente. Sequencialmente, os eletrodos foram lavados com água e submetidos ao bloqueio dos sítios residuais, utilizando uma solução de glicina 0,1 mol L⁻¹ por 30 minutos. Após a conclusão dessas etapas do procedimento experimental, os eletrodos estavam prontos para uso.

3.6.2.1 Estudo da alteração da metodologia na imobilização do Enzima Glicose Oxidase

Com o objetivo de aprimorar o desempenho analítico do biossensor, foram realizadas algumas modificações na metodologia inicial para a imobilização da enzima GOx. Inicialmente, a Alteração I envolveu a imobilização sem a adição de BSA. O restante do procedimento foi conduzido de maneira idêntica ao original.

A Alteração II consistiu na imobilização sem a adição de glutaraldeído e na ausência da lavagem com glicina na etapa final.

Por fim, a Alteração III consistiu na imobilização apenas com nafion e a enzima. Os reagentes empregados, bem como aqueles que não foram utilizados em cada modificação, foram resumidos na TABELA 3.

TABELA 3 - REAGENTES UTILIZADOS EM CADA ALTERAÇÃO DA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.

Reagente	I	II	III
BSA	Não	Sim	Não
Glutaraldeído	Sim	Não	Não
Enzima	Sim	Sim	Sim
Nafion	Sim	Sim	Sim
Glicina	Sim	Não	Não

3.6.3 Potencialidade para detecção de H₂O₂ e Glicose

O filme de azul da Prússia foi estudado como mediador redox para a redução de peróxido de hidrogênio por meio da técnica de CV a uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. O intervalo de potencial de -0,3 a 0,4 V (vs. Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl) foi utilizado para obter os sinais resultantes dos processos faradaicos após a adição de concentrações de 1,0 e 2,0 mmol L⁻¹ de H₂O₂. Essas medidas foram realizadas em meio de solução de eletrólito suporte com uma proporção de 1:10 de Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e tampão acetato a pH 5,5. Para a avaliação da imobilização da enzima GOx, os mesmos parâmetros instrumentais foram utilizados com a adição de concentrações de 10,0 e 20,0 mmol L⁻¹ de GLI.

3.6.4 Curva Analítica para detecção indireta de Glicose

As curvas analíticas destinadas à detecção de GLI foram obtidas por meio da técnica de amperometria, tanto em abordagens estáticas quanto dinâmicas, com o suporte de um agitador magnético. Em ambas as curvas, o potencial aplicado foi fixado em -0,3 V. No método estático, o potencial foi aplicado por um período de 30 segundos, avaliando uma faixa de concentração de 0,1 a 4,0 mmol L⁻¹ de GLI em um tampão acetato com pH 5,0. Já no método dinâmico, a faixa de concentração avaliada foi de 0,1 a 2,5 mmol L⁻¹ de GLI, também em tampão acetato com pH 5,0.

3.7 AVALIAÇÃO DO ELETRODO MODIFICADO COM dHDL PARA DETECÇÃO DE CARBENDAZIM

3.7.1 Potencialidade de detecção do eletrodo impresso para Carbendazim

Por fim, a potencialidade do eletrodo impresso foi avaliada em relação ao CBZ por meio da aplicação da técnica de CV, através de análises diretas. O intervalo de potencial utilizado foi de 0,6 a 1,1 V (vs. Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl), com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ com o objetivo de examinar os processos faradâicos associados ao CBZ em uma concentração de 10,0 µmol L⁻¹ em solução de eletrólito suporte 1:10 Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ e tampão acetato pH 5,5.

3.7.2 Avaliação da proporção de modificador e tempo de pré concentração

O estudo das diferentes proporções de modificador e tempos de pré-concentração foi conduzido por meio da pré-concentração espontânea de CBZ (1,0 µmol L⁻¹) em diferentes intervalos de tempo (1, 2 e 5 minutos). O sinal analítico foi então avaliado através da técnica de voltametria por onda quadrada (SWV), com uma faixa de potencial entre 0,3 e 1,2 V (vs. Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl), frequência de 30 Hz e amplitude de pulso de 30 mV. O eletrólito suporte utilizado foi uma solução composta por tampão Britton-Robinson (BR) pH 7,0 em uma proporção de 1:10 com Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹.

3.7.3 Estudo de pH do eletrólito suporte e padrão

Foram preparadas soluções de tampão BR, abrangendo uma faixa de pH entre 3,0 e 10,0. O sinal analítico foi avaliado por meio da técnica de SWV, utilizando uma faixa de potencial entre 0,3 e 1,2 V (vs. Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl), uma frequência de 30 Hz e uma amplitude de pulso de 30 mV e o valor de pH ideal foi determinado com base no incremento de sinal registrando.

3.7.4 Curva Analítica para detecção de Carbendazim

A solução estoque de CBZ 1,0 mmol L⁻¹ foi preparada em metanol, armazenada e refrigerada até o momento de utilização. Diluições em tampão acetato pH 5,0, com concentrações variando de 1 a 20 µmol L⁻¹, foram preparadas imediatamente antes das análises. O comportamento voltamétrico do fungicida foi então avaliado por meio da técnica

de SWV, no intervalo de potencial de 0,6 a 1,2 V (vs. Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl), com uma frequência de 30 Hz e uma amplitude de pulso de 30 mV.

3.8 PREPARO DE AMOSTRA DE SUCO DE LARANJA

A amostra de suco de laranja foi inicialmente centrifugada por 1 minuto a uma rotação média de 7200 rpm para separar grumos maiores que poderiam interferir no processo de pipetagem. Após a centrifugação, o sobrenadante foi diluído em várias proporções (10, 50, 100, 250, 500 e 1000 vezes) em tampão acetato pH 5,0, preparando-se assim as amostras para as análises.

As amostras diluídas foram empregadas para os ensaios de recuperação sendo adicionados diferentes concentrações dos alvos à célula. O AA foi investigado entre 0,1 e 0,5 mmol L⁻¹, a GLI entre 0,5 e 1,5 mmol L⁻¹ e o CBZ entre 2,5 e 7,5 µmol L⁻¹. Os valores das concentrações dos alvos foram determinados pelo uso de adição de padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

4.1.1 Avaliação do Substrato para Impressão dos Eletrodos

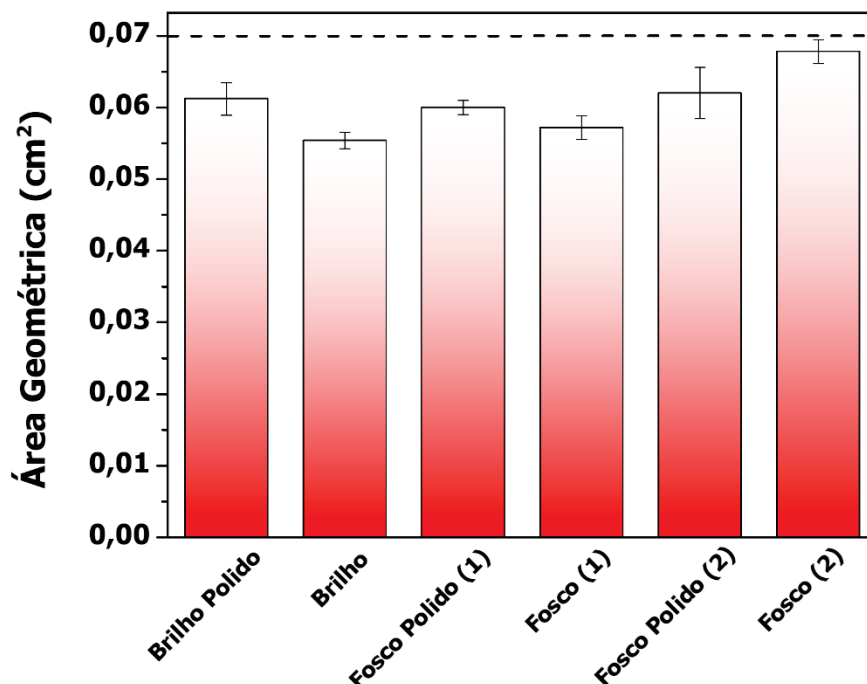
Neste estudo, foram analisados diferentes tipos de PVC com espessura de 0,6 mm, incluindo PVC fosco e PVC brilhoso, com e sem polimento. O PVC brilhoso apresentava uma superfície lisa tanto na frente quanto no verso. Por outro lado, o PVC fosco apresentava superfícies com texturas e rugosidades diferentes na frente e no verso. O polimento foi realizado utilizando uma lixa fina com o propósito de tornar a superfície do substrato mais rugosa, promovendo assim uma melhor aderência entre a tinta e o material. A TABELA 4 lista todos os substratos utilizados no estudo.

TABELA 4 - TIPOS DIFERENTES DE SUBSTRATOS AVALIADOS E SUAS RESPECTIVAS NOMENCLATURAS.

Substrato	Nomenclatura
PVC brilhoso 0,6 mm com polimento	Brilho Polido
PVC brilhoso 0,6 mm sem polimento	Brilho
PVC fosco 0,6 mm (frente) com polimento	Fosco Polido (1)
PVC fosco 0,6 mm (frente) sem polimento	Fosco (1)
PVC fosco 0,6 mm (verso) com polimento	Fosco Polido (2)
PVC fosco 0,6 mm (verso) sem polimento	Fosco (2)

Diante dessas possibilidades, um teste foi conduzido para avaliar o tamanho e a variação da área geométrica do eletrodo de trabalho após a secagem da tinta. A área projetada do eletrodo foi de 0,071 cm² ($\varnothing = 0,3$ cm). A estimativa da área experimental dos eletrodos nos diferentes substratos foi obtida utilizando o programa ImageJ, conforme ilustrado na FIGURA 13.

FIGURA 13 - ÁREA GEOMÉTRICA OBTIDA POR CADA SUBSTRATO APÓS A SECAGEM DA TINTA CONDUTORA.

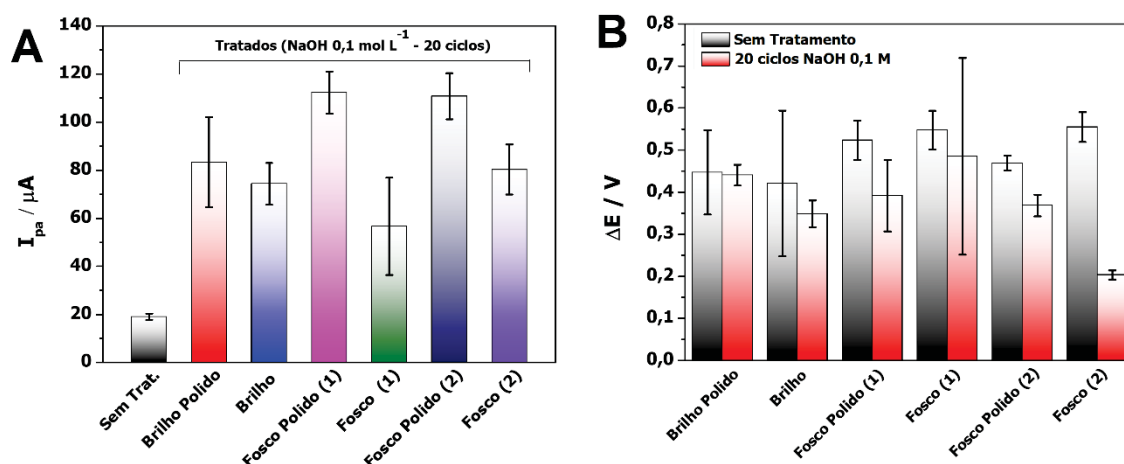


Com base na área geométrica calculada pelo programa ImageJ, foi observado que o substrato fosco (2) apresentou área real calculada mais próxima da área projetada (0,071 cm²), com um valor médio de 0,068 cm². Em seguida, foram realizados testes eletroquímicos para avaliar a interação da tinta com o substrato. Foi utilizada a técnica de CV e uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ como sonda eletroquímica. Nesse estudo, foram comparadas diferentes superfícies, algumas sem tratamento eletroquímico e outras com a aplicação desse tratamento. O objetivo do tratamento eletroquímico foi expor uma maior área eletroativa na superfície do eletrodo partir da remoção parcial do aglutinante. O tratamento utilizado foi adaptado da literatura, conforme descrito por Gevaerd et al.⁸⁰, e posteriormente estudado e otimizado.

Inicialmente, os eletrodos impressos foram submetidos a varreduras de potencial de -1,5 a +1,5 V, empregando CV, em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, durante 20 ciclos. Os resultados obtidos em solução contendo íons ferricianeto encontram-se na FIGURA 14. Neste estudo, foram considerados como parâmetros de avaliação as correntes de pico anódico e a separação entre os picos anódico e catódico (ΔE). Todos os substratos sem a aplicação do tratamento eletroquímico apresentaram resultados eletroquímicos considerados estatisticamente iguais. Dessa forma,

os resultados para os substratos não tratados estão agrupados no grupo denominado “Sem Tratamento”.

FIGURA 14 - CORRENTE DE PICO ANÓDICO COM OS SUBSTRATOS SEM TRATAMENTO (n=18) E CORRENTE PARA CADA SUBSTRATO TRATADO AVALIADO (n=3). B) VARIAÇÃO DO ΔE DOS PICOS EM RELAÇÃO AOS TIPOS DE SUBSTRATOS ESTUDADOS COM E SEM A APLICAÇÃO DO TRATAMENTO (n=3).

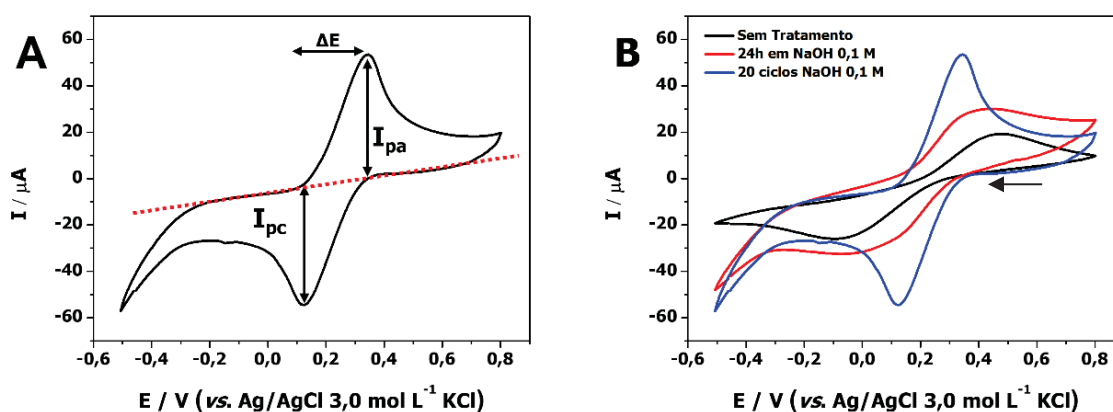


A partir da análise dos dados obtidos, pode-se afirmar que o efeito do substrato em relação ao perfil eletroquímico é mais proeminente após a etapa de tratamento eletroquímico. Antes disso, o comportamento dos eletrodos é muito semelhante, evidenciando a importância dessa etapa. Em (A) é possível observar que em todos os casos o tratamento conferiu um aumento de pelo menos três vezes em relação a corrente do pico de oxidação nos eletrodos sem tratamento. Além disso, em (B) foram avaliados a variação dos ΔE dos picos, onde também é observado uma diminuição após a etapa de tratamento, sugerindo uma melhora na velocidade transferência de carga do processo redox. Diante desses resultados, optou-se pelo uso do substrato de PVC fosco 0,6 mm (verso) sem polimento (Fosco 2) para confecção dos eletrodos, uma vez que, apresentou uma área geométrica mais fiel ao planejado, bom sinal de corrente do sinal anódico, menor valor ΔE e a eliminação de uma etapa no processo que é o polimento da superfície. Além disso, a etapa de polimento garantiu uma maior adesão do adesivo vinílico ao substrato causando uma maior dificuldade mecânica na sua retirada. Tendo em vista que o efeito do tratamento eletroquímico afeta diretamente a resposta do sensor, foram também avaliadas as condições de tratamento superficial.

4.1.2 Avaliação de Diferentes Tratamentos Eletroquímicos

Para fins de comparação, também foi realizado um tratamento não eletroquímico nos eletrodos, no qual os eletrodos foram colocados em contato com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 24 horas, e em seguida, o perfil voltamétrico da sonda redox foi avaliado. Os resultados obtidos estão ilustrados na FIGURA 15.

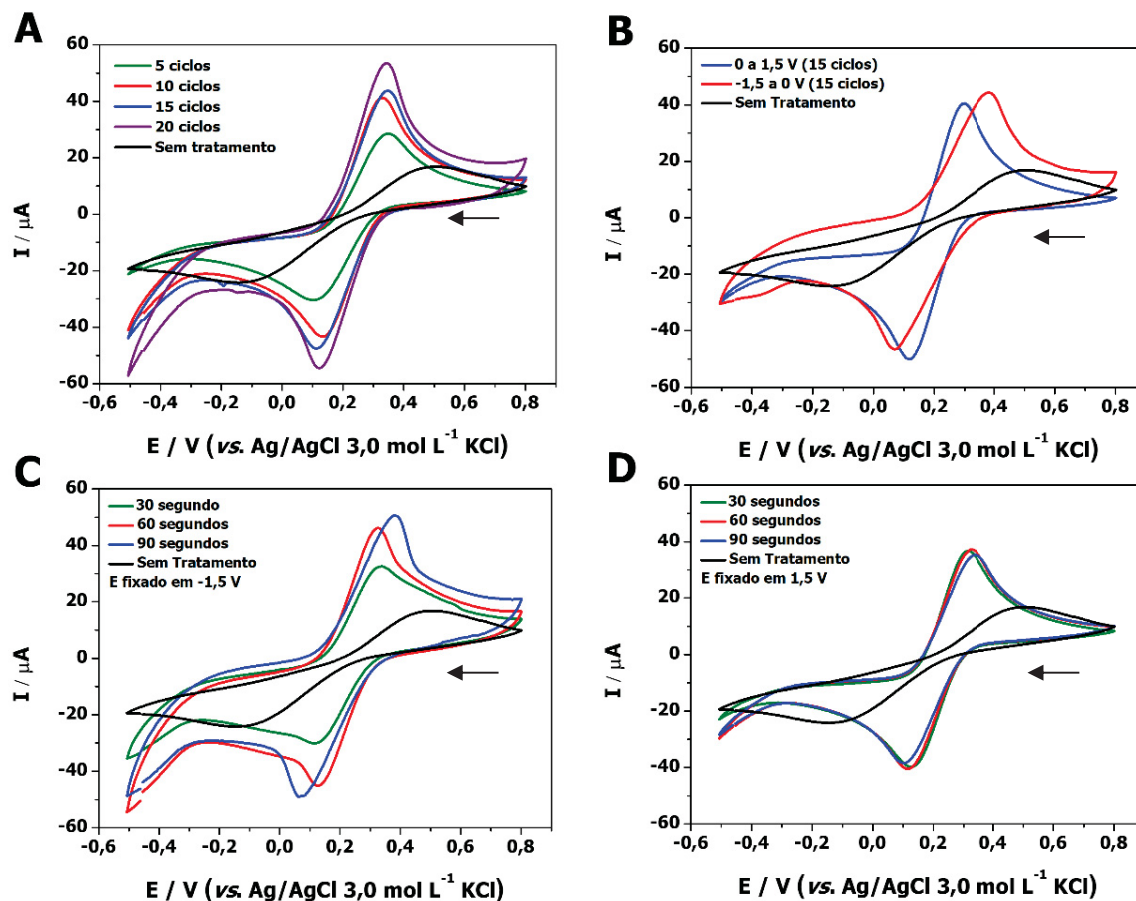
FIGURA 15 - A) PERFIL DO VOLTAMOGRAMA CÍCLICO DA Sonda ELETROQUÍMICA. ONDE, I_{pa} = SINAL DE CORRENTE ELÉTRICA REFERENTE AO PROCESSO DE OXIDAÇÃO, I_{pc} = SINAL DE CORRENTE REFERENTE AO PROCESSO DE REDUÇÃO E ΔE = DIFERENÇA DE POTENCIAL. B) COMPARATIVO DO PERFIL VOLTAMÉTRICO DO ELETRODO SEM TRATAMENTO E APÓS DIFERENTES TRATAMENTOS SUPERFICIAIS PARA O SUBSTRATO FOSCO (2).



A partir da análise dos dados voltamétricos, representados na FIGURA 15 (B), é possível observar que o simples contato com a solução alcalina resulta em uma leve melhora do sinal redox da sonda, em comparação ao eletrodo sem tratamento. Isso pode ser atribuído à possível remoção do aglutinante da superfície do eletrodo. No entanto, esse efeito é pouco significativo quando comparado ao efeito combinado da solução alcalina e do tratamento eletroquímico. Nesse caso, pode-se observar sinais de oxirredução mais definidos, com um aumento no valor da corrente elétrica e uma diminuição na diferença entre os potenciais de oxidação e redução, indicando maior reversibilidade do processo, o que está associado a uma melhora cinética.

Tendo em vista a melhora significativa da superfície eletródica após o tratamento eletroquímico, foram avaliadas diferentes condições eletroquímicas (voltamétricas e amperométricas), conforme ilustrado na FIGURA 16. Esses tratamentos visaram maximizar o desempenho dos eletrodos, levando a uma melhora das respostas eletroquímicas.

