



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)  
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

DANIELLY SANTOS ROCHA

**Desenvolvimento de sensores  
eletroquímicos/colorimétricos e metodologias analíticas  
automatizadas em plataforma de microfluídica digital para  
aplicações em química bioanalítica**

GOIÂNIA - GO  
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

#### 2. Nome completo do autor

Danielly Santos Rocha

#### 3. Título do trabalho

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos/colorimétricos e metodologias analíticas automatizadas em plataforma de microfluídica digital para aplicações em química bioanalítica

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 26/02/2025, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Danielly Santos Rocha, Discente**, em 27/02/2025, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5197174** e o código CRC **330DCA6E**.

---

DANIELLY SANTOS ROCHA

**Desenvolvimento de sensores  
eletroquímicos/colorimétricos e metodologias analíticas  
automatizadas em plataforma de microfluídica digital para  
aplicações em química bioanalítica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química

Orientador: Professor Doutor Wendell Karlos Tomazelli Coltro

GOIÂNIA - GO  
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rocha, Danielly Santos

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos/colorimétricos e metodologias analíticas automatizadas em plataforma de microfluídica digital para aplicações em química bioanalítica [manuscrito] / Danielly Santos Rocha. - 2025.

xxiii, 235 f.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2025.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Plataformas analíticas portáteis. 2. Sensores químicos. 3. Detecção colorimétrica. 4. Detecção eletroquímica. 5. Química analítica verde. I. Coltro, Wendell Karlos Tomazelli, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 196 da sessão de Defesa de Tese de **Danielly Santos Rocha** que confere o título de **Doutora em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e cinco**, a partir das **13h30**, por **Videoconferência**, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada *“Desenvolvimento de sensores eletroquímicos/colorimétricos e metodologias analíticas automatizadas em plataforma de microfluídica digital para aplicações em química bioanalítica”*. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Wendell Karlos Tomazelli Coltro (IQ – UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Cecília de Carvalho Castro e Silva (Universidade Presbiteriana Mackenzie)**; Professora Doutora **Elen Julciléia Romão Sartori (UEL)**; Professor Doutor **Murilo Santhiago (CNPEM)**, Professor Doutor **Wallans Torres Pio dos Santos (UFVJM)**. Durante a arguição, os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Wendell Karlos Tomazelli Coltro**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e cinco**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Professor do Magistério Superior**, em 27/06/2025, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murilo Santhiago, Usuário Externo**, em 27/06/2025, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wallans Torres Pio dos Santos, Usuário Externo**, em 28/06/2025, às 07:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cecilia de Carvalho Castro e Silva, Usuário Externo**, em 30/06/2025, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ELEN JULCILEIA ROMAO SARTORI**, Usuário **Externo**, em 03/07/2025, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5467214** e o código CRC **E1623A56**.

---

**Referência:** Processo nº 23070.005176/2025-96

SEI nº 5467214

Aos meus pais, Roldão e Sônia, por serem meu suporte desde o primeiro dia da minha vida. À minha irmã Elysama, pelo inestimável apoio. Ao meu parceiro de vida, Habdias, por sempre acreditar em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por fazer infinitamente mais do que pedimos ou pensamos, pelo dom da vida e por me conceder resiliência para vencer cada etapa nessa jornada. Apesar dos momentos difíceis, frequentemente, sinto-me no melhor trabalho do mundo! Eu não poderia ter escolhido uma carreira profissional que aquecesse mais o meu coração.

Ao meu pai, Roldão, e à minha mãe, Sônia, que nunca mediram esforços para que suas filhas pudessem ser as primeiras da família a cursar o ensino superior e, buscar uma vida melhor através da educação. À minha irmã Elysama, por ser a melhor e mais gentil irmã do mundo. Agradeço aos três por todo amor incondicional, apoio e orações. Vocês são meus maiores referenciais de honestidade, persistência, companheirismo e fé. É por vocês essa conquista e, se cheguei até aqui, é porque vocês estão ao meu lado em cada passo desse processo. Devo-lhes tudo! Obrigada por me ensinarem a trabalhar duro para realizar meus sonhos com o coração grato e esperançoso de que lindas coisas estão sempre por vir. Eu amo vocês!

Ao meu parceiro de vida, Habdias, por ser o melhor noivo, amigo, incentivador e colega de laboratório que eu poderia ter encontrado nessa linda caminhada. Você é o meu Químico preferido, melhor coautor e uma inspiração para mim! Seu suporte foi fundamental para que eu conseguisse vencer todos os obstáculos com persistência e a cabeça erguida. Obrigada por tudo! Sobretudo, por me escutar, oferecer seus sábios conselhos, por tornar minha vida mais leve e repleta de alegria. Eu amo cada átomo seu!

Ao meu orientador Wendell, esse cientista e professor tão notável, pela oportunidade de ingressar em seu laboratório, ter me orientado desde a iniciação científica e por todas as conquistas acadêmicas que alcancei por intermédio do seu suporte. Obrigada por acreditar em minhas ideias, pela

liberdade que nos fornece para trabalhar e por depositar parte do seu tempo para ensinar esta cientista em formação. Acredito que, nos últimos anos, passei mais tempo no laboratório do que em casa. Serei sempre grata por todas as oportunidades a mim oferecidas durante esses quase nove anos de acolhimento e supervisão. Certamente, sua orientação contribuiu consideravelmente para o meu crescimento profissional e me guiou para os caminhos acadêmicos que tenho trilhado hoje. Tenho muito orgulho de ser time GME e irei sempre lembrar desse período com gratidão.

Aos membros do Laboratório de Microfluídica e Eletroforese. Em especial, aos meus amigos Habledias, Leyllanne, Hellen, Laísa, Maurício, Dioara, Daniel, Kariolanda, Rafael, Joyce, Jamilson e Genildo pelos momentos de descontração, trocas científicas e boas risadas. Vocês tornaram essa jornada mais leve e, tenho certeza de que o laboratório está em excelentes mãos para dar continuidade ao brilhante legado do grupo. Vocês são extraordinários, e me orgulho imensamente em saber que, cada um de vocês, é excepcional de maneira ímpar.

Aos parceiros de trabalhos, pelas colaborações. Em especial, Thaísa, Shellyda, Jordana, Lucas e Gerson por toda ajuda.

Aos colegas e membros do *Wheeler Microfluidics Laboratory*. Em especial, Sathish, Gilberto, Nguyen, Dylan, Leticia, Phrya e Alex por todos os ensinamentos, suporte, acolhimento e amizade.

Aos meus amigos e colegas da Universidade de São Paulo (USP), Lauro, Bruno, Gilberto, Davi, Vanessa, Débora, Ariel e demais colegas por terem me recebido tão bem durante o estágio na USP.

Aos colegas do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) por todo suporte e auxílio nas pesquisas científicas aí desenvolvidas. Em especial, Maria Helena, Gabriel, Makoto e Ângelo.

Ao professor Aaron Wheeler por ter me recebido e me orientado gentilmente na *University of Toronto* (UofT) por intermédio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Literalmente, realizei o sonho da Dani de 10 anos atrás.

Ao professor Thiago Paixão por prontamente ter me recebido em seu laboratório na Universidade de São Paulo para fazer estágio.

Às professoras Lusmaia e Livia, parceiras essenciais neste projeto, juntamente com a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), o Laboratório de Análises Clínicas e Ensino em Saúde (LACES) e a Petrobras, pelo generoso fornecimento de amostras clínicas e petroquímicas.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e por terem despendido seu precioso tempo auxiliando-me na correção da tese. Certamente, suas contribuições e sugestões para o aprimoramento deste trabalho serão incorporadas à versão final.

À empresa Petróleo Brasileiro S.A. (processo 2018/00676-8) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (88881.933937/2024-01; 88887.935054/2024-00) pelas bolsas de estudo concedidas durante parte do meu doutorado. Ao CNPq (processos 405620/2021-7 e 442598/2023-8) e à FAPPEG (processo 202310267000258) pelo suporte financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

*“I... a universe of atoms, an atom in  
the universe.”*

— Richard P. Feynman

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 - Introdução geral</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. Sensores eletroquímicos .....	3
1.1.1.1. Técnicas de fabricação .....	4
1.1.1.2. Desenvolvimento de tintas condutoras .....	5
1.1.1.3. Técnicas voltamétricas .....	8
1.1.1.3.1. Voltametria cíclica .....	8
1.1.1.3.2. Voltametria de pulso diferencial.....	10
1.1.1.3.3. Voltametria de onda quadrada .....	11
1.1.1.4. Amperometria .....	12
1.1.2. Sensores colorimétricos .....	13
1.1.2.1. Impressão 3D .....	15
1.1.2.2. Desenvolvimento de plataformas analíticas.....	16
1.1.2.3. Detecção colorimétrica .....	17
1.1.3. Microfluídica digital.....	18
1.1.3.1. Fabricação e montagem dos chips microfluídicos digitais .....	21
1.1.3.2. Preparo de amostras .....	24
1.1.3.3. Métodos de detecção.....	25
1.1.4. Aplicações de sistemas analíticos portáteis .....	26
1.1.4.1. Diagnóstico clínico .....	27
1.1.4.2. Controle de qualidade de produtos farmacêuticos e suplementos .....	28
1.1.4.3. Indústria petroquímica .....	29
<b>Capítulo 2 - Imunossensor eletroquímico descartável e ecológico para detecção rápida de SARS-CoV-2</b> .....	<b>32</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1. Introdução</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2. Objetivos</b> .....	<b>37</b>
2.2.1. Objetivo geral .....	37

2.2.2. Objetivos específicos.....	37
<b>2.3. procedimento experimental .....</b>	<b>37</b>
2.3.1. Materiais e reagentes .....	37
2.3.2. Instrumentação.....	38
2.3.3. Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina .	38
2.3.4. Preparação do dispositivo eletroquímico e AuNPs.....	38
2.3.5. Preparação do imunossensor.....	40
2.3.6. Caracterizações .....	41
2.3.7. Medidas eletroquímicas.....	43
2.3.8. Preparo de amostras, análises de RT-qPCR e medidas eletroquímicas .....	43
<b>2.4. Resultados e discussão .....</b>	<b>44</b>
2.4.1. Caracterização de dispositivo eletroquímico ecológico .....	44
2.4.2. Síntese de AuNPs-Cys e fabricação do imunossensor .....	47
2.4.3. Desempenho de biossensor.....	53
<b>Capítulo 3 - Detecção aprimorada de cloreto usando eletrodo de grafite/negro de fumo impresso em estêncil modificado com nanopartículas de prata para diagnóstico de fibrose cística.....</b>	<b>63</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1. Introdução .....</b>	<b>65</b>
3.3.1. Laca chinesa .....	65
3.3.2. Dispositivos eletroquímicos .....	66
3.3.3. Fibrose cística .....	66
<b>3.2. Objetivos.....</b>	<b>70</b>
3.2.1. Objetivo geral .....	70
3.2.2. Objetivos específicos.....	70
<b>3.3. procedimento experimental .....</b>	<b>70</b>
3.3.1. Materiais e reagentes .....	70
3.3.2. Instrumentação.....	71
3.3.3. Fabricação de eletrodos através da técnica de impressão em estêncil .....	71

3.3.4. Eletrodeposição de AgNPs .....	73
3.3.5. Caracterizações eletroquímicas e morfológicas .....	73
3.3.6. Medidas eletroquímicas usando VPD .....	74
3.3.7. Preparo de amostras e análise eletroquímica de Cl <sup>-</sup> no suor.....	74
3.3.8. Análise de amostras reais e teste de referência .....	75
<b>3.4. Resultados e discussão .....</b>	<b>75</b>
3.4.1. Fabricação de eletrodos impressos em estêncil e caracterizações	75
3.4.2. Caracterizações .....	86
3.4.3. Otimizações eletroquímicas .....	91
3.4.4. Desempenho analítico .....	94
3.4.5. Estudo de seletividade .....	97
3.4.6. Ensaio de recuperação e análise de amostras de suor sintético....	98
3.4.7. Análise real de amostras de suor e análise de referência .....	101
<b>3.5. Considerações parciais .....</b>	<b>102</b>
<b>Capítulo 4 - Integração simples de dispositivos eletroquímicos baseados em papel e microfluídica digital para análise de L-cisteína .....</b>	<b>104</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>105</b>
<b>4.1. Introdução .....</b>	<b>106</b>
<b>4.2. Objetivos.....</b>	<b>111</b>
4.2.1. Objetivo geral .....	111
4.2.2. Objetivos específicos.....	111
<b>4.3. Procedimento experimental .....</b>	<b>112</b>
4.3.1. Materiais.....	112
4.3.2. Instrumentação.....	113
4.3.3. Fabricação de <i>chips</i> de microfluídica digital.....	113
4.3.4. Fabricação de dispositivos eletroquímicos baseados em papel (ePADs) .....	114
4.3.5. Caracterizações .....	116
4.3.6. Modificação eletroquímica <i>on-chip</i> .....	116
4.3.7. Medidas eletroquímicas integradas com DMF .....	116
4.3.8. Preparação da amostra usando DMF.....	117

4.3.9. Análise eletroquímica de L-cisteína em formulação farmacêutica e plasma.....	118
4.3.10. Estudo de adição de recuperação de L-cis em amostras farmacêutica e de plasma .....	119
<b>4.4. Resultados e discussão .....</b>	<b>120</b>
4.4.1. Fabricação de dispositivos eletroquímicos baseados em papel ...	120
4.4.2. Otimizações da modificação do eletrodo de trabalho com azul da Prússia .....	123
4.4.3. Caracterização morfológica .....	131
4.4.5 Estudos de reprodutibilidade .....	139
4.4.6. Estudo de seletividade .....	140
4.4.7 Análise da amostra e ensaio de adição e recuperação de L-cisteína .....	142
<b>4.5. Considerações parciais .....</b>	<b>145</b>
<b>Capítulo 5 - Abordagem ambientalmente amigável e portátil baseada em impressão 3D para detecção colorimétrica de inibidor de incrustação sulfonato assistida por <i>smartphone</i> .....</b>	<b>146</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>147</b>
<b>5.1. Introdução .....</b>	<b>148</b>
<b>5.2. Objetivos.....</b>	<b>150</b>
5.2.1. Objetivo geral .....	150
5.2.2. Objetivos específicos.....	150
<b>5.3. Procedimento experimental .....</b>	<b>151</b>
5.3.1. Materiais e reagentes .....	151
5.3.2. Instrumentação.....	151
5.3.3. Fabricação de micropoços e mini estúdio .....	152
5.3.4. Medições de microscopia óptica .....	153
5.3.5. Otimização experimental .....	153
5.3.6. Análise colorimétrica.....	154
5.3.7. Preparo da amostra .....	155
5.3.8. Análise comparativa .....	155
<b>5.4. Resultados e discussão .....</b>	<b>156</b>

5.4.1. Fabricação dos micropoços e do mini estúdio.....	156
5.4.2. Caracterização morfológica e perfilométrica .....	157
5.4.3. Otimização de parâmetros experimentais .....	158
5.4.4. Desempenho analítico .....	163
5.4.5. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade .....	165
5.4.6. Estudo interferente e análise de amostras reais .....	166
5.4.7. Experimentos de adição e recuperação .....	167
5.4.8. Análise AGREE .....	169
<b>5.5. Considerações parciais.....</b>	<b>170</b>
<b>Capítulo 6 - Conclusões gerais.....</b>	<b>172</b>
<b>6.1. Conclusões.....</b>	<b>173</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>176</b>
<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>227</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Representação do sinal de excitação de tensão em função do tempo, característico da técnica de voltametria cíclica. Fonte: Adaptado de Pacheco <sup>20</sup> .....	9
<b>Figura 1.2.</b> (A) Representação esquemática dos sinais de excitação inerentes à técnica de voltametria de pulso diferencial. (B) Voltamograma característico da técnica de VPD. Fonte: Adaptado de Compton <sup>69</sup> .....	10
<b>Figura 1.3.</b> (A) Representação esquemática da soma entre uma escada de potencial e uma onda quadrada, característica da VOQ. (B) Típico voltamograma obtido com a VOQ. Fonte: Adaptado de Compton <sup>69</sup> .....	12
<b>Figura 1.4.</b> Etapas básicas envolvidas no processo de impressão 3D via FDM. Fonte: Autoria própria. ....	16
<b>Figura 1.5.</b> Representação esquemática de procedimentos microfluídicos digitais dentro de um <i>chip</i> de placa dupla. As operações básicas envolvem a separação, a mistura, a união e a amostragem de uma gota a partir do eletrodo reservatório. Fonte: Autoria própria.....	20
<b>Figura 1.6.</b> Representação esquemática da vista lateral de dispositivos de microfluídica digital na configuração de (A) duas placas e (B) uma placa. Fonte: Autoria própria. ....	21
<b>Figura 2.1.</b> Imagem real do eletrodo de carbono proposto usando a técnica de impressão por estêncil. Fonte: Autoria própria.....	39
<b>Figura 2.2.</b> (A) Representação esquemática das etapas de fabricação de sensores eletroquímicos ecologicamente corretos utilizando a técnica de impressão em estêncil contendo (i) corte do <i>layout</i> do eletrodo, (ii) preparação de tinta condutiva, (iii) espalhamento da tinta condutiva com espátula e (iv) remoção da máscara adesiva vinílica. (B) Principais etapas envolvidas na produção do imunossensor: (i) ancoragem de AuNPs-Cys, (ii) inserção de grupos -CHO através da utilização de glutaraldeído, seguida da adição de Ab1, (iii) uso de BSA para bloquear os sítios ativos restantes da WE. A etapa final mostra a interação da proteína S presente no vírus SARS-CoV-2 com a superfície do biossensor. (C) Representação da coleta de amostras de pacientes usando um <i>swab</i> , (i) superfície WE na presença de uma amostra positiva de COVID-19 e (ii) leitura eletroquímica via voltametria de onda quadrada (VOQ) empregando o mediador redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio ([Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> ) 1 mmol L <sup>-1</sup> preparado em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Fonte: Autoria própria. ....	41
<b>Figura 2.3.</b> Espectro Raman do material eletródico à base de carbono entre 1000 e 3500 cm <sup>-1</sup> . Fonte: Autoria própria.....	45
<b>Figura 2.4.</b> Medida do ângulo de contato da superfície do WE. Fonte: Autoria própria.....	46

<b>Figura 2.5.</b> Espectros obtidos a partir da técnica de espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para flocos de grafite e grafite na presença de goma laca (tinta condutora). Fonte: Autoria própria.	46
<b>Figura 2.6.</b> (A) Espectros XPS C1s de alta resolução de material de eletrodo proposto. (B) Espectros XPS O1s de alta resolução de material de eletrodo proposto. Fonte: Autoria própria.....	47
<b>Figura 2.7.</b> Espectro UV-Vis de nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina (Cys-AuNPs). Fonte: Autoria própria.....	48
<b>Figura 2.8.</b> Imagens de AuNPs-Cys em diferentes ampliações obtidas por microscópio eletrônico de transmissão destacando tamanhos referentes à (A) 200 nm, (B) 50 nm e (C) 5 nm. Fonte: Autoria própria. ....	48
<b>Figura 2.9.</b> Micrografias de MV referente ao substrato do eletrodo, EC e EC modificado. (A) Substrato de poliéster com aproximação de 50X. (B) Eletrodo auxiliar sob aproximação de 50X. (C) Eletrodo de referência na aproximação de 50X. (D) Substrato de poliéster sob magnificação de 1000X. (E) Vista frontal da sessão transversal do AE sob aproximação de 55X. (F) Vista frontal da sessão transversal do RE sob aproximação de 55X. (G) WE baseado em carbono sob magnificação de 30X, (H) 500X e (I) 1000X, antes da modificação. (J) EC de goma laca modificado com AuNPs-Cys em ampliação de 30X, (K) 500X e (L)1000X, respectivamente. Fonte: Autoria própria. ....	50
<b>Figura 2.10.</b> (A) Espectros EDS mostrando os elementos químicos na superfície eletródica. (B) Espectros de EDS mostrando os elementos químicos na superfície WE modificados com AuNPs-Cys. Fonte: Autoria própria. ....	51
<b>Figura 2.11.</b> Voltamogramas de onda quadrada do imunossensor após cada etapa de modificação e na presença de 1,0 ng mL <sup>-1</sup> de proteína S do SARS-CoV-2 empregando [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> como sonda redox. Fonte: Autoria própria. ....	53
<b>Figura 2.12.</b> (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados na ausência e presença de diferentes concentrações da proteína S do SARS-CoV-2 (250,0 pg mL <sup>-1</sup> a 20,0 µg mL <sup>-1</sup> ). (B) Curva analítica. Fonte: Autoria própria.....	54
<b>Figura 2.13.</b> (A) Teste de repetibilidade utilizando cinco leituras eletroquímicas na presença de 1,0 ng mL <sup>-1</sup> de proteína S. (B) Teste de reprodutibilidade para três imunossensores utilizando 1,0 ng mL <sup>-1</sup> de proteína S. (C) Ensaio de reprodutibilidade utilizando três amostras reais de <i>swab</i> positivas para SARS-CoV-2 utilizando nove imunossensores. Fonte: Autoria própria.....	55
<b>Figura 2.14.</b> Gráfico da porcentagem relativa de corrente para o estudo de estabilidade do imunossensor fabricado e armazenado a 4,0 °C por 4 semanas. Fonte: Autoria própria. ....	56
<b>Figura 2.15.</b> Aplicação do imunossensor eletroquímico descartável e ecológico para detecção da proteína S do vírus SARS-CoV-2 em amostras de <i>swab</i> nasofaríngeo. Fonte: Autoria própria. ....	57

**Figura 3.1.** (A) Representação esquemática do processo de fabricação da nova tinta condutora, utilizando grafite, negro de fumo, laca chinesa e acetona, seguido pelo protocolo de manufatura dos sensores eletroquímicos, empregando a técnica de impressão por estêncil. (B) Etapas envolvidas na preparação de nanopartículas de prata (AgNPs) na superfície WE via eletrodeposição usando amperometria, juntamente com uma representação da leitura eletroquímica realizada a partir da voltametria de pulso diferencial na presença de amostra de suor contendo cloreto. Fonte: Autoria própria.. 72

**Figura 3.2.** Trilhas condutivas produzidas com a nova formulação de tinta à base de laca chinesa, grafite e negro de fumo, mostrando o circuito aberto (A) e fechado (B), com um LED sendo acesso. Fonte: Autoria própria. .... 76

**Figura 3.3.** Imagem real de eletrodo de grafite-negro de fumo impresso em estêncil com 10% m/m de NF. Fonte: Autoria própria. .... 77

**Figura 3.4.** Otimização dos parâmetros de fabricação do sensor eletroquímico e modificação do eletrodo de trabalho com nanopartículas de prata. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na presença de  $\text{Cl}^-$   $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 2,16$ ) para diferentes proporções de grafite e negro de fumo (100% grafite; 95% grafite/5% NF; 90% grafite/10% NF; 85% grafite/15% NF e 20% grafite/20% NF) na formulação da tinta condutora. Fonte: Autoria própria. .... 78

**Figura 3.5.** Micrografias obtidas para o novo sensor eletroquímico proposto à base de laca chinesa usando diferentes proporções entre grafite e negro de fumo. (A) Imagem mostrando a célula eletroquímica construída sobre o substrato de poliéster contendo o WE, RE e o AE, cuja composição é de grafite, além da barreira hidrofóbica de vinil adesivo, sob magnificação de 10 vezes. (B) Imagem do eletrodo de trabalho (magnificação de 10.000 vezes), contendo grafite na composição. (C) Imagem do WE do eletrodo cuja composição é de 95% de grafite e 5% de negro de fumo em relação aos componentes condutivos (magnificação de 10.000 vezes). (D) Imagem do WE do eletrodo com composição de 90% de grafite e 10% de negro de fumo (magnificação de 10.000 vezes). (E) Imagem do WE do eletrodo com composição de 85% de grafite e 15% de negro de fumo (magnificação de 10.000 vezes). (F) Imagem do WE do eletrodo com composição de 80% de grafite e 20% de negro de fumo (magnificação de 10.000 vezes). Fonte: Autoria própria..... 79

**Figura 3.6.** (A) Voltamogramas da VPD obtidos para diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na solução precursora das nanopartículas de prata. (B) Gráfico relacionando a intensidade de corrente obtida em função da concentração de  $\text{AgNO}_3$  empregada. Fonte: Autoria própria..... 81

**Figura 3.7.** (A) Voltamogramas da VPD provenientes de diferentes tempos de eletrodeposição de nanopartículas de prata (100; 200; 300; 400 e 500 s) sobre

o eletrodo de trabalho. (B) Gráfico referente à relação entre a magnitude de corrente e o tempo de aplicação de potencial usado na amperometria. Fonte: Autoria própria. .... 82

**Figura 3.8.** Micrografias adquiridas a partir da técnica de MEV-FEG usando a magnificação de 10.000 vezes. (A) Imagem do WE do dispositivo eletroquímico na ausência de modificação da superfície. (B) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 100 s (C). WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 200 s. (D) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 300 s. (E) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 400 s. (F) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 500 s. O potencial de eletrodeposição utilizado foi de -0,8 V. Fonte: Autoria própria. .... 83

**Figura 3.9.** (A) Voltamogramas da VPD provenientes de diferentes potenciais de eletrodeposição de nanopartículas de prata (-1,0; -0,8; -0,6; -0,4; -0,2 V) sobre o eletrodo de trabalho. (B) Gráfico mostrando a magnitude de corrente em função do potencial aplicado, mantido fixo durante a amperometria. Fonte: Autoria própria. .... 84

**Figura 3.10.** Micrografias adquiridas a partir da técnica de MEV-FEG usando a magnificação de 30.000 vezes. (A) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -1,0 V. (B) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,8 V. (C) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,6 V. (D) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,4 V. (E) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,2 V. (F) Imagem do WE do sensor eletroquímico na ausência de modificação da superfície. O tempo de eletrodeposição utilizado foi de 400 s. Fonte: Autoria própria. .... 85

**Figura 3.11.** Imagens de ângulo de contato obtidas para o WE do EGR-NF (A) sem modificação na superfície e (B) após a eletrodeposição de AgNPs (AgNPs/EGR-NF). Fonte: Autoria própria. .... 87

**Figura 3.12.** Medidas eletroquímicas usando a técnica de voltametria cíclica. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência e presença de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cl}^-$  preparado em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  utilizando eletrodo de grafite não modificado e modificado com AgNPs. (B) Estabilização do sinal analítico após o processo de modificação do WE, na presença de tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$ , sob velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . (C) Reprodutibilidade da modificação do WE com AgNPs. Fonte: Autoria própria. .... 89

**Figura 3.13.** Micrografias adquiridas do WE do dispositivo de grafite-negro de fumo sob magnificação de 5.000 vezes. (A) Sensor após modificação com AgNPs via amperometria. (B) Sensor após modificação com AgNPs via

amperometria, seguido de estabilização usando VC. (C) Sensor após modificação com AgNPs, estabilização e após análise de $\text{Cl}^-$ 1 mmol $\text{L}^{-1}$ em tampão BR 30 mmol $\text{L}^{-1}$ (pH 2,16). Fonte: Autoria própria.....	90
<b>Figura 3.14.</b> Caracterização eletroquímica do eletrodo AgNPs-GR/NF por voltametria cíclica. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de 1,0 mmol $\text{L}^{-1}$ de $\text{Cl}^-$ preparado em tampão BR 30 mmol $\text{L}^{-1}$ registrados em diferentes velocidades de varredura. (B) Corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. (C) $\log I$ vs $\log v$ para o processo de oxidação de $\text{Cl}^-$ . Fonte: Autoria própria.....	91
<b>Figura 3.15.</b> (A) Voltamogramas da otimização da amplitude de pulso da técnica de VPD visando a análise de $\text{Cl}^-$ . (B) Gráfico relacionando os valores de corrente em função dos valores de amplitude. Fonte: Autoria própria....	92
<b>Figura 3.16.</b> (A) Voltamogramas da otimização do degrau de potencial da técnica de VPD visando a análise de $\text{Cl}^-$ . (B) Gráfico relacionando os valores de corrente em função dos valores do degrau de potencial. Fonte: Autoria própria.....	93
<b>Figura 3.17.</b> (A) Voltamogramas da otimização do tempo de pulso da técnica de VPD visando a análise de $\text{Cl}^-$ . (B) Gráfico relacionando os valores de corrente em função dos valores do tempo de pulso. Fonte: Autoria própria.	94
<b>Figura 3.18.</b> (A) Voltamogramas referentes à análise de $\text{Cl}^-$ para diferentes concentrações usando o eletrodo AgNPs/EGR-NF. (B) Curva analítica para análise de $\text{Cl}^-$ entre as concentrações de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Fonte: Autoria própria.....	95
<b>Figura 3.19.</b> (A) Voltamogramas de pulso diferencial referentes ao estudo de reprodutibilidade para a análise de cloreto usando o AgNPs-EGR/NF. (B) Histograma referente ao estudo de reprodutibilidade do método proposto mostrando os valores de corrente em função do número de eletrodos testados. Fonte: Autoria própria.....	96
<b>Figura 3.20.</b> (A) Voltamogramas de pulso diferencial referente ao estudo de seletividade de potenciais compostos interferentes para análise na presença de $\text{Cl}^-$ . (B) Histograma relacionando a porcentagem relativa de corrente obtida no estudo de seletividade, em função dos interferentes empregados na presença de $\text{Cl}^-$ . Fonte: Autoria própria.....	98
<b>Figura 3.21.</b> Voltamogramas referentes à análise de amostras sintéticas de suor contendo níveis de cloreto na faixa de concentração baixa, limítrofe e positiva para FC, acompanhadas das análises dos respectivos brancos. Fonte: Autoria própria.....	101
<b>Figura 4.1.</b> Imagem real do dispositivo de microfluídica digital em configuração de placa dupla. Fonte: Autoria própria.....	114
<b>Figura 4.2.</b> Representação esquemática da fabricação de sensores eletroquímicos baseados em papel. Fonte: Autoria própria.....	115