FIGURA 16 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS USANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ COMO SONDA ELETROQUÍMICA (5 mmol L^{-1} EM KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$) APÓS DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO ELETROQUÍMICO EM SOLUÇÃO DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DE $NaOH$. A) DIFERENTES QUANTIDADES DE CICLOS VOLTAMÉTRICOS. B) DIFERENTES FAIXAS DE POTENCIAL DE VARREDURA (SENTIDO POSITIVO E NEGATIVO). C) POTENCIAL FIXADO EM $-1,5 \text{ V}$ EM DIFERENTES TEMPOS. D) POTENCIAL FIXADO EM $+1,5 \text{ V}$ EM DIFERENTES TEMPOS.



Inicialmente, foi estudado a resposta deste tratamento utilizando quantidades diferentes de ciclos conforme demonstrado na FIGURA 16 (A). A partir da análise dos voltamogramas, é possível observar um aumento nas correntes de pico com o aumento do número de ciclos. Entretanto, também é observada uma tendência ligeiramente mais capacitiva, observada pelo aumento da corrente de fundo, à medida que a quantidade de varreduras aumenta. A corrente capacitiva é dependente do acúmulo de carga de íons presentes eletrólito dado um potencial aplicado, dessa forma, não representando proporcionalidade com a concentração de analito, prevista pela lei de faraday⁸³. Esse efeito afeta a corrente faradaica, mascarando o sinal, e pode acarretar em problemas nos ensaios eletroanalíticos que visam baixos limites de detecção⁸⁴. Além disso, outro ponto desfavorável para esse tratamento foi o tempo de execução, cerca de 20 minutos. Assim,

devido a estas limitações, outras opções de tratamentos eletroquímicos foram exploradas a fim de reduzir tempo de tratamento e melhorar do perfil eletroquímico.

O segundo tratamento estudado (FIGURA 16 (B)) foi a ciclagem variando a faixa de varredura, tanto no sentido positivo (0 a 1,5 V) como no sentido negativo (0 a -1,5 V). Não se observa uma diferença significativa entre os valores de corrente de pico nos diferentes sentidos de varredura; no entanto, a varredura no sentido catódico é responsável pelo aumento do perfil capacitivo do eletrodo. Por fim, foram avaliados os tratamentos utilizando aplicação de potencial constante (FIGURA 16 (C) e (D)). Os potenciais foram fixados em -1,5 V e 1,5 V em intervalos entre 30 e 90 segundos. Nesse caso, o tempo de execução foi reduzido consideravelmente quando comparado aos tratamentos por CV, que variava entre 15 e 20 minutos.

A partir dessa avaliação foi possível observar que a aplicação constante do potencial de -1,5 V (FIGURA 16 (C)) houve um aumento nas correntes de pico acompanhado de um aumento no caráter capacitivo do eletrodo, também observado nos tratamentos voltamétrico catódicos demonstrado em FIGURA 16 (B). Por fim, no tratamento realizado a potencial constante de +1,5 V (FIGURA 16 (D)), a aplicação do potencial durante intervalos maiores que 30 s não afetou significativamente a resposta do eletrodo e apresentou o melhor perfil eletroquímico quando comparado aos outros tratamentos, conferindo: picos bem definidos e menor separação entre eles (ΔE menor). Além disso, o efeito capacitivo foi minimizado, houve incremento no sinal de corrente elétrica, em relação ao eletrodo sem tratamento, e menor tempo de tratamento (30 segundos). Assim, o tratamento eletroquímico realizado em potencial constante (aplicação de potencial fixo +1,5 V por 30 segundos) foi adotado nos estudos posteriores. Esses efeitos podem ser atribuídos a uma possível perda do aglutinante presente na superfície do eletrodo, o que poderia resultar em uma melhoria na transferência de carga do eletrodo, em função de uma maior exposição do material condutor. Devido a esta hipótese, estudos mais aprofundados e relacionados a esse tópico serão abordados em seções subsequentes.

4.1.2.1 Estudo da Área Eletroativa do Eletrodo

Como mencionado anteriormente, a área geométrica dos eletrodos é de 0,07 cm². Entretanto, apenas uma parte dessa área geométrica, denominada área eletroativa, participa do processo de transferência de elétrons. Nesse sentido, a etapa de tratamento eletroquímico,

visa remover o aglutinante presente na superfície do eletrodo, resultando no aumento da área eletroativa. Em sistemas reversíveis com transferência de massa controlada por difusão ocorre uma relação entre a área eletroativa e a corrente elétrica do sinal analítico. Essa relação pode ser calculada através da equação de Randles-Sevcik (**Equação 2**) que possui comportamento linear ⁸⁵.

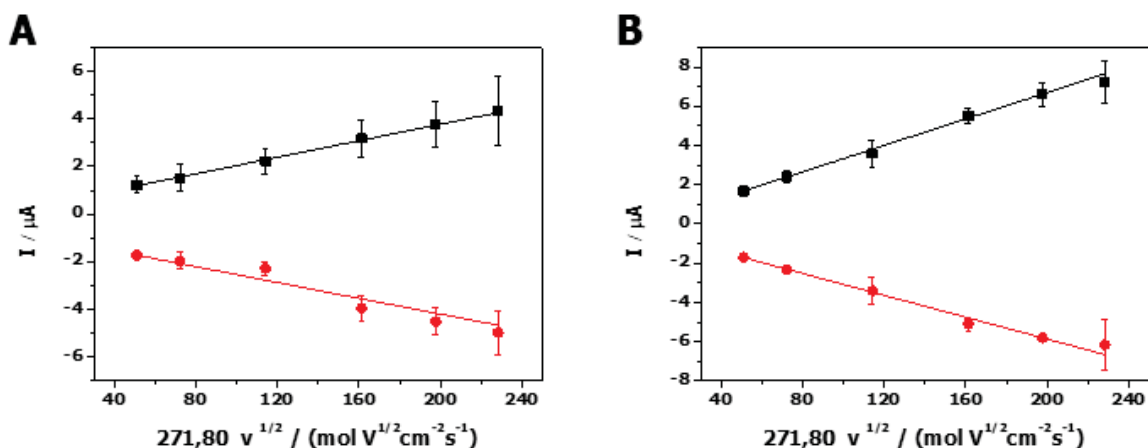
$$I_p = (2,69 \cdot 10^{-5}) n^{3/2} \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

I_p = Corrente elétrica do pico (Ampére); n = Número de eletrons envolvidos na reação redox (adimensional); A = Área eletroativa do eletrodo; C = Concentração (mol cm^{-3}); D = Coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e v = Velocidade de varredura (V s^{-1}).

Para verificar se o tratamento eletroquímico de fato resulta em um aumento da área eletroativa no eletrodo, um estudo comparativo entre a área eletroativa antes e após essa etapa foi realizado. Neste estudo foi utilizada como sonda eletroquímica íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Para este sistema, o valor das variáveis são: $n = 1$, $C = 1 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$, e o coeficiente de difusão (D) de $7,20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$, conforme reportado na literatura⁸⁶. Para obter as curvas, foram variadas diferentes velocidades de varredura (5, 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1}). A FIGURA 17, mostra a comparação entre a área eletroativa dos eletrodos antes e após tratamento eletroquímico otimizado.

FIGURA 17 - DEPENDÊNCIA LINEAR DAS CORRENTE DE PICO EM FUNÇÃO DA RAZA QUADRADA DA VELOCIDADE DE VARREDURA. (A) RETAS PRETAS E VERMELHAS REPRESENTAM OS PICOS DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO, RESPECTIVAMENTE, PARA ELETRODOS QUE NÃO RECEBERAM TRATAMENTO ELETROQUÍMICO. (B) RETAS PRETAS E VERMELHAS REPRESENTAM OS PICOS DE OXIDAÇÃO E REDUÇÃO, RESPECTIVAMENTE, PARA ELETRODOS APÓS O TRATAMENTO ELETROQUÍMICO.

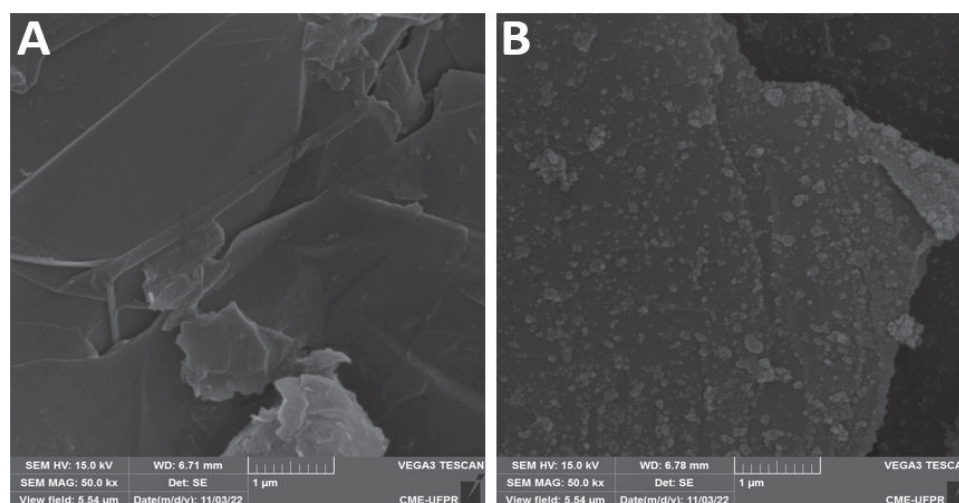


A **Equação 2** foi ajustada de modo que, o valor de $271,80 \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ é o produto das constantes e dos valores experimentais empregados para esse experimento. Assim, a partir da reta obtida é possível estimar a área eletroativa do eletrodo diretamente pelo coeficiente angular. Para os eletrodos sem tratamento eletroquímico prévio, o valor do coeficiente angular encontrado para os processos de oxidação e redução foi de 0,017 e -0,016, respectivamente, resultando em um valor médio de área eletroativa de $0,016 \text{ cm}^2$. Já para os eletrodos após o tratamento eletroquímico, o valor do coeficiente angular obtido para os processos de oxidação e redução foi de 0,033 e -0,027, respectivamente, resultando em um valor médio de área eletroativa de $0,030 \text{ cm}^2$. Portanto, os resultados deste estudo confirmaram um aumento de cerca de 100% na área eletroativa do eletrodo, decorrente do tratamento eletroquímico otimizado. Isso sustenta a hipótese de que essa etapa é capaz de efetivamente remover o aglutinante da superfície do eletrodo por meio da evolução do gás oxigênio, o que resulta em uma exposição maior da superfície gráfica.

4.1.2.2 Caracterização Morfológica do Eletrodo

Para avaliar o efeito do tratamento eletroquímico sobre a morfologia da superfície eletródica foi realizada a caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Imagens representativas para os eletrodos, sem e com tratamento, estão representadas na FIGURA 18.

FIGURA 18 - IMAGENS REPRESENTATIVAS OBTIDA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ELETRODOS IMPRESSOS. (A) SEM TRATAMENTO. (B) APÓS TRATAMENTO ELETROQUÍMICO.



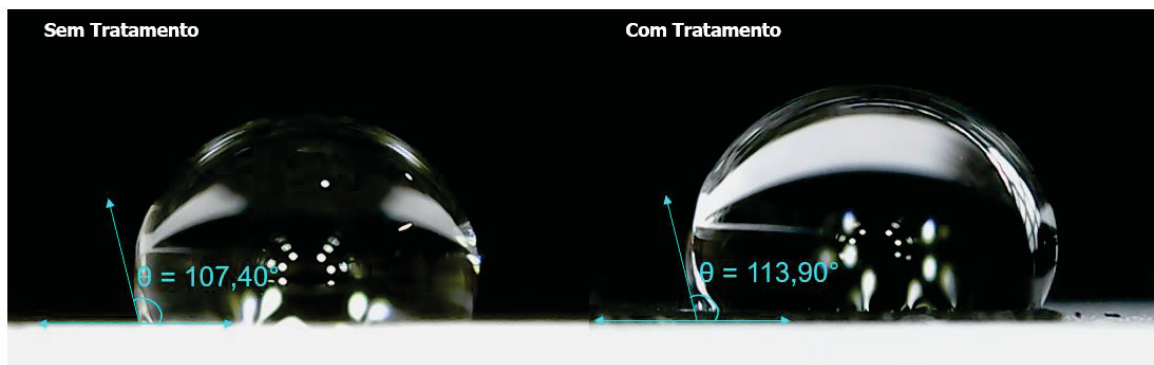
A comparação entre as imagens (A) e (B) indicam uma perda superficial do aglutinante da tinta (esmalte de unha) após o tratamento eletroquímico, gerando um aspecto morfológico com pequenos sítios aglomerados e dispersos (B). Essa perda do aglutinante é possivelmente desencadeada pela evolução de gás oxigênio, levando a um processo físico de lixiviação superficial e expondo uma maior área de superfície gráfrica eletroativa.

4.1.2.3 Análise do Ângulo de Contato

Com o objetivo de investigar se o tratamento eletroquímico adotado afeta a tinta condutora, possivelmente removendo o esmalte superficial, foram realizadas medidas do ângulo de contato usando o software ImageJ em diferentes momentos: apenas no substrato higienizado (I), substrato com uma camada de esmalte (II) e nos eletrodos após a conclusão, com (III) e sem tratamento (IV). O ângulo de contato pode ser definido como um indicador do caráter hidrofóbico/hidrofílico de uma superfície, dependendo da interação da superfície em contato com o líquido⁸⁷.

Neste sentido, o ângulo de contato de 90° é o ponto de divisão teórico para a definição de hidrofobicidade da superfície para um determinado líquido, sendo que um maior ângulo de contato confere uma maior hidrofobicidade e um menor ângulo de contato, uma menor hidrofobicidade⁸⁸. Dessa forma, foi possível avaliar a alteração na superfície após tratamento eletroquímico. Inicialmente foi mensurado o valor de ângulo de contato da superfície do substrato e o valor encontrado foi de $71,90^\circ$, após a adição de uma fina camada de esmalte o ângulo de contato calculado foi de $67,30^\circ$. Apresentando uma variação de $5,4^\circ$, a diminuição do valor de ângulo de contato indica que o filme de esmalte gera uma superfície menos hidrofóbica quando comparada a superfície do substrato higienizado. Após a mensuração desses valores “brancos” foram avaliados eletrodos diferentes ($n=3$) antes e após o tratamento eletroquímico para posterior comparação dos ângulos de contatos. As imagens comparativas se encontram na FIGURA 19. A aparente diferença no tamanho das gotas está associada à distância focal da câmera.

FIGURA 19 - IMAGEM OBTIDA COM MICROSCÓPIO DIGITAL PARA OBTENÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO. GOTA DE 20 mL DE ÁGUA DEIONIZADA SOB A SUPERFÍCIE DO ELETRODO 1 ANTES E APÓS O TRATAMENTO ELETROQUÍMICO OTIMIZADO.



Para os três eletrodos avaliados, observou-se um aumento médio de $7,20^\circ$ no ângulo de contato após o tratamento eletroquímico. Essa mudança indica um aumento na hidrofobicidade. Esse resultado corrobora a hipótese de remoção parcial dos agentes aglutinantes (nitrocelulose e tosilamida), componentes que conferem característica hidrofílica à superfície. Uma vez que a superfície gráfica presente na tinta condutora fica mais exposta, devido ao tratamento, é possível verificar um aumento do ângulo de contato.

A fim de confirmar se essa diferença é estatisticamente significativa, realizou-se um teste-t pareado (intervalo de confiança de 95%). Como cada eletrodo pode apresentar uma pequena variação na resposta devido ao processo de construção, essa estratégia foi adotada utilizando as medidas antes e após o tratamento⁸⁹. O valor de $t_{\text{calculado}}$ pode ser calculado pela **Equação 3** e comparado com o valor $t_{\text{crítico}}$ (tabelado) para verificação da hipótese. Nessa equação, $\bar{D}$ é a diferença média entre cada eletrodo (antes e após), S_D é o desvio padrão para as diferenças de ângulo observado e N o número de pares observações.

$$t = \frac{\bar{D}}{S_D / \sqrt{N}} \quad \text{Equação 3}$$

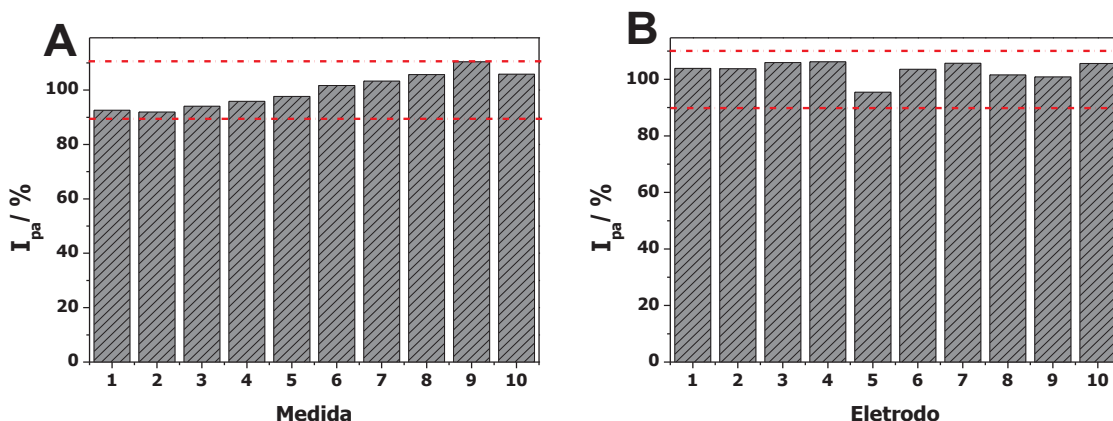
O valor de $t_{\text{calculado}}$ (4,58) foi maior que o valor de $t_{\text{crítico}}$ (4,30) o que indica que há uma diferença significativa entre os valores observados antes e após o tratamento. Portanto, podemos concluir que a etapa de tratamento eletroquímico resultou em uma mudança significativa na hidrofobicidade da superfície eletródica. Isso está de acordo com a teoria de

que mais grafite fica exposto na superfície após o tratamento melhorando a transferência eletrônica e aumentando o caráter hidrofóbico da superfície.

4.1.3 Repetibilidade e Reprodutibilidade do Eletrodo

Visando avaliar a estabilidade dos sinais faradâicos dos eletrodos propostos, medidas voltamétricas foram realizadas em solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ como sonda eletroquímica. Os resultados da variação de corrente de pico anódica obtidos ($n = 10$) utilizando uma mesma superfície eletródica (repetibilidade) e diferentes eletrodos (reprodutibilidade). O valor de referência (100%) foi obtido através do cálculo da média de todas as medidas realizadas. Os resultados estão representados na FIGURA 20 (A) e (B), respectivamente.

FIGURA 20 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO ANÓDICA RELATIVAS PARA O $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ EM KCl 0,1 mol L⁻¹ COMO ELETRÓLITO SUPORTE PARA AVALIAR A REPETIBILIDADE (A) E REPRODUTIBILIDADE (B) ($n=10$).



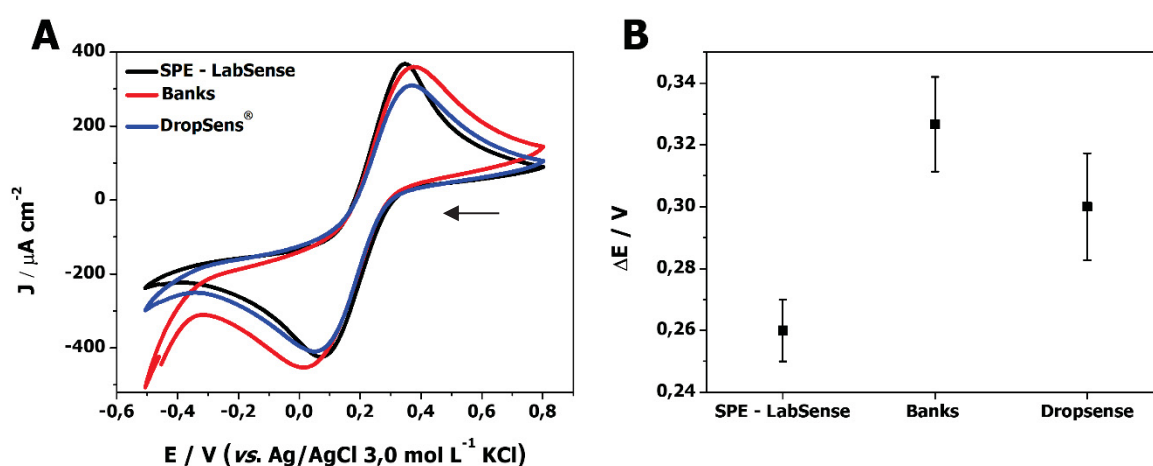
As intensidades de corrente do processo anódico obtidas para cada voltamograma foram comparadas entre si e a variação percentual destes valores permitiram calcular o desvio padrão entre as medidas de cada estudo. Os eletrodos construídos apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade, com RSD de $\pm 6,07$ e $\pm 3,28$ %, respectivamente. Isso demonstra que os eletrodos construídos podem ser empregados com confiabilidade para medidas sucessivas, sem perda de sinal analítico.

4.1.4 Comparação com Eletrodos Impressos Comerciais

Com o objetivo de avaliar o desempenho analítico dos eletrodos desenvolvidos neste trabalho, foram realizados testes comparativos em relação a outros dois dispositivos disponíveis no mercado. Eletrodos comerciais produzidos no laboratório do Professor Dr. Craig Banks na Universidade Metropolitana de Manchester, Reino Unido e os eletrodos comerciais da Metrohm® (DropSens®). O ensaio consistiu no comparativo das respostas eletroquímicas, corrente e potencial de pico, da sonda $K_3[Fe(CN)_6]$ através da técnica de CV.

No experimento, foram avaliados apenas os eletrodos de trabalho dos dispositivos, isolando a influência dos eletrodos de referência e auxiliar. As correntes elétricas foram transformadas em densidade de corrente para comparação, considerando as diferentes áreas geométricas dos eletrodos de trabalho. Além disso, os valores de (ΔE) foram comparados. O dispositivo desenvolvido neste trabalho foi testado após o tratamento eletroquímico, parte do protocolo estabelecido. Em contraste, os outros dispositivos não passaram por tratamento prévio, pois os fornecedores afirmam que estão prontos para uso. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 21.

FIGURA 21 - (A) VOLTAMOGRAMAS DA VARIAÇÃO DE DENSIDADE DE CORRENTE (J) PARA DIFERENTES ELETRODOS IMPRESSOS NA PRESENÇA DE $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ EM KCl 0,1 mol L⁻¹. (B) VARIAÇÃO DE ΔE DOS PICOS EM RELAÇÃO AOS DIFERENTES ELETRODOS IMPRESSOS ESTUDADOS.



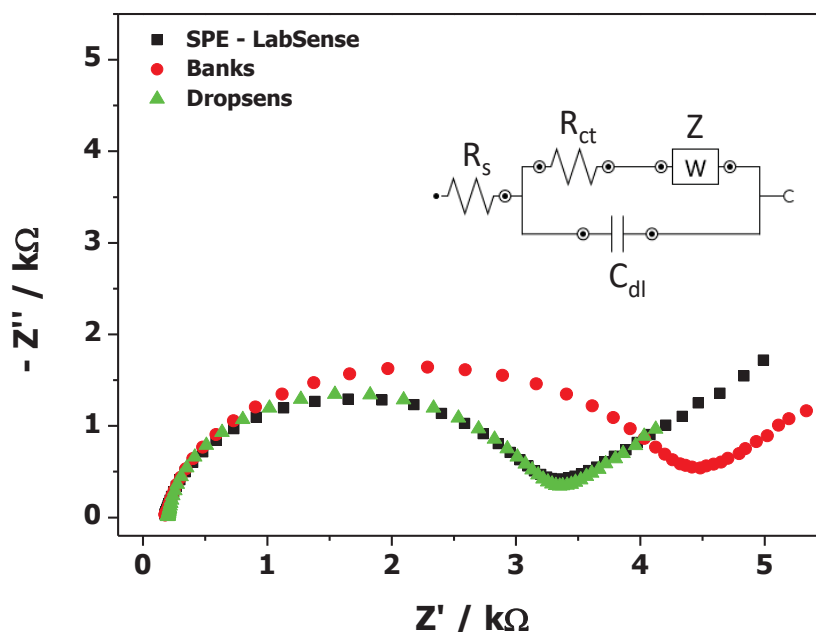
A partir da análise dos voltamogramas, ilustrados na FIGURA 21 (A), observou-se que o perfil voltamétrico dos três dispositivos testados apresentou semelhanças. Em todos

os casos, as reações redox ocorreram em potenciais de pico próximos a 0,3 V para a oxidação e 0,1 V para a redução, em relação ao eletrodo de referência (Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹). Além disso, os dispositivos apresentaram valores de densidade de corrente elétrica semelhantes. Com base na FIGURA 21 (B), constatou-se que a diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução (ΔE) também mostrou semelhanças entre os dispositivos, com uma variação inferior a 100 mV entre eles, sendo o eletrodo impresso SPE – LabSense aquele com menor diferença nos potenciais de oxirredução.

Considerando essas variáveis analisadas, é possível afirmar que o dispositivo demonstra um desempenho eletroquímico comparável aos produtos disponíveis no mercado. Além disso, possui a vantagem adicional de ter um custo extremamente acessível, de apenas R\$ 0,10 por eletrodo, levando em consideração para a base de cálculo apenas o custo dos materiais e reagentes. Essa relação custo-benefício favorável torna o dispositivo uma opção promissora e economicamente viável para aplicações futuras.

Por fim, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi utilizada como um estudo complementar para verificar os processos relacionados a resistência a transferência de cargas (R_{ct}) dos eletrodos estudados. A comparação por EIS está representada na FIGURA 22.

FIGURA 22 - DIAGRAMA DE NYQUIST PARA CADA ELETRODO AVALIADO NA PRESENÇA DE $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ EM KCl 0,1 mol L⁻¹. DETALHE: CIRCUITO ELÉTRICO DE Randles, NA QUAL R_s É A RESISTÊNCIA DO ELETROLITO, R_{ct} É A RESISTÊNCIA A TRANSFERÊNCIA DE CARGA, Z IMPEDÂNCIA WARBURG E C_{dl} É A CAPACITÂNCIA DE DUPLA CAMADA.



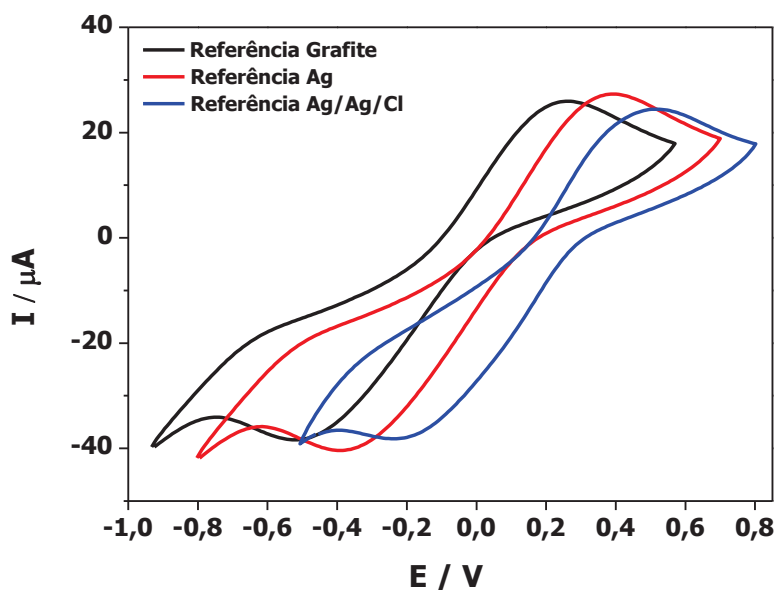
A partir da análise dos diagramas de Nyquist, foi possível observar perfis semelhantes entre os três eletrodos avaliados, nos quais foi realizada uma avaliação do raio dos semicírculos. O raio do semicírculo está diretamente relacionado ao valor da resistência à transferência de carga (R_{ct}). Os valores médios de R_{ct} foram obtidos através do circuito de Randles e apresentaram valores de 3,20 k Ω para os SPE - LabSense, 4,00 k Ω para os eletrodos disponibilizados pelo professor Dr. Banks e 3,40 k Ω para os eletrodos produzidos pela Metrohm (Dropsens), demonstrando diferenças sutis na R_{ct} entre eles. Então, os resultados obtidos através da EIS corroboram aqueles obtidos via CV e evidenciam o bom desempenho do eletrodo proposto em relação a outros eletrodos utilizados e comercializados no mercado. Essa constatação reforça a relevância do eletrodo desenvolvido neste trabalho como uma opção promissora para sua aplicação em sensores eletroquímicos.

4.1.5 Desenvolvimento do dispositivo Multiplex

A construção do dispositivo multiplex foi conduzida de forma análoga ao processo de construção dos eletrodos impressos unitários, que foram previamente utilizados para a otimização da metodologia. A geometria dos eletrodos de trabalho no multiplex foi mantida com o mesmo tamanho dos eletrodos unitários, apresentando uma área de trabalho geométrica de 0,07 cm². Dado que o dispositivo é uma impressão 2D e é importante manter uma distância equidistante entre o eletrodo de referência e os eletrodos de trabalho, foi optado pela construção geométrica de um eletrodo de referência retangular a uma distância comum dos eletrodos de trabalho. O contra-eletrodo foi confeccionado com a mesma geometria do eletrodo de referência, mas posicionado entre o eletrodo de trabalho e o de referência, evitando assim interferências no processo de transferência eletrônica.

Após a fabricação dos eletrodos multiplex, foi realizado um estudo para explorar a influência de diferentes eletrodos de referência e examinar as variações nos potenciais de pico, utilizando a sonda $K_3[Fe(CN)_6]$ em concentração de 5,0 mmol L⁻¹, em KNO_3 a 0,1 mmol L⁻¹ como eletrólito suporte. Diversos eletrodos de referência foram utilizados neste estudo, abrangendo um eletrodo fabricado a partir da tinta de grafite/esmalte, preparada em laboratório e com composição idêntica àquela empregada nos eletrodos de trabalho, outro revestido com tinta de prata comercial, e um terceiro utilizando um eletrodo de referência externo, (Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹ KCl). Os voltamogramas comparativos correspondentes estão disponíveis para visualização na FIGURA 23.

FIGURA 23 - VOLTAMOGRAMAS COMPARATIVOS DE ELETRODOS SEM TRATAMENTO EMPREGANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ COMO Sonda eletroquímica (5 mmol L^{-1} EM KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), VARIANDO OS ELETRODOS DE REFERÊNCIA UTILIZADOS.

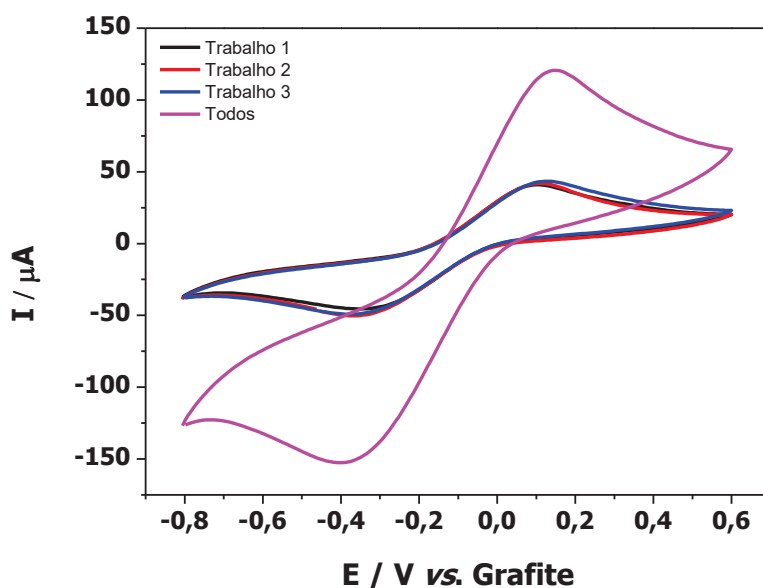


A função primordial do eletrodo de referência em um sistema eletroquímico é fornecer um potencial elétrico constante e conhecido, possibilitando o monitoramento das variações no potencial do eletrodo de trabalho. Nesse contexto, a escolha de um eletrodo de referência fabricado com tinta condutora à base de esmalte/grafite, dispensando o uso de prata, torna-se atrativa, não apenas pela economia no processo de preparação, mas também pela simplificação na etapa de fabricação. Considerando que o deslocamento de potencial apresentado pelo eletrodo de referência à base de tinta caseira não interfere nas análises, este foi selecionado para o desenvolvimento dos dispositivos multiplex.

Além disso, o estudo não apenas ilustrou o deslocamento de picos associado ao uso de diferentes eletrodos de referência, mas também buscou determinar o valor de potencial correspondente a +1,5V a ser aplicado nos eletrodos durante a etapa de tratamento eletroquímico. Os resultados revelaram que o conjunto com o eletrodo de referência de esmalte/grafite apresentou um deslocamento de potencial mais pronunciado para o sentido negativo (300 mV) em comparação com o eletrodo de referência externo (Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl). Enquanto isso, o eletrodo com tinta comercial de prata exibiu um deslocamento intermediário (200 mV) em relação ao eletrodo de referência externo (Ag/AgCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl). Com base nessas observações, o valor de potencial a ser aplicado na etapa de tratamento foi estabelecido em 1,2 V para os eletrodos com referência de esmalte/grafite.

Posteriormente, como ilustrado na FIGURA 24, foi avaliado o perfil entre os eletrodos de trabalho compostos no dispositivo multiplex, além de avaliar a caixa analógica multicanal. Foram avaliados os eletrodos de trabalho de forma individual e simultaneamente na caixa multicanal.

FIGURA 24 - VOLTAMOGRAMAS DOS TRÊS ELETRODOS DE TRABALHO DO DISPOSITIVO MULTIPLEX APÓS TRATAMENTO ELETROQUÍMICO UTILIZANDO $K_3[Fe(CN)_6]$ COMO SONDA ELETROQUÍMICA (5 mmol L^{-1} EM KNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), QUANDO PLUGADOS INDIVIDUALMENTE NO CONTROLADOR ANALÓGICO E SIMULTANEAMENTE.



Após a análise dos voltamogramas, constatou-se que a corrente média de pico de oxidação e redução foi de $39,3 \mu A$ e $40,1 \mu A$, respectivamente. O desvio entre os três eletrodos componentes foi de apenas 3,08% para os picos de oxidação e 1,23% para os picos de redução. Esses resultados indicam uma notável semelhança nos perfis, evidenciando a reprodutibilidade do sinal. Essa consistência é crucial para o eficiente funcionamento do multiplex, assegurando um desempenho confiável em aplicações sequenciais e/ou simultâneas.

Ao conectar todos os eletrodos de trabalho simultaneamente, através da caixa multicanal, os valores experimentais de corrente elétrica foram de $110 \mu A$ para o pico de oxidação e $118 \mu A$ para o pico de redução. Esses resultados apresentaram um desvio de 7,19% em relação ao esperado, considerando três vezes a média unitária para o pico de oxidação, e 1,50% para o pico de redução. Evidenciando que os eletrodos de trabalho possuem boa precisão e que o controlador analógico é apto para sua aplicação em conjunto com o multiplex.

Depois de verificados os aspectos referentes a construção do sistema e ao comportamento voltamétrico foi investigada a aplicabilidade desse sistema multiplex. Nesse sentido, a potencialidade analítica do dispositivo foi testada visando a determinação de três analitos, sendo eles, AA, GLI e CBZ. Essa abordagem multifacetada apresenta a interessante possibilidade de desenvolver um dispositivo versátil e eficiente, empregando um sistema portátil com potencial de aplicação em diversos setores. Além disso, vale ressaltar que esse dispositivo necessita de apenas 100 μL de solução para preencher toda a célula.

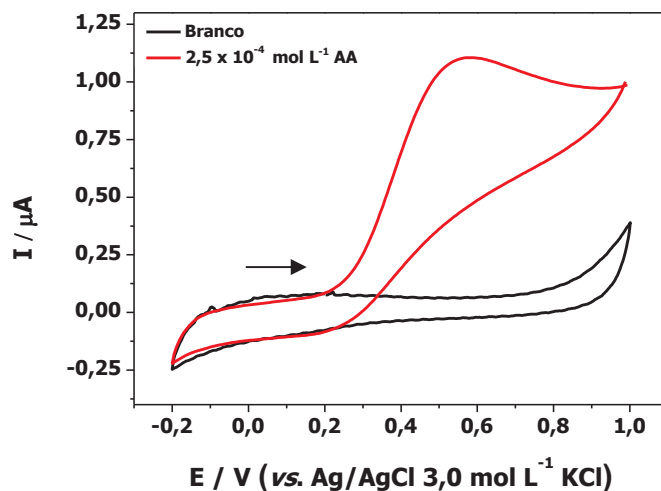
Os resultados alcançados até essa etapa evidenciam que é possível o desenvolvimento de uma plataforma contendo três eletrodos de trabalhos independentes derivados de uma superfície eletródica comum constituída de esmalte de unhas e pó de grafite. Os próximos estudos se destinaram a avaliar diferentes estratégias de uso para esses eletrodos de trabalho. A primeira abordagem de forma convencional, ou seja, utilizando o eletrodo não modificado para a determinação voltamétrica de ácido ascórbico. Posteriormente, eletrodos modificados superficialmente, através da formação de azul da Prússia e do ancoramento da enzima glicose oxidase para construção do biossensor amperométrico para determinação de glicose e finalmente, adicionando um modificador, um hidróxido lamelar duplo, à matriz da tinta condutora para quantificação de carbendazim. Inicialmente foram avaliados os três analitos de maneira individual, iniciando-se pelo AA.

4.2 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS PREPARADOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

4.2.1 Perfil Voltamétrico e desempenho analítico na determinação de Ácido Ascórbico

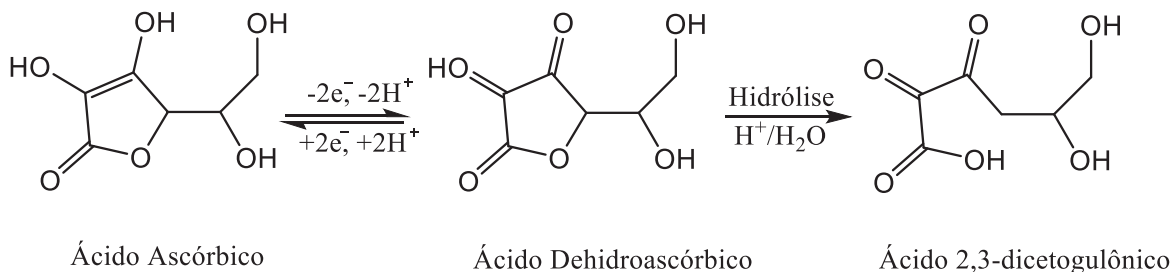
Para avaliar o comportamento voltamétrico do AA nos eletrodos *labmade* preparados, foram conduzidas medidas de CV tanto na ausência quanto na presença do AA. O eletrólito utilizado foi uma solução de tampão acetato com pH 5,0. É importante ressaltar que os estudos com os três tipos de eletrodos (AA, GLI e CBZ) foram conduzidos em paralelo, e ajustes relacionados ao eletrólito foram realizados conforme os resultados eram obtidos para o CBZ. Nesse sentido, em alguns estudos os eletrólitos sofrem alterações, que serão discutidas em seus respectivos tópicos. Os resultados referentes ao perfil voltamétrico do AA estão exibidos na FIGURA 25.

FIGURA 25 - PERFIL VOLTAMÉTRICO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DO AA NA CONCENTRAÇÃO DE 0,25 mmol L⁻¹. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s⁻¹. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETADO pH 5,0.



A FIGURA 25 apresenta o voltamograma cíclico do branco da solução (eletrólito suporte) representado em preto e o perfil voltamétrico do AA em vermelho. É possível observar o pico de oxidação do AA na região de potencial próximo a 0,50 V, sendo o perfil voltamétrico concordante com os relatados na literatura^{90,91}. A reação de oxidação do AA para o ácido dehidroascórbico envolve a perda 2 prótons e 2 elétrons e o perfil usualmente observado nos voltamogramas cíclicos apresenta apenas o pico de oxidação, devido à rápida reação de hidrólise do ácido dehidroascórbico levando a formação do ácido 2,3-dicetogulônico, conforme demonstrado na FIGURA 26.

FIGURA 26 - REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO AA A ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO E DE HIDRÓLISE DESTE ÚLTIMO AO ÁCIDO 2,3-DICETOGULÔNICO.



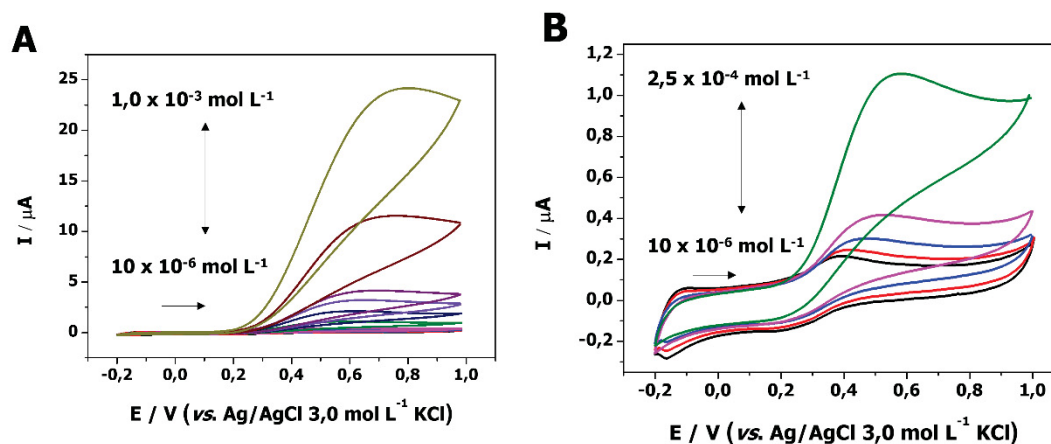
FONTE: A autora

A proposta do presente trabalho é desenvolver uma plataforma multiplex para uso combinado dos eletrodos para a determinação dos três alvos investigados com o mínimo de

alterações experimentais. Levando isso em consideração, é importante que as condições adotadas com relação ao eletrólito de suporte e o pH sejam as mesmas para evitar que sejam necessárias modificações para cada eletrodo de trabalho utilizado. Assim, não houve maiores investigações sobre esses aspectos para o AA.