**Figura 4.3.** (A) Imagem real da integração entre um dispositivo analítico baseado em papel e a técnica de microfluídica digital, a partir da inserção do ePAD dentro do eletrodo reservatório. (B) Vista frontal da integração entre o dispositivo de microfluídica digital e o sensor eletroquímico mostrando a angulação da dobragem necessária. Fonte: Autoria própria..... 122

**Figura 4.4.** Respostas de VC obtidas na ausência e presença de L-cis 1 mmol L<sup>-1</sup> preparada em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, PBS (pH = 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) com a faixa de potencial variando de -0,5 a 1,2 V vs C sob velocidade de varredura de 100 mVs<sup>-1</sup>. A modificação do WE do ePAD-GR foi realizada previamente com a solução precursora da modificação contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup> 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub> 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Tetronic 90R4 0,1% (m/v), via amperometria (t = 80 s; 0,4 V). Fonte: Autoria própria. .... 124

**Figura 4.5.** Procedimentos eletroquímicos integrados com a técnica de DMF utilizados no processo de modificação de ePADs de grafite e negro de fumo com AP, ativação do WE e detecção de L-cis. Fonte: Autoria própria..... 126

**Figura 4.6.** Voltamogramas cíclicos referente ao sexto ciclo do processo de ativação, na presença de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, suplementada com Tetronic 90R4 0,1% (m/v), obtidos para o ePAD de grafite usando-se o sensor fora e dentro do chip de DMF. Fonte: Autoria própria..... 128

**Figura 4.7.** (A) Voltamogramas cíclicos do ePAD de grafite obtidos durante o processo de ativação na presença de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) usando eletrodo de referência de carbono e de prata. (B) Voltamogramas cíclico na presença e e ausência de L-cis em PBS usando eletrodos contendo o eletrodo de referência de carbono e de prata. A velocidade de varredura empregada foi de 100 mV s<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria. .... 129

**Figura 4.8.** (A) Voltamogramas cíclicos referentes à etapa de ativação do ePAD de grafite. (B) Voltamogramas cíclicos provenientes do estudo de reprodutibilidade da modificação do WE com AP de diferentes ePADs de grafite. (C) Voltamogramas cíclicos referentes à etapa de ativação do ePAD de negro de fumo. (B) Voltamogramas cíclicos provenientes do estudo de reprodutibilidade da modificação do WE com AP de diferentes ePADs de negro de fumo. Fonte: Autoria própria..... 130

**Figura 4.9.** Micrografias obtidas a partir da técnica de MEV-FEG usando a diferentes magnificações. (A) Papel coletor antes da modificação do ePAD (10.000X). (B) Papel coletor após a modificação do ePAD com AP (10.000X). (C) WE antes da eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de grafite (30.000X). (D) WE após a eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de grafite (30.000X). (E) WE antes da eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de GR-NF (30.000X). (F) WE após a

eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de GR-NF (30.000X).  
 Fonte: Autoria própria. .... 132

**Figura 4.10.** Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (A) carbono, (B) oxigênio e (C) ferro na superfície do WE do ePAD de grafite. Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (D) carbono, (E) oxigênio e (F) ferro na superfície do WE do ePAD de grafite modificado com AP. Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (G) carbono, (H) oxigênio e (I) ferro na superfície do WE do ePAD de NF. Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (J) carbono, (K) oxigênio e (L) ferro na superfície do WE do ePAD de NF modificado com AP. Fonte: Autoria própria..... 134

**Figura 4.11.** Espectros EDS mostrando os elementos químicos na superfície eletródica do ePAD de GR antes (A) e após (B) a modificação com AP. Espectros EDS mostrando os elementos químicos na superfície eletródica do ePAD de NF antes (C) e após (D) a modificação com AP. Fonte: Autoria própria..... 135

**Figura 4.12.** (A) Amperogramas referentes à análise de L-cisteína para diferentes concentrações usando o eletrodo AP/ePAD-GR. (B) Curva analítica para análise de L-cis entre as concentrações de 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (C) Voltamogramas de onda quadrada referentes à análise de L-cisteína para diferentes concentrações usando o eletrodo AP/ePAD-NF. (B) Curva analítica para análise de L-cis entre as concentrações de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Fonte: Autoria própria..... 137

**Figura 4.13.** (A) Amperogramas referentes ao estudo de reprodutibilidade para a análise de L-cis 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) usando o eletrodo AP/ePAD-GR. (B) Histograma referente ao estudo de reprodutibilidade do método proposto mostrando os valores de corrente em função do número de AP/ePAD-NF testados. (C) Voltamogramas de onda quadrada referentes ao estudo de reprodutibilidade para a análise de L-cis 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) usando o eletrodo AP/ePAD-NF. (D) Histograma referente ao estudo de reprodutibilidade do método proposto mostrando os valores de corrente em função do número de AP/ePAD-NF testados. Fonte: Autoria própria..... 140

**Figura 4.14.** (A) Amperogramas provenientes do estudo de seletividade para a análise de L-cis 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) na presença de potenciais interferentes aminoácidos usando o AP/ePAD-GR. (B) Histograma relacionando a porcentagem relativa de corrente obtida no estudo de seletividade, em função dos interferentes empregados na presença de L-cis empregando amperometria. (C) Voltamogramas de pulso diferencial referente ao estudo de seletividade de potenciais compostos interferentes para análise na presença

de 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) na presença de potenciais interferentes aminoácidos usando o AP/ePAD-NF. (D) Histograma relacionando a porcentagem relativa de corrente obtida no estudo de seletividade, em função dos interferentes empregados na presença de L-cis. Fonte: Autoria própria. .... 141

**Figura 4.15.** Esquema ilustrativo do protocolo automatizado de preparo de sangue para plasma utilizando a técnica de DMF. Fonte: Autoria própria. 144

**Figura 5.1.** Esquema representativo da construção dos micropoços e mini estúdio via impressão 3D, bem como a montagem do sistema para efetuar detecção colorimétrica usando *smartphone*. Fonte: Autoria própria. .... 152

**Figura 5.2.** Representação esquemática do procedimento utilizado para aquisição de valores RGB utilizando o protótipo impresso em 3D e o aplicativo móvel Color Grab. Fonte: Autoria própria. .... 155

**Figura 5.3.** (A) Imagens de MEV mostrando detalhes da superfície na zona de detecção do dispositivo em formato de micropoço. (D) Microscopia óptica e medidas perfilométricas da zona de teste. Fonte: Autoria própria. .... 158

**Figura 5.4.** Otimização de cromógeno. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS usando diferentes cromógenos. (B) Representação gráfica do comportamento do VS versus diferentes cromógenos. Fonte: Autoria própria. .... 159

**Figura 5.5.** Otimização da concentração do tampão Britton-Robinson para análise VS usando sulfato de azul do Nilo. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS utilizando diferentes concentrações de tampão BR. (B) Representação gráfica do comportamento do VS frente a diferentes concentrações do tampão BR. Fonte: Autoria própria. .... 160

**Figura 5.6.** Otimização da concentração de azul de Nilo sulfato A para análise de VS. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS utilizando diferentes concentrações de azul de Nilo sulfato A. (B) Representação gráfica do comportamento do VS 5  $\text{mg L}^{-1}$  frente a diferentes concentrações de azul de Nilo sulfato A. Fonte: Autoria própria. .... 161

**Figura 5.7.** Otimização de luz. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS usando diferentes condições de iluminação. (B) Representação gráfica do comportamento do VS em relação a diferentes parâmetros de iluminação do aplicativo móvel Color Grab. Fonte: Autoria própria. .... 162

**Figura 5.8.** Estudo da cinética de reação (A) Paleta de cores para branco e VS utilizando diferentes tempos de coleta de dados (B) Representação gráfica do comportamento do VS ao utilizar diferentes tempos de aquisição de imagem. Fonte: Autoria própria. .... 163

**Figura 5.9.** (A) Paleta de cores referente às concentrações de 0,5 a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ . (B) Curva analítica para VS de 0,5 a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Fonte: Autoria própria. 164

**Figura 5.10.** Curvas VS analíticas obtidas usando diferentes marcas de

celulares nas mesmas condições experimentais e sem ajuste de iluminação. Fonte: Autoria própria. ....	165
<b>Figura 5.11.</b> Testes analíticos referentes ao estudo de repetibilidade para seis micropoços de em única plataforma. (A) Paleta de cor proveniente da reação colorimétrica obtido para cada replicata. (B) Histograma referente ao teste de repetibilidade para análise de VS na concentração de 5 mg L <sup>-1</sup> . Testes analíticos referentes ao estudo de reprodutibilidade para seis micropoços diferentes. (C) Paleta de cores obtida para cada dispositivo. (D) Histograma referente ao ensaio de reprodutibilidade para análise de SV na concentração de 5 mg L <sup>-1</sup> . Fonte: Autoria própria. ....	166
<b>Figura 5.12.</b> Estudo de seletividade na proporção de 1:10 (analito:interferente) utilizando iodeto de potássio (KI), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> ), cloreto de cobre (CuCl <sub>2</sub> ), cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> ), cloreto de cobre (CuCl <sub>2</sub> ), cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> ), sulfato de ferro (FeSO <sub>4</sub> ), sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> ), nitrato de chumbo (PbNO <sub>3</sub> ), nitrato de bário (BaNO <sub>3</sub> ), carbonato de cálcio (Ca <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ), bicarbonato de cálcio (Ca(HCO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), ácido acético (CH <sub>3</sub> COOH), etilenoglicol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ), HPMA polidisperso (HPMA) e A1 polidisperso (Pol. A1). Fonte: Autoria própria. ....	167
<b>Figura 5.13.</b> (A) Espectro de absorção para VS em diferentes concentrações entre comprimentos de onda de 400 a 600 nm. (B) Curva de calibração de VS usando espectrofotometria. Fonte: Autoria própria. ....	168
<b>Figura 5.14.</b> Análise métrica verde usando <i>software</i> AGREE. Fonte: Autoria própria.....	170

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Parâmetros otimizados e/ou utilizados na fabricação do imunossensor proposto.....	52
<b>Tabela 2.2.</b> Resultados obtidos de ensaios analíticos em triplicata envolvendo o uso de imunossensores eletroquímicos para diagnóstico de COVID-19 em amostras de <i>swab</i> em comparação com a técnica de RT-qPCR.....	58
<b>Tabela 2.3.</b> Comparação do tipo de eletrodo, método eletroquímico, faixa linear e LOD para detecção de proteína S.....	60
<b>Tabela 3.1.</b> Resumo dos parâmetros estudados e fixados para a construção do sensor eletroquímico, bem como a modificação do eletrodo de trabalho com nanopartículas de prata. ....	86
<b>Tabela 3.2.</b> Comparação entre diferentes métodos eletroquímicos para a detecção de cloreto.....	96
<b>Tabela 3.3.</b> Dados do estudo da exatidão pelo método de adição e recuperação, em dois níveis, usando amostra real de suor.....	99
<b>Tabela 3.4.</b> Concentrações de cloreto encontradas em amostras sintéticas de suor usando AgNPs/EGR-NF pelo método voltametria de pulso diferencial. ....	100
<b>Tabela 3.5.</b> Amostras reais de suor analisadas a partir do sensor proposto e da técnica padrão ouro. ....	101
<b>Tabela 4.1.</b> Parâmetros estudados no processo de otimização da fabricação da tinta condutora de grafite. ....	121
<b>Tabela 4.2.</b> Resumo dos parâmetros estudados no processo de otimização da eletrodeposição de AP no ePAD-GR, que incluem a concentração ([ ]) das espécies contendo Fe e tempo de eletrodeposição.....	125
<b>Tabela 4.3.</b> Parâmetros avaliados e selecionados no estudo de otimização de parâmetros da técnica de VOQ visando a detecção de L-cisteína. ....	136
<b>Tabela 4.4.</b> Tabela comparativa para diferentes tipos de eletrodos empregados na análise de L-cisteína em termos de desempenho analítico. ....	139
<b>Tabela 4.5.</b> Análise de cápsulas de L-cis a partir de um “ <i>pool</i> ” de 10 amostras usando a DMF e AP/ePAD-GR (n = 3).....	142
<b>Tabela 4.6.</b> Ensaio de adição e recuperação de L-cis em amostra de suplemento alimentar usando a técnica de DMF e o AP/ePAD-GR (n = 3).143	143
<b>Tabela 4.7.</b> Dados obtidos a partir do estudo de adição e recuperação em três níveis de L-cis em amostra de plasma. Fonte: Autoria própria. ....	144
<b>Tabela 5.1.</b> Estudo da otimização de parâmetros operacionais para detecção de VS. ....	163
<b>Tabela 5.2.</b> Comparação da análise de VS em água produzida utilizando a técnica de colorimetria e espectrofotometria. ....	169

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 3.1.....	94
Equação 3.2.....	99
Equação 3.3.....	99
Equação 4.1.....	138
Equação 5.1.....	164

## LISTA DE REAÇÕES QUÍMICAS

Reação 3.1 .....	88
Reação 3.2 .....	88
Reação 3.3 .....	88
Reação 3.4 .....	88
Reação 4.1 .....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$S_D$	Desvio padrão do branco
$S_b$	Desvio padrão do coeficiente linear
$\mu$ PADS	Microdispositivos analíticos baseados em papel (do inglês, <i>Microfluidic paper-based analytical devices</i> )
$\mu$ TAS	Microssistemas de análise total (do inglês, <i>Micro total analysis systems</i> )
AC	Ângulo de contato
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2 (do inglês, <i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> )
AE	Eletrodo auxiliar (do inglês, <i>Auxiliary electrode</i> )
AgNPs	Nanopartículas de prata
AGREE	Calculadora Gness
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Azul da Prússia
APAE	Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
AuNPs-Cys	Nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BB	Azul de Coomassie brilhante (do inglês, <i>Coomassie brilliant blue</i> )
BR	Tampão Britton-Robinson
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>bovine serum albumin</i> )
CFTR	Gene regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (do inglês, <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> )
COVID-19	Coronavírus 2019

<b>DMF</b>	Microfluídica digital (do inglês, <i>Digital microfluidics</i> )
<b>DPR</b>	Desvio padrão relativo
<b>EC</b>	Eletrodo de carbono
<b>ECL</b>	Eletroquimioluminescência
<b>EDS</b>	Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia
<b>EIS</b>	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> )
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>ENIG/PCB</b>	Eletrodo de níquel com imersão em ouro/placa de circuito impresso
<b>ePAD</b>	Dispositivo analítico eletroquímico baseado em papel (do inglês, <i>Electrochemical Paper-based Analytical Device</i> )
<b>EWOD</b>	Molhabilidade assistida por campo elétrico (do inglês, <i>Electrowetting-on-dielectric</i> )
<b>FBS</b>	Soro bovino fetal (do inglês, <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FDM</b>	Modelo de deposição por fusão (do inglês, <i>Fused deposition modeling</i> )
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
<b>GA</b>	Glutaraldeído
<b>GCE</b>	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, <i>Glassy carbon electrode</i> )
<b>GO</b>	Óxido de grafeno (do inglês, <i>Graphene oxide</i> )

<b>ICAAS</b>	Conselho Internacional sobre Ciência de Aminoácidos (do inglês, <i>International Council on Amino Acid Science</i> )
<b>I<sub>D</sub></b>	Intensidade da banda D
<b>I<sub>D</sub>/ I<sub>G</sub></b>	Razão entre a intensidade da banda D e G
<b>I<sub>G</sub></b>	Intensidade da banda G
<b>I<sub>pa</sub></b>	Corrente de pico anódica
<b>I<sub>pc</sub></b>	Corrente de pico catódica
<b>LED</b>	Diodo emissor de luz (do inglês, <i>Light emitting diode</i> )
<b>LFAs</b>	Ensaio de fluxo lateral (do inglês, <i>Lateral flow assays</i> )
<b>LOD</b>	Limite de detecção (do inglês, <i>Limit of detection</i> )
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação (do inglês, <i>Limit of quantification</i> )
<b>MB</b>	Azul de metileno (do inglês, <i>Methylene Blue</i> )
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês, <i>scanning electron microscopy</i> )
<b>MEV-FEG</b>	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução com análises de feixe de elétrons de emissão de campo (do inglês, <i>Field emission scanning electron microscopy with high-resolution electron beam analysis</i> )
<b>MWCNTs</b>	Nanotubo de carbono de paredes múltiplas (do inglês, <i>Multi-walled carbon nanotubes</i> )
<b>NB</b>	Azul de Nilo A sulfato (do inglês, <i>Nile blue A sulfate</i> )
<b>NF</b>	Negro de fumo
<b>N-HRGO</b>	Grafeno poroso dopado com nitrogênio
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde

<b>PB</b>	Azul da Prússia
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>Pd-Au</b>	Nanofolhas de paládio-ouro
<b>PEDOT</b>	Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
<b>PLA</b>	Ácido polilático (do inglês, <i>Polylactic acid</i> )
<b>PNTN</b>	Programa Nacional de Triagem Neonatal
<b>POC</b>	Ponto de Cuidado (do inglês, <i>Point-of-care</i> )
<b>POCT</b>	Testes no <i>point-of-care</i>
<b>Proteína N</b>	Proteína do nucleocapsídeo
<b>PW</b>	Branco da Prússia (do inglês, <i>Prussian white</i> )
<b>RDC</b>	Resolução da diretoria colegiada
<b>RE</b>	Eletrodo de referência (do inglês, <i>Reference Electrode</i> )
<b>RPM</b>	Rotações por minuto (do inglês, <i>Revolutions per minute</i> )
<b>RT-qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (do inglês, <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> )
<b>S</b>	Desvio padrão do intercept
<b>SARS-CoV-2</b>	Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2
<b>SD</b>	Desvio Padrão (do inglês, <i>Standard deviation</i> )
<b>SPCE</b>	Eletrodo de carbono impresso em estêncil (do inglês, <i>Stencil-printed carbon electrodes</i> )
<b>SPCE*</b>	Eletrodo de carbono serigrafado (do inglês, <i>Screen-printed carbon electrode</i> )
<b>TB</b>	Azul de toluidina (do inglês, <i>Toluidine Blue</i> )
<b>TEM</b>	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês,

	<i>Transmission electron microscopy)</i>
<b>UTM</b>	Meio de transporte universal (do inglês, <i>Universal transport medium</i> )
<b>VC</b>	Voltametria cíclica
<b>VOQ</b>	Voltametria de onda quadrada
<b>VPD</b>	Voltametria de pulso diferencial
<b>VRC</b>	Voltametria de redissolução catódica
<b>WE</b>	Eletrodo de trabalho (do inglês, <i>Working electrode</i> )
<b>XPS</b>	Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios X (do inglês, <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> )
<b><math>\Delta</math>EP</b>	Separação entre os potenciais de pico

## LISTA DE SÍMBOLOS

<i>a</i>	Amplitude
<i>f</i>	Frequência
<i>i</i>	Corrente elétrica
<i>t</i>	Tempo
<i>t</i>	Teste t de <i>Student</i> pareado
<i>a</i>	Sensibilidade analítica ou coeficiente angular

## RESUMO

O campo da microfabricação dedicado ao desenvolvimento de dispositivos analíticos portáteis e ambientalmente amigáveis, no contexto dos sensores eletroquímicos e colorimétricos, expandiu-se consideravelmente nos últimos anos. Além disso, a tecnologia de microfluídica digital (DMF), tem emergido como uma plataforma analítica automatizada, tanto voltada para o preparo de amostras, quanto para a detecção de inúmeros analitos, uma vez que pode ser integrada à uma gama de detectores. Às plataformas analíticas supracitadas são atribuídos um espectro de possibilidades de aplicação, que envolvem, de maneira abrangente, as áreas clínicas, farmacêutica, bioanalítica e petroquímica, por exemplo. Nesse cenário, a presente tese apresenta inovações em plataformas analíticas eletroquímica, colorimétrica e DMF para aplicações visando o controle de qualidade de produtos farmacêuticos, clínicas e indústria petroquímica. Para tal, introduz-se, e aplica-se, com sucesso: (i) um dispositivo eletroquímico ecologicamente correto voltado para o diagnóstico da COVID-19, (ii) um novo sensor eletroquímico miniaturizado e descartável para o diagnóstico de fibrose cística, (iii) a integração de dispositivos analíticos eletroquímicos baseados em papel e DMF para a extração de plasma, seguido da análise de L-cisteína (biomarcador de Alzheimer), e (iv) um novo dispositivo colorimétrico portátil e ambientalmente amigável para a detecção de vinil sulfonato de sódio em amostras de água produzida, visando a detecção de inibidores de incrustação.

**Palavras-Chave:** plataformas analíticas portáteis, sensores químicos, detecção colorimétrica, detecção eletroquímica, química analítica verde.

## ABSTRACT

The field of microfabrication dedicated to the development of portable and environmentally friendly analytical devices, in the context of electrochemical and colorimetric sensors, has expanded considerably in recent years. Furthermore, digital microfluidic (DMF) technology has emerged as an automated analytical platform, both for sample preparation and for the detection of numerous analytes, as it can be integrated with a range of detectors. The aforementioned analytical platforms are attributed to a spectrum of application possibilities, which comprehensively involve clinical, pharmaceutical, bioanalytical, and petrochemical fields, for example. In this context, the current thesis presents innovations in electrochemical, colorimetric, and DMF analytical platforms for applications aimed at quality control of pharmaceutical products, clinics, and the petrochemical industry. To this end, the following analytical devices and approaches were introduced and successfully applied: (i) an environmentally friendly electrochemical device for COVID-19 diagnosis, (ii) a new miniaturized and disposable electrochemical sensor for cystic fibrosis diagnosis, (iii) the integration of paper-based electrochemical analytical devices and DMF for plasma extraction, followed by the analysis of L-cysteine (an Alzheimer's biomarker), and (iv) a new portable and environmentally friendly colorimetric device for the detection of sodium vinyl sulfonate in produced water samples, aiming at the detection of scale inhibitors.

**Keywords:** portable analytical platforms, chemical sensors, colorimetric detection, electrochemical detection, green analytical chemistry.

## PREFÁCIO

A motivação para realizar o doutorado surgiu do meu profundo apreço pela ciência e pela genuína satisfação em contemplar ideias outrora dispostas em papéis em algo palpável e com potencial de, um dia, beneficiar as pessoas. Ao longo dos últimos anos, este projeto não significou um mero trabalho acadêmico, mas uma jornada intensa de trabalho duro, aprendizados, erros e acertos que contribuíram para além do âmbito educacional. O privilégio de ter me dedicado a um tema pelo qual tenho tanta paixão, fez com que, muitas vezes, o ato de fazer ciência não parecesse um “trabalho”, no sentido literal da palavra.

Dessa forma, esta tese engloba uma série de projetos desenvolvidos durante meu doutorado em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, com período sanduíche na University of Toronto. Os temas explorados neste estudo envolvem a busca por sensores analíticos de fácil uso, versáteis, com boa relação custo-benefício e potencialmente voltados para análises no campo. Em sua maior parte, são explorados materiais de baixo custo e estratégias ecologicamente corretas para a fabricação de sensores eletroquímicos e colorimétricos, além do desenvolvimento de metodologias microfluídicas digitais, visando ensaios analíticos automatizados. Dessa forma, vislumbrando métodos ambientalmente amigáveis, em conformidade com os princípios da Química Analítica Verde. Ademais, aplicáveis em inúmeras vertentes, tais como diagnóstico clínico, controle de qualidade de produtos farmacêuticos e indústria petroquímica, conforme aqui explorado. Para uma melhor compreensão do desdobramento dos trabalhos, cada projeto foi cuidadosamente alocado separadamente. A seguir, é fornecida uma breve descrição de cada capítulo.

O Capítulo 1, intitulado **“Introdução geral”** descreve um breve estado da arte em termos de procedimentos de fabricação de sensores analíticos eletroquímicos; com foco na técnica de impressão por estêncil, colorimétricos; com destaque para a técnica de impressão 3D, e microfluídicos digitais; com destaque da fotolitografia. Além disso, traz consigo definições relacionadas às técnicas eletroquímicas comumente exploradas, bem como tópicos pertinentes à detecção colorimétrica e microfluídica digital. Por fim, destaca algumas das inúmeras possibilidades de aplicações dos respectivos sensores nas áreas bioanalítica e química.

O Capítulo 2, **“Imunossensor eletroquímico descartável e ecológico para detecção rápida de SARS-CoV-2”** apresenta um novo dispositivo eletroquímico de baixo custo para a detecção da proteína *spike*. Para tanto, é explorada a formulação de uma tinta condutora à base de goma laca, uma resina natural excretada por um inseto denominado *Kerria lacca*. O dispositivo foi caracterizado eletroquimicamente, morfologicamente e aplicado, com sucesso, no diagnóstico de COVID-19 durante a pandemia.

O Capítulo 3, **“Detecção aprimorada de cloreto usando eletrodo de grafite/negro de fumo impresso em estêncil modificado com nanopartículas de prata para diagnóstico de fibrose cística”** dispõe a respeito da fabricação personalizada de um novo sensor eletroquímico. O material aglutinante explorado foi a resina Laca Chinesa, cuja obtenção é a partir da extração de árvores do gênero *Toxicodendron vernicifluum*. Os estudos envolvendo diferentes composições da tinta condutora, além da otimização da modificação do eletrodo de trabalho com nanopartículas de prata para a detecção de cloreto foram exploradas. Amostras de suor sintéticas e reais foram avaliadas, demonstrando potencial para detectar o analito de interesse na faixa clinicamente relevante.

O Capítulo 4, “**Integração simples de dispositivos eletroquímicos baseados em papel e microfluídica digital para análise de L-Cisteína**” relata uma nova abordagem para hifenar sensores eletroquímicos e a técnica de microfluídica digital. A proposta de integração tem o potencial não apenas de facilitar a detecção de L-cisteína, mas também de permitir a análise de outros analitos, contribuindo para avanços na área. Como prova de conceito, amostras de produtos farmacêuticos e plasma foram analisados.

O Capítulo 5, “**Abordagem ambientalmente amigável e portátil baseada em impressão 3D para detecção colorimétrica de inibidores de incrustações sulfonato assistida por *smartphone***” exhibe a fabricação de um mini estúdio impresso em 3D contendo micropoços deslizantes para realizar-se detecção colorimétrica. O aplicativo de celular gratuito ColorGrab foi utilizado como detector portátil. É importante mencionar que parâmetros como iluminação e canal de cor podem ser ajustados dentro do próprio aplicativo. Sob parâmetros operacionais e experimentais ótimos, amostras de água produzida enriquecidas com vinil sulfonato de sódio foram analisadas e comparadas com a técnica de espectrofotometria. A métrica verde, que avalia quão de acordo com os princípios da química analítica verde é o método, foi determinada a partir do uso do *software* gratuito AGREE.

O Capítulo 6, “**Conclusões gerais**” reporta uma recapitulação dos principais pontos abordados nos capítulos anteriores, destacando suas contribuições, desafios e perspectivas no que se refere ao uso de sensores portáteis, ensaios analíticos automatizados e reuso de plataformas analíticas de baixo custo.

## **Capítulo 1 - Introdução geral**

## 1.1. INTRODUÇÃO

Uma gama de análises químicas e biológicas foram e são desempenhadas a partir do uso de instrumentação analítica de grande porte, alocada em laboratórios tradicionais, a partir de analistas altamente qualificados<sup>1</sup>. Esses equipamentos comumente são volumosos e de alto custo, o que, conseqüentemente, limita os procedimentos no ambiente laboratorial e encarece as análises de moléculas orgânicas, íons metálicos e biomoléculas, por exemplo. Além disso, é frequentemente necessário proceder-se com etapas de pré-tratamento de amostras que podem ser complexas e que demandam um longo tempo. Nesse viés, dentre as instrumentações que podem ser mencionadas, tem-se os equipamentos de ressonância magnética nuclear, a espectrometria de massas e a cromatografia líquida e gasosa, integrados à diferentes detectores<sup>2</sup>.

Na década de 1990, o conceito de sistemas miniaturizados de análise química total ( $\mu$ TAS) proposto por Manz et al. começou a ganhar espaço devido o potencial para atenuar as limitações ocasionadas por instrumentação de grande porte. A ideia de encolher um laboratório em um *chip* (*lab-on-a-chip*) envolveu a possibilidade de incorporar, em pequenos dispositivos analíticos, uma série de etapas que, comumente, são realizadas em grandes laboratórios via processos fragmentados. Além disso, devido a integração de múltiplas etapas, funções complexas poderiam, então, serem automatizadas para executar tarefas repetitivas de laboratório<sup>3,4</sup>.

Um laboratório em um *chip* abrangente deve ser passível de realizar procedimentos de laboratórios padrões desde o manuseio da amostra bruta, mistura, reação entre amostra e reagente, separação e detecção do analito alvo, o que prospecta a possibilidade de análises rápidas, simples, portáteis e que podem ser executadas no local de necessidade. Dessa forma, descentralizando e democratizando inúmeros procedimentos analíticos<sup>4</sup>. Devido às inúmeras vantagens, os  $\mu$ TAS se expandiram de maneira avassaladora no âmbito da Química Analítica, instaurando contribuições expressivas em um amplo espectro de aplicações<sup>5</sup>.

As ideias inovadoras acima mencionadas, em associação com o

advento da miniaturização, resultaram em reduções significativas no custo e no tempo necessários para tais análises e ampliaram o panorama das mesmas, para que elas pudessem ser executadas no ponto de atendimento ou mesmo no conforto da casa do próprio paciente<sup>6</sup>. Adicionalmente, superar as desvantagens dos procedimentos analíticos convencionais<sup>2</sup>.

A partir dos anos 2000, a microfluídica digital também ganhou espaço na comunidade científica por proporcionar ensaios analíticos automatizados e miniaturizados, usando um reduzido volume de amostras e portabilidade<sup>7</sup>. Ainda no contexto dos dispositivos miniaturizados, no ano de 2007, o grupo de pesquisa do professor Whitesides<sup>8</sup> introduziu os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel ( $\mu$ PADs), cuja notoriedade se deu, principalmente, devido à versatilidade para serem usados no ponto de atendimento (POC). Outra classe de sensores que cresceu substancialmente foram os dispositivos eletroquímicos baseados em papel, propostos por Dungchai et al.<sup>9</sup> em 2009, o que possibilitou que o substrato de papel, de baixo custo, pudesse ser explorado para uma gama de análises.

Nessa perspectiva, o campo da microfabricação dedicada ao desenvolvimento de dispositivos analíticos, que apresentam como características o baixo custo, a descartabilidade, a portabilidade, e obedecem à determinados princípios da química verde, expandiu-se consideravelmente nos últimos anos, especialmente no contexto dos sensores eletroquímicos e colorimétricos<sup>10,11</sup>. No que se refere à produção das plataformas analíticas supramencionadas, pode-se utilizar materiais mundialmente acessíveis como substratos à base de papel<sup>12</sup>, materiais poliméricos<sup>13</sup> e tintas alternativas<sup>14</sup>, por exemplo. Ademais, inúmeras tecnologias podem ser exploradas para produzir sensores eletroquímicos e colorimétricos.

### **1.1.1. Sensores eletroquímicos**

Sensores eletroquímicos são uma subclasse de sensores químicos, cujo funcionamento baseia-se na integração entre a parte receptora do dispositivo e um transdutor eletroquímico, capaz de transformar uma informação eletroquímica adquirida da interação entre o analito e o eletrodo em um sinal elétrico mensurável<sup>15-18</sup>. Alguns de seus louváveis atributos são

ser compatíveis com a miniaturização, necessitar de baixo volume de amostra e reagentes, produzir uma baixa quantidade de resíduos, permitir análise no campo e fornecer resultados similares a algumas técnicas convencionais em termos de detectabilidade, sobretudo quando se procede com modificação da superfície do eletrodo de trabalho<sup>19,20</sup>.

#### 1.1.1.1. Técnicas de fabricação

Inúmeras técnicas podem ser aplicadas na fabricação de sensores eletroquímicos. Pode-se mencionar, por exemplo, a pintura direta<sup>21</sup>, a gravação a laser<sup>22</sup>, a impressão 3D<sup>23</sup>, a impressão a jato de tinta<sup>24</sup> e a serigrafia/impressão por estêncil<sup>25</sup>; sendo que a última tem recebido uma crescente notoriedade. A impressão por estêncil, voltada para a fabricação de sensores eletroquímicos, é uma técnica simples, versátil e economicamente acessível. A partir dessa abordagem, tintas condutivas de elevada viscosidade são espalhadas manualmente com o auxílio de espátulas ou rodos sobre as máscaras (contendo o *layout* dos eletrodos) previamente fixadas no substrato de interesse. Assim, a tinta é incorporada ao substrato<sup>26</sup> e, quando a máscara (comumente feita de transparência, vinil adesivo ou poliéster) é removida, a geometria dos eletrodos fica impressa na plataforma escolhida<sup>19</sup>. A próxima etapa consiste na cura da tinta condutiva (em temperatura ambiente, tratamento UV ou aquecimento entre 60 - 90 °C, por exemplo<sup>14,27,28</sup>, seguida pela pintura dos eletrodos de referência com tinta condutora de prata (quando necessário) e adição de uma barreira hidrofóbica.

Uma característica apreciável inerente aos eletrodos impressos produzidos via impressão por estêncil é a versatilidade dos materiais que podem ser utilizados como substrato. A literatura destaca o uso de materiais cerâmicos, diferentes tipos de papel e filmes poliméricos<sup>29</sup>. Em termos de plataformas de papel, exemplos usuais incluem papel cromatográfico<sup>30</sup>, papel de filtro<sup>31</sup>, papel fotográfico<sup>32</sup>, papel de pedra<sup>33</sup>, papel vegetal<sup>34</sup>, papel impermeável<sup>35</sup> e papel de escritório<sup>36</sup>. Por sua vez, materiais termoplásticos amplamente utilizados para construção de sensores eletroquímicos são poliéster<sup>37</sup>, tereftalato de polietileno (PET)<sup>38</sup>, filme de poliimida<sup>39</sup> e filmes de transparência<sup>40</sup>.

No tocante aos materiais carbonáceos eletródicos, grafite, negro de fumo (NF), grafeno e nanotubos de carbono têm sido usados impulsionados pela relação custo-benefício, ampla janela de potencial, compatibilidade com modificações (bio)químicas<sup>36,41-43</sup>. Frequentemente, formulações baseadas em negro de fumo, nanotubos de carbono e grafeno fornecem tintas condutoras com taxas de transferência de elétrons superiores em comparação ao grafite sozinho, devido à sua elevada área de superfície e condutividade aprimorada. No entanto, é importante mencionar que o ligante presente na composição da tinta pode influenciar negativamente, dificultando a transferência de elétrons. Portanto, pode ser necessário realizar tratamentos no eletrodo de trabalho, como ativação eletroquímica, tratamento a laser e plasma ou polimento mecânico, para melhorar o desempenho analítico<sup>44-48</sup>.

Para tintas condutoras baseadas em componentes metálicos (incluindo nanopartículas), prata, cobre e ouro se destacam devido às suas propriedades excepcionais, como alta condutividade e baixa resistividade elétrica. Por outro lado, em comparação com as tintas à base de carbono, o custo é mais elevado, especialmente para prata e ouro<sup>49,50</sup>.

Dentre os substratos pode-se destacar materiais como papel, tecido e plástico, por exemplo<sup>51</sup>. As principais vantagens inerentes a este protocolo de produção de sensores são a liberdade para elaborar o *design* dos dispositivos, a produção em larga escala e a possibilidade de utilização de tintas condutoras alternativas<sup>52</sup>. Entretanto, algumas limitações podem ser encontradas em termos dos resíduos gerados, tempo de secagem da tinta e uso de solventes na formulação da tinta<sup>51,53</sup>. Outro aspecto notável no âmbito do campo da microfabricação dedicado ao desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos é a enorme variedade de tintas condutoras disponíveis para uso, que abrange opções comercializadas e caseiras, especialmente aquelas baseadas em compostos de carbono ou nanopartículas metálicas<sup>14</sup>.

#### 1.1.1.2. Desenvolvimento de tintas condutoras

A área de pesquisa que envolve a síntese de novas tintas condutoras visando à construção de sensores eletroquímicos e biossensores miniaturizados, ambientalmente corretos e de custo acessível, tem ganhado

significativa notoriedade na comunidade científica<sup>14,54</sup>. Em geral, as tintas condutoras são formadas por um ou mais materiais condutores, um polímero denominado aglutinante e, opcionalmente, solvente<sup>55</sup>. Adicionalmente, algumas formulações podem experimentar a adição de um agente estabilizante, tal como um surfactante<sup>56</sup>.

No que se refere à porção condutora do material eletródico, pode-se mencionar o uso de inúmeros metais, como prata, ouro e cobre, por exemplo, uma vez que esses apresentam baixa resistência elétrica, apreciável condutividade e, ainda, elevada taxa de transferência de elétrons<sup>49,50,57</sup>. Em contrapartida, apresentam um custo elevado. Outras fontes de componentes condutores são os materiais à base de carbono, tais como nanotubo de carbono, grafeno, grafite e negro de fumo, o qual são vastamente explorados para a construção de trilhas condutivas<sup>14,58,59</sup>. A extensiva utilização dos componentes carbonáceos para a elaboração de sensores está relacionada principalmente ao custo mais acessível, ampla janela de trabalho e, ainda, compatibilidade com a modificação da superfície do eletrodo de trabalho com nanomateriais e elementos de reconhecimento biológico. Além disso, os eletrodos à base de carbono podem ter o desempenho eletroquímico aprimorado a partir de diferentes processos de ativação<sup>44-48,58</sup>.

O material aglutinante (ou ligante), tem como finalidade agregar as partículas condutoras nas formulações e contribuir com a adesão da tinta ao substrato, permitindo a formação de um filme. Consequentemente, desempenha um papel crucial na distribuição uniforme do componente condutor sobre o substrato, bem como influencia a flexibilidade do dispositivo<sup>14</sup>. Alguns exemplos acessíveis e bem-sucedidos dedicados à construção de sensores eletroquímicos são: verniz vitral<sup>41</sup>, óleo mineral<sup>60</sup>, resina de poliéster<sup>61</sup>, goma laca<sup>37</sup>, polidimetilsiloxano<sup>62</sup>, reuso de filamentos de impressão 3D<sup>34</sup> e esmalte de unhas<sup>63</sup>. Entretanto, a presença desses materiais pode aumentar a resistência elétrica da tinta, uma vez que a maior parte dos polímeros usados para essa finalidade são compostos de cadeias orgânicas não conjugadas, classificados como isolantes elétricos. Alternativamente, pode-se empregar polímeros condutores como a polianilina, poli(3,4-etilenodioxitiofeno) e o polipirrol<sup>14,59</sup>.

Em relação aos solventes, frequentemente empregados para ajustar a viscosidade da tinta, de acordo com a necessidade da aplicação, como anteriormente mencionado, pode-se optar por utilizá-los ou não. Sua função é auxiliar na fluidez da tinta, ajustar a viscosidade e, paralelamente, facilitar a aplicação da mesma sobre a plataforma de interesse. Outro importante fator a ser mencionado é que deve haver afinidade entre o solvente e o aglutinante para permitir uma efetiva dispersão dos componentes da formulação. Assim, solventes orgânicos e voláteis são preferíveis, dado que o ligante é comumente polimérico e auxilia na redução do tempo do processo de cura da tinta. Pode-se mencionar a recente utilização de tolueno, acetona e etanol, por exemplo<sup>14,58,64,65</sup>. Todavia, uma questão associada ao impacto ambiental do uso de componentes tóxicos tem sido levantada e discutida<sup>54</sup>. Dessa forma, alternativas mais sustentáveis como o uso de água também têm sido exploradas.

Sob o ponto de vista do viés ambiental, insumos ecologicamente corretos são preferíveis no âmbito das tintas condutivas. Nesse contexto, em termos de aglutinantes, resinas naturais são uma excelente alternativa que tem possibilitado a construção de sensores eletroquímicos com sucesso, em associação com o uso de solventes de menor toxicidade. Um exemplo é a goma laca<sup>37</sup>. Ademais, fontes de aglutinantes provenientes de fontes de material reciclável também tem emergido como uma abordagem promissora.

Migliorini et al.<sup>66</sup> propuseram um imunossensor eletroquímico miniaturizado, descartável e ambientalmente amigável para a detecção de aflatoxina B1, empregando goma laca como aglutinante da tinta condutora proposta. Para tanto, a nova tinta apresentou como materiais condutores, grafite e negro de fumo, além de um dispersor tipo UltraTurrax®. O eletrodo de trabalho foi posteriormente modificado com um filme de quitosana/nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) e funcionalizado com os elementos de reconhecimento biológico (anticorpos) com sucesso. O sensor foi aplicado na vertente de segurança alimentar.

Em outro estudo, Silva-Neto et al.<sup>34</sup> demonstraram a produção de dispositivos eletroquímicos baseados em papel empregando resíduos de filamentos de impressão 3D de acrilonitrila butadieno estireno (ABS)

solubilizados em acetona como material aglutinante e solvente, respectivamente, e grafite como material condutor. O sensor eletroquímico foi modificado com uma combinação de MWCNTs, óxido de grafeno (GO) e nanopartículas de cobre para detecção amperométrica de S-nitrosocisteína, um importante biomarcador de Alzheimer.

#### 1.1.1.3. Técnicas voltamétricas

No contexto dos métodos eletroanalíticos, inúmeras vantagens como seletividade (ocasionada pela oxirredução de espécies analíticas sob um potencial específico ou devido o material do eletrodo), sensibilidade e baixos limites de detecção, podem ser mencionados<sup>20</sup>. Nesse sentido, as técnicas voltamétricas destacam-se, ainda, por fornecerem respostas analíticas satisfatórias e de modo relativamente simples e com potencial para análise diretamente no local de necessidade<sup>28,54</sup>.

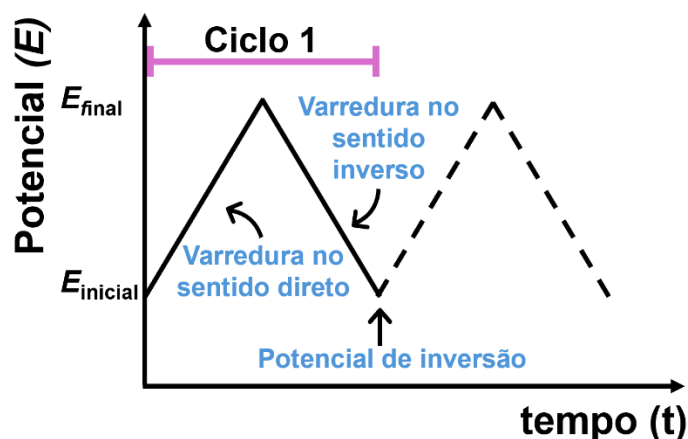
A voltametria pode ser classificada como uma técnica eletroquímica que se baseia nos fenômenos que acontecem na interface eletrodo/solução. Dessa forma, aplica-se uma diferença de potencial sobre a célula eletroquímica entre o eletrodo de referência e de trabalho, o qual faz surgir uma corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, que é medida com o auxílio de um potenciostato. A referida magnitude de corrente que surge pode ser correlacionada com a concentração de espécies eletroativas de interesse e promover o desenvolvimento de protocolos analíticos para a identificação quantitativa e qualitativa de inúmeros compostos<sup>20</sup>. Algumas técnicas voltamétricas amplamente utilizadas nas análises de espécies eletroativas são a voltametria cíclica, a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada.

##### 1.1.1.3.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma importante técnica eletroanalítica. Embora ela não seja amplamente explorada no contexto das análises quantitativas, é frequentemente utilizada em caracterizações eletroquímicas, estudo de reações de oxirredução, detecção de intermediários de reações químicas, acompanhamento de produtos de reações<sup>67</sup> e monitoramento da

taxa de reações eletroquímicas, por exemplo<sup>68</sup>.

Na VC, primeiramente a varredura de potencial é feita em um sentido e, na sequência, é invertida para a outra direção, durante a medida dos valores de corrente<sup>67</sup>. A forma de aplicação do potencial na VC está esquematizada na Figura 1.1. Conforme pode ser observado, durante um experimento de VC, o potencial é varrido de maneira linear em função do tempo, no eletrodo de trabalho estacionário, com a solução mantida em repouso, de modo que o valor de potencial é alternado entre crescente e decrescente<sup>20</sup>. Dessa forma, tem-se o valor de potencial inicial, a varredura no sentido direto, a varredura no sentido inverso, o potencial de inversão e o início de um novo ciclo. Paralelamente, o potenciostato registra a corrente proveniente da reação redox como uma função do potencial aplicado. Esse gráfico é denominado de voltamograma.



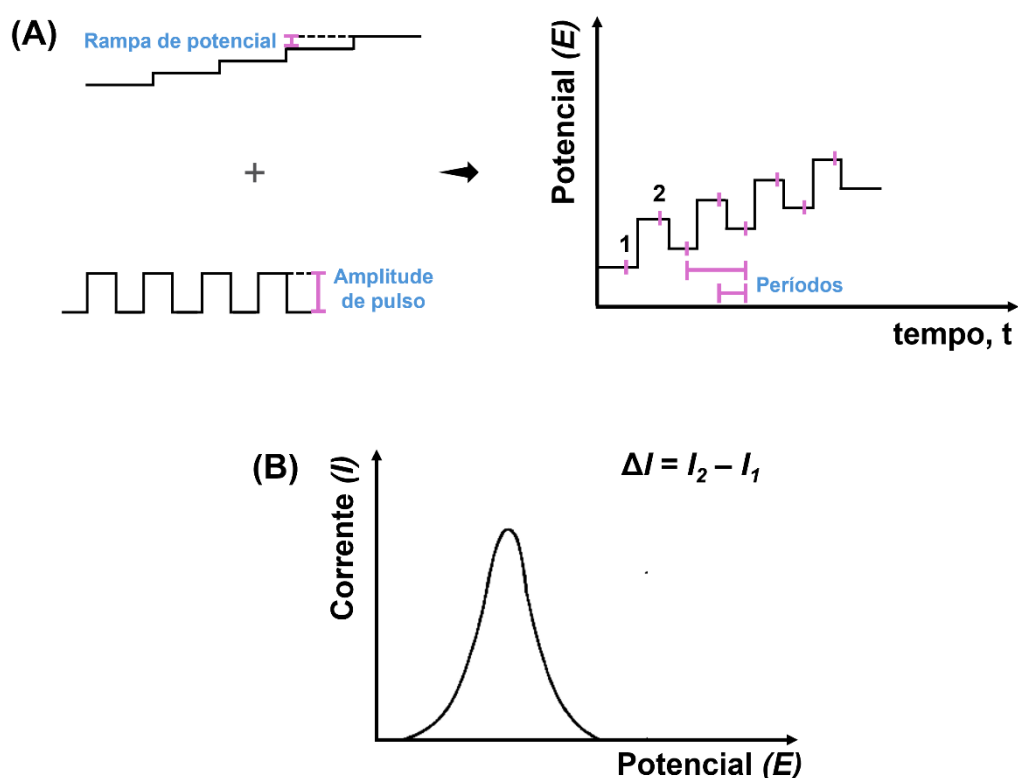
**Figura 1.1.** Representação do sinal de excitação de tensão em função do tempo, característica da técnica de voltametria cíclica. Fonte: Adaptado de Pacheco<sup>20</sup>.

Uma das desvantagens da VC é que os valores de correntes fornecidos possuem contribuição tanto da corrente capacitiva quanto da corrente faradaica. A corrente capacitiva, que é uma corrente de fundo residual, é a corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução. Por sua vez, a corrente faradaica é proveniente da oxirredução da espécie analisada no eletrodo. Dessa forma, a sensibilidade da técnica é ligeiramente reduzida. É importante mencionar que, uma vez que a corrente faradaica decai mais lentamente do que a corrente capacitiva, é

possível discriminá-las. Nesse sentido, uma maneira de atenuar este inconveniente, é recorrer-se às técnicas de pulso, que minimizam a contribuição da corrente capacitiva<sup>20</sup>.

#### 1.1.1.3.2. Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica eletroquímica amplamente usada em análises quantitativas<sup>69</sup>. Na VPD, pequenos pulsos de amplitude ( $a$ ) fixos, sobrepostos a uma rampa de potencial crescente, são aplicados no eletrodo de trabalho, formando uma onda similar a uma escada. A Figura 1.2 A-B reporta esquematicamente essa combinação<sup>20,68</sup>.



**Figura 1.2.** (A) Representação esquemática dos sinais de excitação inerentes à técnica de voltametria de pulso diferencial. (B) Voltamograma característico da técnica de VPD. Fonte: Adaptado de Compton<sup>69</sup>.

Nos experimentos usando VPD, a corrente é amostrada duas vezes. Uma medida ocorre antes do pulso ser aplicado (ponto 1) e a outra, imediatamente ao final do pulso (ponto 2). Dessa forma, a diferença entre as duas correntes é medida instrumentalmente, o qual permite que a corrente resultante seja plotada em função do potencial aplicado, gerando um

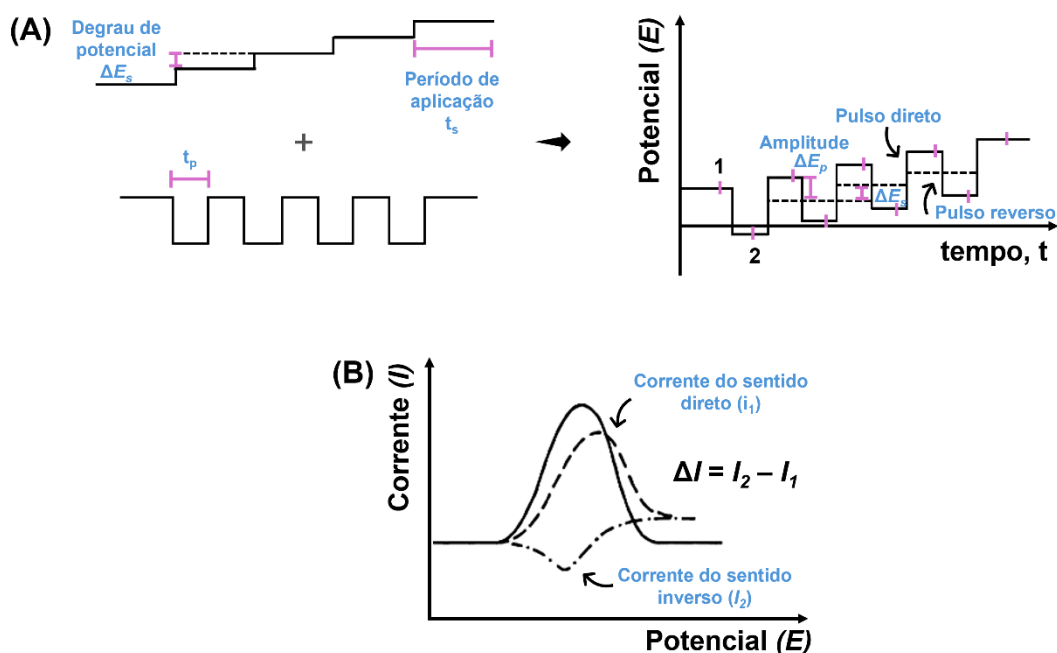
voltamograma similar a uma gaussiana<sup>20,69</sup>. A vantagem de se realizar a leitura da corrente em dois momentos distintos é corrigir a corrente capacitiva.

Quando o pulso é aplicado, ocorre um acréscimo tanto da contribuição da corrente capacitiva quanto da corrente faradaica. Entretanto, a corrente capacitiva decai de maneira exponencial, conquanto a corrente faradaica diminui de modo linear. Sendo assim, selecionando-se um tempo adequado para efetuar a segunda leitura, é possível obter uma corrente total na qual a contribuição da corrente capacitiva é irrisória, e, praticamente, desconsiderada. Esse formato de aquisição de dados permite que sejam obtidos limites de detecção da ordem de  $10^{-8}$  a  $10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> <sup>20,69</sup>.

#### 1.1.1.3.3. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ), consiste em uma das técnicas voltamétricas com maior velocidade na aquisição dos dados. Além disso, a sensibilidade é comparável à voltametria de pulso diferencial, obtendo-se frequentemente, limites de detecção comparáveis às técnicas espectroscópicas<sup>70</sup>.

Na VOQ a forma do pico resultante no voltamograma é proveniente da sobreposição entre pulsos simétricos de amplitude  $\Delta E_p$  e uma rampa de potencial na forma de escada (*staircase*), cuja amplitude é caracterizada por  $\Delta E_s$ , uma largura  $a$  e período  $t_s$ , que é aplicado ao eletrodo de trabalho. As medidas de corrente são realizadas ao final de cada pulso, uma no sentido direto e outra no sentido reverso, cuja diferença entre eles fornece uma corrente resultante de forma diferencial. A magnitude de corrente resultante, assim como na VPD, minimiza a contribuição da corrente capacitiva<sup>20,69,70</sup>. A Figura 1.3 A-B mostra a representação esquemática da forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada e um voltamograma resultante para um sistema reversível.



**Figura 1.3.** (A) Representação esquemática da soma entre uma escada de potencial e uma onda quadrada, característica da VOQ. (B) Típico voltamograma obtido com a VOQ. Fonte: Adaptado de Compton<sup>69</sup>.

A frequência ( $f$ ) da onda quadrada, expressa em  $s^{-1}$ , pode também ser expressa como  $1/t$ .  $\Delta E_p$  representa a amplitude do pulso da onda quadrada em mV, enquanto  $2E_p$  corresponde à amplitude pico a pico.  $\Delta E_s$ , também em mV, é denominado incremento de potencial, que indica a altura do degrau. O produto de  $f$  por  $\Delta E_s$  resulta na velocidade de varredura ( $v$ ) da medida<sup>70</sup>. É importante mencionar que enquanto na voltametria de pulso diferencial a magnitude da velocidade de varredura é habitualmente empregada entre valores de 1 a 10  $mV s^{-1}$ , na voltametria de onda quadrada a velocidade varia de 100 a 1000  $mV s^{-1}$ , o que reduz significativamente o tempo de análise de cerca de 3 a 5 minutos para poucos segundos (3 a 10 s)<sup>20</sup>.

#### 1.1.1.4. Amperometria

A amperometria é uma técnica eletroanalítica bastante usada no campo dos biosensores<sup>71</sup>, tratamento na superfície do eletrodo de trabalho<sup>72</sup>, além da possibilidade de síntese de nanopartículas *in situ* de modo uniforme<sup>73</sup>.

O funcionamento da amperometria ocorre mediante a aplicação de um potencial redutor ou oxidante, constante, a um eletrodo de trabalho. A medição

da corrente faradaica proveniente da reação é realizada em paralelo com o experimento. A magnitude da corrente medida está relacionada à concentração da espécie reduzida ou oxidada. O gráfico que relaciona os valores de corrente em função do tempo é, portanto, obtido, e denomina-se amperograma<sup>74-76</sup>.

Um importante aspecto a ser destacado é que tanto analitos eletroativos quando não eletroativos podem ser analisados de modo indireto, a partir de protocolos de derivatização, ou, ainda, via titulações amperométricas. Entre os aspectos favoráveis dessa técnica destacam-se boa sensibilidade, e a capacidade de distinguir compostos seletivamente mediante seleção cuidadosa do potencial aplicado e/ou o material constituinte do eletrodo.<sup>75</sup> Além disso, é uma técnica proveniente de uma instrumentação portátil, baixo custo e que vem tornando-se cada vez mais atraente devido a combinação com as análises em fluxo, o qual alguns dispositivos evoluíram para a fase comercial, tal como o glicosímetro<sup>77</sup>.

### 1.1.2. Sensores colorimétricos

Os sensores colorimétricos são uma classe de sensores ópticos que operam com base na mudança de cor que ocorre mediante estímulos externos, tal como uma reação química entre um analito e um agente cromogênico<sup>78</sup>. Sendo assim, é possível efetuar a detecção instantânea do analito a partir das alterações na cor, visualmente ou com o auxílio de detectores como *scanners* de bancada, máquinas fotográficas e câmeras de celulares<sup>79,80</sup>.

Nessa vertente, dispositivos microfluídicos baseados em papel ( $\mu$ PADs) são frequentemente utilizados em conjunto com transdutores ópticos. Em geral, essa classe de sensores colorimétricos é construída de modo a criar uma espécie de barreira hidrofóbica que permeia o substrato delimitando “caminhos” hidrofílicos para que a amostra possa ser transportada, por capilaridade, partindo de uma zona de amostragem para uma zona de reação e/ou detecção. Outra opção é utilizar técnicas de recortes para criar a geometria e o canal microfluídico de interesse<sup>6,81</sup>.

Algumas das vantagens associadas ao uso dos  $\mu$ PADs são o baixo

custo, não requerimento de bombas e válvulas para atuar no transporte de amostras, compatibilidade com produção em larga escala, respostas analíticas rápidas, além da portabilidade, o que é extremamente importante em aplicações no local de necessidade<sup>82</sup>. Todavia, os desafios associados a esses dispositivos são a reprodutibilidade e o efeito de lavagem (distribuição não uniforme da coloração), o que requer, em alguns casos, a modificação da superfície do substrato com nanomateriais, por exemplo. Sendo assim, isso pode resultar em um aumento no número de etapas de preparo do sensor, elevando também, o custo final do dispositivo<sup>83,84</sup>.

Inúmeros protocolos podem ser utilizados para produzir sensores microfluídicos, dentre eles, pode-se mencionar a fotolitografia, impressão flexográfica, serigrafia, impressão a cera<sup>85</sup>, impressão a jato de tinta<sup>86</sup>, e recorte à laser<sup>87</sup>.

Outro tipo de sensor que vem ganhando espaço para ser integrado à detecção colorimétrica são os dispositivos impressos via a impressão 3D<sup>88</sup>, o qual fornece uma gama de vantagens particularmente interessantes. Em geral, podem ser produzidos em uma única etapa, de modo automatizado, em larga escala, além de possibilitarem a fabricação de dispositivos reutilizáveis.