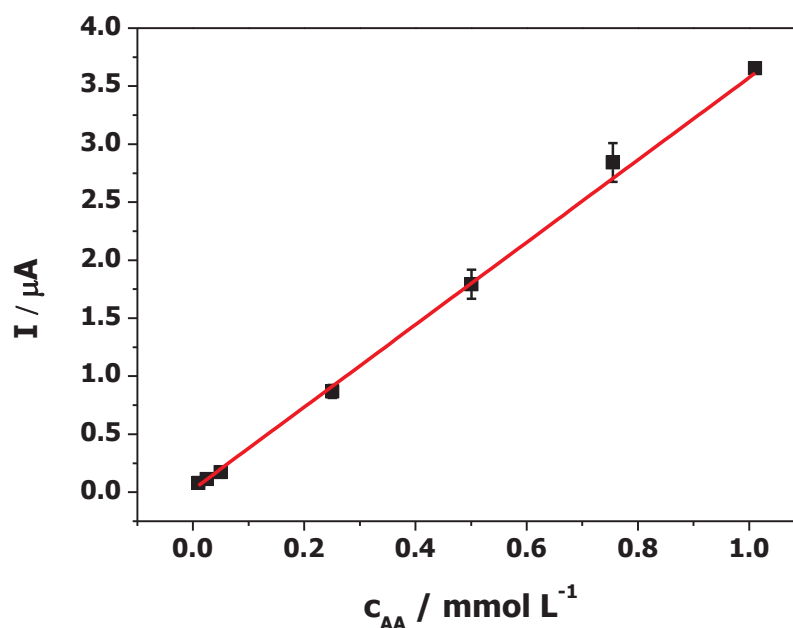
Após avaliar a viabilidade do eletrodo na detecção de AA, procedeu-se a construção de uma curva analítica para investigar o desempenho do eletrodo. Esse estudo permitiu a obtenção de dados quantitativos sobre a resposta do eletrodo em diferentes concentrações de AA. Os voltamogramas obtidos para cada concentração encontram-se na FIGURA 27.

FIGURA 27 - (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS DE $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ A $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE AA. (B) AMPLIAÇÃO DE 10 mmol L^{-1} A $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s^{-1} . ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETADO pH 5,0.



O desempenho analítico dos eletrodos impressos para a determinação de AA, nas condições determinadas, foi verificado pelas medidas com o incremento das concentrações do analito. A FIGURA 27 (A) mostra os voltamogramas cíclicos obtidos na faixa de concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Na FIGURA 27 (B) é possível observar a ampliação dos voltamogramas obtidos na região de concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Os resultados obtidos por CV foram sumarizados na forma de curva de regressão linear e está representado na FIGURA 28.

FIGURA 28 - CURVA ANALÍTICA DO AA OBTIDA POR CV COM FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DE $10 \mu\text{MOL L}^{-1}$ A $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($n = 5$).



A curva analítica representada na FIGURA 28, apresentou um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9951$), indicando um bom ajuste no modelo de regressão linear, com uma região linear de resposta entre $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, onde houve uma correlação direta entre a concentração do analito e o sinal analítico detectado, apresentando uma sensibilidade de $3,55 \mu\text{A L mmol}^{-1}$, com base na seguinte equação que rege esta correlação: $I (\mu\text{A}) = 3,55 C_{\text{AA}} (\text{mmol L}^{-1}) + 2,34 \times 10^{-2}$. No entanto, acima desses valores, observou-se uma saturação da superfície do sensor. Para realizar os cálculos do limite de detecção (LOD), utilizou-se a fórmula da razão de três vezes o desvio padrão do branco dividido pela sensibilidade. Da mesma forma, para o limite de quantificação (LOQ), aplicou-se a fórmula da razão de dez vezes o desvio padrão do branco pela sensibilidade⁹². Os valores obtidos foram um LOD de $0,712 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOQ de $2,37 \mu\text{mol L}^{-1}$. A partir dessas informações, os valores dos parâmetros analíticos de mérito da metodologia proposta foram comparados com os de outros trabalhos reportados na literatura que utilizaram eletrodos impressos. Os resultados estão apresentados na TABELA 5.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE AA.

Sensor	Método	LDR/ mol L ⁻¹	LOD/ μmol L ⁻¹	S/ μA L mmol ⁻¹	Ref
SPE/3D-rGO	LSV	1,0 x10 ⁻⁵ a 10 x10 ⁻²	3,4	15	93
CuO nanoneedles/SPEs	AM	1 x10 ⁻⁴ a 8 x10 ⁻³	88	7,5	94
β-CD/rGO/SPE	DPV	2 x10 ⁻⁴ a 2 x10 ⁻³	67,00	4,63	95
SPE -LabSense	CV	1 x10 ⁻⁵ a 1 x10 ⁻³	0,712	3,55	*

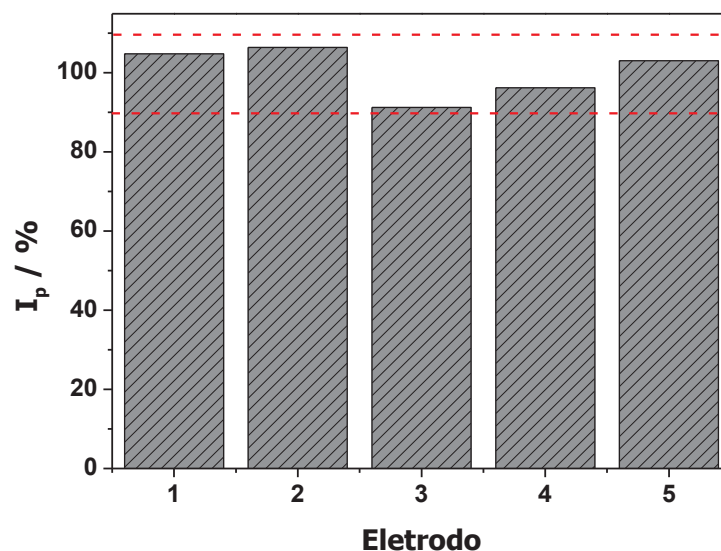
Three-dimensional graphene oxide/ Screen-Printed Electrode (SPE/3D-rGO); Copper Oxide nanoneedles/ Screen-Printed Electrode (CuO nanoneedles/SPEs); β-cyclodextrin/ Reduced graphene oxide/ Screen-Printed Electrode (β-CD/rGO/SPE)

LSV – Linear Sweep Voltametry; AM – Amperometry; DPV – Differential Pulse Voltametry; CV – Cyclic Voltametry; LDR – Linear Dynamic Range; S -sensibilidade; LOD – Limit of detection; *Esse trabalho

O método proposto demonstrou potencial analítico para a determinação de AA, apresentando uma faixa linear, LOD e sensibilidade comparáveis e, por vezes, melhores aos demais estudos relatados na literatura. É relevante destacar que os dispositivos desenvolvidos com esta metodologia não foram alterados com a adição de nenhum modificador em sua composição; apenas uma modificação superficial foi realizada por meio do tratamento eletroquímico. Essa abordagem contrasta com outros sensores revisados, já que todos eles incorporam algum tipo de modificador em sua estrutura. Esses resultados evidenciam a eficácia do dispositivo desenvolvido e sua viabilidade para futuras aplicações em análises de amostras alimentares.

A análise da curva analítica permitiu também a determinação da precisão intermediária do método, um parâmetro que avalia a concordância entre várias medidas realizadas em uma mesma amostra. Como cada ponto da curva analítica foi feito em quintuplicada, foram utilizados os valores de corrente elétrica obtidos para a concentração de 0,5 mmol L⁻¹ de AA. O valor de referência (100%) foi obtido através do cálculo da média de todas as medidas realizadas. Os resultados estão representados na FIGURA 29.

FIGURA 29 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA O AA 0,5 mmol L⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.



Pelo gráfico de barra, pode-se observar que as réplicas apresentaram valores entre 90 e 110% em relação ao valor médio de corrente elétrica obtida (100%), apresentando um desvio padrão relativo de $\pm 6,98\%$, indicando que o método proposto apresenta confiabilidade nos resultados.

Dessa forma, como parte do desenvolvimento do sistema multiplex, o próximo analito estudado foi a GLI, por meio do desenvolvimento de um biossensor. Para isso, foram realizados estudos com o objetivo de imobilizar a enzima GOx associada a um filme Prússia, utilizado para detectar o peróxido de hidrogênio gerado durante a reação enzimática com a GLI.

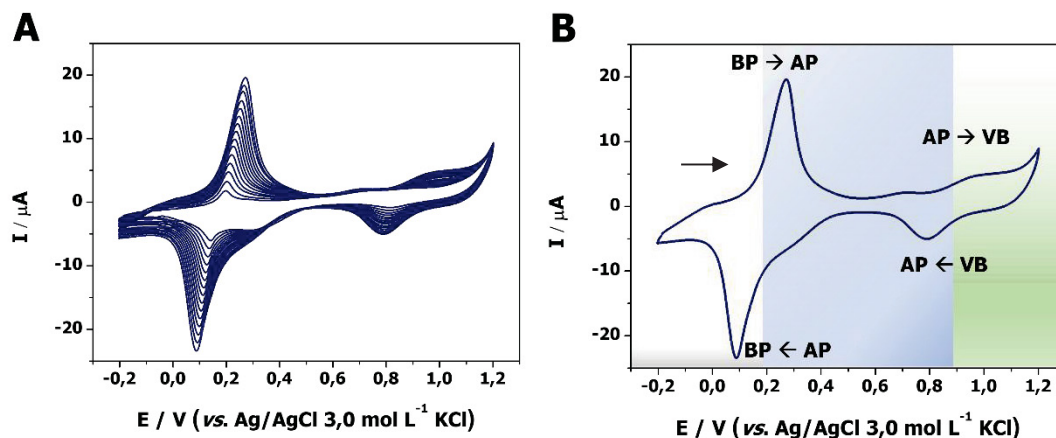
4.3 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS PARA A DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICA DE GLICOSE

4.3.1 Formação do Filme de Azul da Prússia

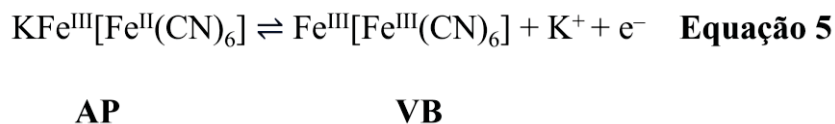
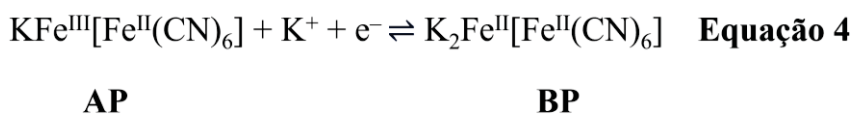
Inicialmente, a metodologia para a formação e crescimento do filme de azul da Prússia foi estudada. De acordo com o item "3.3.2.1 Formação do Filme de Azul da Prússia", foi empregado um procedimento potenciodinâmico de 15 ciclos. Esse procedimento foi realizado em uma solução contendo íons ferricianeto e ferro (III), juntamente com o surfactante CTAB, conforme descrito na metodologia proposta por Lowinsohn⁹⁶. Os

voltamogramas que representam o crescimento do filme podem ser visualizados na FIGURA 30.

FIGURA 30 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS A PARTIR DA SOLUÇÃO PREPARADA PARA ELETRODEPOSIÇÃO DO AZUL DA PRÚSSIA (15 CICLOS). (B) VOLTAMOGRAMA DO 15º CICLO DO FILME DE AZUL DA PRÚSSIA. B.P: BRANCO DA PRÚSSIA. A.P: AZUL DA PRÚSSIA. V.B: VERDE DE BERLIM.



Pelos voltamogramas mostrados na FIGURA 30, durante a etapa de crescimento do filme de azul da Prússia foi observada a presença de quatro processos faradaicos, respectivos a reações redox das espécies azul da Prússia/branco da Prússia e azul da Prússia/verde de Berlim, em acordo com os resultados apresentados na literatura⁹⁷. Essas etapas são descritas pelas Equações 4 e 5⁹⁸.



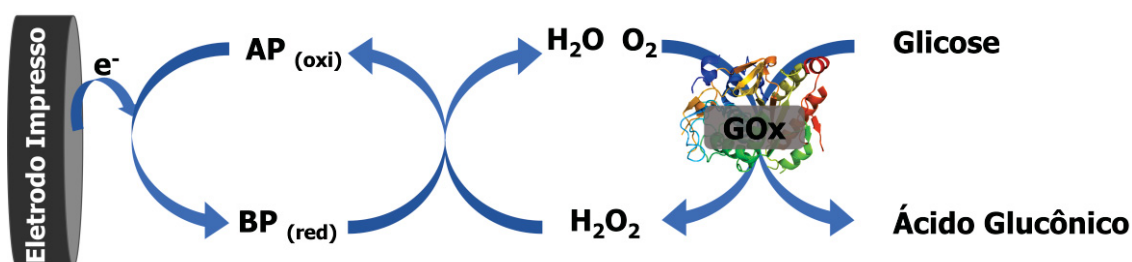
A oxidação do branco da Prússia a azul da Prússia foi observada em potencial de pico de 0,27 V, já o processo de redução do azul da Prússia novamente a branco da Prússia foi observado em -0,08 V. Também foram registrados os processos redox relacionados à reação de oxidação do azul da Prússia em verde de Berlim, em 0,96 V, e a reação reversa de redução, em 0,78 V. Devido ao branco da Prússia apresentar atividade catalítica para a redução do

peróxido de hidrogênio em meio ácido a formação do filme ocorre em baixos valores de pH. No entanto, a enzima GOx necessita de meios onde o valor de pH sejam mais brandos para uma atividade ótima, o que compromete a estabilidade do filme de azul da Prússia. Nesse sentido, o emprego do CTAB é indicado na literatura⁹⁹⁻¹⁰¹ para garantir essa estabilidade do filme que tende a ser afetado pelo pH do meio. Desse modo, foi optado pela metodologia com o uso do surfactante para crescimento do filme por eletrodeposição.

4.3.2 Avaliação do eletrodo impresso com Azul da Prússia na detecção do H_2O_2

Uma das abordagens convencionais para a determinação de GLI utilizando biossensores eletroquímicos é a detecção do peróxido de hidrogênio gerado na reação enzimática da GLI. Filmes de azul da Prússia em sua forma reduzida (branco da Prússia) podem ser oxidados quimicamente pelo peróxido de hidrogênio, gerando azul da Prússia que pode ser reduzido novamente ao branco, em condições favoráveis de potencial e pH (ácido), fornecendo um sinal proporcional ao H_2O_2 presente. Essa sequência de etapas é comumente classificada como um mecanismo eletroquímico-químico (EC') pois, envolve inicialmente a reação eletroquímica (E) para formação do branco da Prússia e, posteriormente, uma reação química (C) entre ele e o peróxido de hidrogênio regenerando o azul da Prússia. As reações que ocorrem na superfície do biossensor na presença de GLI pode ser ilustrado pelo esquema representativo apresentado na FIGURA 31.

FIGURA 31 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS NA DETERMINAÇÃO DE GLI EMPREGANDO UM BIOSENSOR ELETROQUÍMICO.

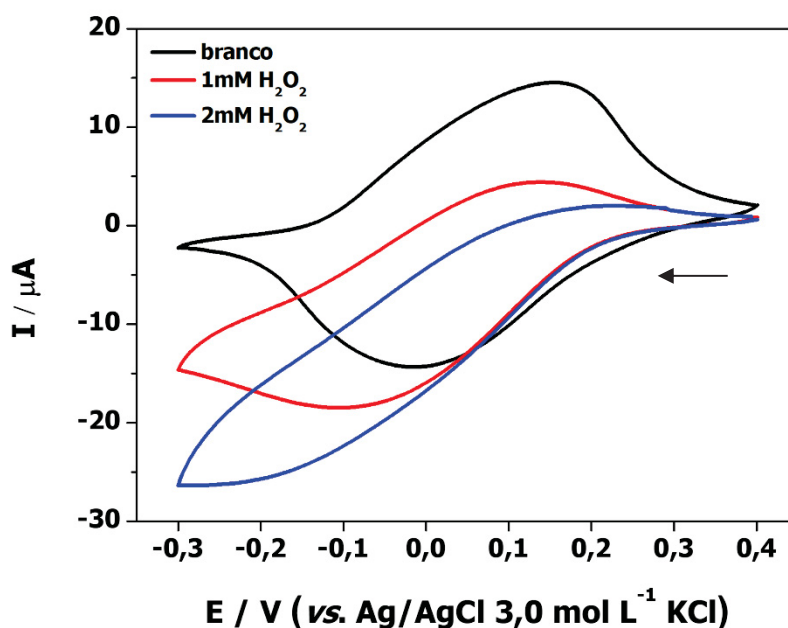


FONTE: A autora.

Assim, foi estudado o comportamento eletroquímico desse filme frente à redução de peróxido de hidrogênio, com ênfase aos processos branco e azul da Prússia. Os resultados mostrados na FIGURA 32 são referentes a voltametrias cíclicas obtidas para o eletrodo modificado na ausência e com duas adições sucessivas de peróxido de hidrogênio em solução

0,1 mol L⁻¹ de Na₂SO₄ e tampão acetato pH 5,5 (pH dentro da faixa de atividade máxima da enzima livre¹⁰²). O Na₂SO₄ foi incorporado como eletrólito suporte neste estudo, pois, nesta fase, ainda estava sendo avaliado o uso do HDL ou dHDL como modificador. Como o material lamelar apresentava íons SO₄²⁻ no espaço interlamelar, era necessário a presença desses íons na solução de eletrólito suporte.

FIGURA 32 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS APENAS NO ELETRÓLITO SUPORTE (1:10 TAMPÃO ACETATO pH 5,5 E SOLUÇÃO DE Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹) E APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE 1 E 2 mmol L⁻¹ DE H₂O₂. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s⁻¹.

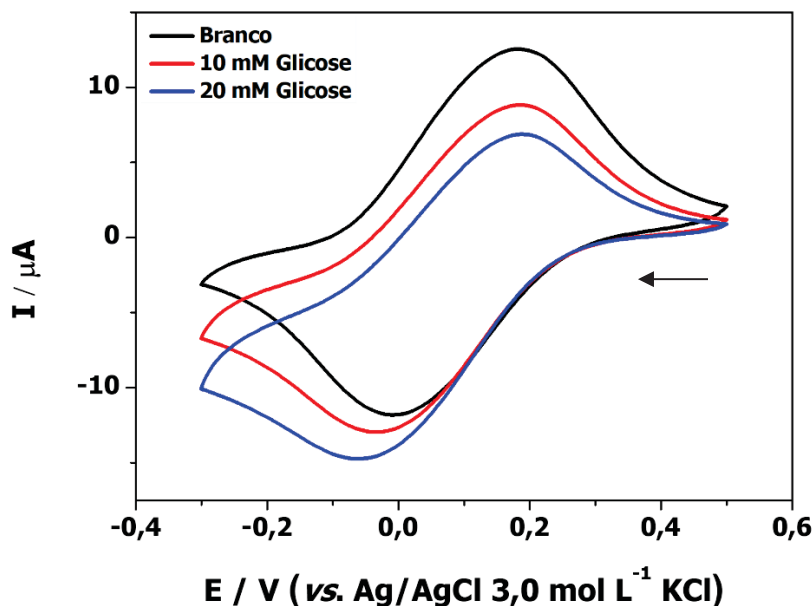


Na FIGURA 32, após as adições de peróxido de hidrogênio pode-se observar um aumento sucessivo da corrente elétrica na região de potencial relacionada à redução do azul da Prússia à branco da Prússia, assim como diminuição no valor da corrente de oxidação do branco da Prússia a azul da Prússia. Quando a varredura atinge valores de potencial que favorece a formação do branco da Prússia, ele é consumido quimicamente pelo peróxido de hidrogênio e regenera o azul da Prússia. Sendo o potencial aplicado favorável a redução, o azul da Prússia é reduzido novamente levando a um aumento da corrente catódica quando comparado à ausência do H₂O₂. É uma resposta típica para um processo de mediação redox, indicando que o peróxido de hidrogênio pode ser reduzido pelo branco da Prússia em potenciais abaixo de -0,1 V, e evidenciando que o uso do filme de azul da Prússia é viável para promover a redução de peróxido de hidrogênio e, consequentemente, a detecção de GLI.

4.3.3 Potencialidade Analítica para a Detecção de Glicose

Após a avaliação do filme de azul da Prússia como mediador redox viável para a detecção de peróxido de hidrogênio, procedeu-se à avaliação da imobilização proposta para a enzima GOx, conforme descrito no item “3.4.3 Imobilização da Enzima Glicose Oxidase”. A imobilização foi realizada por meio de ligação cruzada, formando ligações intermoleculares entre a enzima e reagentes, tornando-a insolúvel no meio reacional. Agentes de reticulação são moléculas que possuem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos da enzima, sendo nesse caso, o glutaraldeído o agente reticulador da ligação cruzada no biossensor¹⁰³. O nafion tem a função de formar um filme estável sobre a superfície do eletrodo, auxiliando no ancoramento da enzima. O BSA se reticula com a enzima, tornando-a mais estável e menos solúvel, enquanto a glicina tem a função de bloquear sítios remanescentes que não foram ocupados pela enzima¹⁰⁴. Uma vez concluída a imobilização, foram adicionadas concentrações sucessivas de GLI para avaliar a eficácia da metodologia proposta para a detecção indireta de GLI. Os resultados obtidos foram apresentados na FIGURA 33.

FIGURA 33 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS APENAS NO ELETRÓLITO SUPORTE (1:10 TAMPÃO ACETATO pH 5,5 E Na_2SO_4 0,1 mol L⁻¹) E APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE 10 E 20 mmol L⁻¹ DE GLI. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s⁻¹.



Conforme previsto, após as adições de GLI, foi possível observar um incremento sucessivo da corrente elétrica relacionada à redução do azul da Prússia à branco da Prússia,

bem como uma diminuição no valor da corrente de oxidação do branco da Prússia à azul da Prússia. É importante destacar que esse incremento foi inferior ao observado com a adição de peróxido de hidrogênio, mas isso já era esperado devido ao fato da produção de peróxido de hidrogênio passar a depender de fatores externos, como concentrações, atividade da enzima, difusão dentro do filme, entre outros.