Diferentes estratégias podem ser adotadas para elaborar sensores colorimétricos diretamente impressos em 3D. A literatura reporta micropoços, *chips* microfluídicos<sup>89,90</sup>, câmaras de reações, dispositivos híbridos integrados com outros tipos de plataformas analíticas, por exemplo<sup>91-93</sup>. Além disso, a tecnologia de impressão 3D também tem sido empregada na construção de suportes que promovem um melhor controle de luz no contexto de análises colorimétricas<sup>94</sup>, impressão de moldes e/ou sensores e plataformas para serem integradas com dispositivos analíticos comerciais. Em geral, os dispositivos impressos via impressão 3D podem ser classificados em físicos, biossensores e sensores químicos, sendo que, normalmente, os sensores colorimétricos englobam a classe dos biossensores ou sensores químicos. Neste caso, comumente, na forma de sensores líquidos<sup>95</sup>. Quando se trabalha com plataformas diretamente impressas em 3D, uma das vantagens é que a problemática do efeito de lavagem presente nos  $\mu$ PADs não acontece e, além disso, possuem potencial para serem reutilizadas.

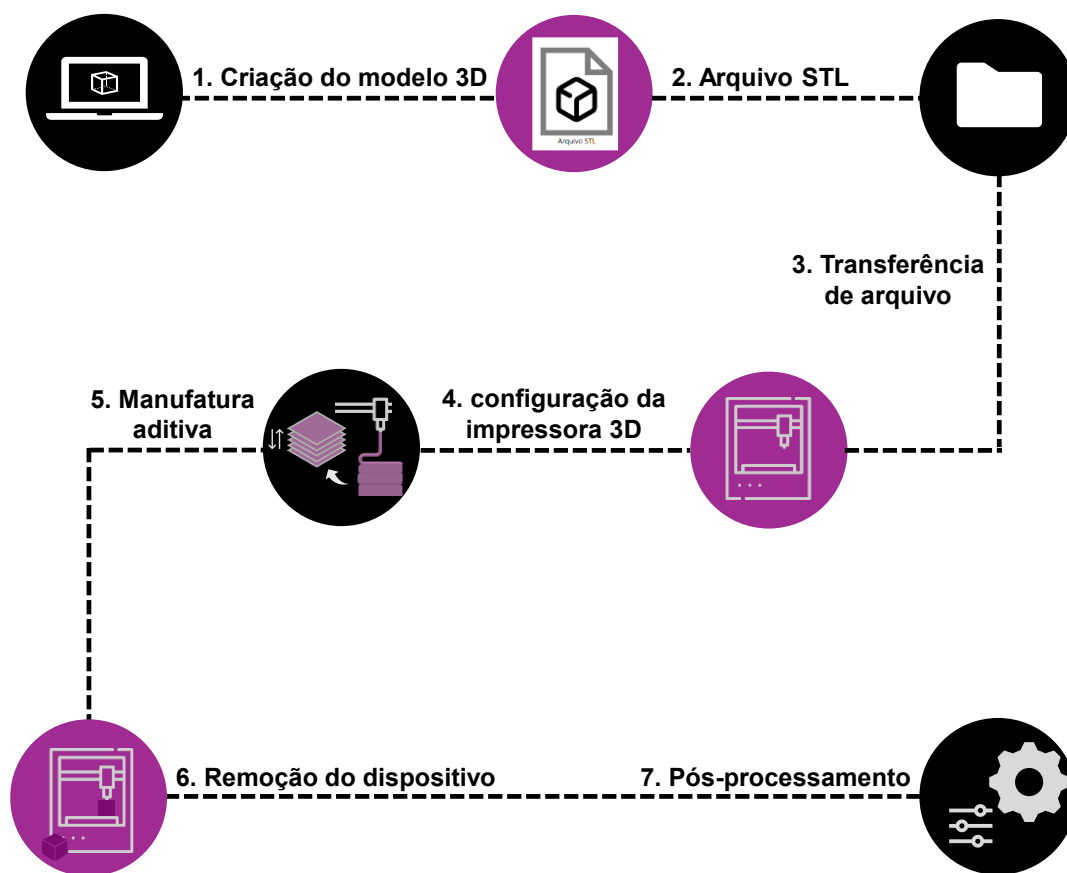
### 1.1.2.1. Impressão 3D

A impressão aditiva, ou impressão 3D, voltada para a fabricação de sensores, pode ser classificada em diferentes tipos, tais como: estereolitografia, sinterização seletiva a laser, jato de tinta/extrusão 3D, impressão de dois fótons, fusão seletiva a laser, fabricação de objeto laminado e a modelo de deposição por fusão (FDM)<sup>96-99</sup>. Em relação aos insumos que podem ser processados pela tecnologia de impressão 3D, pode-se mencionar materiais poliméricos termoplásticos, como acrilonitrila butadieno estireno (ABS), ácido polilático, poliamida (PA), policarbonato (PC), polifenilsulfona (PPSF), plásticos de polipropileno, bem como materiais poliméricos termoendurecíveis, como resinas epóxi, além de metal, cerâmica, tinta metálica, tinta magnética e bio-tinta<sup>95,98,100,101</sup>.

Dentre as tecnologias de impressão 3D, a FDM tem sido amplamente explorada dado a boa relação custo-benefício e sistema de código aberto. Entretanto, uma de suas limitações pode ser a baixa resolução de impressão e velocidade de impressão lenta, quando comparada à outras opções<sup>95</sup>.

Um tipo de impressão 3D, frequentemente usada na produção de plataformas analíticas, é a técnica de FDM. A impressão 3D é uma técnica automatizada de impressão aditiva que possibilita a rápida prototipagem de arquiteturas tridimensionais provenientes de projetos digitais gráficos empregando *software* de *design* auxiliado por computador (CAD)<sup>102</sup>. A partir do desenho criado, é necessário convertê-lo para o formato de arquivo STL (do inglês, *stereolithography*), compatível com os *softwares* de impressoras 3D, o qual convertem o conjunto de dados em um arquivo de código G após ser submetido a um processo denominado de “fatiamento”. Essa etapa, fundamenta-se na geração de sucessivas camadas 2D que seccionam todo o objeto. A depender do módulo de trabalho da impressora 3D, há diferentes princípios de funcionamento. A modelo de deposição por fusão, particularmente, destaca-se por apresentar uma apreciável relação custo-benefício. Nela, emprega-se filamentos poliméricos que, quando submetidos à aquecimento no bico da impressora, passam para um estado semi-líquido, o qual a partir do processo de extrusão, permite que o material de interesse

seja depositado camada por camada, uma sobre a outra, até perfazer o objeto<sup>102-104</sup>. Algumas vantagens inerentes a esse protocolo via FDM são a personalização do *design*, custo acessível e versatilidade de filamentos, dentre as quais, alguns materiais são sustentáveis. As desvantagens, por outro lado, estão relacionadas à resolução da impressão e o tempo de impressão, a depender do *layout*<sup>103,105</sup>. A Figura 1.4 esquematiza resumidamente as etapas necessárias para a construção de objetos tridimensionais a partir do uso da tecnologia de FDM.



**Figura 1.4.** Etapas básicas envolvidas no processo de impressão 3D via FDM. Fonte: Autoria própria.

#### 1.1.2.2. Desenvolvimento de plataformas analíticas

Wu e Wang<sup>106</sup> apresentaram uma plataforma de resina impressa em 3D portátil integrada a um *smartphone* para resolver problemas de captura de sinal. No presente estudo, uma condição de luz homogênea e uma posição fixa da lente do *smartphone* foram estabelecidas. O *layout* do dispositivo consistiu uma rede de canais ocios em forma de flor projetada no centro do

*chip* impresso em 3D, o qual foi preenchido com pó de celulose para promover capilaridade. A plataforma foi utilizada para detectar pesticidas organofosforados e multiensaio de suco de frutas, com sucesso.

Vargas-Muñoz et al.<sup>107</sup> propuseram a fabricação de uma caixa de luz fotográfica impressa em 3D usando a técnica de FDM e filamento PLA de cor preta. A estrutura foi revestida internamente com LEDs e difusor para promover um adequado controle de luz. A montagem da plataforma contou com parafusos em sua construção e foi empregada em associação com microplacas de plástico comerciais de 96 poços, em posição fixa, associados com dispositivos de papel visando a realização de ensaios colorimétricos de compostos voláteis. A aplicação explorada foi na determinação simultânea de amônia e sulfeto. A captura das imagens foi realizada com o auxílio de um *smartphone* e os dados foram analisados com o *software* ImageJ.

Um modelo de utilidade desenvolvido na China<sup>108</sup> mostrou, no âmbito do campo técnico de equipamentos de instrumentos, um dispositivo portátil para análise colorimétrica. A instrumentação conta com uma câmara, porta amostra para cubetas e um suporte para *smartphone*. Além disso, dispõe de um sistema de iluminação diretamente sobre a cubeta e, adicionalmente, filtros ópticos são utilizados para permitir a seleção da absorção específica da amostra de análise colorimétrica.

Diante dos exemplos acima mencionados, a associação entre a técnica de impressão 3D e o uso de detectores colorimétricos são bastante úteis no campo da Química Analítica. Sobretudo, devido a versatilidade, custo acessível e possibilidade de fácil integração com detectores como àqueles voltados para a colorimetria.

### 1.1.2.3. Detecção colorimétrica

No caso do uso de *smartphone*, a detecção colorimétrica comumente ocorre mediante a análise da imagem digital empregando-se aplicativos (app) de celular<sup>109</sup>. Para tanto, capta-se o sinal analítico frequentemente em intensidade de cor/intensidade de *pixel* pelo meio do qual é estabelecida uma correlação com a concentração das espécies químicas analisadas. Neste sentido, utiliza-se canais de cores como o CMYK (do inglês, *cyan*, *magenta*,

*yellow e key (black)*), canais de cinza e RGB (do inglês, *red, green e blue*), HSB (do inglês, *hue, saturation, brightness*)<sup>80,110,111</sup>, dependendo da cor apresentada e da ferramenta de análise. Alguns exemplos de app móveis reportados para análises químicas são: *photometrix*<sup>112</sup>, *pixel picker*<sup>113</sup>, *color picker*<sup>114</sup> e *Color Grab*<sup>115</sup>. É importante mencionar que durante as análises colorimétricas, um adequado controle de luz é um fator primordial para a garantia de análises com qualidade e reprodutibilidade dos resultados. Neste contexto, estabelecer sistemas com essas características, sobretudo visando análises no campo, constitui-se como um desafio<sup>80,116</sup>.

Uma das grandes vantagens da utilização de câmeras de *smartphones* é a portabilidade, a simplicidade e a praticidade no que tange ao tratamento de dados, uma vez que muitos aplicativos já fornecem os valores de intensidade de cor em canais específicos e/ou são capazes de plotar curvas analíticas. Por meio desses sistemas, é possível se obter informações analíticas que vão desde resultados que respondem qualitativamente, aos semiquantitativos e quantitativos<sup>80,111</sup>.

Dentro das aplicabilidades provenientes tanto da detecção eletroquímica, quanto colorimétrica, tem-se inúmeras áreas de interesse abrangendo, inclusive, ambiental<sup>117,118</sup>, alimentícia<sup>12,119</sup>, farmacêutica<sup>120,121</sup>, forense<sup>122,123</sup>, diagnóstico clínico<sup>124,125</sup> e indústria do petróleo<sup>126,127</sup>.

### **1.1.3. Microfluídica digital**

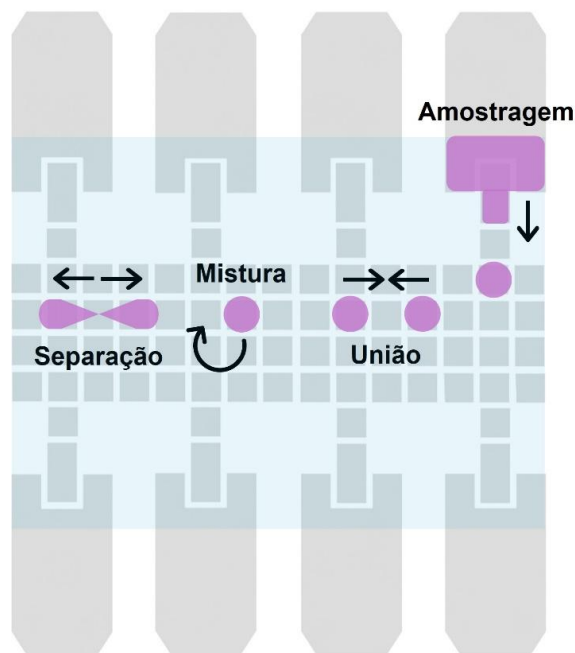
A microfluídica digital é uma tecnologia relativamente emergente que se baseia no uso de forças eletrostáticas para manipular gotículas com volume da ordem de microlitros sobre uma matriz de eletrodos isolados<sup>7,128,129</sup>. Ela foi popularizada no início dos anos 2000, a partir de estudos realizados nos grupos de pesquisa de Fair<sup>130</sup> e Kim<sup>131</sup> na *Duke University* e *University of California, Los Angeles* (UCLA), respectivamente. No trabalho pioneiro, foi possível observar a movimentação de gotículas sobre um material isolante sob a influência da aplicação de potencial elétrico. O fenômeno utilizado para explicar o funcionamento do sistema foi o “*electrowetting*” ou “*electrowetting-on-dielectric*” (EWOD). Essa nomenclatura estava intimamente ligada à observação de mudanças no ângulo de contato entre a gota e a superfície do

dispositivo, no qual o valor do ângulo era reduzido consideravelmente proporcionando um maior contato com a superfície, durante o processo de movimentação da gota. Dessa forma, à medida que o eletrodo adjacente é acionado ou desligado, a gota se movimenta<sup>7</sup>.

Embora o fenômeno de EWOD<sup>132</sup> seja bastante usual para explicar a movimentação de gotículas em microfluídica digital, esse modelo possui algumas limitações, uma vez que não explica o movimento de gotículas no que se refere a líquidos de baixa tensão superficial e que, portanto, não apresentem mudanças expressivas no ângulo de contato. Ademais, não é capaz de explicar o fenômeno de saturação do ângulo de contato. Ou seja, a constância dos valores de ângulo de contato mesmo após um aumento de potencial aplicado (limiar), que não é capaz de resultar em ângulo zero<sup>7,128,133</sup>.

Nessa perspectiva, o modelo eletromecânico, explica tanto o fenômeno da umectação quanto da movimentação de gotículas, baseando-se em forças elétricas em cargas livres e dipolos dentro da gota, para fluidos condutores e dielétricos, respectivamente. Assim, esta abordagem explica o movimento de líquidos dielétricos e líquidos que não sofrem uma mudança no ângulo de contato. Ademais, fornece uma justificativa para o fenômeno da saturação do ângulo de contato, como resultado do equilíbrio entre forças elétricas e de tensão superficial<sup>133,134</sup>.

Uma das principais vantagens da utilização da microfluídica digital é que a manipulação das gotas ocorre sem a necessidade de válvulas, bombas ou misturadores mecânicos<sup>128,135</sup>. Além disso, o transporte de gotículas pode ser controlado de modo independente, paralelo, com alta precisão e de modo reconfigurável a depender do que requer o experimento. As operações de movimentação das gotas incluem amostragem a partir do reservatório, mistura, união, separação e gerenciamento controlado das gotas, de modo automatizado ou em tempo real<sup>128,136,137</sup>. A Figura 1.5 ilustra as operações microfluídicas digitais básicas. Outro ponto positivo é a versatilidade no *design* o que permite combinação com outras técnicas analíticas, tanto voltadas para a separação de compostos quanto de detecção<sup>138</sup>.



**Figura 1.5.** Representação esquemática de procedimentos microfluídicos digitais dentro de um *chip* de placa dupla. As operações básicas envolvem a separação, a mistura, a união e a amostragem de uma gota a partir do eletrodo reservatório. Fonte: Autoria própria.

Como desafios, entretanto, pode-se mencionar o efeito de evaporação das gotas (sobretudo, e dispositivos de configuração de placa única)<sup>139</sup>, vida útil dos dispositivos<sup>116</sup>, bioincrustação<sup>140</sup>, e custo dos dispositivos fabricados via fotolitografia e<sup>128</sup>, em alguns casos, o acesso limitado às salas limpas para fabricar os *chips*, a depender da região<sup>141</sup>. Além disso, o movimento das gotas pode ser comprometido por imperfeições nas camadas dielétrica e hidrofóbica<sup>140</sup>. Outro fator importante a ser mencionado é o rompimento da camada dielétrica, que pode causar danos irreversíveis à superfície, impedindo o funcionamento do dispositivo permanentemente<sup>142</sup>.

No que se refere às limitações da DMF, diversas estratégias podem ser adotadas para atenuar alguns dos problemas que eventualmente possam surgir. Em relação ao processo de evaporação, pode-se trabalhar em câmara úmida, ou em meio oleoso<sup>128,133,143</sup>. No que diz respeito ao custo dos dispositivos, pode-se explorar métodos de fabricação alternativas que não requerem a utilização de sala limpa ou reciclar os dispositivos fabricados via fotolitografia<sup>141,144</sup>. Para evitar processos de bioincrustação, comumente

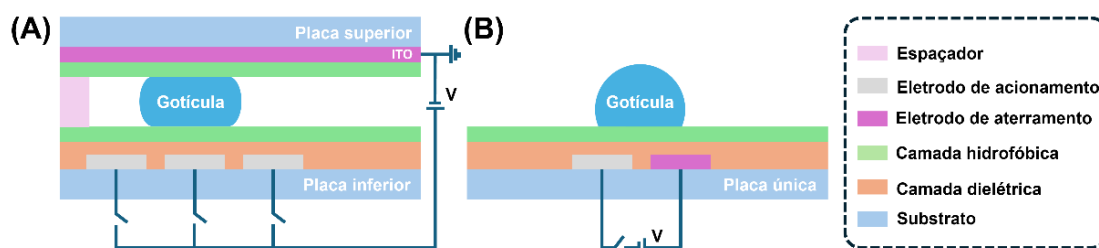
trabalha-se com as gotículas suplementadas com surfactantes<sup>145,146</sup>.

### 1.1.3.1. Fabricação e montagem dos chips microfluídicos digitais

Tipicamente, a arquitetura dos *chips* de microfluídica digital envolve o formato de placa dupla, onde as gotículas são imprensadas entre dois substratos separados por uma lacuna, cuja placa inferior abriga os eletrodos de acionamento e a placa superior, o eletrodo de aterramento<sup>128</sup>. Outro formato possível é o modelo de placa única, no qual as gotículas repousam sobre uma superfície e, portanto, ficam mais expostas ao ar. Neste caso, o substrato inferior é composto tanto pelos eletrodos de atuação, quanto os de aterramento<sup>147</sup>.

Dentre os dois formatos disponíveis, os dispositivos de placa dupla são preferíveis devido algumas vantagens como dispensar gotas do reservatório, possibilidade de separação de gotas, mistura mais eficiente e, redução do efeito de evaporação<sup>128,148</sup>. Por sua vez, embora o modelo de *chip* aberto não seja apto para dividir e distribuir/fracionar gotas a partir do reservatório, e possua uma maior taxa de evaporação do líquido, o *design* aberto facilita o acesso de amostras para detectores externos, além de facilitar a manipulação de gotas de maior volume<sup>148-150</sup>.

Em geral, os componentes dos *chips* microfluídicos digitais são: substrato, eletrodos, conectores, camada dielétrica, camada hidrofóbica e, no caso dos sistemas de duas placas, eletrodos transparentes revestidos com uma camada hidrofóbica (presente na placa superior)<sup>133,138</sup>. A representação esquemática de um dispositivo de duas placas e o modelo de uma placa são demonstrados na Figura 1.6 A-B.



**Figura 1.6.** Representação esquemática da vista lateral de dispositivos de microfluídica digital na configuração de (A) duas placas e (B) uma placa. Fonte: Autoria própria.

Em se tratando de *chips* microfluídicos digitais, os eletrodos podem ser fabricados sobre o substrato (normalmente vidro, plástico, ou placa de circuito impresso), a partir de técnicas como fotolitografia<sup>151</sup>, impressão a jato de tinta<sup>141</sup>, gravação a laser<sup>152</sup> ou serigrafia<sup>153</sup>, por exemplo. Assim, os materiais dos eletrodos são frequentemente compostos por metais como cromo, ouro, cobre, materiais como grafeno, além de tintas condutivas à base de nanopartículas de prata, ouro ou carbono<sup>141,151,153–155</sup>. O arranjo de eletrodos comumente consiste em eletrodos reservatórios (maiores), eletrodos de distribuição e eletrodos de atuação, que também podem ser chamados de eletrodos de condução.

Um aspecto importante em relação ao *design* do dispositivo é que os eletrodos podem assumir diferentes geometrias e pode influenciar, de certa forma, nos valores de potencial aplicados para movimentar as gotículas. Frequentemente, a distância entre os eletrodos adjacentes varia aproximadamente de 20 a 200  $\mu\text{m}$ <sup>128,141,152</sup>. Logo, é requerido uma boa resolução da técnica de fabricação dos eletrodos. Além disso, é preferível que o arranjo de eletrodos possua um *layout* que favoreça a gotícula presente em um eletrodo de atuação ocupar parcialmente o eletrodo adjacente, uma vez que o potencial requerido para movimentar a gota pode ser reduzido nessa condição<sup>156</sup>.

Tanto na configuração de placa dupla como na modalidade de placa única dos *chips* de microfluídica digital, uma camada de um material dielétrico isolante é usada para recobrir os eletrodos, a fim de auxiliar na limitação dos valores de corrente, bem como evitar processos indesejados de eletrólise<sup>142</sup>. Ademais, a presença desse material auxilia no acúmulo de carga ou gradientes de campo, necessários para a atuação das gotículas<sup>128</sup>. A camada dielétrica pode ser depositada a partir de várias técnicas, como deposição de vapor, utilizando materiais como Parileno C<sup>157</sup>, fluoropolímeros amorfos e nitreto de silício<sup>128,139</sup>. Outra opção, é o crescimento térmico, mediante o uso de óxido de silício<sup>128</sup>. Além disso, pode-se empregar a formação de filmes por rotação ou centrifugação (*spin-coating*), com materiais como polidimetilsiloxano (PDMS)<sup>158</sup> e fotorresiste SU-8<sup>159</sup>. Alternativamente, pode-se usar fita adesiva<sup>160</sup> ou à base de poliimida<sup>161</sup>. Outra opção é a técnica de

revestimento por rolo miniatura (*mini roll coater*) empregando cianoresina CR-S cianoetilpululano (CEP)<sup>141</sup>.

A camada hidrofóbica dos dispositivos de microfluídica digital estão presentes tanto na placa inferior, quanto na placa superior (nos casos de dispositivos de placa dupla). Sua função é minimizar a resistência ao movimento das gotículas<sup>162</sup>. Os materiais normalmente usados são Teflon® AF<sup>163</sup>, FluoroPel (de diversos tipos como AF1600), Cytop®<sup>139,161</sup> ou a partir de uma abordagem de melhor custo-benefício utilizando produtos à prova d'água<sup>164</sup>. Comumente, essa camada é depositada via formação de filmes por rotação ou centrifugação, imersão ou utilizando spray. É importante ressaltar que, no caso da placa superior, antes do processo de deposição da camada hidrofóbica, o substrato composto comumente de vidro ou polietileno tereftalato (PET) são acoplados a uma camada condutora transparente de óxido de estanho dopado com índio (ITO), a fim de atuar como um eletrodo de aterramento do sistema<sup>128,139,141</sup>.

Recentemente, uma camada dielétrica e hidrofóbica composta à base de tiol-eno foi proposta por Liu et al.<sup>152</sup> utilizando-se uma mistura dos reagentes pentaeritritol tetrakis mercaptoacetato, trialil-1,3,5-triazina-2,4,6-triona e 2-hidroxi-2-metilpropiofeno-nona. Outro estudo reportado por Jain et al. empregaram poli(dimetilsiloxano) (PDMS) usando uma espessura de 35 µm como camada dielétrica e hidrofóbica, no qual o ângulo de contato de uma gota de água sobre a superfície do dispositivo foi de aproximadamente 109°<sup>165</sup>.

Em termos de montagem dos dispositivos de duas placas, comumente emprega-se fita condutora de carbono ou cobre para estabelecer o contato entre a placa inferior e a placa superior. Além disso, espaçadores, como pedaços de fita adesiva dupla face, são adicionados ao longo do dispositivo para manter uma altura fixa e reproduzível entre as duas placas<sup>166</sup>. Assim, o dispositivo torna-se apto para o uso.

A tecnologia de microfluídica digital tem sido empregada com sucesso nas áreas química<sup>116,167</sup>, diagnóstico clínico<sup>168</sup>, biológica<sup>167,169</sup>, controle de qualidade<sup>170</sup> e química forense<sup>171</sup>, por exemplo. Nessa perspectiva, dentre as inúmeras possibilidades da técnica, uma das aplicabilidades que tem sido

extensivamente explorada desde sua popularização é o preparo de amostra.

### 1.1.3.2. *Preparo de amostras*

O preparo ou pré-tratamento de amostra consiste em uma etapa primordial no campo das análises químicas, sendo frequentemente determinante para o sucesso da análise. Comumente, esse processo é requerido quando se trabalha com matrizes complexas, para evitar interferências de determinadas espécies químicas, pré-concentrar o analito, derivatizar, precipitar componentes ou diluí-la, por exemplo<sup>172,173</sup>. Uma das maneiras de evitar que os procedimentos de preparo de amostra sejam demasiadamente dispendiosos, é recorrer a alternativas automatizadas, dentre as quais, a microfluídica digital tem sido explorada para o preparo de amostras de sangue em plasma, diluições, lise de células, remoção de ácido desoxirribonucleico (DNA), clivagem homolítica sob luz UV e separação magnética, por exemplo<sup>174</sup>.

Os ganhos relacionados à utilização da microfluídica digital no preparo de amostras são o baixo volume de amostra e reagentes usados, a possibilidade de integração de etapas de pré-tratamento e análise na mesma plataforma, além do elevado nível de automação da técnica<sup>128,136,175</sup>.

No que se refere ao preparo de plasma a partir de amostras de sangue, uma das possibilidades é a integração entre o protocolo de preparo de amostra e de etapas de detecção na mesma plataforma. Nesse caso, o diagnóstico clínico pode eventualmente ocorrer de maneira rápida, automatizada e personalizada, auxiliando na tomada de decisão do profissional da saúde quanto ao melhor tratamento.

Dixon et al. demonstraram a integração entre uma plataforma de microfluídica digital com membranas porosas, semelhantes a papel, visando a separação de plasma sanguíneo proveniente de punção digital de modo automatizado. A estratégia adotada englobou o uso de uma membrana de separação (quadrada), posicionada de forma alinhada com os eletrodos reservatórios vizinhos e atravessando um eletrodo de atuação (em formato retangular). Após a inserção do sangue total na membrana de separação, as células sanguíneas são capturadas e o plasma filtrado flui através do

transporte de membrana (formato retangular) sobre eletrodos de atuação. Um tampão de extração é dispensado do eletrodo reservatório e permeia através do papel embebido de plasma, de modo perpendicular, por meio de forças eletrostáticas, para então ser coletada em forma de gotículas e analisado. O protocolo proposto foi comparado com a técnica de centrifugação “padrão ouro”, e, como prova de conceito, um imunoenensaio de IgG do vírus rubéola foi realizado. O limite de detecção foi de  $1,9 \text{ UI mL}^{-1}$ , suficientemente aplicável no diagnóstico clínico<sup>176</sup>.

Narahari et al. propuseram um protocolo utilizando microfluídica digital para extrair RNA viral do Zika usando esferas magnéticas, limpeza de RNA e amplificação isotérmica seletiva. Pequenos volumes de  $5 \mu\text{L}$  de amostras aquosas e plasmáticas simuladas, além de suspensões do vírus cultivado foram analisados de modo portátil, automatizado e integrando múltiplas etapas. Os cartuchos de DMF usados eram de configuração fechada, o que promovia um ambiente umidificado para o procedimento de ciclagem térmica sob temperatura elevada. Um ensaio colorimétrico baseado em papel para RNA amplificado do Zika foi empregado. O limite de detecção para RNA livre no plasma foi próximo a 1000 cópias por mL, e entre 10 e 100 PFU  $\text{mL}^{-1}$  em amostras contendo partículas do vírus Zika. Sob ensaios analíticos às cegas, a sensibilidade e a especificidade do método foram de 100 e 75%, respectivamente. A plataforma foi então transportada para Recife, Brasil, e aplicada na detecção do vírus Zika no nível de 100 PFU  $\text{mL}^{-1}$ , demonstrando seu potencial para diagnóstico automatizado e portátil<sup>177</sup>.

#### 1.1.3.3. Métodos de detecção

Conforme mencionado anteriormente, a tecnologia de microfluídica digital pode ser integrada com diversas técnicas analíticas. Esse acoplamento pode promover análises *in-line*, *on-line* e *off-line*, por exemplo. Nos sistemas de análise *in-line*, os constituintes das gotículas são analisados dentro do dispositivo em tempo real. No que se refere às análises *on-line*, ocorrem enquanto o processo está em execução, mas as amostras são geralmente retiradas e transportadas para um analisador localizado nas proximidades. Por sua vez, nas análises *off-line*, tem-se que a amostra é coletada e

analisada fora do dispositivo, geralmente, em outro ambiente<sup>138,178</sup>.