Contudo, os resultados obtidos indicam que a enzima foi efetivamente ancorada à superfície do eletrodo impresso através da imobilização proposta, e o filme de azul da Prússia desempenhou seu papel de mediador redox na redução do peróxido de hidrogênio em potenciais próximos a -0,05 V. Esses resultados validam a metodologia proposta para a detecção indireta de GLI, evidenciando seu potencial para o desenvolvimento de biossensores.

Com o intuito de aprimorar a etapa de imobilização e reduzir o efeito capacitivo observado no eletrodo, foram exploradas diversas modificações nesse procedimento, conforme descrito na TABELA 3. O estudo para determinar o procedimento mais adequado para a imobilização envolveu a realização de uma curva analítica investigativa para GLI ao longo de um período de dois dias. Uma curva analítica foi construída utilizando a cronoamperometria, aplicando um potencial de -0,3V por 30 segundos, com uma faixa de concentração de 1 a 6 mmol L⁻¹ de GLI. Para a análise, foram avaliados a sensibilidade da curva, o valor da corrente elétrica correspondente à menor concentração de GLI e a estabilidade de um dia para o outro. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 - COMPARATIVO DE SENSIBILIDADE E VALOR DE CORRENTE ELÉTRICA PARA A MENOR CONCENTRAÇÃO DE GLI.

Procedimento	Sensibilidade Dia 1 / $\mu\text{A L mmol}^{-1}$	Sensibilidade Dia 2 / $\mu\text{A L mmol}^{-1}$	Corrente (1 mM GLI (dia 1)) / μA
I	1,69	1,50	2,13 μA
II	1,03	0,10	1,04 μA
III	1,05	0,51	0,97 μA

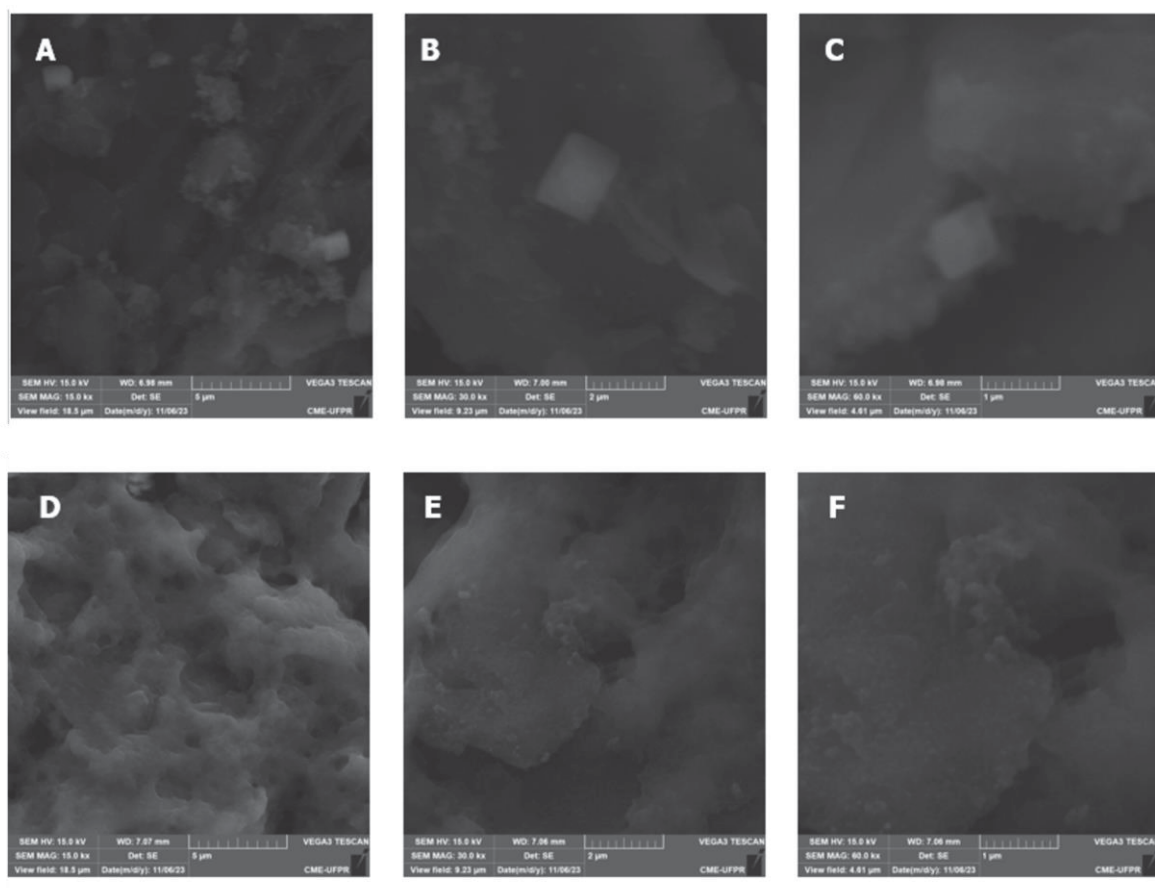
Com base na TABELA 6, nota-se que o procedimento I demonstrou maior sensibilidade e uma menor perda de sensibilidade ao longo do dia em comparação com os outros métodos. Além disso, para a menor concentração de GLI estudada (1,0 mmol L⁻¹), o procedimento I apresentou praticamente o dobro da corrente elétrica em relação aos demais,

indicando uma maior sensibilidade e menores valores de LOD e LOQ. Essa diferença pode estar relacionada ao BSA, uma vez que, por ser uma proteína de grande tamanho, pode interferir no processo de transferência de carga na superfície do eletrodo.

Além disso, procedimento II e III não contam com o glutaraldeído, que é responsável pela ligação cruzada da enzima e a superfície eletródica. Se a ligação entre enzima/eletrodo não ocorre eficientemente, ocorrerá naturalmente a lixiviação da enzima. Com uma quantidade reduzida de enzima, a conversão de glicose diminui, resultando em um sinal gerado menor. Assim, a imobilização da enzima GOx foi realizada por meio da modificação do procedimento original, removendo o BSA da composição.

Após a otimização da etapa de imobilização, foram realizadas imagens de MEV da superfície do eletrodo após a formação do filme de Azul da Prússia e imobilização da enzima, as quais estão apresentadas na FIGURA 34.

FIGURA 34 - IMAGENS REPRESENTATIVAS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO BIOCSENSOR. (A, B E C) CRISTAIS DE AZUL DA PRÚSSIA SOBRE A SUPERFÍCIE ELETROQUÍMICA. (D, E E F) FILME POLIMÉRICO COM ENZIMA SOBRE O FILME DE AZUL DA PRÚSSIA.

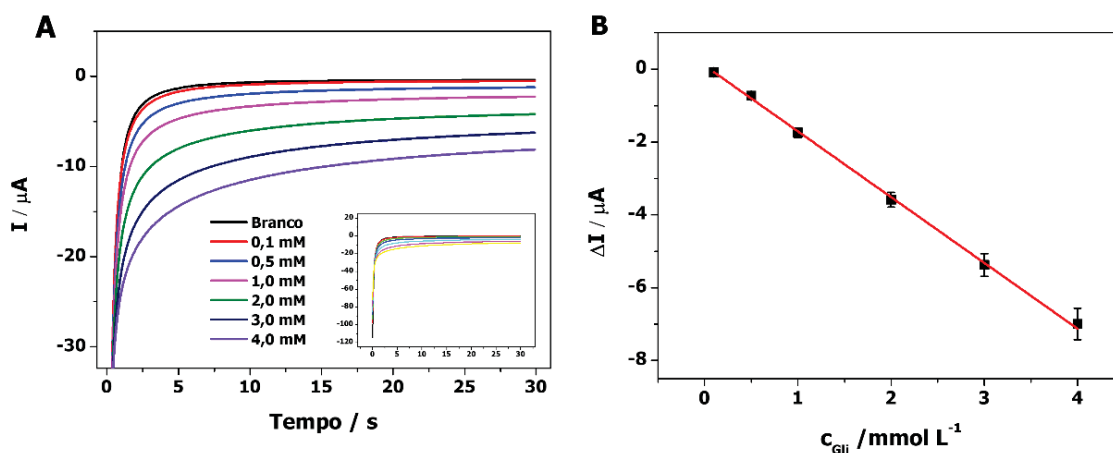


As imagens das FIGURA 34 (A, B e C), confirmam a presença do azul da Prússia eletrodepositado na superfície do eletrodo, como sugerem os perfis voltamétricos obtidos. Isso é evidenciado pela presença de cristais cúbicos de azul da Prússia, visíveis na região mais clara das imagens. Na FIGURA 34 (D), observa-se o filme polimérico correspondente ao ancoramento da enzima GOx na superfície eletródica e nas FIGURA 34 (E e F) é possível observar os cristais de azul da Prússia sob o filme com proteína.

4.3.4 Desempenho Analítico na determinação de Glicose

Com base nos parâmetros otimizados, a avaliação do desempenho analítico do método foi conduzida mediante a adição de concentrações crescentes de GLI, utilizando a técnica de cronoamperometria tanto com agitação (dinâmica) quanto sem agitação (estática), aplicando um potencial constante de $-0,3 \text{ V vs. (Ag/AgCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl)}$. Esses ensaios foram realizados apenas para comparação do desempenho do biossensor. Os resultados da curva analítica amperométrica estática se encontra na FIGURA 35.

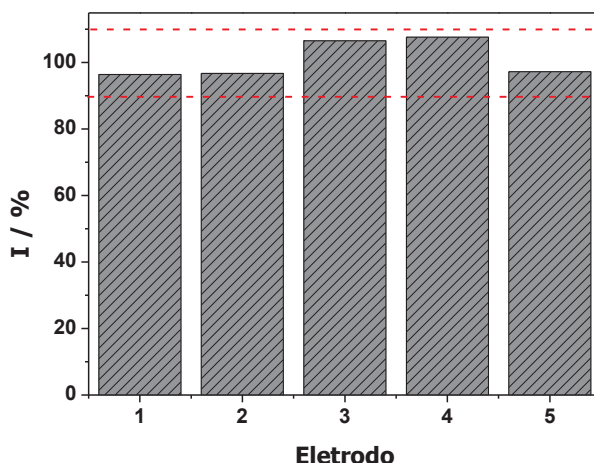
FIGURA 35 - (A) CRONOAMPEROGRAMAS OBTIDOS NA FAIXA DE $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ A $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DE GLI, COM POTENCIAL APLICADO DE $-0,3 \text{ V}$. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 5,0. (B) CURVA ANALÍTICA CORRESPONDENTE (n=5).



A curva analítica apresentou região linear de trabalho de $0,1$ a $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$, coeficiente de correlação de $0,9985$, sensibilidade de $1,80 \mu\text{A L mmol}^{-1}$ e equação de reta representada por: $I (\mu\text{A}) = -1,81 C_{\text{Gli}} (\text{mmol L}^{-1}) + 9,87 \times 10^{-8}$. Com base nesses parâmetros, os limites de detecção e quantificação para este sensor foram determinados como $18,9$ e $63,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

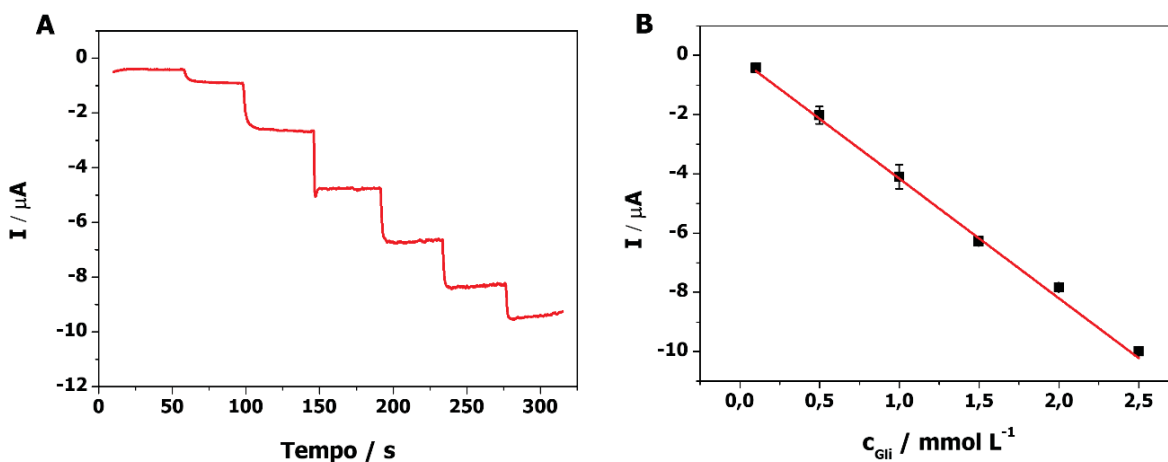
A partir da curva analítica, o estudo de precisão intermediária do método foi realizado. Os valores de corrente elétrica para a concentração de $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de GLI foram utilizados. O valor de referência (100%) foi calculado a partir da média de todas as medidas realizadas. Os resultados estão ilustrados na FIGURA 36.

FIGURA 36 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA A GLI $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.



Todas as réplicas avaliadas apresentaram um valor de corrente elétrica dentro da faixa de 10% de variação em relação ao valor de referência de 100%. Por meio do cálculo do valor médio da corrente elétrica e do desvio padrão entre as replicatas, foi possível determinar um desvio padrão relativo de $\pm 5,72\%$. Esses resultados indicam que a metodologia apresenta um comportamento eletroquímico com pouca flutuação nos valores de corrente elétrica para a determinação da concentração de GLI. Para a curva analítica amperometria dinâmica os resultados estão dispostos na FIGURA 37.

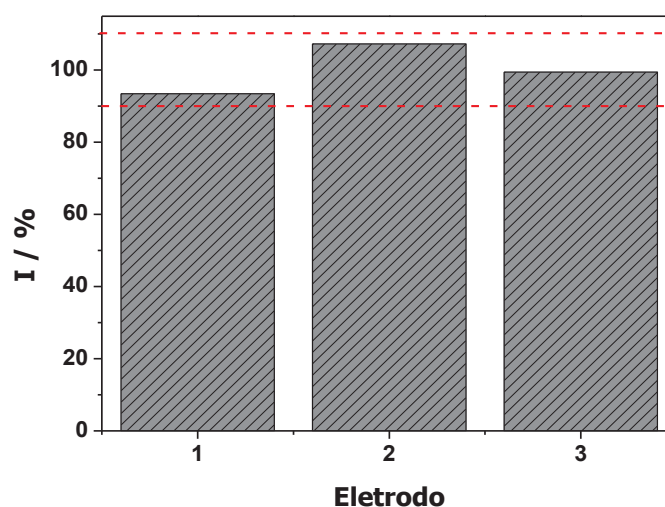
FIGURA 37 - (A) AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA FAIXA DE $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ A $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ DE GLI, COM POTENCIAL APLICADO DE $-0,3 \text{ V}$. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 5,0. (B) CURVA ANALÍTICA CORRESPONDENTE ($n=3$).



Observa-se um aumento linear na resposta de corrente em função do aumento da concentração de GLI na faixa de 0,1 a 2,5 mmol L⁻¹, com uma sensibilidade de 4,04 $\mu\text{A L mmol}^{-1}$. A técnica dinâmica exibe uma maior sensibilidade em comparação com a estática, devido à contribuição do transporte de massa por convecção. Isso resulta em valores mais baixos para o LOD e LOQ, que foram determinados como 8,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 28,30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

De forma análoga às outras curvas analíticas reportadas neste documento, foi conduzido um ensaio de precisão intermediária do método, empregando os valores de corrente elétrica associados à concentração de 1 mmol L⁻¹ de GLI. Como a construção dessa curva analítica foi realizada em triplicata, o resultado reflete a variação dessas três medidas e está representado na FIGURA 38.

FIGURA 38 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA A GLI 1,0 mmol L⁻¹ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.



Apesar de a quantidade de replicatas para esse ensaio não ser ideal, este estudo demonstra a tendência de reprodutibilidade entre os eletrodos utilizados nesta metodologia. Por meio dos cálculos necessários, o valor do desvio padrão relativo foi de $\pm 6,92\%$, indicando novamente confiabilidade dos resultados da metodologia aplicada.

Por fim, os resultados obtidos tanto pela técnica de cronoamperometria estática quanto dinâmica foram comparados com o desempenho analítico de outros eletrodos impressos modificados com azul da Prússia para detecção de GLI, e estão apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE ELETRODOS IMPRESSOS MODIFICADOS COM AZUL DA PRÚSSIA PARA DETERMINAÇÃO DE GLI.

Sensor	Método	LDR / mol L ⁻¹	LOD / μ mol L ⁻¹	S/ μ A L mmol ⁻¹	Ref
Paper-based/PB-SPCE	Amperometria	2,5 x10 ⁻⁴ a 2,0 x10 ⁻³	1,0 x10	2,13	105
Gr/PANI/AuNPs /GOD/SPCE	DPV	2,0 x10 ⁻⁴ a 1,12 x10 ⁻²	1,0 x10 ²	4,58	106
GOx/AuNPs/Pty/ PB/SPCE	Amperometria em Fluxo	1,0 x10 ⁻⁶ a 1,0 x10 ⁻³	1,00	4,21	107
SPE -LabSense	Amperometria Estática	1,0 x10 ⁻⁴ a 4,0 x10 ⁻³	1,89 x10	1,80	*
SPE -LabSense	Amperometria Dinâmica	1,0 x10 ⁻⁴ a 2,5 x10 ⁻³	8,50	4,04	*

Paper-based/Prussian Blue/Screen-Printed Carbon Electrode (Paper-based/PB-SPCE)

Graphene/polyaniline/Au nanoparticles/GOD/Screen-Printed Electrode (Gr/PANI/AuNPs/GOD/SPCE)

Glucose oxidase/gold nanoparticles/polytyramine layer/Prussian Blue/Screen-Printed Carbon Electrode (GOx/AuNPs/Pty/PB/SPCE)

Os resultados obtidos revelam semelhanças no desempenho analítico com outros sensores que empregam eletrodos impressos de carbono modificados com azul da Prússia, conforme relatado na literatura. A metodologia desenvolvida e posteriormente aplicada destaca-se pela sua simplicidade, dispensando qualquer outra forma de modificação eletroquímica, com exceção da eletrodeposição do azul da Prússia, contrastando com as demais metodologias mencionadas na tabela.

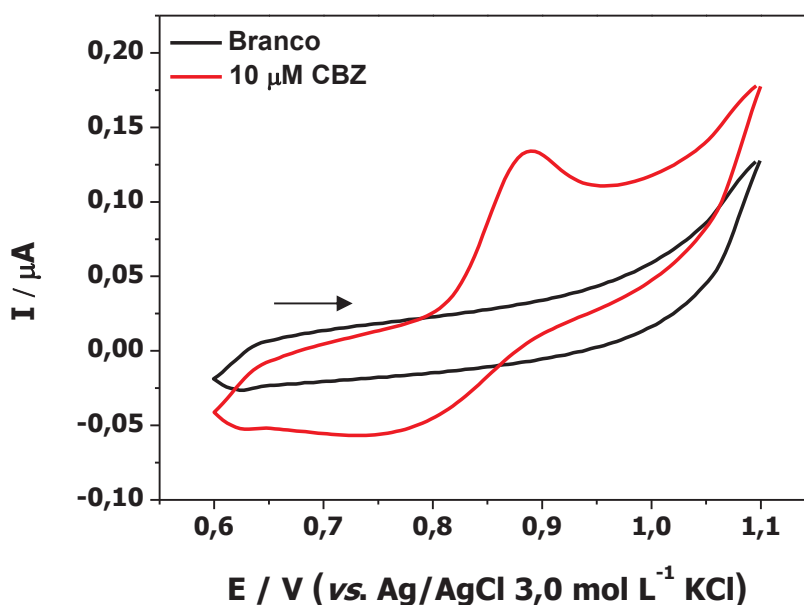
Por fim, realizou-se a avaliação do último componente, o CBZ, integrante da proposta do multiplex. Os estudos relacionados ao CBZ tinham como objetivo principal avaliar a potencialidade dos eletrodos impressos desenvolvidos para sua determinação e futura aplicação no sistema multiplex.

4.4 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS COM dHDL Zn/Al PARA DETERMINAÇÃO DE CARBENDAZIM

4.4.1 Perfil Voltamétrico do Carbendazim

Inicialmente, para avaliar o comportamento voltamétrico do CBZ foram utilizados os eletrodos impressos sem modificação. Para o estudo, foram realizadas medidas de CV ao longo de uma faixa de potencial de 0,6 a 1,1 V na ausência e na presença de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ do fungicida. Os resultados constam na FIGURA 39.