Nesse contexto, pode-se destacar as técnicas de espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, eletroforese capilar, fluorescência, reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>179</sup>, amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)<sup>180</sup>, ressonância plasmônica de superfície<sup>181</sup>, quimiluminescência<sup>182</sup>, eletroquimiluminescência<sup>183</sup> colorimetria<sup>116</sup> e eletroquímica<sup>151</sup>. Essas inúmeras possibilidades tornam a DMF uma plataforma atraente para implementar análises laboratoriais de rotina<sup>135,139</sup>.

Inúmeros estudos têm se dedicado a propor novas formas de integração entre detectores e as plataformas microfluídicas digitais, a fim de facilitar o acesso da amostra com sistema de detecção<sup>116,135,184-186</sup>. Comumente, independentemente do tipo de transdução empregada (elétrica, mecânica, óptica ou eletroquímica), importantes alterações na estrutura dos *chips* de microfluídica são requeridos. Em geral, as modificações necessárias no *layout* ocorrem adaptando-se a placa superior ou inferior dos dispositivos<sup>135</sup>. Um exemplo é a utilização da placa superior transparente usando ITO como eletrodo para permitir o acesso óptico à amostra<sup>187</sup>. O recorte da placa superior para a inserção de sensores eletroquímicos também foi explorado<sup>186</sup>. Outro exemplo de modificação é a fabricação de sensores eletroquímicos diretamente na placa inferior, o que pode ser relativamente laborioso e limitar o reuso do dispositivo<sup>151</sup>.

#### **1.1.4. Aplicações de sistemas analíticos portáteis**

Dados os avanços da miniaturização e automação de plataformas analíticas, o desenvolvimento de procedimentos analíticos portáteis tem sido impulsionado em diferentes campos, proporcionando análises rápidas, simples e com a promessa de serem aplicadas diretamente no local de interesse, como mencionado anteriormente. Por meio do uso de sensores eletroquímicos, dispositivos colorimétricos, microfluídica digital e tecnologia de impressão 3D, áreas como diagnóstico clínico, controle de qualidade de produtos farmacêuticos e indústria petroquímica podem ser categorizadas como potenciais campos de aplicação para fins de diagnósticos, pesquisas e interesses industriais.

#### 1.1.4.1. Diagnóstico clínico

A obtenção de cuidados médicos de alta qualidade e acessíveis continua a ser um obstáculo para diversas comunidades. Em vista disto, as plataformas analíticas usadas no pronto atendimento são uma alternativa formidável para promover o rápido acesso a diagnósticos e descentralizar os atendimentos nos hospitais, permitindo que o paciente inicie o tratamento necessário o mais cedo possível<sup>6</sup>.

Uma ferramenta apreciável para fornecer diagnósticos precisos e seletivos é o uso de biossensores eletroquímicos<sup>188,189</sup>. Resumidamente, eles consistem em uma subclasse de sensores químicos, que combinam a sensibilidade oriunda de transdutores eletroquímicos com a elevada especificidade proveniente de processos de reconhecimento biológico. Os biossensores contêm um elemento de reconhecimento biológico (tais como enzimas, proteínas, anticorpos, ácidos nucleicos, ou receptores) que possuem a capacidade de reagir seletivamente com analito alvo, produzindo um sinal elétrico associado à concentração do analito em estudo<sup>190–193</sup>.

Outra classe de dispositivos importantes são os sensores eletroquímicos miniaturizados. Alguns exemplos de aplicações desses dispositivos na área de diagnóstico clínico incluem a detecção de infecções virais e doenças como, influenza<sup>194</sup>, dengue<sup>195</sup>, *chikungunya*<sup>196</sup>, ebola<sup>197</sup>, zika<sup>198</sup>, *monkeypox*<sup>199</sup> e COVID-19<sup>200</sup>. Além disso, esses dispositivos podem ser utilizados para diagnosticar e/ou monitorar outras doenças, como fibrose cística<sup>201</sup> e a doença de Alzheimer<sup>54</sup>.

A pandemia relativamente recente, desencadeada pela disseminação em massa do vírus da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), destacou a vital importância de diagnósticos rápidos para conter a propagação da doença, monitorá-la e, sobretudo, realizar os tratamentos necessários. Nesse cenário, a proposição e aperfeiçoamentos de métodos analíticos que forneçam diagnósticos rápidos, acessíveis, seletivos e aplicáveis no local de interesse são comumente demandas imediatas que precisam ser atendidas continuamente<sup>202–205</sup>.

Outro exemplo relevante é a fibrose cística, uma das doenças que podem ser diagnosticadas na triagem neonatal (teste do pezinho), ou quando

há suspeita clínica. Em caso positivo, prossegue-se com a investigação por meio do teste do suor. Fornecer resultados precisos, acessíveis e dentro do período estabelecido pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) é imprescindível para o alcance de bons prognósticos<sup>206,207</sup>. Os sensores portáteis possuem potencial para alavancar tanto esse quanto diagnósticos similares.

No âmbito dos distúrbios neurológicos, ou das doenças neurodegenerativas, que interferem no sistema nervoso central e periférico e são associadas a déficits cognitivos, o Alzheimer (60-70% dos casos) e a doença de Parkinson merecem uma atenção especial<sup>6,54</sup>. A partir do banco de dados da OMS, estima-se que centenas de milhões de pessoas em todo o mundo sejam afetadas por doenças neurológicas<sup>208</sup>. Assim, um diagnóstico precoce é importante para melhorar a qualidade e a expectativa de vida dos indivíduos afetados por essas condições clínicas.

#### *1.1.4.2. Controle de qualidade de produtos farmacêuticos e suplementos*

O controle de qualidade de ativos farmacêuticos é indispensável, uma vez que é por intermédio dele que se verifica e atesta-se a qualidade do fármaco, garantindo sua eficiência terapêutica, bem como a ausência de impurezas que oferecem risco à saúde<sup>209</sup>. Outras atribuições que englobam o controle de qualidade é identificar eventuais falhas, otimizar os processos de produção dos medicamentos e uniformizar a produção dos insumos farmacêuticos. Além disso, a importância dos procedimentos vinculados às boas práticas de fabricação de medicamentos decorre do fato de que medicamentos contaminados com resíduos nocivos ou fora da dosagem necessária, podem gerar sérios problemas de saúde<sup>210-212</sup>.

Ainda no âmbito da indústria farmacêutica, uma importante classe de produtos, amplamente comercializados e que requer atenção especial, são os suplementos alimentares. Esses produtos são produzidos para serem usados devido aos seus nutrientes, que podem beneficiar a saúde. Entretanto, o crescimento vertiginoso nas vendas, concomitante com a ausência de uma regulamentação eficaz, torna esse mercado mais suscetível a acessar produtores adulterados ou de qualidade comprometida (como contaminação

por pesticidas e micotoxinas), oferecendo prejuízos à saúde humana<sup>213</sup>.

Um exemplo de suplementos alimentares amplamente comercializados é o dos aminoácidos (como a L-cisteína, L-lisina, L-serina e L-alanina, por exemplo), cuja utilização tem crescido consideravelmente<sup>214</sup>. Nessa perspectiva, no começo da década de 2000, estabeleceu-se o Conselho Internacional sobre Ciência de Aminoácidos (ICAAS, do inglês, *Indispensable Amino Acid Score*), com a finalidade de inúmeras empresas produtoras de aminoácidos registrarem dados de segurança sobre o uso de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas em humanos e assegurarem o monitoramento dos padrões de pureza em suplementos alimentares que contêm aminoácidos na formulação<sup>215</sup>.

Dentro desse paradigma, algumas técnicas analíticas são comumente exploradas para atestar a qualidade de insumos farmacêuticos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência cromatografia gasosa, titulação, espectroscopia UV-Vis, espectrometria de massas, análise termogravimétrica e espectroscopia no infravermelho próximo<sup>216,217</sup>. Alternativamente, os sensores eletroquímicos são uma promissora ferramenta analítica para a análise de produtos de interesse farmacêutico, graças à sua capacidade de fornecer resultados rápidos, simples e acessíveis<sup>218</sup>. Dessa forma, propor métodos analíticos aprimorados, com as características supramencionadas, pode auxiliar demasiadamente nas análises de rotina das indústrias farmacêuticas, a um apreciável custo-benefício<sup>219</sup>.

#### 1.1.4.3. Indústria petroquímica

A indústria petroquímica é uma das forças econômicas de maior impacto no cenário mundial. À essa indústria compete abastecer matrizes energéticas, efetuar exportações, arrecadar recursos no país e, e fornecer insumos para a fabricação de inúmeros produtos. No que concerne às demandas energéticas, diversas etapas compõem o processamento da matéria-prima até a finalização dos produtos acabados<sup>220</sup>. Essas operações unitárias precisam e devem ser acompanhadas por procedimentos que atestem a qualidade dos produtos gerados. Por conseguinte, a gestão da qualidade nos processos, bem como a atenção aos resíduos produzidos e, a

busca por métodos mais verdes, configura-se como uma necessidade significativa no âmbito da área em questão<sup>220-222</sup>.

Inerentes ao sistema de transportes de produtos, bem como nas etapas de exploração do petróleo ou gás natural, há comumente uma problemática de acúmulo de sais inorgânicos nas tubulações<sup>223</sup>. Em geral, esses sais inorgânicos apresentam-se nas formas de sulfato de bário, cálcio e estrôncio, ou ainda, como carbonato de cálcio. O efeito que os compostos supracitados causam nas tubulações resultam em problemas operacionais, além de interrupções da cadeia produtiva, o que podem acarretar em prejuízos econômicos<sup>224</sup>. Dessa forma, comumente emprega-se agentes químicos com propriedades que inibem a formação de tais sais nas tubulações<sup>225</sup>.

Conquanto o uso de agentes inibidores de incrustação seja importante para prevenir a deposição de sais, esses compostos podem ocasionar impactos ambientais e desequilíbrios ecológicos, inclusive em etapas de extração do óleo ou na água produzida<sup>226</sup>. A matriz de água produzida é considerada um dos maiores fluxos de resíduos gerados na indústria de petróleo, óleo e gás<sup>227,228</sup>. Ela provém dos processos de perfuração e extração visando produção de petróleo e, portanto, é contaminada com diversos poluentes, incluindo metais pesados, espécies orgânicas e sólidos dissolvidos/suspensos<sup>227</sup>. Além disso, pode experimentar a presença de elevadas quantidades de outros produtos químicos tóxicos utilizados durante o processo de recuperação do petróleo, tais como: inibidores de corrosão e incrustação, desemulsificantes, metanol, glicol, biocidas, além de uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos<sup>227,229</sup>.

A problemática ambiental intrínseca à água produzida, principalmente em áreas *offshore* no qual a descarga é realizada diretamente no mar, pode ser impactada em diferentes graus a depender da toxicidade e concentração dos constituintes<sup>228</sup>. Dessa forma, é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação e quantificação desses compostos em efluentes de tratamento de águas residuárias<sup>230</sup>.

Nesse contexto, o presente trabalho apresenta inovações em plataformas analíticas eletroquímicas, microfluídica digital e colorimétrica para aplicações clínicas, controle de qualidade de produtos farmacêuticos e

indústria petroquímica. Para tanto, introduz-se um novo dispositivo eletroquímico ecologicamente correto voltado para o diagnóstico da COVID-19. Propõe-se um novo sensor eletroquímico portátil à base de laca chinesa, grafite e negro de fumo modificado com nanopartículas de prata para o diagnóstico de fibrose cística. Aplica-se um método eletroanalítico em associação com a DMF para a análise de L-cisteína visando executar procedimentos de controle de qualidade de produtos farmacêuticos, além da quantificação do mesmo no plasma sanguíneo. Por fim, emprega-se um novo dispositivo colorimétrico portátil e ambientalmente amigável para a detecção de vinil sulfonato de sódio visando a detecção de inibidores de incrustação em amostras de água produzida. Os resultados serão apresentados, a seguir, em cinco outros capítulos.

## **Capítulo 2 - Imunossensor eletroquímico descartável e ecológico para detecção rápida de SARS-CoV-2**

## RESUMO

Neste capítulo é apresentado o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico simples, descartável e ecológico para detecção rápida do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Os dispositivos eletroquímicos foram fabricados por impressão em estêncil usando materiais de baixo custo, como filmes de poliéster, flocos de grafite e resina natural. O imunossensor foi construído empregando-se nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina, glutaraldeído, anticorpo monoclonal anti-SARS-CoV-2 proteína S (Ab1) como receptor biológico e albumina sérica bovina como agente de bloqueio. O diagnóstico da COVID-19 foi baseado em medidas rápidas de voltametria de onda quadrada usando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como sonda redox. O método apresentou uma resposta linear na faixa de concentração de  $250 \text{ pg mL}^{-1}$  a  $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína *spike*, com um limite de detecção de  $36,3 \text{ pg mL}^{-1}$ . O imunossensor proposto foi estável por até duas semanas quando armazenado a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e demonstrou excelente desempenho clínico no diagnóstico de COVID-19 quando aplicado a um painel de 44 amostras de *swab* não diluídas coletadas de pacientes sintomáticos. Em comparação com os resultados obtidos pela reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa o imunossensor proposto ofereceu 100% de precisão, surgindo assim como um candidato alternativo poderoso para testes de rotina e descentralizados, o que pode ser útil no controle do surto de COVID-19.

**Palavras-Chave:** *dispositivo eletroquímico, biossensor, diagnóstico clínico, COVID-19.*

## 2.1. INTRODUÇÃO

Os casos de pneumonia denominados síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) originados em Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019, impactaram negativamente a saúde pública, com milhares de mortes. Segundo o painel de controle do coronavírus da Organização mundial da saúde (OMS) registrado em 2023, os casos confirmados no mundo foram de cerca de 765 milhões, com aproximadamente 7 milhões de mortes envolvendo a infecção por SARS-CoV-2<sup>231,232</sup>. Por esta razão, esforços massivos foram dedicados ao desenvolvimento de métodos de teste acessíveis, descentralizados e acessíveis para detectar SARS-CoV-2, principalmente no ponto de atendimento (POC) <sup>233,234</sup>.

A partir de 2021, a busca por dispositivos analíticos que fornecem resultados rápidos para detecção de coronavírus aumentou significativamente, resultando em inúmeros testes aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA<sup>203,235</sup>. Apesar das opções disponíveis para testes *point-of-care* (POCT), alguns protocolos apresentam limitações em termos de sensibilidade e lutam para manter a sua capacidade de detectabilidade em baixas cargas virais. Consequentemente, a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) ainda é a técnica mais recomendada, sensível e padrão-ouro<sup>236</sup>. Embora o ensaio RT-qPCR apresente limites de detecção (LODs) mais baixos e alta especificidade, suas etapas podem levar várias horas para serem concluídas desde o local de coleta da amostra até o diagnóstico final. Além disso, este é um método de custo relativamente alto.

Outros métodos analíticos frequentemente usados para detectar coronavírus 2019 (COVID-19) incluem ensaios imunoenzimáticos (ELISA) realizados em laboratórios e ensaios de fluxo lateral portáteis (LFAs), nos quais o princípio de funcionamento é associado ao reconhecimento específico de antígenos ou anticorpos<sup>236</sup>. A abordagem ELISA apresenta limitações semelhantes às observadas no método PCR, como instrumentação cara, operadores altamente qualificados e análises de longo prazo que limitam os testes POC, principalmente em países em desenvolvimento<sup>237,238</sup>. Por outro lado, os LFAs podem oferecer sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA e os dispositivos podem ser fabricados utilizando materiais de custo acessível e

fáceis de usar<sup>239</sup>. Desta forma, é desejável que métodos de teste acessíveis combinem o desempenho analítico de um ELISA laboratorial e a facilidade de utilização dos LFAs.

Nesse contexto, os biossensores eletroquímicos também exibem desempenho adequado tal como aqueles encontrados nas abordagens ELISA e LFAs. Os dispositivos eletroquímicos são compatíveis com tintas condutoras alternativas e técnicas de fabricação em microescala que consomem uma quantidade mínima de reagentes e amostras. Técnicas de impressão 3D, desenho a lápis, gravação a laser e impressão em estêncil são as opções mais populares para a construção de dispositivos eletroquímicos descartáveis<sup>240,241</sup>. Além disso, sensores eletroquímicos alternativos podem ser fabricados usando abordagens ecologicamente corretas a partir do uso de componentes naturais, biodegradáveis, não tóxicos e materiais recicláveis<sup>34,242</sup>. Esses sensores associados a receptores biológicos podem ser úteis para realizar análises eletroquímicas de biomarcadores e diagnóstico precoce de infecções virais, por exemplo<sup>242</sup>. Os biossensores oferecem uma resposta rápida em poucos minutos em comparação com as técnicas convencionais mencionadas anteriormente<sup>243,244</sup>. Em relação à detecção da infecção por SARS-CoV-2, diversas estratégias de biossensores foram relatadas, principalmente usando a proteína *spike* (proteína S) e a proteína do nucleocapsídeo (proteína N) como analito alvo.

Hosseini et al.<sup>245</sup> desenvolveram um imunossensor de eletroquimiluminescência tipo sanduíche para imobilizar anticorpos para o diagnóstico da COVID-19. O eletrodo usado foi de carbono vítreo decorado com nanopartículas de ouro. O método analítico relatado exibiu um comportamento linear na concentração de antígeno na faixa clinicamente relevante para proteína S do SARS-CoV-2, LOD ~ 1,93 ng mL<sup>-1</sup> e tempo de análise de aproximadamente 90 min. de Lima et al.<sup>246</sup> desenvolveram um biossensor eletroquímico usando grafite de lapiseira modificadas com nanopartículas de ouro e receptores humanos da enzima conversora de angiotensina 2 para detecção rápida (6,5 min) e sensível da proteína *spike* do SARS-CoV-2. O LOD obtido foi de 229 fg mL<sup>-1</sup>.

Em termos de sensores serigrafados/impressos em estêncil, Ferreira et

al<sup>247</sup> propuseram um imunossensor descartável de baixo custo modificado com negro de fumo e nanopartículas de ouro para detecção de SARS-CoV-2 em substrato de tereftalato de polietileno. O período de incubação da proteína S foi de 10 min e 120 min, com LODs de 101 fg mL<sup>-1</sup> e 46,2 fg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O imunossensor foi aplicado para detecção de proteína S em amostras clínicas e ambientais enriquecidas.

Recentemente, Samper et al.<sup>233</sup> desenvolveram um imunensaio sanduíche altamente sensível para detecção quantitativa da proteína do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 usando eletrodos impressos em estêncil baseados em tinta de carbono comercial e grafite. O tempo de análise ocorreu aproximadamente 1 hora e 10 minutos e o LOD foi estimado em 45 UFP mL<sup>-1</sup> ( $\sim 2,17 \times 10^6$  cópias de RNA viral mL<sup>-1</sup>). O dispositivo foi aplicado com sucesso para analisar 22 amostras de nasofaringe e comparado com RT-qPCR, que apresentou correlação adequada.

A partir dos exemplos de biossensores citados acima, é possível notar que diferentes estratégias foram utilizadas para modificar o eletrodo de trabalho (WE) visando aprimorar a sensibilidade e seletividade para detecção de SARS-CoV-2. No entanto, poucos estudos relataram o uso de tintas condutoras alternativas para a fabricação de (bio)eletrodos, que podem ser uma opção adequada e acessível para aumentar os métodos de teste do SARS-CoV-2 em ambientes POC, principalmente em países em desenvolvimento.

Neste capítulo, foram fabricados sensores eletroquímicos descartáveis utilizando uma opção ecologicamente correta de tinta condutora, e desenvolvido um imunossensor *label-free* para detectar a proteína S em amostras clínicas não diluídas. O sensor descartável, composto pelos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, foi fabricado a partir de uma tinta condutiva formulada com resina goma laca e flocos de grafite. O biossensor proposto consiste em eletrodos à base de carbono modificados com nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina (AuNP-Cys) e anticorpo monoclonal anti-proteína S do SARS-CoV-2. Os aspectos morfológicos, estruturais e eletroquímicos da tinta condutora e do eletrodo modificado foram caracterizados detalhadamente. O método eletroanalítico proposto foi

aplicado na análise de 44 amostras clínicas de *swab* nasofaríngeo provenientes de indivíduos saudáveis e infectados, cujos resultados diagnósticos revelaram concordância com o método RT-qPCR.

## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1. Objetivo geral**

Desenvolver um imunossensor eletroquímico ambientalmente amigável para aplicação clínica.

### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver uma nova tinta condutora composta por resina de goma laca e flocos de grafite;
- Explorar a técnica de impressão por estêncil para fabricar sensores eletroquímicos descartáveis;
- Efetuar caracterização eletroquímica, estrutural e morfológica dos dispositivos fabricados;
- Construir um imunossensor eletroquímico visando o diagnóstico de COVID-19;
- Aplicar o dispositivo na detecção de proteína *spike* em amostras de *swab* nasofaríngeo.

## **2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **2.3.1. Materiais e reagentes**

O ferrocianeto de potássio foi obtido da Vetec® (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Ferricianeto de potássio, cloreto de potássio (KCl) e acetona foram adquiridos da Neon® (Suzano, SP, Brasil). Dihidrogenofosfato de sódio, hidrogenofosfato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), ácido cloroáurico tri-hidratado (HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O), cisteamina, albumina sérica bovina (BSA), glutaraldeído (GA), anticorpo monoclonal anti-SARS-CoV-2 direcionado à proteína S (Ab1) e proteína S recombinante foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos). As soluções estoque e padrão foram preparadas utilizando água ultrapura processada por um sistema de purificação de água Direct-Q®3 da Millipore (Darmstadt, HES,

Alemanha) com resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm a 25 °C. Pó de grafite, resina de goma laca, tinta condutora de prata (PC-9070/1) e esmalte foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil), Acrilex® (São Paulo, SP, Brasil), Joint Metal Comércio LTDA (São Paulo, SP, Brasil) e Risqué® (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente. Plásticos de poliéster para laminação térmica (250  $\mu$ m de espessura) e adesivo de vinil foram adquiridas da Yidu Group Co., Ltd (Hsi-Chih, Taipei, Taiwan) e Imprimax® (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

### **2.3.2. Instrumentação**

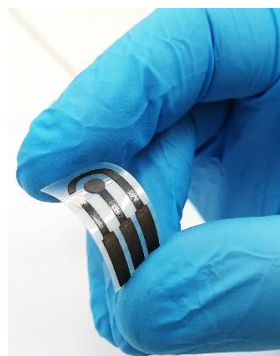
As máscaras adesivas de estêncil foram confeccionadas através de um *plotter* de recorte interfaceada com o *software* Silhouette Cameo adquirido da Silhouette Studio (Belo Horizonte, MG, Brasil). Os experimentos eletroquímicos foram realizados utilizando um bipotenciostato/galvanostato  $\mu$ Stat 400 da DropSens SL (Oviedo, Espanha) equipado com o *software* DropView 2.9. A microcentrífuga refrigerada, modelo NT 805, foi adquirida da Novatecnica (Piracicaba, SP, Brasil). Os elementos de reconhecimento biológico imobilizados nas superfícies do eletrodo de trabalho (WE) foram incubados em estufa de secagem adquirida da Ethik Technology (São Paulo, SP, Brasil).

### **2.3.3. Síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina**

A síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina (AuNPs-Cys) foi realizada de acordo com estudos previamente relatados<sup>248,249</sup>. Resumidamente, 193  $\mu$ L de solução de HAuCl<sub>4</sub> 50,0 g L<sup>-1</sup> foram adicionados a 20,0 mL de água deionizada sob agitação mecânica de 750 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 200  $\mu$ L de cisteamina (213,0 mmol L<sup>-1</sup>) foi adicionada à solução mencionada acima. Após 20 min, duas alíquotas de 5,0  $\mu$ L de NaBH<sub>4</sub> (10,0 mmol L<sup>-1</sup>) também foram adicionadas sequencialmente à solução final. A formação de AuNPs-Cys foi confirmada pela mudança da solução de cor amarela para uma suspensão de cor vermelha.

### **2.3.4. Preparação do dispositivo eletroquímico e AuNPs**

Os sensores descartáveis foram fabricados através da técnica de impressão em estêncil<sup>25,250</sup> utilizando uma tinta condutora ecologicamente correta, conforme segue. Primeiramente, a geometria da célula eletroquímica contendo eletrodo de trabalho (WE,  $\varnothing = 4$  mm), de referência (RE) e auxiliar (AE) foi desenhada em um *software* gráfico (CorelDraw). Em seguida, foram adicionadas duas camadas de adesivo vinílico sobre a superfície do substrato de poliéster, seguidas da impressão redutora do *layout* usando *plotter* de recorte. Os padrões resultantes foram destacados dos substratos e a tinta condutora foi utilizada para preencher os padrões dos eletrodos com uma espátula. Após a tinta secar, a máscara foi removida e os eletrodos foram formados. A formulação da tinta carbono alternativa foi sintetizada utilizando a resina natural goma laca, grafite e acetona. Para isso, misturou-se o equivalente a uma proporção ótima de 50:50 (resina:grafite); sendo 0,50 g de resina com 0,50 g de grafite e 1,3 mL de acetona. O tempo de agitação utilizado para homogeneização da tinta foi de 30 min em velocidade média, semelhantemente relatado anteriormente por Silva-Neto et al.<sup>250</sup>. A quantidade de tinta condutora utilizada na construção dos dispositivos é capaz de produzir cerca de 20 sensores. Posteriormente, o eletrodo de referência foi pintado com tinta condutora de prata e a região de interesse da célula eletroquímica foi delimitada utilizando esmalte de unha como barreira hidrofóbica. A imagem real do sensor eletroquímico e a representação esquemática dos dispositivos eletroquímicos podem ser vistos nas Figura 2.1 e Figura 2.2 A, respectivamente.

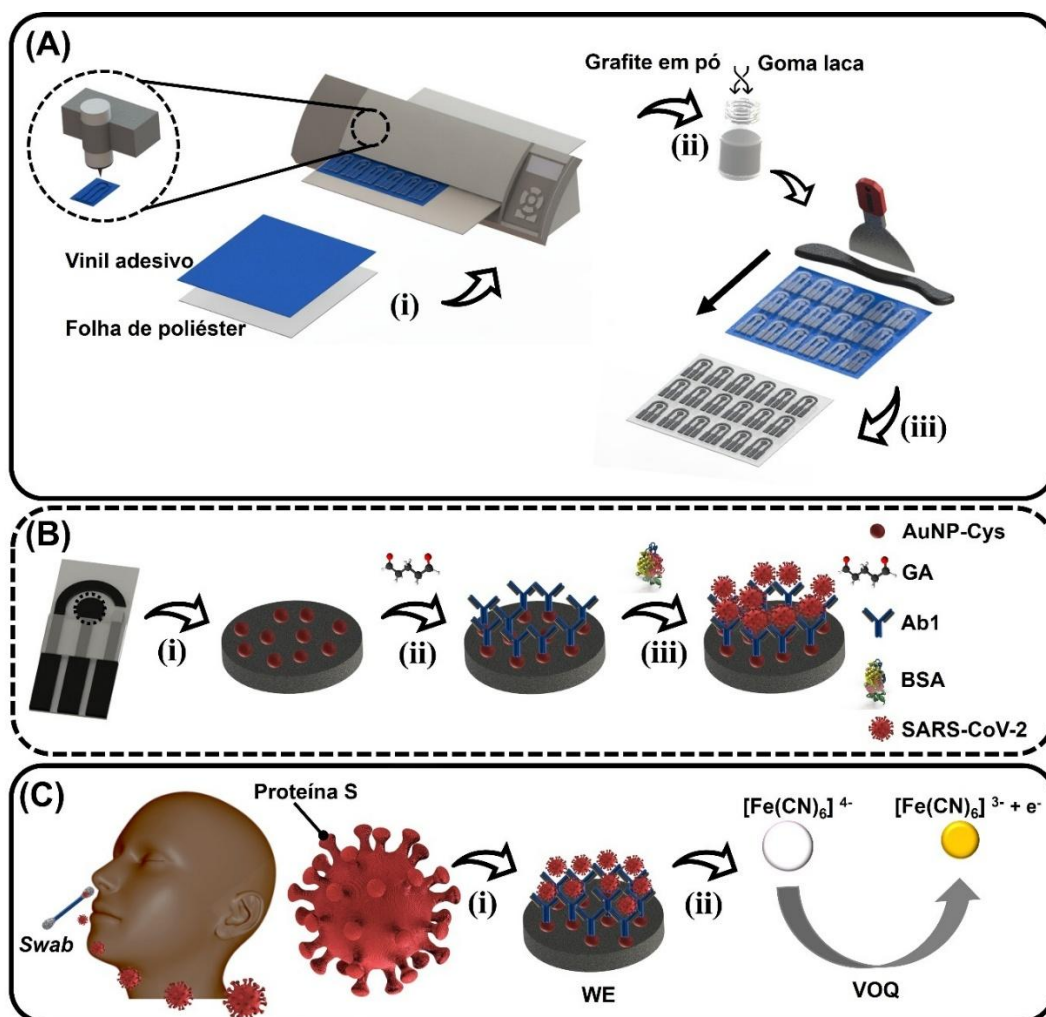


**Figura 2.1.** Imagem real do eletrodo de carbono proposto usando a técnica de impressão por estêncil. Fonte: Autoria própria.

### 2.3.5. Preparação do imunossensor

O preparo do imunossensor foi realizado da seguinte forma: uma alíquota de 20,0  $\mu\text{L}$  de suspensão de AuNPs-Cys foi adicionada sobre a superfície do WE e seca por 12 horas durante a noite a  $21 \pm 2$  °C. Outra alíquota de 15,0  $\mu\text{L}$  de glutaraldeído 1,0% (v/v) foi adicionada à superfície do WE e seca por 15 min em temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Posteriormente, a célula eletroquímica foi lavada com alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  de água ultrapura por três vezes. Em seguida, uma alíquota de 10,0  $\mu\text{L}$  de Ab1  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi imobilizada na superfície WE e encubada *overnight* a 4 °C. A superfície eletroquímica da célula foi lavada com uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato (PBS 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH = 7,4). Para realizar a etapa de bloqueio, uma alíquota de 10,0  $\mu\text{L}$  de BSA 1,5% (m/v) foi adicionada à superfície do eletrodo a 37 °C por 30 min. Em seguida, a superfície do biossensor foi lavada três vezes com alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  de PBS 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH = 7,4.

Antes de iniciar a leitura eletroquímica, a superfície WE foi exposta a 10  $\mu\text{L}$  de solução padrão de proteína S ou amostras de *swab* não diluídas, incubadas por 15 min a 37 °C e lavadas duas vezes com 40  $\mu\text{L}$  de PBS 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH=7,4. A representação esquemática das etapas de funcionalização do imunossensor é mostrada e princípio de funcionamento podem ser vistos na Figura 2.2 B-C.



**Figura 2.2.** (A) Representação esquemática das etapas de fabricação de sensores eletroquímicos ecologicamente corretos utilizando a técnica de impressão em estêncil contendo (i) corte do *layout* do eletrodo, (ii) preparação de tinta condutiva, (iii) espalhamento da tinta condutiva com espátula e (iv) remoção da máscara adesiva vinílica. (B) Principais etapas envolvidas na produção do imunossensor: (i) ancoragem de AuNPs-Cys, (ii) inserção de grupos -CHO através da utilização de glutaraldeído, seguida da adição de Ab1, (iii) uso de BSA para bloquear os sítios ativos restantes da WE. A etapa final mostra a interação da proteína S presente no vírus SARS-CoV-2 com a superfície do biossensor. (C) Representação da coleta de amostras de pacientes usando um *swab*, (i) superfície WE na presença de uma amostra positiva de COVID-19 e (ii) leitura eletroquímica via voltametria de onda quadrada (VOQ) empregando o mediador redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  1 mmol L<sup>-1</sup> preparado em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria.

### 2.3.6. Caracterizações

As medidas do ângulo de contato (AC) foram realizadas com uma câmera de *smartphone* (Xiaomi Redmi note 10 lite) acoplada a um suporte

impresso em 3D<sup>251</sup> e analisadas através do *software* ImageJ.

A análise do material proposto por espectroscopia Raman foi realizada utilizando um espectrômetro Raman confocal (modelo Horiba LabRAM HR Evolution, HORIBA France SAS) com laser de 532 nm. Para a técnica de espectroscopia de Infravermelho foram utilizadas as regiões do infravermelho médio (MIR) (varredura média de 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) em um espectrofotômetro PerkinElmer, modelo Spectrum 400.

A análise de espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS) foi realizada utilizando o analisador hemisférico de alta resolução SPECS Phoibos 150 com detecção multicanal de elétrons usando uma fonte de raios X Al K $\alpha$  (1486,6 eV) com 240 W, sob uma pressão base de baixa  $10^{-8}$  mbar, em emissão normal, e energia de passagem constante (20 eV) para todos os picos. A amostra foi colada a um porta-amostras de placa com fita de carbono condutora. Contatos elétricos extras foram feitos nas laterais da amostra utilizando pintura com tinta condutiva de prata. A amostra foi inserida em uma câmara *load-lock* para desgaseificar por 12 horas antes de ser transferida para a câmara XPS. Os dados obtidos foram ajustados assumindo um fundo do tipo Shirley e picos Lorentzianos numericamente complicados com uma função Gaussiana normalizada com um máximo fixo de meia largura total de  $\sim 1,0$  eV descreve o alargamento instrumental. As concentrações atômicas foram obtidas utilizando o procedimento relatado por Wagner et al.<sup>252</sup>.

O microscópio eletrônico de varredura, (Jeol, JSM – 6610), equipado com espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), foi obtido da Thermo Scientific NSS (Tóquio, Japão) e utilizado para a aquisição de micrografias e espectros de EDS.

O espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-M51 foi adquirido da Bel Photonics (Piracicaba, SP, Brasil). O microscópio eletrônico de transmissão (MET), (Jeol, JEM-2100) foi adquirido da Thermo Scientific (Tóquio, Japão).

Medições de voltametria cíclica (VC) com valores de taxa de varredura de 10 a 100  $\text{mV s}^{-1}$  foram realizadas para calcular a constante de taxa heterogênea ( $k_s$ ) do dispositivo fabricado para sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ .

### 2.3.7. Medidas eletroquímicas

Para avaliar o impacto de cada etapa de modificação na superfície WE, experimentos de VC foram realizados na presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  preparado em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para (i) eletrodo recém-fabricado, após inserção de (ii) AuNPs-Cys, (iii) GA/AuNPs-Cys, (iv) Ab1/GA/AuNPs-Cys e (v) proteína S/Ab1/GA/AuNPs-Cys, em uma faixa de potencial de  $-0,4$  a  $0,8 \text{ V vs Ag}$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Uma curva analítica com a concentração de proteína S variando de  $250,0 \text{ pg mL}^{-1}$  a  $20,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  foi construída utilizando medidas de VOQ. Todas as medidas foram registradas após a incubação da solução padrão da proteína S na superfície do imunossensor por 15 minutos. A resposta analítica foi baseada na corrente de pico anódica ( $i_{pa}$ ) da sonda redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ . Os parâmetros VOQ de tempo de equilíbrio, passo, amplitude, frequência e faixa de potencial foram  $3 \text{ s}$ ,  $0,005 \text{ V}$ ,  $0,1 \text{ V}$ ,  $10 \text{ Hz}$  e  $-0,2$  a  $0,6 \text{ V vs Ag}$ , respectivamente.

Os estudos de repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do imunossensor proposto também foram realizados com base nas respostas do VOQ. Medidas de repetibilidade foram obtidas na presença de  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S. Por sua vez, dois experimentos distintos avaliaram o desempenho da reprodutibilidade: (i) na presença de uma solução padrão de proteína S ( $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ) e (ii) pela detecção da proteína S em três diferentes amostras de *swab*.

O estudo de estabilidade do dispositivo proposto foi realizado medindo-se a resposta do imunossensor ao longo de quatro semanas de armazenamento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , com medições semanalmente.

### 2.3.8. Preparo de amostras, análises de RT-qPCR e medidas eletroquímicas

Como prova da aplicabilidade do biossensor proposto, foram coletadas 44 amostras da região nasofaríngea de diferentes voluntários, o qual foram ressuspensas em cloreto de sódio (NaCl)  $0,9\%$  (m/v) e armazenadas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  (no Laboratório de análises clínicas e educação em saúde, no ano de 2021). As amostras orofaríngeas e nasofaríngeas foram realizadas por fricção com

*swabs* de náilon em pacientes sintomáticos (3-5 dias de sintomas). A amostragem e os exames diagnósticos de referência (RT-qPCR) foram realizados conforme protocolo de ética e segurança confirmado pela Universidade Federal de Goiás (protocolo 50176621.7.0000.5083).

O processo de extração de ácidos nucleicos das amostras de *swab* foi realizado utilizando um kit comercial modelo Biopur obtido da Mobius Life Science (Pinhais, PR, Brasil). Resumidamente, as amostras foram incubadas a 95°C com tampão de lise (v/v) durante 9 min e incubadas a 4°C durante 5 min. A análise RT-qPCR foi realizada através de um kit multiplex XGEN Master COVID-19 da Mobius Life Science no sistema QuantStudio 5 Real PCR Time da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). As amostras foram consideradas positivas para SARS-CoV-2 quando apresentaram amplificação dos dois fragmentos de DNA viral antes dos 38 ciclos (ORF1ab e N) além da amplificação do fragmento de controle interno.

As 44 amostras de *swab* também foram analisadas pelo método VOQ. Uma alíquota de 10,0 µL (amostra de *swab* não diluída) foi adicionada à superfície WE funcionalizada (incubada por 15 min a 37 °C) e lavada duas vezes com 40 µL de solução PBS. Em seguida, outra alíquota de 100 µL de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  1,0 mmol L<sup>-1</sup> preparado em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi adicionada à célula eletroquímica e realizada a leitura do VOQ. Todas as medidas eletroquímicas foram registradas em triplicata à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

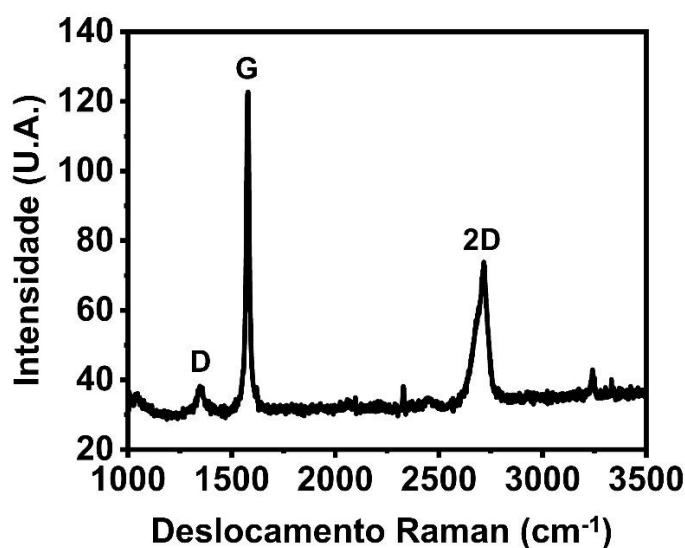
## **2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.4.1. Caracterização de dispositivo eletroquímico ecológico**

A fabricação do novo dispositivo eletroquímico à base de goma laca foi realizada utilizando-se uma proporção de 50% de grafite e 50% de goma laca, além de acetona como solvente. Sob esta condição para fabricação dos eletrodos descartáveis, aspectos físico-químicos do material eletródico foram cuidadosamente avaliados considerando análises morfológicas, estruturais e medidas eletroquímicas.

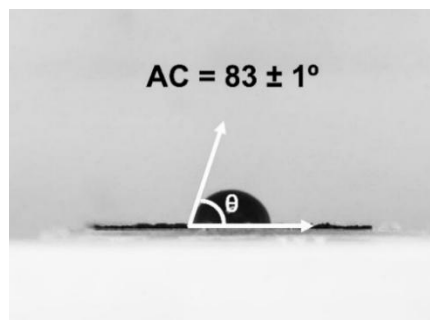
Conforme indicado na Figura 2.3, os espectros Raman da superfície do eletrodo mostraram bandas D (do inglês, *disorder*), G (do inglês, *graphite*) e 2D (segunda ordem da banda D, ou sobretom da banda D) em 1350, 1576 e

2713  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. As bandas D e G estão associadas às hibridizações  $\text{sp}^3$  e  $\text{sp}^2$  dos alótropos de carbono<sup>253</sup>. A razão de intensidade entre as bandas D e G ( $I_D/I_G$ ) foi de 0,097, sugerindo que a tinta condutora apresentou baixa desordem estrutural. Esse leve distúrbio pode estar associado à presença de ligante de goma laca aderido aos flocos de grafite<sup>254</sup>. A literatura demonstra diferentes tipos de superfícies à base de carbono com valores de  $I_D/I_G$  variando de 0,16 a 0,81<sup>255-258</sup>, o que indica que o valor obtido é relativamente próximo do esperado.



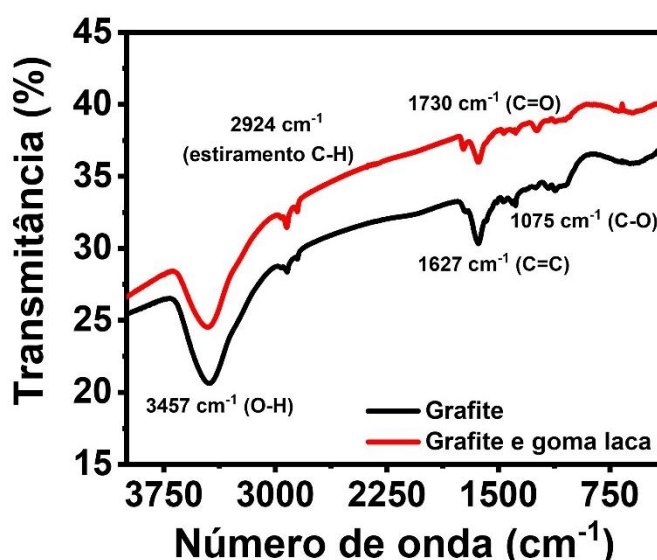
**Figura 2.3.** Espectro Raman do material eletrodico à base de carbono entre 1000 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ . Fonte: Autoria própria.

Medidas de ângulo de contato, que descreve o comportamento de uma gota de líquido que repousa sobre uma superfície sólida em contato com o ar, e é definido como o ângulo medido entre a tangente no ponto trifásico e a superfície sólida<sup>251,259</sup>, também foram realizadas. O intuito da análise foi avaliar a molhabilidade da superfície WE e indicar se o material possui caráter predominantemente hidrofílico ou hidrofóbico. O valor do AC calculado foi  $83 \pm 1^\circ$ , conforme reporta a Figura 2.4. Uma vez que valores de AC  $\theta < 90^\circ$  para superfícies sólidas são hidrofílicos e AC  $\theta > 90^\circ$  são considerados hidrofóbicos<sup>259</sup>, infere-se que os dados obtidos são característicos de material hidrofílico, indicando que a superfície do eletrodo pode apresentar grupos funcionais oxigenados<sup>256</sup>, uma importante característica para a construção de biosensores.



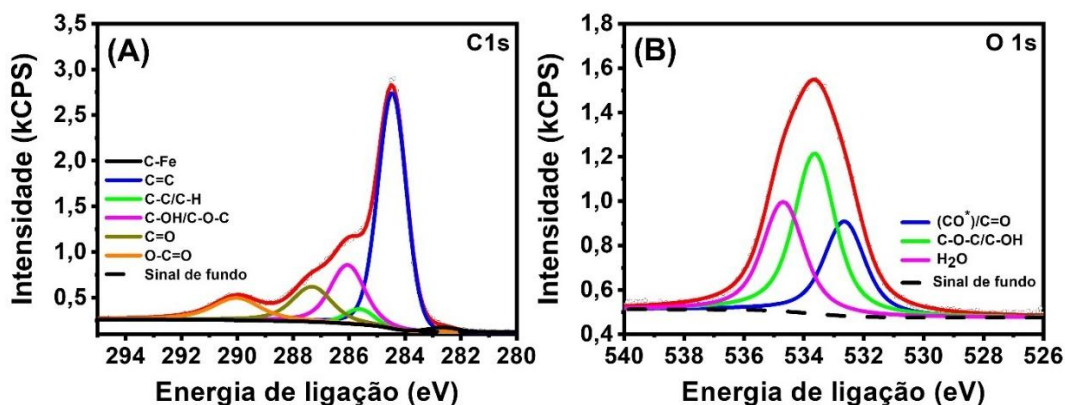
**Figura 2.4.** Medida do ângulo de contato da superfície do WE. Fonte: Autoria própria.

Para verificar a presença de grupos funcionais na superfície do eletrodo, foram realizadas análises dos flocos de grafite puro e da tinta condutora por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho. É possível observar, a partir do espectro apresentado na Figura 2.5 que duas bandas distintas em 1730 e 2924  $\text{cm}^{-1}$  são associadas a bandas carbonílica e alongamentos C-H, respectivamente. Outras bandas com sinal em 3458 e 1075  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas aos grupos OH e CO, cujas intensidades são reduzidas na presença do ligante goma laca<sup>260–262</sup>. Além disso, a banda em 1627  $\text{cm}^{-1}$  é característica de C=C e está relacionada aos domínios de grafite<sup>263</sup>. Recentemente, outros estudos caracterizaram a resina goma laca como um polímero natural composto por cadeias laterais ácidas e hidroxila<sup>261</sup>.



**Figura 2.5.** Espectros obtidos a partir da técnica de espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para flocos de grafite e grafite na presença de goma laca (tinta condutora). Fonte: Autoria própria.

Para avaliar a composição elementar, grupos funcionais, bem como informações sobre ligações químicas presentes no material eletródico, também foi realizada análise quantitativa pela técnica XPS. Os resultados obtidos estão resumidos nas Figuras 2.6 A-B. A partir dos espectros C1s, os picos estão relacionados às ligações C-Fe (282,5 eV), ligação  $\pi$  entre carbonos C=C (284,3 eV) com contribuições majoritárias de carbono sp<sup>2</sup> (54%), CC/CH (285,5 eV), C-OH/C-O-C (285,9 eV), carbonil C=O (287,2 eV) e O-C=O (289,9 eV). A presença de impurezas de Fe no material condutor pode ser atribuída ao uso de uma espátula contendo este componente no processo de impressão do estêncil. Por outro lado, o pico de nível central O1s apresentou ligações (C-O<sup>\*</sup>)/C=O pico em 532,6 eV, ligações contendo ligações simples e possivelmente hidroxila, C-O-C e C-OH (533,6 eV) e H<sub>2</sub>O adsorvido (534,7 eV) com contribuições expressivas de 26; 44 e 30% do percentual relativo, respectivamente<sup>264,265</sup>. A análise XPS indicou que a superfície eletródica exibiu grupos funcionais oxigenados que promovem interações químicas com (bio)estruturas<sup>266</sup>. Com base nas propriedades atuais, a combinação de pó de grafite e resina de goma laca pode ser uma possibilidade interessante para a fabricação de biossensores eletroquímicos.

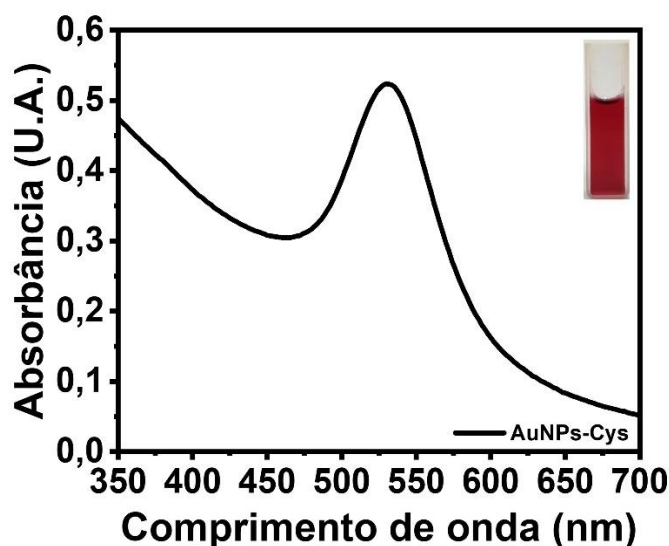


**Figura 2.6.** (A) Espectros XPS C1s de alta resolução de material de eletrodo proposto. (B) Espectros XPS O1s de alta resolução de material de eletrodo proposto. Fonte: Autoria própria.

#### 2.4.2. Síntese de AuNPs-Cys e fabricação do imunossensor

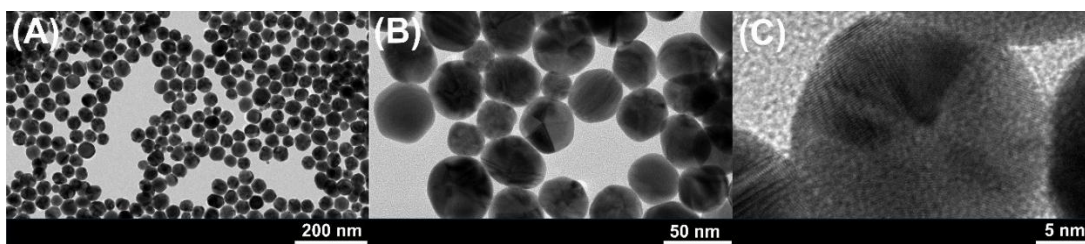
As nanopartículas de ouro decoradas com cisteamina (AuNPs-Cys) sintetizadas foram caracterizadas com base na espectrofotometria e experimentos de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Como

mostrado na Figura 2.7, é possível observar uma banda de absorvância bem definida para AuNPs-Cys no comprimento de onda de aproximadamente 525 nm, que está em conformidade com outros trabalhos reportados na literatura<sup>267</sup>.



**Figura 2.7.** Espectro UV-Vis de nanopartículas de ouro estabilizadas com cisteamina (AuNPs-Cys). Fonte: Autoria própria.

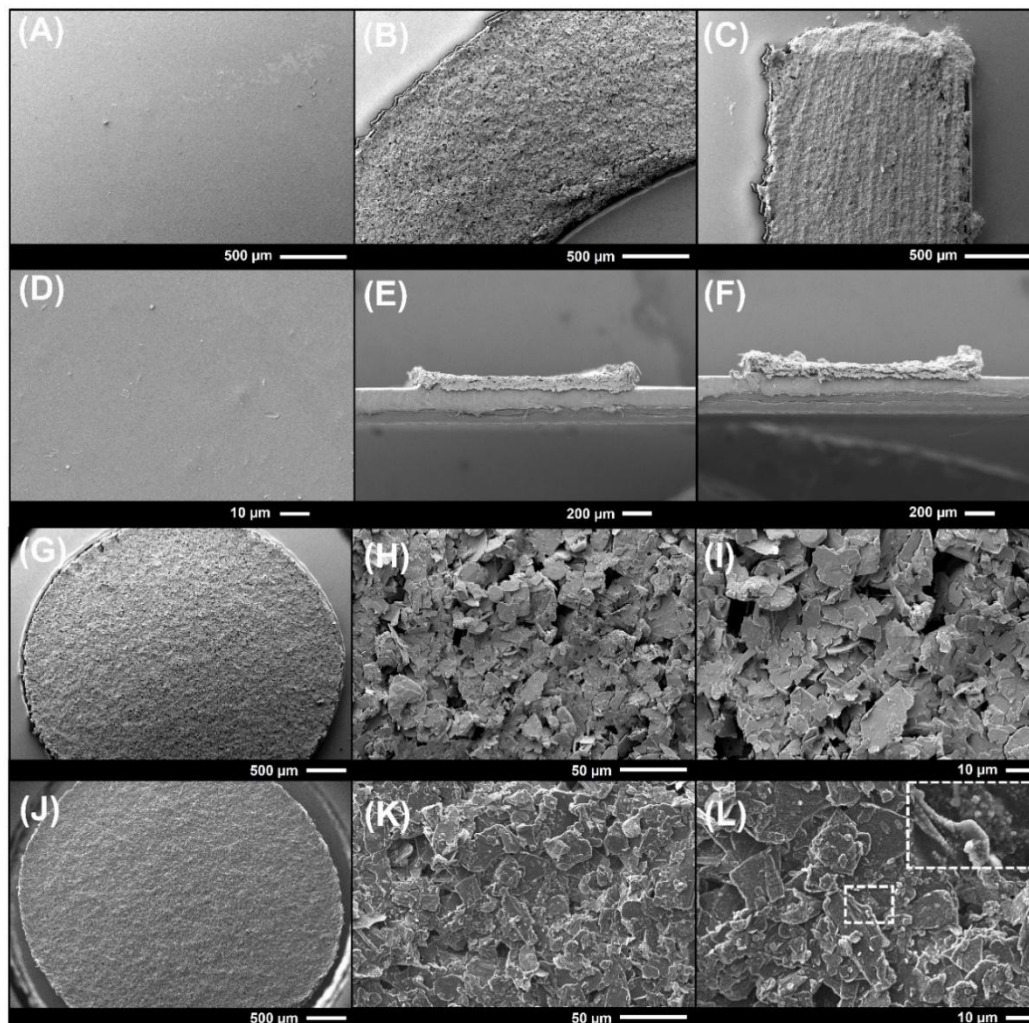
A partir de imagens de MET (Figura 2.8 A-C) é possível observar que as nanopartículas de ouro com geometria aproximadamente esféricas foram sintetizadas com sucesso. O valor médio do diâmetro de AuNPs-Cys foi calculado como  $44 \pm 8$  nm e, dessa forma pode ser inserida em eletrodos para interagir com (bio)estruturas, conforme destaque na literatura de outros autores<sup>249,268,269</sup>.



**Figura 2.8.** Imagens de AuNPs-Cys em diferentes ampliações obtidas por microscópio eletrônico de transmissão destacando tamanhos referentes à (A) 200 nm, (B) 50 nm e (C) 5 nm. Fonte: Autoria própria.

Para investigar a construção do imunossensor para COVID-19, medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e EDS foram

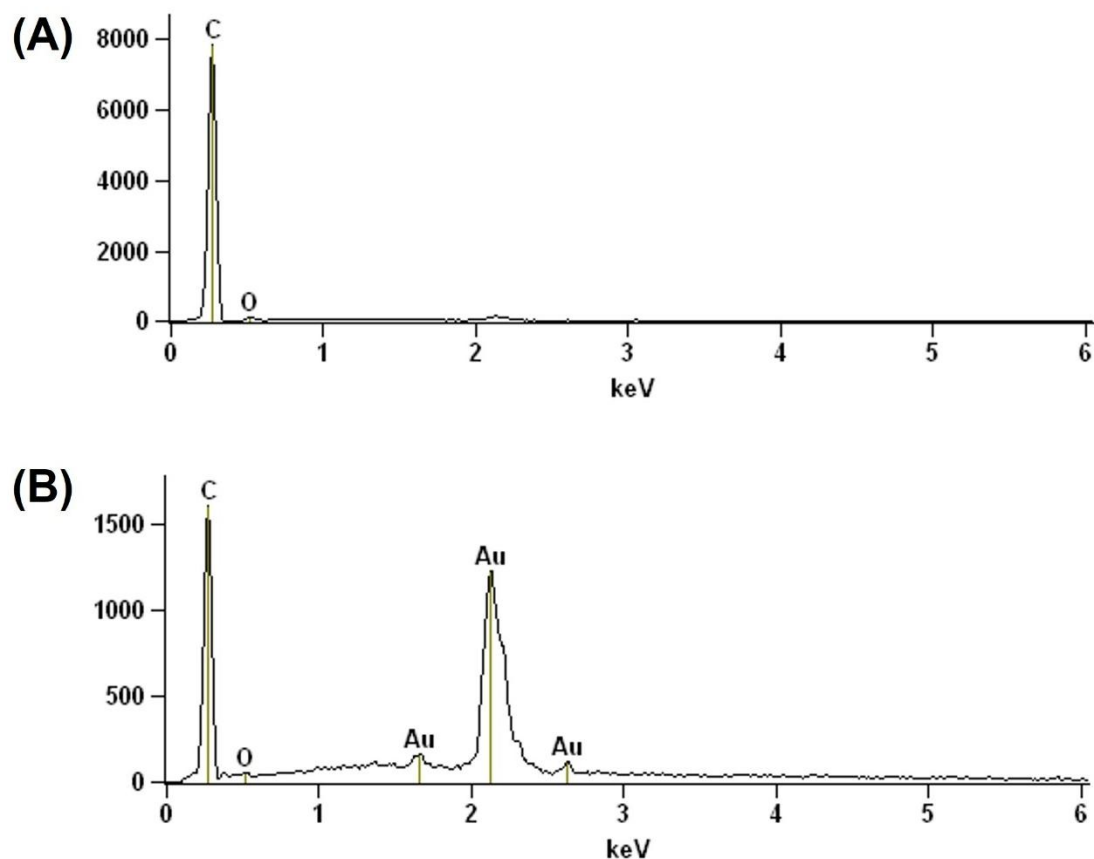
registradas para o substrato de poliéster, o eletrodo auxiliar, o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho sem modificação e com o WE modificado com AuNPs-Cys. Como pode ser visualizado, a superfície do substrato de poliéster apresentou um perfil liso (Figura 2.9 A e Figura 15 D) que quando utilizado para fabricar os eletrodos aderiu o material condutor sobre a superfície com êxito, tanto empregando o material à base de carbono (Figura 2.9 B e Figura 2.9 E) para o eletrodo auxiliar, quanto pintando o RE com tinta de prata posteriormente (Figura 2.9 C e Figura 2.9 F). Em termos do eletrodo de trabalho sem modificação, as imagens de MEV em diferentes magnificações (Figura 2.9 G-I) revelou estruturas de grafite bem distribuídas no formato de flocos com  $\varnothing \sim 50 \mu\text{m}$ , indicando que a tinta alternativa cobriu o substrato de poliéster de modo bem-sucedido. Além disso, as Figuras 2.9 J-L demonstram que após o processo de *drop-casting* utilizando AuNPs-Cys, as nanopartículas recobriram a superfície do WE de maneira efetiva.



**Figura 2.9.** Micrografias de MV referente ao substrato do eletrodo, EC e EC modificado. (A) Substrato de poliéster com aproximação de 50X. (B) Eletrodo auxiliar sob aproximação de 50X. (C) Eletrodo de referência na aproximação de 50X. (D) Substrato de poliéster sob magnificação de 1000X. (E) Vista frontal da sessão transversal do AE sob aproximação de 55X. (F) Vista frontal da sessão transversal do RE sob aproximação de 55X. (G) WE baseado em carbono sob magnificação de 30X, (H) 500X e (I) 1000X, antes da modificação. (J) EC de goma laca modificado com AuNPs-Cys em ampliação de 30X, (K) 500X e (L) 1000X, respectivamente. Fonte: Autoria própria.