FIGURA 39 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS COM ELETRODOS IMPRESSOS NÃO MODIFICADO NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE CBZ. VELOCIDADE DE VARREDURA: 50 mV s^{-1} . ELETRÓLITO SUPORTE: 1:10 TAMPÃO ACETADO pH 5,5 E Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

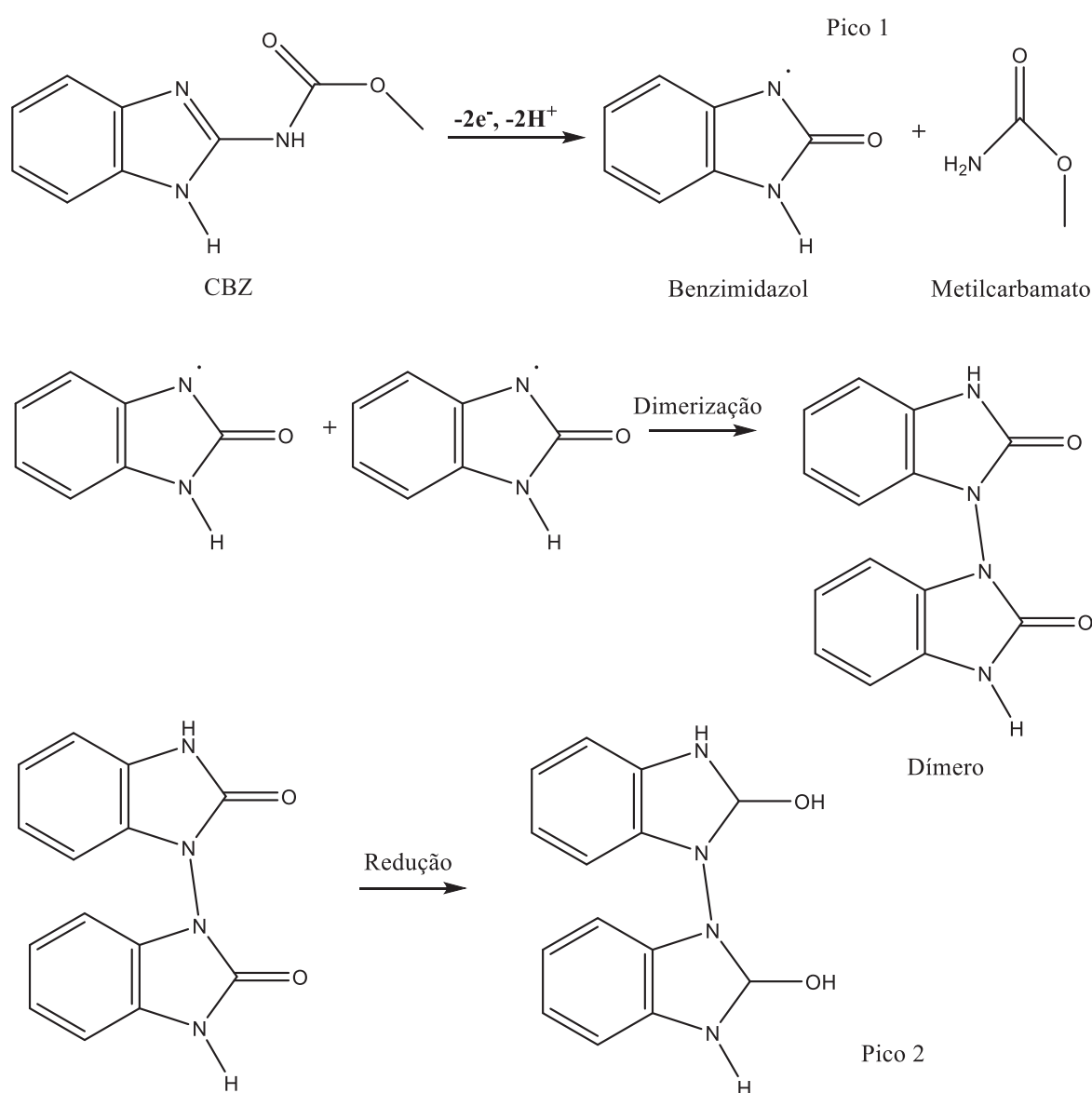


A FIGURA 39 apresenta o voltamograma cíclico do branco da solução (eletrólito suporte) representado em preto e o perfil voltamétrico do CBZ em vermelho. O voltamograma cíclico sugere um processo quasi-reversível, onde é possível observar um pico de oxidação próximo a 0,90 V e redução próximo de 0,77 V. Para um processo totalmente reversível é necessário que o valor da corrente elétrica do pico de oxidação seja igual ao valor da corrente elétrica do pico de redução independente da velocidade de varredura¹⁰⁸. Entretanto, no caso do voltamograma estudado, percebe-se que as correntes elétricas dos picos de oxidação e redução são diferentes, indicando um certo grau de irreversibilidade.

Nesse contexto, a oxidação do CBZ, ilustrada na

FIGURA 40, ocorre por meio de um processo de transferência de 2 elétrons e 2 prótons, resultando em um radical instável de benzimidazol heterocíclico e metilcarbamato. Os radicais instáveis de benzimidazol heterocíclico reagem completamente para formar um dímero, que é então reduzido para proporcionar o álcool correspondente a 0,7 V (pico 2).

FIGURA 40 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA DO CBZ NA SUPERFÍCIE DO ELETRODO IMPRESSO.



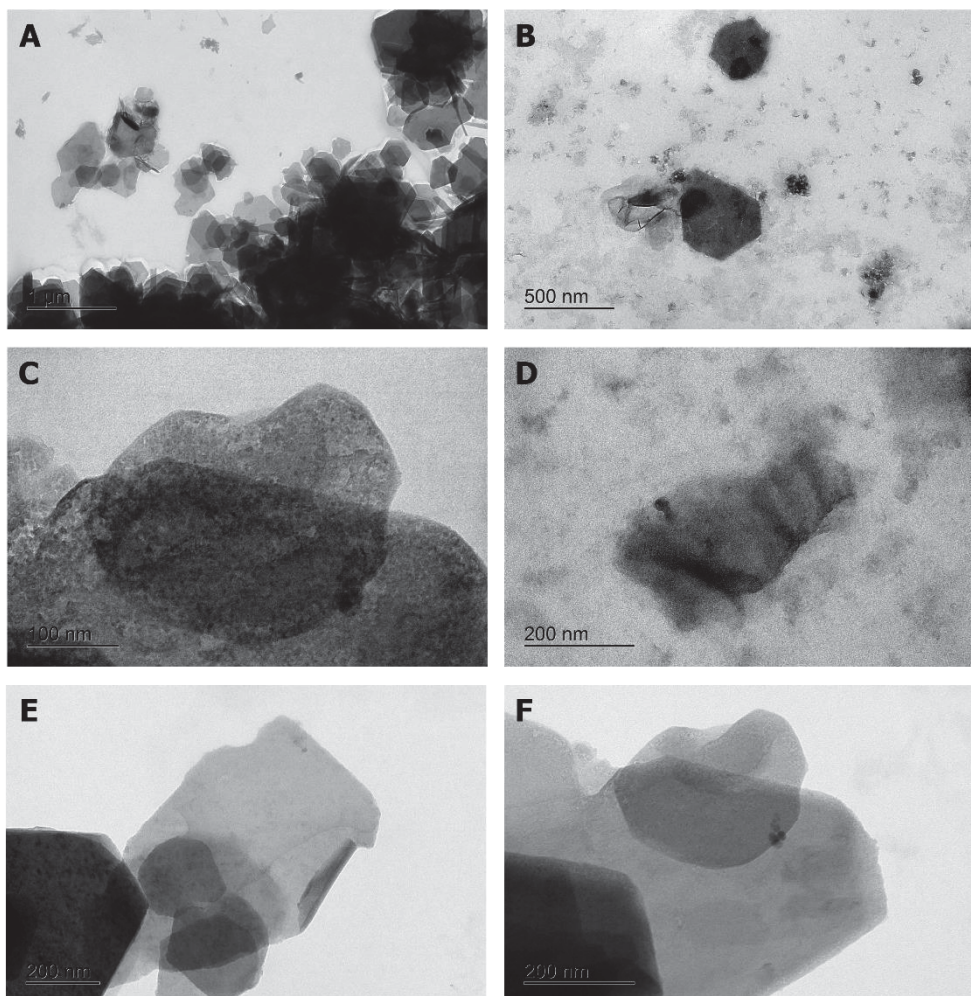
FONTE: Adaptado de Periyasamy et al¹⁰⁹.

Devido à suspensão desse analito pela ANVISA, a concentração do CBZ, se presente em amostras, deve ser baixa. Para atingir um LOD compatível com concentrações usualmente encontradas antes da proibição da ANVISA, adotaram-se estratégias, como a modificação do eletrodo em associação sinérgica com a técnica pulsada SWV. Nesse sentido, foi caracterizado a delaminação do HDL Zn/zAl por MET.

4.4.2 Caracterização do dHDL

A delaminação do HDL foi realizada conforme descrito por Perez-Barrado et al.⁷⁹, baseado na sonicação do material na presença de formamida como solvente. O dHDL foi avaliado através de imagens de MET, com a finalidade de avaliar a morfologia e tamanho médio de partículas. As imagens obtidas estão representadas na FIGURA 41.

FIGURA 41 - IMAGENS DE MET OBTIDAS DO dHDL: (A), (B), (C), (D), (E) E (F), NAS AMPLIAÇÕES DE 5, 10, 50, 30, 20 E 30KX RESPECTIVAMENTE.



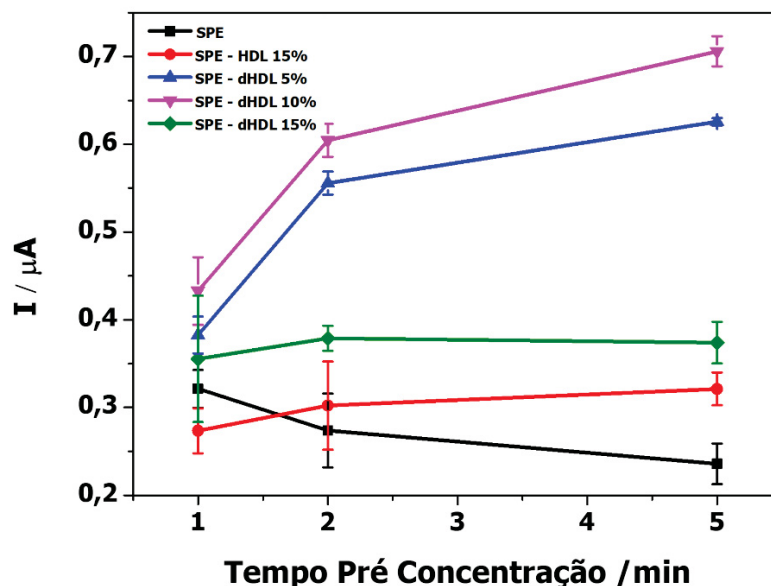
Com base nas imagens obtidas por MET, apresentadas na FIGURA 41, as partículas de dHDL exibem uma geometria irregular (circular), em contraste com a geometria hexagonal típica do HDL. Essa alteração geométrica era esperada e está em consonância com estudos previamente relatados na literatura^{79,110}. É observado em certas regiões de aglomerados (A), a presença de partículas com a geometria característica do HDL, sugerindo que, em algumas regiões, a delaminação pode não ter sido completa de forma uniforme em toda a extensão da amostra. Contudo, as imagens em associação com os estudos de adsorção e voltamétricos sugerem a delaminação devido a melhora das características.

Nesse contexto, o estudo posterior teve como objetivo a comparação do desempenho eletroquímico do modificador (forma delaminada e íntegra) para a pré concentração do CBZ e investigar as proporções adequadas de modificador para as futuras análises.

4.4.3 Potencialidade Analítica dos Eletrodos Impressos Modificados com HDL Zn/Al

Como mencionado anteriormente, os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) possuem propriedades adsorptivas, o que lhes permite a pré-concentração *ex situ* do CBZ na superfície do eletrodo, resultando em um aumento do sinal analítico. Nesse contexto, foram avaliados três diferentes tempos de pré-concentração. Devido ao CBZ apresentar um comportamento quasi-reversível, na condição de velocidade de varredura nos ensaios com CV, estudos subsequentes foram conduzidos utilizando SWV, visando melhorar a sensibilidade da metodologia. Neste estudo, foram examinados tanto os eletrodos impressos sem modificação, como aqueles modificados com HDL em uma proporção de 15% (m/m). Além disso, foram analisados eletrodos modificados com diferentes proporções de HDL delaminado (dHDL). Os resultados estão dispostos na FIGURA 42.

FIGURA 42 - INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDAS PARA O CBZ EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E DIFERENTES PROPORÇÕES DE HDL. ELETRÓLITO SUPORTE: 1:10 TAMPÃO BR pH 7,0 E Na_2SO_4 0,1 mol L^{-1} .



Os resultados evidenciaram que a presença do modificador no eletrodo proposto promove uma melhora em relação ao sinal de resposta quando comparado ao eletrodo não modificado. Para o HDL não delaminado, não foram obtidas melhoras tão expressivas frente ao eletrodo convencional, embora exista uma variação do sinal com o tempo de acumulação. Por outro lado, à medida em que a proporção de dHDL foi aumentada, foi observado um incremento substancial na intensidade de sinal, o que pode estar em acordo com aumento de área ativa capaz de adsorver o analito. O valor máximo de corrente foi gerado quando no eletrodo impresso confeccionado com 10 % (m/m) de dHDL, após isso o valor começa a diminuir. O decaimento do sinal pode ser consequência da perda de condutividade do sensor, como o modificador não se trata de um condutor elétrico, à medida que o grafite (condutor) é substituído pelo dHDL, em maiores proporções, o caráter isolante do material modificador prevalece e, nesse caso, é observada a queda da corrente registrada. Assim, optou-se pelo uso de eletrodos modificados com dHDL na proporção de 10% (m/m) e com um tempo de pré-concentração de 2 minutos. O incremento no sinal elétrico observado para o tempo de pré-concentração de 5 minutos não apresenta uma melhoria expressiva suficiente para compensar o aumento do tempo dedicado a essa etapa do processo.

Adicionalmente, com a opção pelo uso do dHDL, a necessidade de incorporar Na_2SO_4 no eletrólito suporte, devido a possíveis trocas iônicas entre os íons presentes no eletrólito e no espaço interlamelar do material (HDL), foi eliminada. Os estudos foram então

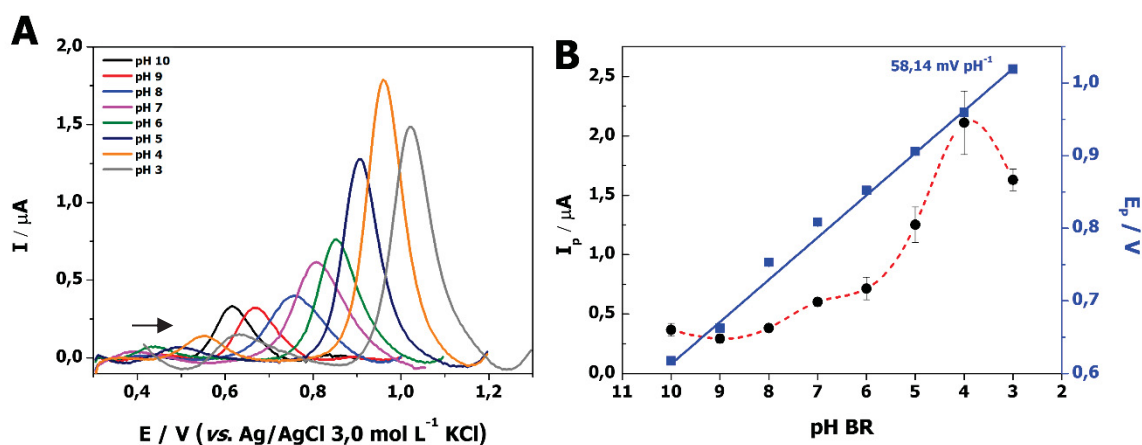
conduzidos após essa otimização, sem a adição de Na_2SO_4 na composição do eletrólito suporte.

Por fim, é importante considerar um estudo sobre o efeito do pH durante a etapa de pré-concentração e leitura, a fim de otimizar o sinal analítico. Com essas informações, será possível aprimorar as condições experimentais para análises futuras.

4.4.4 Estudo de pH de pré-concentração e leitura

Foi realizado um estudo a fim de se verificar a influência do pH exercida sobre a resposta do sensor. O mesmo eletrólito suporte estudado foi utilizado tanto na etapa de pré-concentração como na etapa de leitura. Para o estudo foram preparadas soluções tampão (BR), no intervalo de pH de 3,0 a 10,0, as quais foram empregadas para pré-concentrar uma solução de CBZ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e também para a medida eletroquímica em tampão. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 43.

FIGURA 43 - VOLTAMOGRAMAS DE SWV (A) E INTENSIDADES DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO OBTIDAS PARA O CBZ EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES VALORES DE pH DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO E LEITURA COM VALOR DE SLOPE OBTIDO DE POTENCIAL vs pH (B) ($n=3$).



Os resultados demonstram que o sinal analítico aumenta à medida que o pH diminui, alcançando o valor máximo em pH 4,0. No entanto, observou-se uma maior dispersão entre as replicatas nesse ponto. Esse comportamento sugere que a interação entre o CBZ e o dHDL possa ser de natureza eletrostática, uma vez que o pKa do analito é em torno de 4,53, levando a um aumento na concentração do CBZ carregado positivamente (protonado) em regiões próximas ao pH 4,0⁵⁴. Por outro lado, o sinal analítico diminui em pH mais baixos, como em pH 3,0, o que pode ser explicado por uma possível degradação do dHDL devido a uma reação ácido-base. Nessas condições mais ácidas, o dHDL pode não ser estável, resultando em uma

redução do sinal analítico. Além disso, em valores de pH muito baixos, há um excesso de íons H^+ presentes na solução, os quais podem competir com o CBZ pelos sítios disponíveis na superfície do modificador.

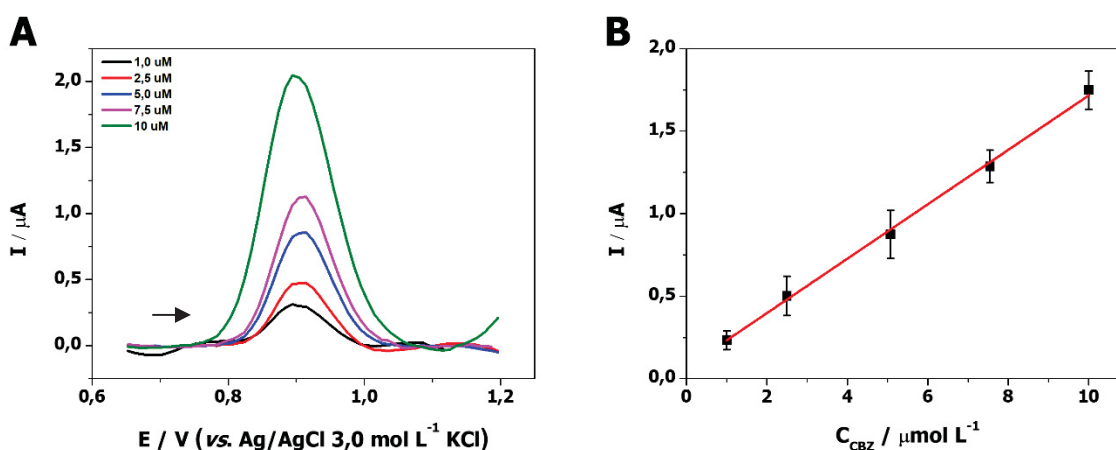
No que diz respeito aos potenciais de pico, verificou-se que o potencial de oxidação se desloca para valores mais positivos à medida que o pH diminui. A inclinação da curva revelou um valor de $58,14 \text{ mV pH}^{-1}$, indicando que a reação envolve um número igual de elétrons e prótons. A reação sugerida por Periyasamy et al.¹⁰⁹ segue o comportamento observado sendo descrita com dois elétrons e dois prótons durante a oxidação do CBZ.

Portanto, considerando os resultados, o pH 5,0 foi definido como adequado para as análises, pois aproxima-se dos valores de pH utilizados para analisar os outros analitos desse dispositivo, visando o sistema multiplex. Além disso, essa condição de pH favorece a adsorção do fungicida na superfície do eletrodo sem a degradação do modificador. Nesse contexto, para a próxima etapa de desenvolvimento do sensor, foi explorado o desempenho analítico do sensor desenvolvido através da elaboração de uma curva analítica para a detecção de CBZ.

4.4.5 Desempenho Analítico para determinação do Carbendazim

Com as otimizações feitas, obteve-se a melhor condição de compromisso e uma curva analítica pode ser construída, o método foi aplicado na determinação de CBZ em diferentes valores de concentração. A FIGURA 44 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica obtidos ($n=5$) para este estudo.

FIGURA 44 - (A) VOLTAMOGRAMAS DE SWV OBTIDOS NA FAIXA DE $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ A $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE CBZ, APÓS PRÉ – CONCENTRAÇÃO DE 2 MINUTOS. ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO ACETATO pH 5,0. (B) CURVA ANALÍTICA CORRESPONDENTE.



A curva analítica apresentou uma região linear na faixa de concentração entre 1,0 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CBZ com sensibilidade de 0,168 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$. Esta relação linear é expressa pela equação: $I (\mu\text{A}) = 0,168 C_{\text{CBZ}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 6,75 \times 10^{-8}$, com LOD e LOQ de 66,63 e 222,11 nmol L^{-1} , respectivamente. A eficácia da metodologia foi comparada com outros estudos presentes na literatura que empregam eletrodos impressos a base de carbono para a determinação de CBZ, sendo os resultados sumarizados na TABELA 8.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TRABALHOS REPORTADOS DE ELETRODOS IMPRESSOS PARA DETERMINAÇÃO DE CBZ.