A técnica de EDS também foi explorada com a finalidade de confirmar se a modificação do WE com nanopartículas de ouro ocorreu de maneira adequada. A Figura 2.10 A-B apresenta os espectros de EDS das superfícies do WE sem modificação e modificados com AuNPs-Cys, respectivamente. Como pode ser visto, os resultados revelaram que o eletrodo nu é composto basicamente por elementos de carbono e oxigênio, enquanto o dispositivo

modificado demonstrou a presença do elemento Au no WE modificado, destacando o sucesso da incorporação das nanopartículas de ouro sobre o material eletródico.



**Figura 2.10.** (A) Espectros EDS mostrando os elementos químicos na superfície eletródica. (B) Espectros de EDS mostrando os elementos químicos na superfície WE modificados com AuNPs-Cys. Fonte: Autoria própria.

Para avaliar as etapas de modificação da superfície do eletrodo para a construção de um imunossensor para diagnóstico de COVID-19, os experimentos VOQ foram realizados na presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  usando o (i) eletrodo à base de carbono puro, (ii) WE modificado com AuNPs-Cys, (iii) WE modificado com GA/AuNPs-Cys, (iv) WE modificado com Ab1/GA/AuNPs-Cys, (v) WE modificado com BSA/Ab1/GA/AuNPs-Cys e (vi) WE modificado com proteína S/BSA/Ab1/GA/AuNPs-Cys, respectivamente. Esses estudos foram realizados utilizando as condições químicas otimizadas, conforme resumido na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Parâmetros otimizados e/ou utilizados na fabricação do imunossensor proposto.

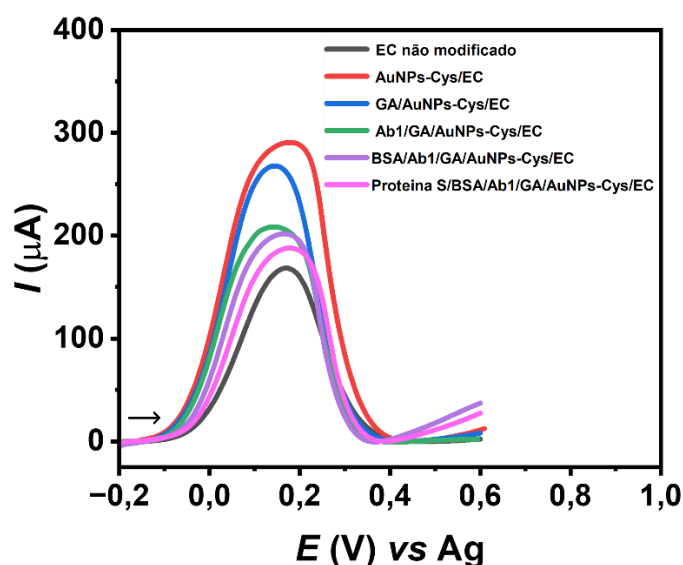
Parâmetro	Faixa estudada	Condição selecionada
Concentração de albumina sérica bovina (BSA) % (m/v)	0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5	1,5
Tempo de incubação do GA 1,0% (v/v) (min)	-	15
Tempo de incubação do anticorpo monoclonal anti-proteína S COVID-19 (Ab1) de 10,0 µg mL <sup>-1</sup> (h)	-	12
Tempo de incubação de BSA 1,5% (m/v) (min)	5; 15; 30	30
Tempo de incubação da proteína S (min)	10; 20; 30; 40; 50; 60	15

Como exhibe a Figura 2.11, o valor de *I<sub>pa</sub>* dos eletrodos modificados com AuNPs-Cys apresentou melhora na resposta de corrente, com valores de aproximadamente duas vezes maiores que o material eletródico não modificado. O melhor desempenho catalítico pode estar relacionado às características aprimoradas de transferência de elétrons e à área superficial dos AuNPs<sup>270,271</sup>. Após a inclusão de glutaraldeído na superfície do eletrodo de carbono (EC) modificado por AuNPs-Cys (GA/AuNPs-Cys/EC), foi evidenciada uma ligeira diminuição na corrente de pico anódica da leitura VOQ, observada de forma semelhante ao anexar o anticorpo Ab1 sob a camada de glutaraldeído. A introdução do biorreceptor na superfície do eletrodo causou a diminuição dos resultados do *I<sub>pa</sub>*, fornecendo aproximadamente metade da corrente de pico apresentada pelo eletrodo funcionalizado com AuNPs, o que confirma a ancoragem adequada do elemento de reconhecimento à superfície do eletrodo, dado que levou ao impedimento dos processos faradaicos de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> na superfície do imunossensor (Ab1/GA/AuNPs-Cys/EC)<sup>272</sup>.

O uso do glutaraldeído como reticulador de proteínas representa uma importante estratégia química para o desenvolvimento de biossensores. Fornece uma ligação covalente entre seus grupos -CHO com o terminal N do anticorpo Ab1<sup>273,274</sup>. Uma etapa final envolvendo o uso de um agente bloqueador para prevenir interações não específicas é crucial para garantir medições robustas e seletivas<sup>274,275</sup>. Assim, para caracterizar a introdução de

BSA no eletrodo funcionalizado (BSA/Ab1/GA/AuNPs-Cys/EC), também foi realizada uma medição de VOQ na presença de 1,5% (v/v) de BSA, que demonstrou uma diminuição do sinal analítico, como esperado, devido à inserção de material não condutor que dificulta o acesso da sonda redox à superfície do eletrodo.

Por fim, a Figura 2.11 demonstra a resposta do imunossensor proposto após incubação de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S. A supressão da corrente de pico confirma a interação específica entre o Ab1 e a proteína S. Vale ressaltar também que a variação no sinal eletroquímico alcançada destaca a arquitetura funcional adequada para o imunossensor, possibilitando a rápida interação biológica da proteína S no eletrodo modificado por Ab1. Além disso, o imunossensor proposto exibiu características redox semelhantes de arquiteturas de imunossensores bem estabelecidas, como outros modelos de sistemas eletroquímicos compactos<sup>274,275</sup>.

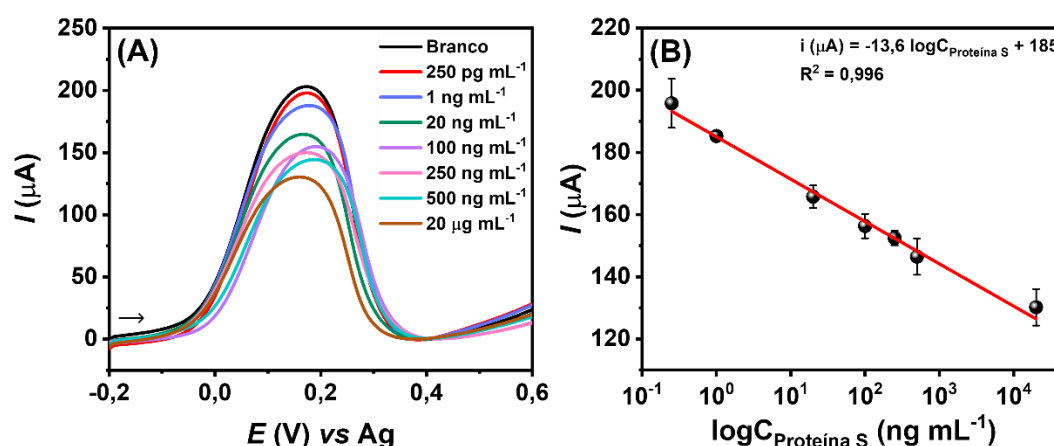


**Figura 2.11.** Voltamogramas de onda quadrada do imunossensor após cada etapa de modificação e na presença de  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S do SARS-CoV-2 empregando  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  como sonda redox. Fonte: Autoria própria.

### 2.4.3. Desempenho de biossensor

Para obtenção do desempenho analítico do imunossensor proposto, foi construída uma curva analítica com base na corrente de pico anódica do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  registrada pela técnica VOQ após incubação de soluções padrão de proteína S. A faixa de concentração linear obtida para a solução padrão de

proteína S preparada em tampão de lise e de PBS 10 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 7,4) na proporção de 1:1 variou de 250,0 pg mL<sup>-1</sup> a 20,0 µg mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,996). A equação linear foi  $i (\mu\text{A}) = -13,6 \log C_{\text{proteína S}} + 185$  e os voltamogramas VOQ obtidos e a curva analítica estão resumidos na Figura 2.12 A-B. Os experimentos foram realizados em triplicata.

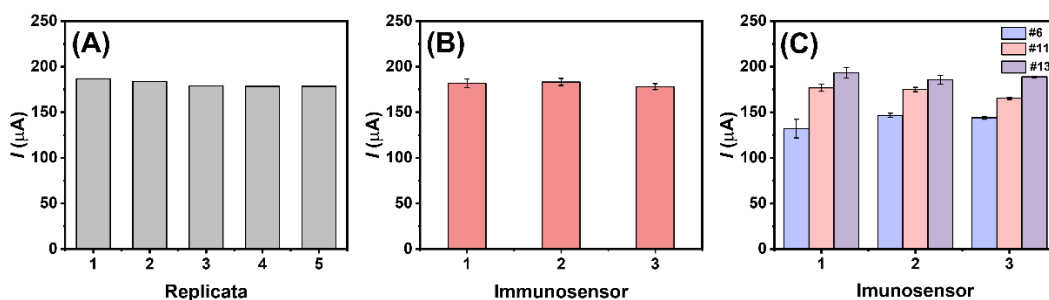


**Figura 2.12.** (A) Voltamogramas de onda quadrada registrados na ausência e presença de diferentes concentrações da proteína S do SARS-CoV-2 (250,0 pg mL<sup>-1</sup> a 20,0 µg mL<sup>-1</sup>). (B) Curva analítica. Fonte: Autoria própria.

O limite de detecção (LOD) do método proposto foi calculado como 36,3 pg mL<sup>-1</sup> de acordo com o sinal do controle (tampão de lise e 10 mmol L<sup>-1</sup> de PBS (pH = 7,4) na proporção de 1:1) mais 3x o desvio padrão desse sinal<sup>276,277</sup>. O LOD obtido é comparável aos valores relatados na literatura. Além disso, a combinação proposta do imunossensor descartável e do método eletroquímico portátil abrange a faixa clinicamente relevante e, portanto, possui grande potencial para ser usado como um dispositivo no local de atendimento (POC) para detecção rápida de SARS-CoV-2 em países em desenvolvimento.

A repetibilidade e a reprodutibilidade do método proposto foram também estudadas. Considerando os testes de repetibilidade, utilizando proteína S 1,0 ng mL<sup>-1</sup>, foram realizadas cinco medidas eletroquímicas no mesmo sensor, no qual o DPR calculado foi de 3,8% (Figura 2.13 A). Além disso, a reprodutibilidade do biossensor VOQ foi avaliada na presença da proteína S do SARS-CoV-2 utilizando três diferentes dispositivos. Paralelamente, foram realizados experimentos na presença de amostras de *swab* coletadas de três pacientes diferentes, denominadas amostras #6, #11 e #13. Como mostrado

nas Figuras 2.13 B-C, os valores de DPR para a solução padrão de proteína S e em amostras reais de *swab* variaram de 1,4 a 5,5%. Estes resultados obtidos concordaram com os requisitos para métodos bioanalíticos<sup>278</sup>, demonstrando assim a sua relevância para testes POC.

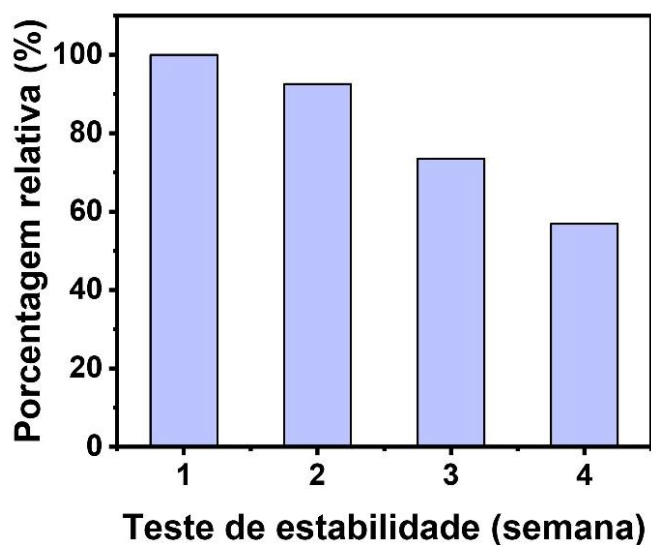


**Figura 2.13.** (A) Teste de repetibilidade utilizando cinco leituras eletroquímicas na presença de  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S. (B) Teste de reprodutibilidade para três imunossensores utilizando  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  de proteína S. (C) Ensaio de reprodutibilidade utilizando três amostras reais de *swab* positivas para SARS-CoV-2 utilizando nove imunossensores. Fonte: Autoria própria.

Vale ressaltar que as baixas cargas virais que os biossensores eletroquímicos conseguem detectar permitem a identificação precoce da infecção pelo SARS-CoV-2, ainda nos primeiros dias de infecção pelo vírus. Além disso, prevê que os pacientes assintomáticos também possam ser diagnosticados, reforçando que o dispositivo proposto pode ser de extrema importância para prevenir complicações via síndromes respiratórias agudas graves, bem como determinar procedimentos clínicos e isolamento de pacientes positivos, por exemplo.

Outro importante aspecto avaliado foi a estabilidade do imunossensor fabricado. Para tanto, os dispositivos foram armazenados a  $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e as medidas de VOQ foram registradas semanalmente durante 4 semanas (Figura 2.14). Os resultados indicaram que o imunossensor é estável durante duas semanas de armazenamento, uma vez que a leitura do VOQ exibiu apenas uma perda de 7,5% na resposta do sinal. Em contrapartida, o imunossensor proposto apresentou maior diminuição do sinal analítico (26,5 e 43,1%) quando utilizados dispositivos armazenados por 3 e 4 semanas. Alguns estudos apresentaram diferentes modelos de imunossensores para detecção de SARS-CoV-2 e relataram prazo de validade entre uma e três semanas<sup>279–282</sup>.

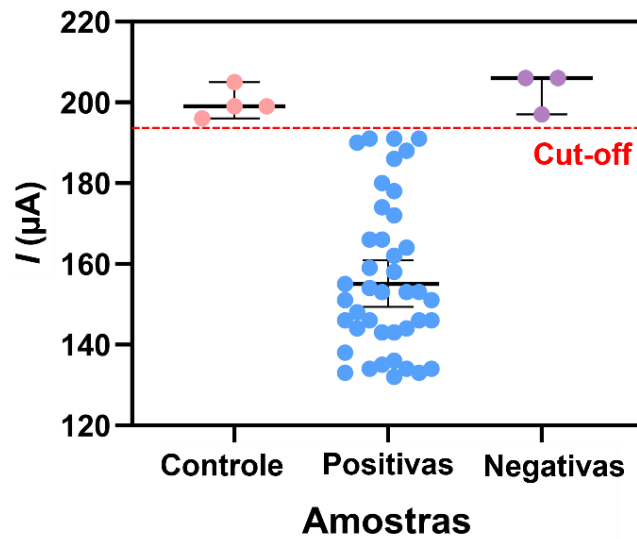
Além disso, acredita-se que a estabilidade poderia ser aumentada utilizando condições de armazenamento mais controladas.



**Figura 2.14.** Gráfico da porcentagem relativa de corrente para o estudo de estabilidade do imunossensor fabricado e armazenado a 4,0 °C por 4 semanas. Fonte: Autoria própria.

#### 2.4.4. Análise de SARS-CoV-2 em amostras de *swab*

Uma vez realizado os estudos de desempenho analítico além da estabilidade, o imunossensor foi explorado para detecção de proteína S em amostras de *swab* coletadas de 44 pacientes sob suspeita de infecção por COVID-19. Para as análises das amostras, 10  $\mu\text{L}$  de amostras de *swab* nasofaríngeo não diluídas foram incubadas por 15 min na superfície do imunossensor, e o diagnóstico positivo ou negativo de infecção foi avaliado através das respostas do VOQ. Valores atuais inferiores a 195  $\mu\text{A}$  indicaram resultados positivos para diagnóstico de COVID-19 e valores superiores a 196  $\mu\text{A}$  foram negativos para infecção por COVID-19. Assim, o valor de corte foi selecionado com base na leitura eletroquímica mais baixa discernível entre o branco e a proteína spike SARS-CoV-2 mais baixa quantificada<sup>246,283</sup>. A Figura 2.15 mostra os valores atuais das 41 amostras positivas de *swab* nasofaríngeo, 3 amostras negativas de *swab* nasofaríngeo, 4 controles e o valor de corte.



**Figura 2.15.** Aplicação do imunossensor eletroquímico descartável e ecológico para detecção da proteína S do vírus SARS-CoV-2 em amostras de *swab* nasofaríngeo. Fonte: Autoria própria.

Em experimentos paralelos, as mesmas amostras foram pré-tratadas e analisadas pelo método RT-qPCR. A Tabela 2 resume ambos os resultados diagnósticos obtidos para 44 amostras de esfregaços diferentes. Os valores do limiar do ciclo (Ct) variaram entre 11,1 e 37,0 para amostras positivas, enquanto o RNA viral não foi detectado para amostras negativas.

**Tabela 2.2.** Resultados obtidos de ensaios analíticos em triplicata envolvendo o uso de imunossensores eletroquímicos para diagnóstico de COVID-19 em amostras de *swab* em comparação com a técnica de RT-qPCR.

Sample	i (μA)	Immunosensor	RT-qPCR
#1	133 ± 3	+	+
#2	144 ± 2	+	+
#3	134 ± 12	+	+
#4	158 ± 3	+	+
#5	151 ± 1	+	+
#6	144 ± 2	+	+
#7	132 ± 3	+	+
#8	146 ± 2	+	+
#9	153 ± 4	+	+
#10	174 ± 5	+	+
#11	159 ± 5	+	+
#12	190 ± 4	+	+
#13	188 ± 1	+	+
#14	151 ± 1	+	+
#15	153 ± 1	+	+
#16	191 ± 1	+	+
#17	146 ± 1	+	+
#18	164 ± 3	+	+
#19	166 ± 2	+	+
#20	191 ± 1	+	+
#21	191 ± 3	+	+
#22	180 ± 3	+	+
#23	172 ± 2	+	+
#24	154 ± 4	+	+
#25	148 ± 2	+	+
#26	186 ± 4	+	+
#27	146 ± 3	+	+
#28	178 ± 2	+	+
#29	134 ± 1	+	+
#30	143 ± 2	+	+
#31	166 ± 1	+	+
#32	146 ± 7	+	+
#33	133 ± 6	+	+
#34	143 ± 6	+	+
#35	138 ± 1	+	+
#36	162 ± 1	+	+
#37	153 ± 6	+	+
#38	155 ± 1	+	+
#39	134 ± 11	+	+
#40	135 ± 8	+	+
#41	136 ± 4	+	+
#42	206 ± 1	-	-
#43	206 ± 5	-	-
#44	197 ± 1	-	-

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2.2, é possível notar que ambos os métodos concordaram com o diagnóstico positivo ou negativo para infecção por SARS-CoV-2, destacando a contribuição do biossensor ecologicamente correto proposto para a rápida triagem e diagnóstico clínico

de COVID-19 em amostras não diluídas. É importante ressaltar que amostras apresentando baixas concentrações de DNA viral ( $CT \geq 35$ ) foram detectadas pelo imunossensor, demonstrando que o alcance de detecção deste método é comparável ao método RT-qPCR, técnica padrão-ouro. Além disso, o sistema eletroquímico desenvolvido pode ser adequado para ancorar outros modelos de anticorpos para o desenvolvimento de imunossensores distintos ou testes multiplexados.

Diferentes estratégias de fabricação de biossensores, incluindo diferentes materiais empregados como eletrodo, técnica eletroquímica, além de parâmetros como matrizes analisadas, faixa linear para a detecção de proteína S dedicadas aos testes bioanalíticos do COVID-19, juntamente com valores de limite de detecção estão disponíveis na Tabela 2.3.

De acordo com os dados apresentados, é possível observar que embora alguns estudos tenham apresentado valores de limite de detecção menores, a estratégia aqui proposta envolve o uso de materiais ambientalmente amigáveis. O sensor proposto possui compatibilidade com o viés de química analítica verde, uma vez que corrobora com o mínimo consumo de amostra ou reagente, baixa geração de resíduos, possibilidade de utilização *point-of-care* do dispositivo, portabilidade e baixa utilização de produtos tóxicos no método analítico, por exemplo. Além disso, em termos de construção do dispositivo analítico infere-se que foram empregados insumos de baixa toxicidade, sobretudo, a resina goma laca proveniente de fonte natural. Além disso, algumas estratégias apresentadas na Tabela 2.3 são mais complexas e de custo mais elevado, o que poderia dificultar a introdução desses dispositivos nas análises de rotina no contexto dos países em desenvolvimento.

**Tabela 2.3.** Comparação do tipo de eletrodo, método eletroquímico, faixa linear e LOD para detecção de proteína S.

Eletrodo	Técnica	Amostra	Tempo de incubação da proteína S (min)	Faixa linear	LOD	Referência
N-HRGO/Nanocompósito de tiona/GCE	DPV	Saliva diluída e soro humano	60	1 pg mL <sup>-1</sup> – 10 ng mL <sup>-1</sup>	0,3 pg mL <sup>-1</sup>	282
SiO <sub>2</sub> @UiO-66/SPCE	EIS	Fluido nasal	30	100,0 fg mL <sup>-1</sup> – 10,0 ng mL <sup>-1</sup>	100 fg mL <sup>-1</sup>	284
Nanopartículas de ouro eletrodepositadas /SPCE	EIS	Saliva enriquecida	30	100 pmol L <sup>-1</sup> – 1 μmol L <sup>-1</sup>	3,16 pmol L <sup>-1</sup>	285
GCE/Pd-Au	DPV	Nasofaríngeo	40	0,01 ng mL <sup>-1</sup> – 1000 ng mL <sup>-1</sup>	6,0 pg mL <sup>-1</sup>	281
Nanopartículas de ouro /GCE	ECL	Nasofaríngeo	60	10 ng mL <sup>-1</sup> – 10 μg mL <sup>-1</sup>	1,93 ng mL <sup>-1</sup>	245
ENIG/PCB	DPV	Saliva artificial enriquecida	5	100 ng mL <sup>-1</sup> – 1000 ng mL <sup>-1</sup>	0,1 ng mL <sup>-1</sup>	286
ePAD	VOQ	- Swab	45	1 ng mL <sup>-1</sup> – 1.000 ng mL <sup>-1</sup>	0,11 ng mL <sup>-1</sup>	280
ACE2/GA/SPCE	EIS	nasofaríngeo/orofaríngeo	2	0,1 pg mL <sup>-1</sup> – 10 μg mL <sup>-1</sup>	2,8 fg mL <sup>-1</sup>	274
ProtA/Cu <sub>2</sub> O NCs/SPCE	EIS	Saliva, nasal artificial e UTM	20	0,25 fg mL <sup>-1</sup> – 1 μg mL <sup>-1</sup>	0,04 fg mL <sup>-1</sup>	287
AuNP-CB/PET-SPE	VOQ	Água do rio, saliva artificial e soro sanguíneo	10 and 120	7,65 fg mL <sup>-1</sup> – 7,65 μg mL <sup>-1</sup>	101 fg mL <sup>-1</sup> and 46,2 fg mL <sup>-1</sup>	247
Ab1/Gold nanoparticles/ eletrodo à base de carbono	VOQ	Swab nasofaríngeo	15	250 pg mL <sup>-1</sup> – 20 μg mL <sup>-1</sup>	25,6 pg mL <sup>-1</sup>	Este estudo

\***N-HRGO**: grafeno poroso dopado com nitrogênio; **GCE**: Eletrodos de carbono vítreo; **DPV**: Voltametria de Pulso Diferencial; **SPCE\***: eletrodo de carbono serigrafado; **EIS**: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica; **Pd-Au**: Nanofolhas de paládio-ouro; **ECL**:

Eletroquimioluminescência; **ENIG/PCB**: níquel eletrolítico com imersão em ouro/placa de circuito impresso; **ePAD**: dispositivo analítico eletroquímico baseado em papel; **VOQ**: Voltametria de onda quadrada; **ACE2**: enzima conversora de angiotensina-2; **GA**: glutaraldeído; **SPCE**: eletrodo de carbono impresso em estêncil; **UTM**: meio de transporte universal.

## 2.4. Considerações parciais

Desenvolveu-se um novo imunossensor eletroquímico ecológico para detecção de SARS-CoV-2 através da proteína S como analito alvo. A voltametria de onda quadrada e a conhecida sonda redox de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  foram utilizadas para os experimentos eletroquímicos. Cada análise voltamétrica foi realizada em 15 segundos e o tempo de incubação da proteína S foi de 15 minutos. Os testes de repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram valores de DPR entre 1,8% e 5,5%. O limite de detecção foi de  $25,6 \text{ pg mL}^{-1}$  para a proteína S e os ensaios de estabilidade demonstram que o sensor pode ser usado por até 2 semanas, o que é comparável a outros estudos relatados recentemente. Amostras clínicas obtidas de pacientes com sintomas de infecção por COVID-19 foram testadas com sucesso e apresentaram 100% de precisão diagnóstica em comparação com o método padrão ouro RT-qPCR. Assim, o imunossensor ambientalmente amigável preparado com materiais acessíveis demonstra potencial para análise rápida no local de atendimento.

**Capítulo 3 - Detecção aprimorada de cloreto usando eletrodo de grafite/negro de fumo impresso em estêncil modificado com nanopartículas de prata para diagnóstico de fibrose cística**

## RESUMO

Este capítulo versa sobre o desenvolvimento de um novo dispositivo eletroquímico descartável e de baixo custo para o diagnóstico de fibrose cística (FC). A FC é uma doença genética, crônica e incurável que afeta órgãos como pulmões e intestino. Associada a essa doença está a produção de excesso de muco e aumento dos níveis de cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) no suor. Indivíduos com essa condição clínica tipicamente apresentam uma taxa de sobrevivência reduzida, com expectativa de vida em torno de 30-40 anos. Nesse sentido, a triagem neonatal oferece uma alternativa para o diagnóstico precoce auxiliando na amenização dos sintomas da doença. Em geral, a FC é diagnosticada por meio da iontoforese, aliada à medida da condutividade do  $\text{Cl}^-$  em amostras de suor. Entretanto, falsos positivos ou negativos podem surgir, uma vez que outros íons podem coexistir com a análise de interesse na matriz. Nessa perspectiva, outras técnicas têm sido utilizadas para propor métodos alternativos para quantificação do  $\text{Cl}^-$  no suor. Dentre elas, a voltametria tem demonstrado desempenho analítico adequado na faixa clinicamente relevante. Nesse sentido, o presente estudo apresenta a fabricação de sensores eletroquímicos miniaturizados, a partir de uma nova formulação de tinta condutora à base de laca chinesa, negro de fumo, grafite e acetona, e modificada com nanopartículas de prata via eletrodeposição para detecção de  $\text{Cl}^-$ . O intervalo linear obtido foi de 50 a 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  via voltametria de pulso diferencial. O limite de detecção (LOD) foi calculado em 1,4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Como prova de conceito, a detecção de  $\text{Cl}^-$  foi realizada em amostras de suor sintético e de doadores saudáveis, apresentando boa correlação com a técnica padrão-ouro. O novo sensor de miniaturização e suas capacidades permitiram uma aplicação promissora no campo do ponto de atendimento.

**Palavras-chave:** triagem neonatal; biomarcador; sensor descartável; detecção eletroquímica.

### 3.1. INTRODUÇÃO

#### 3.3.1. Laca chinesa

A laca chinesa (*urushi*) é um material de revestimento natural antigo comumente utilizado no acabamento de obras de arte, móveis, metais, objetos cerâmicos e artefatos manufaturados em madeira. Ela possui propriedades adesivas e destaca-se devido a capacidade de criar filmes duráveis e resistentes quimicamente. Os objetos lacados são componentes extremamente importantes do ponto de vista do património cultural chinês, além de estar diretamente relacionado à preservação da história local. Sua obtenção é proveniente da seiva das árvores laca (*Rhus vernicifera*) nativas da China e outras regiões da Ásia<sup>288</sup>.

A seiva coletada da *Rhus vernicifera* apresenta como características, a cor branca de aspecto leitoso e ser uma emulsão dupla (água/urushiol/água). A fase aquosa externa é separada após um período de maturação no escuro, na ordem de meses. Assim, a laca urushi bruta é obtida<sup>288,289</sup>. Essa fração muda rapidamente para a cor castanha sob exposição ao ar, sendo que o urushi cru é um sistema coloidal composto por uma emulsão de água em óleo. A fase oleosa consiste em uma mistura de fenóis e catecóis (1,2-di-hidroxi-benzeno) substituídos na posição 3 por longas cadeias alifáticas (C15, C17), tanto saturadas quanto insaturadas, conhecidas como urushiol, o qual compõem cerca de 60-65% da composição. Por sua vez, a fase aquosa dispersa na fase oleosa é constituída por aproximadamente 20-25% de água contendo mono-, oligo- e polissacarídeos (6,5-10%) e 0,1-1% de enzima lacase. Ademais, emulsificantes constituídos de glicoproteínas, presentes em ambas as fases, integram cerca de 1,2-2,8%<sup>288</sup>.