Sensor	Método	LDR/ mol L^{-1}	LOD/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	S/ $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$	Ref
SPCE/K	DPV	$5,0 \times 10^{-7}$ a $10,0 \times 10^{-6}$	0,06	0,095	111
CT-fC-Cu/SPCE	LSV	$8,0 \times 10^{-7}$ a $2,8 \times 10^{-4}$	0,02	0,089	112
Gr/SPCE	SWV	$2,6 \times 10^{-6}$ a $5,2 \times 10^{-5}$	2,61	0,046	113
SPE - LabSense	SWV	$1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$	0,06	0,168	*

Screen-Printed Electrode/ Kraft Paper (SPCE/K)

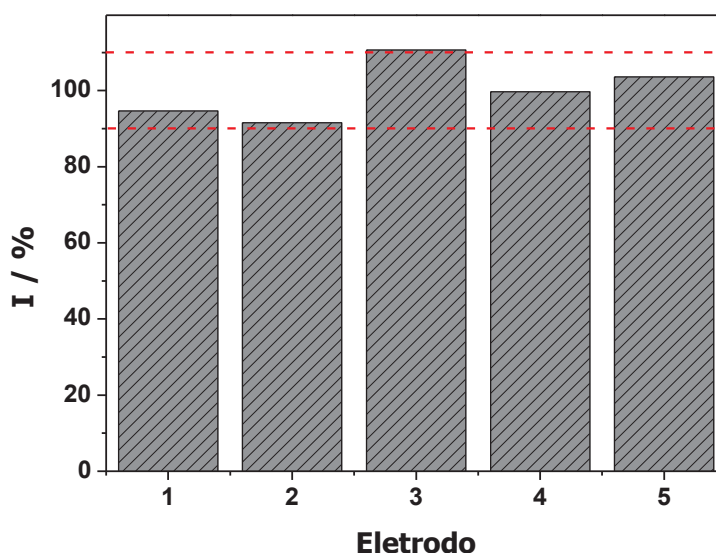
Chitosan-Functionalized Carbon Nanofiber/ Cu Nanoparticles/Screen-Printed Electrode (CT-fC-Cu/SPCE)

Graphene/ Screen-Printed Electrode (Gr/SPCE)

A TABELA 8 exhibe diferentes sensores eletroquímicos que empregam eletrodos impressos à base de carbono para a detecção de CBZ em diversas amostras, como cascas de frutas e vegetais, água e solo. Todos os sensores mencionados na tabela derivaram de modificações eletroquímicas visando aprimorar o desempenho analítico do dispositivo. O sensor destacado neste estudo demonstrou um LOD comparável aos demais trabalhos citados, além de exibir uma sensibilidade superior, evidenciando um desempenho analítico sólido em comparação com outros métodos.

Finalmente, realizou-se um ensaio de precisão intermediária do método, utilizando os valores de corrente elétrica associados à concentração de $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CBZ, conforme ilustrado na FIGURA 45.

FIGURA 45 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE PICO RELATIVAS PARA O CBZ $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ EM TAMPÃO ACETATO pH 5,0 PARA AVALIAR A PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.



Todas as réplicas analisadas demonstraram uma corrente elétrica situada dentro de uma margem de variação de 10%, em relação ao valor de referência estabelecido em 100%. A obtenção do valor médio da corrente elétrica e do desvio padrão entre as réplicas permitiu a determinação de um desvio padrão relativo de $\pm 7,54\%$. Estes resultados evidenciam que a abordagem utilizada exibe um comportamento eletroquímico com mínima flutuação nos valores de corrente elétrica durante a análise da concentração de CBZ.

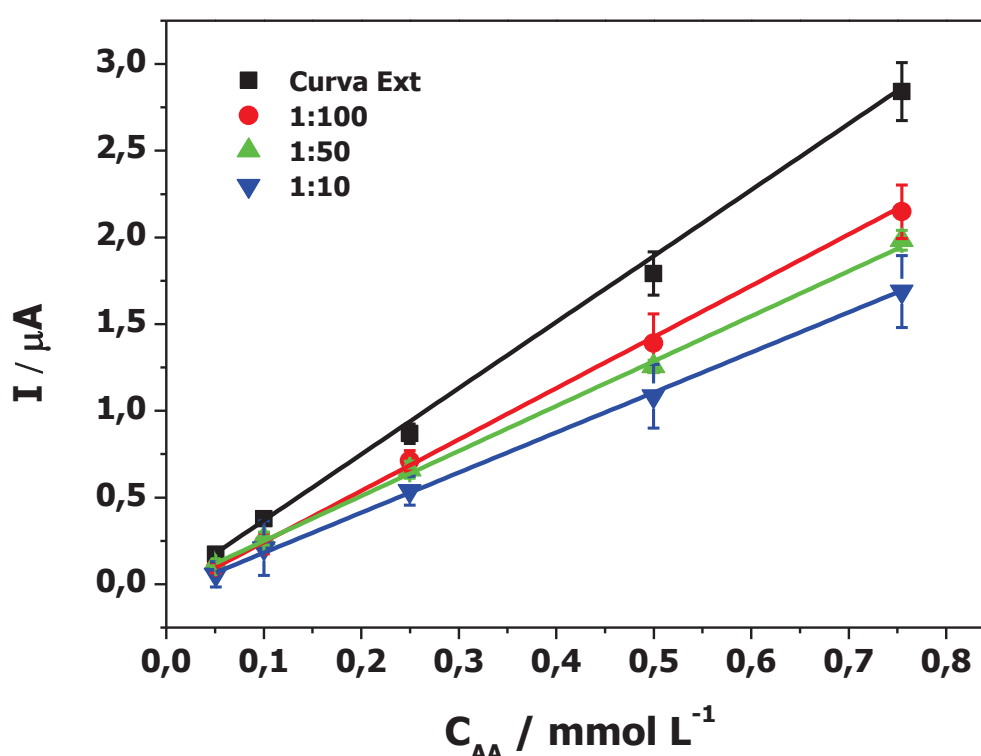
Com base em todas as otimizações e estudos realizados ao decorrer deste documento, o próximo tópico trata sobre a validação do sistema em uma amostra de suco de laranja de marca comercial.

4.5 ESTUDOS SOBRE O EFEITO DE MATRIZ E AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS PARA DETERMINAÇÃO DE AA, GLI E CBZ EM AMOSTRAS DE SUCO DE LARANJA

Inicialmente, investigou-se a presença de efeito de matriz na faixa de trabalho entre $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes níveis de diluição. Após a etapa de centrifugação,

o suco foi diluído em proporções de 10, 50 e 100 vezes, sendo fortificado com padrão de AA para alcançar os mesmos níveis de concentração utilizados na construção da curva de calibração, mas desta vez na presença da matriz. Os resultados comparativos para cada concentração, em relação aos obtidos na ausência da matriz, são apresentados na FIGURA 46.

FIGURA 46 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO CONSTRUÍDAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DA MATRIZ DE SUCO DE LARANJA DE MARCA COMERCIAL PARA AA.



A análise das curvas analíticas obtidas evidencia diferenças, essa observação é confirmada quando as inclinações das retas são comparadas, considerando os valores de sensibilidade obtidos para cada uma delas: $3,55 \mu\text{A L mmol}^{-1}$, $2,96 \mu\text{A L mmol}^{-1}$, $2,59 \mu\text{A L mmol}^{-1}$ e $2,31 \mu\text{A L mmol}^{-1}$, para as curvas externas, 1:100, 1:50 e 1:10, respectivamente. Os resultados mostram que há um maior efeito de matriz para amostra com menor diluição, o que é esperado uma vez que há uma maior concentração dos concomitantes da amostra na célula, mesmo com uma diluição de cem vezes. Adicionalmente, realizou-se um teste-t para duas médias independentes, empregando um intervalo de confiança de 95%. Em todos os casos comparativos, o valor de $t_{\text{calculado}}$ foi superior ao valor de t_{tabelado} ($t_{\text{tabelado}} = 3,182$). Portanto, os valores de sensibilidade não podem ser considerados estatisticamente iguais, indicando que o efeito de matriz é significativo e deve ser considerado nas análises subsequentes. É importante ressaltar que há boa linearidade para as curvas obtidas com

coeficiente linear próximo a origem, o que demonstra que, mesmo com algum efeito de matriz, é possível realizar a quantificação do analito empregando o método de adição de padrão (calibração interna).

Por fim, foi conduzido um estudo de adição e recuperação para a amostra fortificada com três concentrações do analito, com o objetivo de avaliar a exatidão do método. Os resultados desse estudo estão exibidos na TABELA 9.

TABELA 9 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO DO AA EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO.

AA adicionado $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação Diluição 1:100	Recuperação Diluição 1:50	Recuperação Diluição 1:10	Recuperação Média
	/%	/%	/%	/%
100	100,4	86,4	90,9	$93 \pm 7,1$
250	97,6	100,5	95,2	$98 \pm 2,7$
500	88,2	93,7	91,6	$91 \pm 2,8$
Rec. média %	$95 \pm 6,4$	$93 \pm 7,1$	$93 \pm 2,3$	

Os resultados apresentados na TABELA 9 mostram, em geral, bons valores de recuperação, condizentes com aqueles adicionados à amostra com uma recuperação média próxima de 100%. Portanto, o procedimento proposto pode ser considerado adequado, também em termos de exatidão, para a determinação de AA em sucos de laranja adotando a quantificação por adição de padrão. Nesse sentido, foram realizados ensaios análogos tanto para a GLI quanto para o CBZ, seguindo uma abordagem semelhante ao que foi descrito para o AA.

Os estudos iniciais de recuperação para a glicose (GLI) foram realizados nas mesmas condições de diluição descritas para o ácido ascórbico (entre 10 e 100 vezes). Porém, observou-se que devido à sua concentração mais elevada na matriz analisada em comparação com o AA, as diluições inicialmente investigadas para o AA não forneceram resultados adequados para a detecção de GLI. Diante disso, a GLI foi examinada em maiores diluições (1:1000, 1:500 e 1:250). Como descrito anteriormente para o AA, foram construídas curvas analíticas para o analito na presença da amostra em diferentes diluições. Os parâmetros obtidos na curva de calibração (linearidade e sensibilidade) foram comparados e analisados.

Os resultados comparativos das curvas, tanto na ausência quanto na presença da amostra, estão apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DE CURVAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE GLI: COM E SEM AMOSTRA, DESTACANDO SUAS RESPECTIVAS SENSIBILIDADES.

Curva	Sensibilidade/ $\mu\text{A L mmol}^{-1}$	R^2
Externa	4,04	0,999
1:1000	3,69	0,998
1:500	2,39	0,999
1:250	1,95	0,999

Os resultados sugerem um comportamento semelhante ao observado para a determinação de AA. As curvas analíticas obtidas com diferentes diluições da amostra para a determinação de GLI apresentam variações nos valores de coeficiente angular (sensibilidade) em relação àquela construída na ausência da amostra (calibração externa). Notar-se-á um decréscimo na sensibilidade à medida que o grau de diluição diminui, seguindo a mesma tendência observada para o AA, o que sugere um menor efeito de matriz à medida que a amostra é mais diluída. Importante reforçar que, mesmo alterando o coeficiente angular (sensibilidade) da curva, é observada uma boa linearidade para os dados da calibração sugerindo que o método da adição de padrão é a estratégia mais adequada para realizar a quantificação desse alvo na amostra.

Os dados obtidos das curvas analíticas construídas em diferentes diluições foram então submetidos à uma análise estatística empregando teste-t para comparação dos resultados, ao nível de confiança de 95%. Os valores de sensibilidade (coeficiente angular) das curvas obtidas para as amostras diluídas foram avaliadas e comparadas à curva externa. Os valores de $t_{\text{calculado}}$ para todas as diluições investigadas foram superiores ao valor de t_{tabelado} de 2,306, indicando diferenças significativas nos valores de sensibilidade e, consequentemente, um efeito de matriz.

Por fim, foi conduzido um estudo de adição e recuperação para a amostra fortificada com três concentrações do analito, com o objetivo de avaliar a exatidão do método. Os resultados desse estudo estão exibidos na TABELA 11.

TABELA 11 - RECUPERAÇÃO DE GLI EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO.

GLI adicionado mmol L⁻¹	Recuperação Diluição 1:1000 /%	Recuperação Diluição 1:500 /%	Recuperação Diluição 1:250 /%	Recuperação Média /%
0,5	90,0	107,8	99,2	99 ± 8,9
1,0	104,2	107,9	102,9	105 ± 2,6
1,5	99,0	97,9	102,1	99 ± 2,2
Rec. média %	98 ± 7,2	104 ± 5,7	101 ± 1,9	

Os dados apresentados na TABELA 11 mostram valores de recuperação condizentes com aqueles adicionados à amostra, resultando em uma recuperação média próxima de 100%. Esses resultados indicam que a metodologia proposta é adequada para a determinação de GLI, apesar do efeito de matriz observado anteriormente.

Como não foi possível estabelecer inicialmente uma diluição comum entre o ácido ascórbico (AA) e a glicose (GLI) para uma boa recuperação, foi necessário ajustar essa condição em comum entre os três analitos alvos para o sistema multiplex e avaliar o efeito de matriz e recuperação nessas condições.

Assim, a diluição de 250 vezes foi avaliada novamente para o AA para os mesmos valores de concentração investigados anteriormente. Além disso, os estudos realizados para a determinação de CBZ empregaram a amostra diluída na mesma condição (250 vezes) fortificada com concentrações de 2,5, 5,0 e 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Com isso, os resultados das recuperações dos três analitos em uma diluição de 250 vezes foram sumarizados na TABELA 12.

TABELA 12- RECUPERAÇÃO DO AA, GLI E CBZ EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO NA DILUIÇÃO OTIMIZADA DE 250 VEZES.

Concentração	Recuperação AA 1:250 /%	Recuperação GLI 1:250 /%	Recuperação CBZ 1:250 /%
Mínima	108,0	99,2	106,6
Média	101,7	102,9	92,4
Máxima	97,4	102,1	96,2
Rec. média %	102 ± 5,3	101 ± 1,9	98 ± 7,4

Mais uma vez, os resultados obtidos por adição de padrão apresentaram bons valores de recuperação, evidenciando a eficiência da abordagem proposta para determinação dos três analitos avaliados neste trabalho. Pelos estudos apresentados fica claro que, embora o sistema sofra efeito de matriz, é possível obter bons resultados analíticos empregando uma diluição adequada e realizando a quantificação pelo método da adição de padrão. Com base nos valores de recuperação obtidos para os três analitos, sob uma mesma condição de diluição (1:250), evidencia-se a viabilidade do uso dessa metodologia para a determinação dos analitos através do sistema multiplex. Isso demonstra uma abordagem de baixo custo, fácil manuseio e com resultados satisfatórios em termos de precisão e exatidão do método.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi realizado com sucesso o desenvolvimento e a caracterização de eletrodos impressos do tipo *labmade*, utilizando reagentes e materiais acessíveis, como esmalte de unha, grafite em pó e folhas de PVC. O custo médio unitário desses eletrodos foi de R\$ 0,10, tornando-os economicamente vantajosos. Essa abordagem de impressão foi aplicada no desenvolvimento de um dispositivo eletroquímico multiplex, integrando três eletrodos de trabalho distintos (um convencional não modificado, um biossensor e um com o modificador incorporado à tinta) em um mesmo arranjo. A preparação desses eletrodos de base simples e acessíveis revelou-se como uma estratégia de alta versatilidade. Após uma rápida etapa de tratamento eletroquímico em solução alcalina, observou-se uma melhora significativa no desempenho eletroquímico do sensor, equiparando-se a outros eletrodos impressos comercialmente disponíveis. Esses eletrodos foram empregados na determinação de ácido ascórbico (AA) glicose (GLI) e carbendazim (CBZ) em amostras de suco de laranja. Utilizando o eletrodo impresso convencional (sem modificações), foi possível realizar a determinação direta do AA utilizando a voltametria cíclica (CV), obtendo figuras de mérito analítico comparáveis ou até superiores aos trabalhos relatados na literatura. O biossensor amperométrico para a GLI demonstrou ser uma plataforma viável para ancorar o filme de azul da Prússia eletrodepositado em sua superfície, atuando como mediador redox na oxidação química do analito. Foi observado um bom desempenho analítico em comparação com outros estudos relatados. Além disso, a tinta *labmade* proposta neste trabalho mostrou-se receptiva à incorporação de modificadores, como a incorporação de um hidróxido lamelar duplo (dHDL) em uma proporção de 10% (m/m), exibindo alta sensibilidade e baixo LOD. Empregando diferentes diluições da amostra de suco foi observado efeito de matriz para todos os eletrodos de trabalho avaliados, porém com boa resposta linear em todos os casos. Utilizando uma diluição comum de 250 vezes, alcançou-se valores de recuperações entre 98 e 105 % para todos os alvos, o que pode ser considerado adequado para a aplicação do dispositivo multiplex em amostras de suco de laranja. O controlador analógico desenvolvido para direcionar o eletrodo de trabalho para a medida mostrou-se uma abordagem interessante para determinações sequenciais sem grande manipulação do sistema eletroquímico. Também permite o uso simultâneo dos eletrodos de trabalho controlando os três ao mesmo tempo, possibilitando que eles sejam submetidos, se necessário, a um processo de ativação eletroquímica ao mesmo tempo. Com relação a plataforma, outras estratégias de construção/modificação dos eletrodos poderão ser investigadas para outros alvos de interesse ambiental, farmacêutico e de diagnóstico clínico, por exemplo. Para tornar as medidas mais

abrangentes e rápidas, outras disposições com mais eletrodos de trabalho poderão ser investigadas e acopladas a potenciostatos multicanais para medidas simultâneas. Esses resultados destacam a viabilidade e a eficácia dos eletrodos impressos desenvolvidos, assim como a versatilidade do dispositivo eletroquímico proposto para diversas aplicações analíticas futuras.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAGNUSSON, B. In *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*; Eurachem: 2014.
2. DOS SANTOS, S. M. V.; OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, M. C.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JR, L. H. Eletrodos impressos construídos por serigrafia utilizando negro de fumo como material condutor. **Revista virtual de química**, v.9, n.2. 2017.
3. ADAM, H.; GOPINATH, S. C.; ARSHAD, M. M.; ADAM, T.; HASHIM, U.; SAULI, Z.; FAKHRI, M. A.; SUBRAMANIAM, S.; CHEN, Y.; SASIDHARAN, S. Integration of microfluidic channel on electrochemical-based nanobiosensors for monoplex and multiplex analyses: An overview. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.146, p.104814. 2023.
4. DEVADHASAN, J. P.; KIM, J. A chemically functionalized paper-based microfluidic platform for multiplex heavy metal detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.273, p.18. 2018.
5. JAYARAMAN, N.; PALANI, Y.; JONNALAGADDA, R. R.; SHANMUGAM, E. Covalently dual functionalized graphene oxide-based multiplex electrochemical sensor for Hg (II) and Cr (VI) detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.367, p.132165. 2022.
6. LIANG, Q.; XIAO, W.; ZHANG, C.; ZHU, D.; WANG, S.-L.; TIAN, S.-Y.; LONG, T.; YUE, E.-L.; WANG, J.-J.; HOU, X.-Y. MOFs-based Fe@ YAU-101/GCE electrochemical sensor platform for highly selective detecting trace multiplex heavy metal ions. **Talanta**, v.259, p.124491. 2023.
7. DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. **Analytical chemistry**, v.81, n.14, p.5821. 2009.
8. DE MATOS MORAWSKI, F.; MARTINS, G.; RAMOS, M. K.; ZARBIN, A. J.; BLANES, L.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. A versatile 3D printed multi-electrode cell for determination of three COVID-19 biomarkers. **Analytica Chimica Acta**, v.1258, p.341169. 2023.
9. WANG, G.; SUN, J.; LI, B.; GUAN, F.; HUANG, J.; DONG, H.; ZHANG, J.; HAN, J.; SHEN, Z.; XU, D. Multiplex strategy electrochemical platform based on self-assembly dual-site DNA tetrahedral scaffold for one-step detection of diazinon and profenofos. **Science of The Total Environment**, v.868, p.161692. 2023.
10. POUDYAL, D. C.; DHAMU, V. N.; SAMSON, M.; MUTHUKUMAR, S.; PRASAD, S. Pesticide analytical screening system (PASS): A novel electrochemical system for multiplex screening of glyphosate and chlorpyrifos in high-fat and low-fat food matrices. **Food Chemistry**, v.400, p.134075. 2023.

11. SHEN, Z.; HE, L.; CAO, Y.; HONG, F.; ZHANG, K.; HU, F.; LIN, J.; WU, D.; GAN, N. Multiplexed electrochemical aptasensor for antibiotics detection using metallic-encoded apoferritin probes and double stirring bars-assisted target recycling for signal amplification. **Talanta**, v.197, p.491. 2019.
12. HAN, Z.; TANG, Z.; JIANG, K.; HUANG, Q.; MENG, J.; NIE, D.; ZHAO, Z. Dual-target electrochemical aptasensor based on co-reduced molybdenum disulfide and Au NPs (rMoS₂-Au) for multiplex detection of mycotoxins. **Biosensors and Bioelectronics**, v.150, p.111894. 2020.
13. ZHANG, X.; FAN, X.; SONG, R.; GAO, Y.; SONG, W. A smartphone-controlled portable multiplexed photoelectrochemical sensor based on dual UV intelligent response system-assisted signal resolution strategy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, p.135281. 2024.
14. GRABOWSKA, I.; HEPEL, M.; KURZĄTKOWSKA-ADASZYŃSKA, K. Advances in design strategies of multiplex electrochemical aptasensors. **Sensors**, v.22, n.1, p.161. 2021.
15. TSAI, S.-M.; GOSHIA, T.; CHEN, Y.-C.; KAGIRI, A.; SIBAL, A.; CHIU, M.-H.; GADRE, A.; TUNG, V.; CHIN, W.-C. High-throughput label-free microcontact printing graphene-based biosensor for valley fever. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v.170, p.219. 2018.
16. MAN, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, Y.; GUO, P. Patterned growth of vertically aligned carbon nanotube arrays using colloidal lithography and plasma enhanced chemical vapor deposition. **Journal of Alloys Compounds**, v.650, p.86. 2015.
17. CINTI, S.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; GONZALEZ-MACIA, L.; KILLARD, A. J. Cholesterol biosensor based on inkjet-printed Prussian blue nanoparticle-modified screen-printed electrodes. **Sensors Actuators B: Chemical**, v.221, p.187. 2015.
18. BAI, Y.; GUO, Q.; XIAO, J.; ZHENG, M.; ZHANG, D.; YANG, J. An inkjet-printed smartphone-supported electrochemical biosensor system for reagentless point-of-care analyte detection. **Sensors Actuators B: Chemical**, v.346, p.130447. 2021.
19. FAVA, E. L.; DO PRADO, T. M.; GARCIA-FILHO, A.; SILVA, T. A.; CINCOTTO, F. H.; DE MORAES, F. C.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Non-enzymatic electrochemical determination of creatinine using a novel screen-printed microcell. **Talanta**, v.207, p.120277. 2020.
20. DE OLIVEIRA, T. R.; FONSECA, W. T.; DE OLIVEIRA SETTI, G.; FARIA, R. C. Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using

a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes. **Talanta**, v.195, p.480. 2019.

21. SMIRNOFF, N.; WHEELER, G. L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Critical reviews in plant sciences**, v.19, n.4, p.267. 2000.

22. ROSA, J. S. D.; GODOY, R. L. D. O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. D. S.; MATTA, V. M. D.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S. D.; SOUZA, R. S. D. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Food Science and Technology**, v.27, p.837. 2007.

23. CUQ, J.; JAUSSAN, V. Caffeic acid oxidation and antibacterial effects. **Sciences des Aliments (France)**. 1991.

24. GAZDIK, Z.; KRSKA, B.; ADAM, V.; SALOUN, J.; POKORNA, T.; REZNICEK, V.; HORNA, A.; KIZEK, R. Electrochemical determination of the antioxidant potential of some less common fruit species. **Sensors**, v.8, n.12, p.7564. 2008.

25. WIESE, M.; PLOTKE, B.; GUPTA, P.; MIRSCH, D. A 2-year-old with Scurvy: A Modern case of a historical disease. **Visual Journal of Emergency Medicine**, v.25, p.101122. 2021.

26. ANVISA. **Resolução-RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0269_22_09_2005.html. Acesso: 28/01/2023

27. VANDERJAGT, D. J.; GARRY, P. J.; BHAGAVAN, H. N. Ascorbic acid intake and plasma levels in healthy elderly people. **The American journal of clinical nutrition**, v.46, n.2, p.290. 1987.

28. HAGEL, A. F.; ALBRECHT, H.; DAUTH, W.; HAGEL, W.; VITALI, F.; GANZLEBEN, I.; SCHULTIS, H. W.; KONTUREK, P. C.; STEIN, J.; NEURATH, M. F. Plasma concentrations of ascorbic acid in a cross section of the German population. **Journal of International Medical Research**, v.46, n.1, p.168. 2018.

29. MELLO, L. P. **Detalhamento Exame VITAC - Vitamina C**. Disponível em: <https://laboratoriopalmamello.com.br/exame/vitamina-c/>. Acesso: 18/07/23

30. BEHRING, L. **Ácido Ascórbico**. Disponível em: <https://www.laboratoriobehring.com.br/pdfs/?id=233>. Acesso: 18/07/2023

31. HABIB, A.; MABROUK, M. M.; FEKRY, M.; MANSOUR, F. R. Glycerol as a new mobile phase modifier for green liquid chromatographic determination of ascorbic acid and glutathione in pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.219, p.114870. 2022.

32. KHAJEHSHARIFI, H.; POURBASHEER, E.; TAVALLALI, H.; SARVI, S.; SADEGHI, M. The comparison of partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid in real samples. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, p.S3451. 2017.
33. MU, C.; LU, H.; BAO, J.; ZHANG, Q. Visual colorimetric ‘turn-off’ biosensor for ascorbic acid detection based on hypochlorite–3, 3', 5, 5',-Tetramethylbenzidine system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.201, p.61. 2018.
34. GUAN-TING, X.; TIAN-SHENG, Z.; ZHANG, K.; LI-ZHEN, G.; YONG-QIN, H.; JIAN-HUA, H.; YI-JING, L.; XI, M.; NA, L. Smartphone assisted fluorescent sensor for Fe³⁺ and ascorbic acid determination based on off-on carbon dots probe. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.51, n.1, p.100206. 2023.
35. LIU, Y.; WEI, Z.; DUAN, W.; REN, C.; WU, J.; LIU, D.; CHEN, H. A dual-mode sensor for colorimetric and “turn-on” fluorescent detection of ascorbic acid. **Dyes and Pigments**, v.149, p.491. 2018.
36. OLIVEIRA, R. G. D.; GODOY, H. T.; PRADO, M. A. Otimização de metodologia colorimétrica para a determinação de ácido ascórbico em geleias de frutas. **Food Science and Technology**, v.30, p.244. 2010.
37. SHENDURSE, A.; KHEDKAR, C. Glucose: properties and analysis. **Encyclopedia of food and health**, v.3, p.239. 2016.
38. WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **Clinical biochemist reviews**, v.26, n.2, p.19. 2005.
39. GELONEZE, B.; LAMOUNIER, R. N.; COELHO, O. R. Hiperglicemia pós-prandial: tratamento do seu potencial aterogênico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87, p.660. 2006.
40. FEDERATION, I. D. Five questions on the IDF Diabetes Atlas. **Diabetes research and clinical practice**, v.102, n.2, p.147. 2013.
41. KALINKE, C.; WOSGRAU, V.; OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, G. A.; MARTINS, G.; MANGRICH, A. S.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Green method for glucose determination using microfluidic device with a non-enzymatic sensor based on nickel oxyhydroxide supported at activated biochar. **Talanta**, v.200, p.518. 2019.
42. CHEN, J.; ZHU, X.; JU, Y.; MA, B.; ZHAO, C.; LIU, H. Electrocatalytic oxidation of glucose on bronze for monitoring of saliva glucose using a smart toothbrush. **Sensors and Actuators B: Chemical**

v.285, p.56. 2019.

43. PARRILLA, M.; DETAMORNRAT, U.; DOMÍNGUEZ-ROBLES, J.; DONNELLY, R. F.; DE Wael, K. Wearable hollow microneedle sensing patches for the transdermal electrochemical monitoring of glucose. **Talanta**, v.249, p.123695. 2022.
44. KONG, T.; CHEN, Y.; YE, Y.; ZHANG, K.; WANG, Z.; WANG, X. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.138, n.1, p.344. 2009.
45. FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. Biossensores. **Química Nova**, v.15, n.1, p.28. 1992.
46. KAFI, A.; ALIM, S.; JOSE, R.; YUSOFF, M. M. Fabrication of a glucose oxidase/multiporous tin-oxide nanofiber film on Prussian blue–modified gold electrode for biosensing. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.852, p.113550. 2019.
47. LEE, S. H.; CHUNG, J.-H.; PARK, H.-K.; LEE, G.-J. A simple and facile glucose biosensor based on prussian blue modified graphite string. **Journal of Sensors**, v.2016. 2016.
48. YAN, L.; MIAO, K.; MA, P.; MA, X.; BI, R.; CHEN, F. A feasible electrochemical biosensor for determination of glucose based on Prussian blue–Enzyme aggregates cascade catalytic system. **Bioelectrochemistry**, v.141, p.107838. 2021.
49. KOMKOVA, M. A.; KARYAKINA, E. E.; KARYAKIN, A. A. Catalytically synthesized prussian blue nanoparticles defeating natural enzyme peroxidase. **Journal of the American Chemical Society**, v.140, n.36, p.11302. 2018.
50. JIA, Z. Synthesis of Prussian Blue nanocrystals with metal complexes as precursors: Quantitative calculations of species distribution and its effects on particles size. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.389, n.1-3, p.144. 2011.
51. GIMENES, D. T.; NOSSOL, E. Effect of light source and applied potential in the electrochemical synthesis of Prussian blue on carbon nanotubes. **Electrochimica Acta**, v.251, p.513. 2017.
52. TOYODA, Y.; KATOH, N.; KUWABARA, K. Dependence of redox characteristics in Prussian blue-modified electrode on pH of electrolytic solution. **Materials Science and Engineering: B**, v.108, n.3, p.271. 2004.
53. RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v.21, n.3, p.389. 2005.

54. COUTINHO, C. F.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. Carbendazim e o meio ambiente: degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.16. 2006.
55. IBGE. **Produção Agrícola - Lavoura Permanente**. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/pesquisa/15/0?tipo=ranking&indicador=11968>. Acesso: 13/02/2023
56. SILVA, R. C.; BARROS, K. A.; PAVÃO, A. C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Química Nova**, v.37, p.1329. 2014.
57. PARA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2016.
58. PAPI, M. A. P. Desenvolvimento de eletrodos compósitos modificados com a resina de troca catiônica (amberlite IR120) para determinação não-enzimática da glicose e do pesticida carbendazim. . **Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná**. . 2018.
59. ANVISA. **DESPACHO Nº 60, DE 21 DE JUNHO DE 2022**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/despacho-n-60-de-21-de-junho-de-2022-409393414>. Acesso: 13/02/2023
60. ANVISA. **Nota Técnica Conclusiva de Reavaliação do Carbendazim**. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/copy_of_NotaTcnicaFinaldeReavaliadoCarbendazimcomseusAnexos.pdf. Acesso: 14/02/2023
61. SCHEEL, G. L.; TARLEY, C. R. T. Simultaneous microextraction of carbendazim, fipronil and picoxystrobin in naturally and artificial occurring water bodies by water-induced supramolecular solvent and determination by HPLC-DAD. **Journal of Molecular Liquids**, v.297, p.111897. 2020.
62. WANG, L.; HARUNA, S. A.; AHMAD, W.; WU, J.; CHEN, Q.; OUYANG, Q. Tunable multiplexed fluorescence biosensing platform for simultaneous and selective detection of paraquat and carbendazim pesticides. **Food Chemistry**, v.388, p.132950. 2022.
63. SUBHANI, Q.; HUANG, Z.; ZHU, Z.; ZHU, Y. Simultaneous determination of imidacloprid and carbendazim in water samples by ion chromatography with fluorescence detector and post-column photochemical reactor. **Talanta**, v.116, p.127. 2013.
64. POURREZA, N.; RASTEGARZADEH, S.; LARKI, A. Determination of fungicide carbendazim in water and soil samples using dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume UV-vis spectrophotometry. **Talanta**, v.134, p.24. 2015.

65. TAMILALAGAN, E.; AKILARASAN, M.; CHEN, S.-M.; MAHESHWARAN, S.; HUANG, Y.-F. Rationally designed urchin-like structured cobalt diselenide (o-CoSe₂) for the sensitive voltammetric detection of carbendazim fungicide in vegetables and water samples. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.653, p.129941. 2022.
66. SILVA, L. R. G.; STEFANO, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; JANEGITZ, B. C. 3D electrochemical device obtained by additive manufacturing for sequential determination of paraquat and carbendazim in food samples. **Food Chemistry**, v.406, p.135038. 2023.
67. YOLA, M. L. Carbendazim imprinted electrochemical sensor based on CdMoO₄/g-C₃N₄ nanocomposite: Application to fruit juice samples. **Chemosphere**, v.301, p.134766. 2022.
68. KILLEDAR, L.; ILAGER, D.; MALODE, S. J.; SHETTI, N. P. Fast and facile electrochemical detection and determination of fungicide carbendazim at titanium dioxide designed carbon-based sensor. **Materials Chemistry and Physics**, v.285, p.126131. 2022.
69. SOUZA, M. D. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química nova**, v.20, p.191. 1997.
70. KOVANDA, F.; JINDOVÁ, E.; LANG, K.; KUBÁT, P.; SEDLÁKOVÁ, Z. Preparation of layered double hydroxides intercalated with organic anions and their application in LDH/poly (butyl methacrylate) nanocomposites. **Applied clay science**, v.48, n.1-2, p.260. 2010.
71. LEGROURI, A.; LAKRAIMI, M.; BARROUG, A.; DE ROY, A.; BESSE, J. Removal of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetate from water to zinc–aluminium–chloride layered double hydroxides. **Water Research**, v.39, n.15, p.3441. 2005.
72. SOTILES, A. R. Síntese e caracterização de novos hidróxidos duplos lamelares trocadores catiônicos e/ou aniônicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2021.
73. GOH, K.-H.; LIM, T.-T.; DONG, Z. Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: a review. **Water research**, v.42, n.6-7, p.1343. 2008.
74. SOHRABI, H.; DEZHAKAM, E.; KHATAEE, A.; NOZOHOURI, E.; MAJIDI, M. R.; MOHSENI, N.; TROFIMOV, E.; YOON, Y. Recent trends in layered double hydroxides based electrochemical and optical (bio) sensors for screening of emerging pharmaceutical compounds. **Environmental Research**, v.211, p.113068. 2022.
75. SHAMSAYEI, M.; YAMINI, Y.; ASIABI, H.; KHATAEI, M. M. Electrodeposition of layered double hydroxide intercalated with 2, 3-dimercaptopropane sulfonate on carbon

cloth and application for effective uptake of heavy metals. **Applied Clay Science**, v.196, p.105747. 2020.

76. TCHEUMI, H. L.; KAMENI WENDJI, A. P.; TONLE, I. K.; NGAMENI, E. A low-cost layered double hydroxide (LDH) based amperometric sensor for the detection of isoproturon in water using carbon paste modified electrode. **Journal of analytical methods in chemistry**, v.2020. 2020.

77. TAKÁCS, D.; VARGA, G.; CSAPÓ, E.; JAMNIK, A.; TOMŠIČ, M.; SZILÁGYI, I. Delamination of Layered Double Hydroxide in Ionic Liquids under Ambient Conditions. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v.13, n.51, p.11850. 2022.

78. FOGG, A. M.; WILLIAMS, G. R.; CHESTER, R.; O'HARE, D. A novel family of layered double hydroxides—[MAI 4 (OH) 12](NO 3) 2 · x H 2 O (M= Co, Ni, Cu, Zn). **Journal of Materials Chemistry**, v.14, n.15, p.2369. 2004.

79. PEREZ-BARRADO, E.; SALAGRE, P.; MARSAL, L. F.; AGUILO, M.; CESTEROS, Y.; DIAZ, F.; PALLARES, J.; CUCINOTTA, F.; MARCHESE, L.; PUJOL, M. C. Ultrasound-assisted reconstruction and delamination studies on CaAl layered double hydroxides. **Applied Clay Science**, v.118, p.116. 2015.

80. GEVAERD, A.; WATANABE, E. Y.; JANEGITZ, B. C.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Simple Melatonin Determination Using Disposable and Low-Cost Lab-Made Screen-Printed Carbon Electrode. **Journal of The Electrochemical Society**, v.169, n.3, p.037503. 2022.

81. LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Flow injection analysis of blood L-lactate by using a Prussian Blue-based biosensor as amperometric detector. **Analytical biochemistry**, v.365, n.2, p.260. 2007.

82. RICCI, F.; AMINE, A.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, n.2-3, p.165. 2003.

83. PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; DE ALMEIDA, V. G.; RITTA, A. G. S.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.4, p.516. 2013.

84. ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. **Revista Chemkeys**, n.3, p.1. 2003.

85. STEFANO, J. S. Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para a determinação de ciprofloxacina. **Dissertação de Mestrado**. Disponível em: <https://repositorio-dev.ufu.br/handle/123456789/17449>. Acesso: 11/07/2023

86. MOLDENHAUER, J.; MEIER, M.; PAUL, D. W. Rapid and direct determination of diffusion coefficients using microelectrode arrays. **Journal of The Electrochemical Society**, v.163, n.8, p.H672. 2016.
87. RAO, S. R.; LEJA, J. **Surface chemistry of froth flotation: reagents and mechanisms**. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004. p.
88. DA SILVA, V. A.; TARTARE, V. A.; KALINKE, C.; OLIVEIRA, P. R. D.; SOUZA, D. C. D.; BONACIN, J. A.; JANEGITZ, B. C. Construção de um suporte ajustável lab-made impresso em 3D para medição de ângulo de contato. **Química Nova**, v.43, p.1312. 2020.
89. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; CARACELLI, I. **Princípios de análise instrumental**. 2002. p.
90. LI, H.; ZHOU, Y.; DU, J. Ascorbic acid as an alternative coreactant for luminol reaction and sensitive chemiluminescence determination of ascorbic acid in soft drinks. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**, v.429, p.113945. 2022.
91. SHEN, Y.; ZHENG, L. Polyaniline-poly (methylene blue) nano-rod composites as an electrochemical sensor for sensitive determination of ascorbic acid. **International Journal of Electrochemical Science**, v.18, n.1, p.6. 2023.
92. HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. Bookman. 2009. p.
93. BUFFON, E.; STRADIOTTO, N. R. Disposable three-dimensional graphene oxide electrode with sandwich-like architecture for the determination of ascorbic acid in fruit juices. **Materials Today Communications**, v.35, p.105535. 2023.
94. GOPALAKRISHNAN, A.; SHA, R.; VISHNU, N.; KUMAR, R.; BADHULIKA, S. Disposable, efficient and highly selective electrochemical sensor based on Cadmium oxide nanoparticles decorated screen-printed carbon electrode for ascorbic acid determination in fruit juices. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v.16, p.96. 2018.
95. QIN, Q.; BAI, X.; HUA, Z. Electropolymerization of a conductive β -cyclodextrin polymer on reduced graphene oxide modified screen-printed electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.782, p.50. 2016.
96. LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Flow injection analysis of blood L-lactate by using a Prussian Blue-based biosensor as amperometric detector. **Analytical biochemistry**, v.365, n.2, p.260. 2007.

97. KARYAKIN, A. A. Prussian blue and its analogues: electrochemistry and analytical applications. **Electroanalysis**, v.13, n.10, p.813. 2001.
98. LUNDGREN, C.; MURRAY, R. W. Observations on the composition of Prussian blue films and their electrochemistry. **Inorganic Chemistry**, v.27, n.5, p.933. 1988.
99. LOWINSOHN, D. **Desenvolvimento de um sensor para análise de lactato em amostras alimentares e biológicas**. Universidade de São Paulo, 2007. p.
100. VITTAL, R.; GOMATHI, H. Beneficial effects of cetyltrimethylammonium bromide in the modification of electrodes with cobalt hexacyanoferrate surface films. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.106, n.39, p.10135. 2002.
101. KUMAR, S. S.; PILLAI, K. C. Compositional changes in unusually stabilized Prussian blue by CTAB surfactant: Application to electrocatalytic reduction of H₂O₂. **Electrochemistry Communications**, v.8, n.4, p.621. 2006.
102. BHATTI, H.; MADEEHA, M.; ASGHER, M.; BATOOL, N. Purification and thermodynamic characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger*. **Canadian journal of microbiology**, v.52, n.6, p.519. 2006.
103. FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, v.43, p.463. 2020.
104. MARTINS, G.
Construção e Avaliação de Imunossensores Eletroquímicos em
Plataformas Descartáveis Visando Diagnóstico e Triagem de
Hantavírus Araucária e SARS-CoV-2. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná. 2022.
105. SEKAR, N. C.; SHAEGH, S. A. M.; NG, S. H.; GE, L.; TAN, S. N. A paper-based amperometric glucose biosensor developed with Prussian Blue-modified screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.204, p.414. 2014.
106. KONG, F.-Y.; GU, S.-X.; LI, W.-W.; CHEN, T.-T.; XU, Q.; WANG, W. A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v.56, p.77. 2014.
107. KHUMNGERN, S.; JIRAKUNAKORN, R.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P.; NUMNUAM, A. A highly sensitive flow injection amperometric glucose biosensor using a gold nanoparticles/polytyramine/Prussian blue modified screen-printed carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v.138, p.107718. 2021.

108. GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. Instrumental Methods in Electrochemistry, Ellis Horwood Limited. 1985.
109. PERIYASAMY, S.; VINOTH KUMAR, J.; CHEN, S.-M.; ANNAMALAI, Y.; KARTHIK, R.; ERUMAIPATTY RAJAGOUNDER, N. Structural insights on 2D gadolinium tungstate nanoflake: a promising electrocatalyst for sensor and photocatalyst for the degradation of postharvest fungicide (carbendazim). **ACS applied materials & interfaces**, v.11, n.40, p.37172. 2019.
110. CHO, S.; HONG, S. C.; KIM, S. Quantum dot-layered double hydroxide composites for near-infrared emitting codes. **Journal of Materials Chemistry C**, v.2, n.3, p.450. 2014.
111. MARTINS, T. S.; MACHADO, S. A.; OLIVEIRA JR, O. N.; BOTT-NETO, J. L. Optimized paper-based electrochemical sensors treated in acidic media to detect carbendazim on the skin of apple and cabbage. **Food Chemistry**, v.410, p.135429. 2023.
112. SUNDARESAN, P.; FU, C.-C.; LIU, S.-H.; JUANG, R.-S. Facile synthesis of chitosan-carbon nanofiber composite supported copper nanoparticles for electrochemical sensing of carbendazim. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.625, p.126934. 2021.
113. NOYROD, P.; CHAILAPAKUL, O.; WONGSAWAT, W.; CHUANUWATANAKUL, S. The simultaneous determination of isoproturon and carbendazim pesticides by single drop analysis using a graphene-based electrochemical sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.719, p.54. 2014.