A laca é um material de revestimento regularmente utilizado em indústrias dos segmentos químico, petroquímico, além da construção naval e no artesanato<sup>290</sup>. Em termos de propriedades químicas, a laca urushi crua apresenta algumas diferenças em comparação com filme líquido apresentando mudanças estruturais após o processo de cura<sup>288</sup>. De acordo com a literatura vigente, embora a laca chinesa tenha sido usada na fabricação de tinta<sup>291,292</sup>, sua utilização na manufatura de tintas condutoras, sobretudo para a confecção de sensores eletroquímicos, ainda não foi

relatada.

### 3.3.2. Dispositivos eletroquímicos

Dentre as diversas classificações de sensores eletroquímicos, destacam-se os amperométricos, impedimétricos, potenciométricos, coulométricos e voltamétricos, por exemplo<sup>19,293,294</sup>. No caso dos sensores voltamétricos, eles elencam uma série de vantagens, tais como rapidez na resposta analítica, sensibilidade e versatilidade.

Uma configuração amplamente utilizada dos dispositivos eletroquímicos é *design* composto por três eletrodos: eletrodo de trabalho (WE, do inglês *working electrode*), eletrodo auxiliar (AE, do inglês *auxiliary electrode*) e o eletrodo de referência (RE, do inglês *reference electrode*)<sup>295</sup> que, com o advento da miniaturização, contribuiu significativamente para a expansão impactante e popularização desses dispositivos. Essa característica possibilitou o uso de volumes reduzidos de amostra ou reagente, a modificação superfície do eletrodo de forma controlada, seja quimicamente ou com elementos de reconhecimento biológico, além de conferir portabilidade ao sistema, habilitando análises diretamente no ponto de cuidado (POC, do inglês, *point-of-care*)<sup>296-298</sup>.

Os sensores miniaturizados têm sido aplicados com sucesso ao POC em diferentes vertentes, incluindo segurança alimentar, monitoramento ambiental, área forense, farmacêutica, e no diagnóstico clínico e/ou acompanhamento periódico de doenças<sup>2,123,296</sup>. Especialmente no que concerne ao diagnóstico clínico, inúmeros dispositivos foram propostos nos últimos anos. Há exemplos de sensores ou biossensores eletroquímicos para o diagnóstico de diabetes<sup>299</sup>, COVID-19<sup>300</sup>, câncer<sup>301</sup>, anemia<sup>302</sup>, doenças renais<sup>303</sup>, triagem neonatal<sup>207</sup>, entre outros.

### 3.3.3. Fibrose cística

No que se refere à triagem de doenças neonatais, no Brasil, o exame popularmente conhecido como “teste do pezinho” é um importante mecanismo para a detecção precoce de doenças raras. A coleta de amostra para a execução deste teste ocorre entre o 3º e o 5º dia de vida do recém-nascido

nas Unidades Básicas de Saúde ou em maternidades cadastradas. De acordo com o Ministério da Saúde, atualmente, as doenças inseridas no escopo do Programa Nacional de Triagem Neonatal são sete: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doença falciforme e outras hemoglobinopatias, hiperplasia adrenal congênita, deficiência de biotinidase, toxoplasmose congênita e fibrose cística. Entretanto, há previsão de ampliação do número de doenças a serem identificadas com esse exame<sup>304</sup>.

Particularmente, a fibrose cística (FC), é uma doença genética, crônica e incurável, caracterizada por uma mutação no gene regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR, do inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que é responsável pelo transporte de íons sódio e cloreto (Cl<sup>-</sup>) através das células epiteliais. Esse transporte irregular de íons comumente afeta funções essenciais nas glândulas sudoríparas, pulmões, intestinos, pâncreas e rins<sup>305-307</sup>. Conseqüentemente, há aumento da produção de muco e circulação bacteriana periódica, devido à incapacidade dos íons bloqueados de se moverem através dos tecidos brônquicos. Como resultado, a concentração de cloreto aumenta e afeta a defesa do organismo, comprometendo a ação dos anticorpos necessários<sup>308</sup>.

Alguns sintomas persistentes em pacientes com diagnóstico de FC incluem dificuldade em respirar, insuficiência pancreática e excreção de altas concentrações de íons Cl<sup>-</sup> através do suor. Nessa perspectiva, uma forma de aliviar os sintomas recorrentes em pacientes com FC é através do tratamento com agentes farmacológicos e, às vezes, proceder-se com suplementação de oxigênio. Como a FC reduz drasticamente a expectativa de vida para 30-40 anos, o diagnóstico precoce é essencial para prosseguir com o protocolo de tratamento o mais rápido possível. A triagem neonatal, por exemplo, é uma excelente alternativa que contribui para a redução de internações graves e melhora a eficiência pulmonar<sup>309,310</sup>.

Dado que pacientes com FC comumente excretam grandes quantidades de cloreto pelas glândulas sudoríparas, o método diagnóstico mais estabelecido para esta doença consiste em um teste do suor (padrão ouro), por um dispositivo de iontoforese e, geralmente, uma medição de condutividade<sup>310</sup>. Esse diagnóstico consiste na estimulação das glândulas

sudoríparas por meio da aplicação de uma corrente de baixa intensidade associada à pilocarpina (medicamento), que permite a passagem intradérmica do suor e posterior coleta com gaze ou uma espécie de micro serpentina. Após a coleta da amostra, um cloridrômetro fornece resultados quantitativos<sup>311</sup>. Os níveis de cloreto no suor de um adulto saudável normalmente ficam abaixo de 39 mmol L<sup>-1</sup>. Concentrações entre 40 e 59 mmol L<sup>-1</sup> são consideradas limítrofes e níveis acima de 60 mmol L<sup>-1</sup> são considerados positivos para FC. Por sua vez, as concentrações para crianças são: < 29 mmol L<sup>-1</sup> (negativa), 59 mmol L<sup>-1</sup> (limítrofe) e > 60 mmol L<sup>-1</sup> (positiva)<sup>306</sup>.

Esforços notáveis da comunidade científica têm sido feitos com o objetivo de promover ferramentas alternativas de diagnóstico que apresentem menos falsos positivos ou negativos do que o método baseado na medição de condutividade (devido à interferência de outros íons na amostra). Além disso, tem sido explorado o uso de ferramentas analíticas simples, de baixo custo, versáteis e portáteis, com potencial para aplicação direta no ponto de cuidado. Exemplos desses protocolos analíticos incluem inúmeras técnicas, como colorimetria<sup>312</sup>, eletroforese<sup>307</sup> e eletroquímica utilizando-se voltametria<sup>201,308</sup>.

Toh et al.<sup>308</sup> demonstraram a utilização de um sensor eletroquímico comercial de carbono vítreo modificado com nanopartículas de prata (AgNPs) via *drop-casting* visando propor um método para a triagem de pacientes com suspeita de FC. No presente trabalho, o procedimento de modificação da superfície do WE envolveu 5 etapas de adição das nanopartículas (previamente sintetizadas<sup>313</sup>, seguido por secagem em estufa a 50°C por 10 minutos cada etapa subsequente à adição de AgNPs. A detecção de Cl<sup>-</sup> baseou-se no princípio de que a prata presente na superfície do eletrodo de trabalho foi oxidada na presença de Cl<sup>-</sup> para formar de cloreto de prata (AgCl). O eletrólito suporte empregado foi nitrato de sódio de concentração 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A partir do método proposto foi possível correlacionar linearmente a magnitude do sinal analítico com a concentração de cloreto usando a técnica de voltametria cíclica. A faixa linear obtida foi entre 2 e 40 mmol L<sup>-1</sup> e a aplicabilidade do dispositivo foi demonstrada para a detecção de Cl<sup>-</sup> em amostras de suor sintético.

Em outro estudo, Cinti et al.<sup>201</sup> demonstraram o uso de uma tinta condutora de prata comercial para fabricação de eletrodos em substrato de papel filtro, a partir da técnica de serigrafia. A detecção de cloreto foi realizada livre de reagentes, uma vez que uma solução de 10  $\mu\text{L}$  contendo 200  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) foi adicionada sobre os três eletrodos, seguido de secagem à temperatura ambiente por 15 minutos antes das análises. A técnica eletroquímica usada na análise de foi a VC que permitiu o monitoramento da corrente elétrica proveniente da reação de oxirredução, de modo diretamente proporcional à concentração de íons cloreto na solução. O comportamento linear para a análise de  $\text{Cl}^-$  foi entre 10 e 200  $\text{mmol L}^{-1}$  e o limite de detecção foi calculado como 1,5  $\text{mmol L}^{-1}$ . Amostras de soro e suor foram analisados com percentuais de recuperação variando entre  $93 \pm 10\%$  e  $108 \pm 8\%$ . Além disso, os resultados alcançados foram comparados com uma técnica de referência, demonstrando compatibilidade entre ambas.

Kumar et al.<sup>314</sup> propuseram um sensor descartável à base de um nanocompósito prata-manganês fabricado via serigrafia para detecção de cloreto. Adicionalmente, foi proposto uma tira biosensora fabricada com uma membrana eletródica para analisar cloreto em tempo real em aplicações POC. A técnica empregada foi a voltametria de pulso diferencial. A faixa de concentração detectável no sensor foi de 5  $\text{mmol L}^{-1}$  a 200  $\text{mmol L}^{-1}$ , com limite de detecção de  $207 \pm 7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $17 \pm 6 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o sensor descartável e a tira, respectivamente. O dispositivo foi capaz de detectar cloreto em suor em níveis negativo, limítrofe e positivos, em comparação com exames clínicos laboratoriais.

Atrelado ao acima mencionado, dentro do contexto eletroquímico, diversos trabalhos demonstrando tintas condutivas alternativas associadas à modificação do eletrodo de trabalho têm promovido excelentes respostas analíticas em diversas vertentes, inclusive no diagnóstico de doenças<sup>14</sup>. Diante do contexto supramencionado, este capítulo vislumbra propor uma nova tinta condutora utilizando uma combinação inédita envolvendo a porção condutora à base de carbono (grafite e/ou negro de fumo), laca chinesa como material aglutinante e acetona como solvente. Além disso, fabricar sensores eletroquímicos miniaturizados, ambientalmente amigáveis e acessíveis para

detectar cloreto (enquanto biomarcador para fibrose cística) em suor. Para promover uma detecção sensível e seletiva de cloreto, é proposto também uma modificação da superfície do eletrodo de trabalho com AgNPs via o protocolo de eletrodeposição o qual ainda não foi reportado para essa aplicação com esta combinação.

## **3.2. OBJETIVOS**

### **3.2.1. Objetivo geral**

Desenvolver uma nova tinta condutora e fabricar dispositivos eletroquímicos portáteis para aplicação em diagnóstico clínico.

### **3.2.2. Objetivos específicos**

- Produzir uma nova tinta condutiva à base de laca chinesa, flocos de grafite, negro de fumo e acetona;
- Utilizar a técnica de impressão por estêncil para fabricar sensores eletroquímicos de baixo custo;
- Modificar o eletrodo de trabalho com nanopartículas de prata usando a técnica de eletrodeposição;
- Efetuar caracterizações dos dispositivos elaborados;
- Aplicar o dispositivo eletroquímico na análise de cloreto visando o diagnóstico de fibrose cística;
- Testar o sensor proposto em amostras sintéticas e reais de suor.

## **3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.3.1. Materiais e reagentes**

Cloreto de sódio, nitrato de prata, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido acético, glicose, uréia, melatonina, fluoreto de sódio, creatinina, sulfato de sódio, fosfato de sódio monobásico, carbonato de sódio, iodeto de potássio, brometo de potássio, D(+)-alanina, ácido aspártico, glicina, ácido úrico, ácido ascórbico, ácido sulfúrico e acetona foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O ferricianeto de potássio e o ferrocianeto de potássio foram adquiridos da Neon (Suzano, SP, Brasil). As soluções estoque e padrão foram preparadas utilizando água purificada por osmose reversa do purificador da

marca Gehaka, linha LXE Alfa Mare, modelo OS10LXE (Goiânia, GO, Brasil).

O pó de grafite foi obtido da Synth (Diadema, SP, Brasil). O negro de fumo Vulcan VXC72 foi generosamente doado pela Cabot Corporation (São Paulo, SP, Brasil). A laca chinesa e o esmalte foram adquiridos pela Acrilex® (São Paulo, SP, Brasil) e Risqué® (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente. A tinta condutiva à base de prata foi adquirida da Joint metal comercial LTDA (São Paulo, SP, Brasil). Folhas de poliéster (250 µm de espessura) e adesivo de vinil foram fornecidos pela Yidu Group Co. (Hsi-Chih, Taipei, Taiwan) e Imprimax® (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

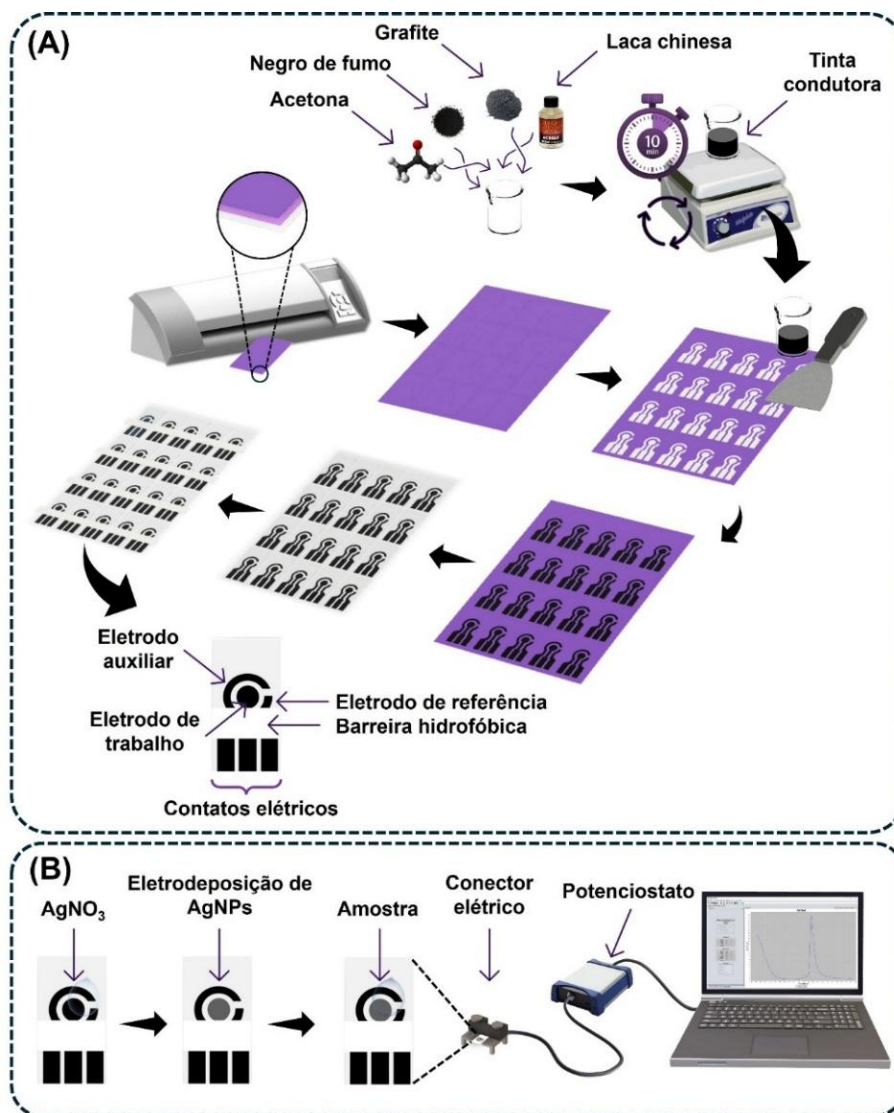
### **3.3.2. Instrumentação**

As máscaras de eletrodos foram confeccionadas usando uma impressora de recorte Silhouette (Belo Horizonte, MG, Brasil). As análises eletroquímicas foram realizadas utilizando um bipotenciostato / galvanostato µStat 400 da DropSens SL (Oviedo, Espanha) e monitoradas com o *software* DropView 2.9. O agitador magnético (modelo AA-840) foi adquirido da Gehaka (São Paulo, SP, Brasil).

### **3.3.3. Fabricação de eletrodos através da técnica de impressão em estêncil**

Os dispositivos eletroquímicos foram fabricados pela técnica de impressão por estêncil, conforme método relatado por Rocha et al.<sup>37</sup> com algumas adaptações. Inicialmente, o projeto do sensor eletroquímico, composto por um sistema com WE, RE e eletrodo auxiliar AE, foi desenvolvido utilizando o *software* gráfico CorelDraw™. Em seguida, duas camadas de adesivo vinílico foram adicionadas ao filme de poliéster. A geometria dos eletrodos foi cortada utilizando um plotter de corte. Posteriormente, os padrões dos eletrodos foram removidos e a tinta condutora foi espalhada na máscara com uma espátula. Sob condições otimizadas, a nova tinta condutora ecologicamente correta foi sintetizada a partir de uma mistura de grafite, negro de fumo e laca chinesa (1,6 g; 0,4 g e 2,0 g, respectivamente), seguida pela adição de solvente acetona (5 mL) e agitação por 10 minutos a 750 rpm. Posteriormente, o excesso da máscara adesiva vinílica foi removido com

auxílio de uma pinça após aproximadamente 30 min. Por fim, os dispositivos eletroquímicos foram secos à temperatura ambiente e a barreira hidrofóbica foi adicionada com adesivo vinílico. A Figura 3.1 ilustra esquematicamente o processo de fabricação do eletrodo.



**Figura 3.1.** (A) Representação esquemática do processo de fabricação da nova tinta condutora, utilizando grafite, negro de fumo, laca chinesa e acetona, seguido pelo protocolo de manufatura dos sensores eletroquímicos, empregando a técnica de impressão por estêncil. (B) Etapas envolvidas na preparação de nanopartículas de prata (AgNPs) na superfície WE via eletrodeposição usando amperometria, juntamente com uma representação da leitura eletroquímica realizada a partir da voltametria de pulso diferencial na presença de amostra de suor contendo cloreto. Fonte: Autoria própria.

### 3.3.4. Eletrodeposição de AgNPs

O procedimento para a eletrodeposição de nanopartículas de prata na superfície do eletrodo de trabalho foi baseado no protocolo desenvolvido por Xing et al.<sup>315</sup>. Resumidamente, 50  $\mu\text{L}$  de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  preparado em tampão Britton-Robinson (concentração  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 2,16$ ) foram adicionados ao eletrodo. A seguir, foi realizada uma medida amperométrica durante 400 s usando o potencial fixo de  $-0,6 \text{ V vs C}$  para formação das nanopartículas. A superfície do eletrodo foi limpa com água e seca com papel toalha por ação capilar. Posteriormente, 10 voltamogramas cíclicos variando de  $-0,8$  a  $0,8 \text{ V vs C}$  foram realizados sob velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  na presença de  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão BR ( $\text{pH} = 2,16$ ).

Para as otimizações de eletrodeposição, foram estudadas diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  como solução precursora das nanopartículas, o valor de potencial e o tempo de eletrodeposição. Para tanto, a solução de  $\text{AgNO}_3$  em tampão BR foi avaliado nas concentrações de  $0,10$ ;  $0,25$ ;  $0,50$ ;  $0,75$  e  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ . Em relação aos experimentos de otimização de potencial utilizando amperometria, foram testados os potenciais de  $-1,0$ ;  $-0,8$ ;  $-0,6$ ;  $-0,4$  e  $-0,2 \text{ V}$ . Por sua vez, para a otimização do tempo de eletrodeposição foram usados intervalos de 100, 200, 300, 400 e 500 segundos.

### 3.3.5. Caracterizações eletroquímicas e morfológicas

As medidas eletroquímicas de VC foram realizadas sob velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  usando  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^-$  preparado em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 2,16$ ). A caracterização eletroquímica usando a técnica de VC, para o estudo do efeito da variação da velocidade de varredura, foi registrada empregando a faixa de potencial entre  $-0,5$  a  $0,15 \text{ V vs C}$  sob taxas de varredura de  $10$ ;  $25$ ;  $50$ ;  $75$  e  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , na presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Cl}^-$  preparado em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$ .

A Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução com análise por feixe de elétrons de emissão de campo (MEV-FEG) foi realizada usando um microscópio modelo JSM 7100-F da JEOL (Waltham, MA, EUA).

As medidas de ângulo de contato (CA) foram realizadas usando uma

câmera de *smartphone* (Xiaomi Redmi note 10 lite) acoplada a um suporte ajustável *lab-made* impresso em 3D para medição de ângulo de contato<sup>251</sup>. Nesse sentido, uma alíquota de água ultrapura foi adicionada ao WE antes e depois da modificação com AgNPs. Após 10 s da gota no material eletrodico, as imagens foram capturadas e analisadas pelo *software* ImageJ.

### 3.3.6. Medidas eletroquímicas usando VPD

As análises eletroquímicas de soluções padrão de cloreto e amostras sintéticas ou reais foram realizadas utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial. Os parâmetros otimizados de tempo de equilíbrio, degrau de potencial, amplitude de pulso, tempo de pulso e velocidade de varredura foram de 3 s; 0,005 V; 0,075 V; 100 ms e 0,04 V s<sup>-1</sup>, respectivamente. A faixa de potencial empregada variou de -0,8 V a 0,2 V vs C. Soluções padrão analíticas de Cl<sup>-</sup> nas concentrações de 50 µmol L<sup>-1</sup> a 300 µmol L<sup>-1</sup> foram preparadas em tampão BR 30 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 2,16) como eletrólito suporte.

### 3.3.7. Preparo de amostras e análise eletroquímica de Cl<sup>-</sup> no suor

A amostra de suor usada no estudo de adição e recuperação foi coletada após exercício físico (corrida), filtrada com o auxílio de uma seringa e um filtro de partículas de 22 µm de diâmetro e, posteriormente armazenada em microtubos no congelador. A amostra foi quantificada usando VPD, diluída para 100 µmol L<sup>-1</sup> e enriquecida com 80 e 130 µmol L<sup>-1</sup> contendo tampão de 30 mmol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte.

As amostras de suor artificial foram preparadas em água ultrapura de acordo com o protocolo de Kumar et al.<sup>314</sup> com cada componente dez vezes mais concentrado. Dessa forma foram utilizados 4,1 mmol L<sup>-1</sup> de sulfato de sódio, 30 mmol L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio, 2,95 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio, 1,7 mmol L<sup>-1</sup> de D(+)glicose, 5,7 mmol L<sup>-1</sup> de D(+)alanina, 3,4 mmol L<sup>-1</sup> de ácido aspártico, 3,9 mmol L<sup>-1</sup> de glicina, 0,59 mmol L<sup>-1</sup> de ácido úrico, 100 mmol L<sup>-1</sup> de ureia, 0,84 mmol L<sup>-1</sup> de creatinina e 99,9 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico. Posteriormente, o pH foi ajustado com 1 mol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico até pH = 5,5.

Para simular condições de concentrações baixa, limítrofe e alta de

cloreto no suor, visando a triagem de indivíduos suspeitos de ter fibrose cística, o suor foi diluído em água ultrapura (1:10) e enriquecido com cloreto nas concentrações de 15; 55 e 75 mmol L<sup>-1</sup>. Em seguida, as amostras artificiais foram diluídas em um tampão BR a 30 mmol L<sup>-1</sup> para atingir concentrações finais teóricas de cloreto de 54; 198 e 270 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A coleta de amostras de suor de crianças oriundas da triagem neonatal foi realizada a partir do estímulo da sudorese usando iontoforese com pilocarpina em gel, seguido da coleta da amostra em um tudo *microbore* (tipo serpentina), pelos profissionais da área da saúde da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) da unidade de Anápolis<sup>316</sup>.

### **3.3.8. Análise de amostras reais e teste de referência**

As amostras reais de suor foram analisadas após dois processos de diluição para adequar-se à faixa de concentração necessária para ser empregada a técnica de voltametria de pulso diferencial. A primeira diluição consistiu em utilizar-se o volume de 15 μL de amostra e 235 μL de água ultrapura. Para a segunda diluição, utilizou-se uma alíquota de 50 μL de amostra previamente diluída, 325 μL de água ultrapura e 125 μL de tampão BR, perfazendo-se a concentração final do eletrólito suporte de 30 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 2,16). O volume de solução usada no eletrodo foi de 50 μL.

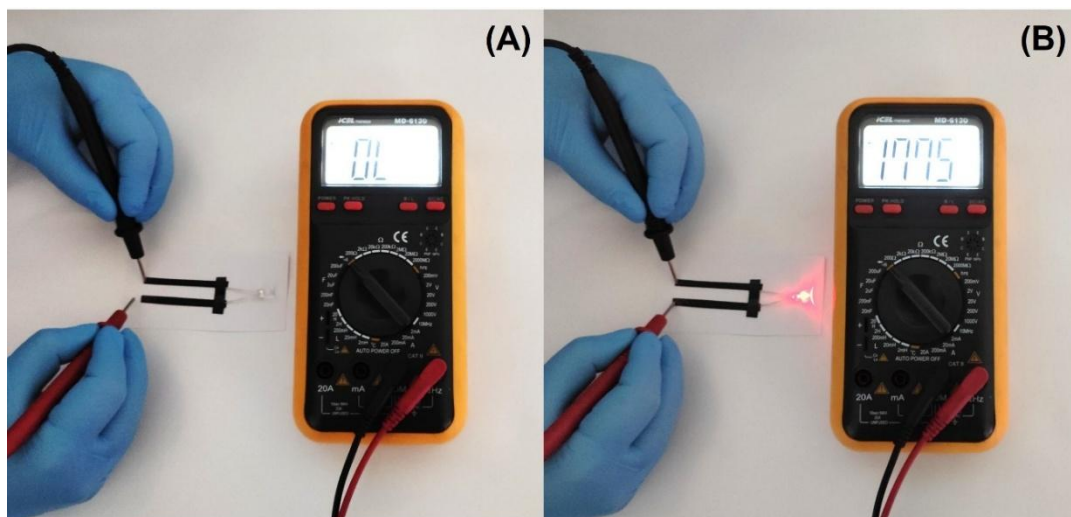
A técnica usada como análise de referência para o teste de suor dos pacientes da triagem neonatal foi a partir do uso de um analisador cloridrômetro ChloroChek®.

## **3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.4.1. Fabricação de eletrodos impressos em estêncil e caracterizações**

A fabricação de sensores eletroquímicos utilizando a técnica de impressão por estêncil a partir de uma nova tinta condutora à base de laca chinesa, grafite e acetona foi testada com diferentes proporções de negro de fumo na formulação (5, 10, 15 e 20% m/m, em relação ao componente condutor). A fim de demonstrar o potencial da tinta condutora para conduzir corrente elétrica, uma trilha condutiva foi criada em um substrato de papel

sulfite usando uma formulação contendo 20% m/m de negro de fumo como exemplo. Posteriormente, as trilhas foram integradas a um diodo emissor de luz (LED) e, com auxílio de um multímetro, considerando o circuito aberto ou fechado, conforme mostra a Figura 3.2 A-B, foi possível acender o LED.



**Figura 3.2.** Trilhas condutoras produzidas com a nova formulação de tinta à base de laca chinesa, grafite e negro de fumo, mostrando o circuito aberto (A) e fechado (B), com um LED sendo acesso. Fonte: Autoria própria.

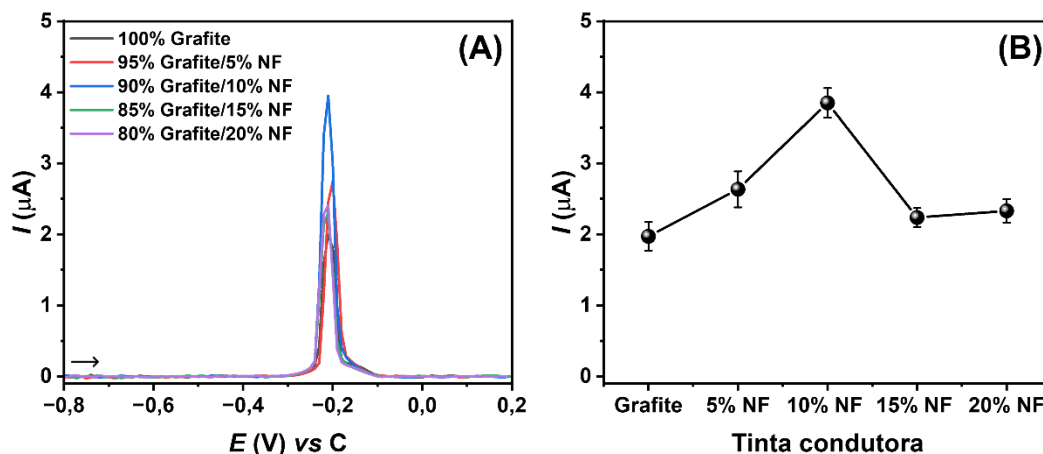
Uma vantagem do uso de tintas condutoras alternativas para detecção eletroquímica de compostos eletroativos é a flexibilidade para ajustar a formulação de acordo com as necessidades específicas da aplicação. Além disso, a possibilidade de produzir dispositivos ecologicamente corretos é outro atributo que merece destaque<sup>14</sup>. Nesse contexto, para cada formulação proposta à base de laca chinesa, grafite e negro de fumo, foram construídos dispositivos eletroquímicos, os quais foram posteriormente modificados com nanopartículas de prata. Em seguida, foram realizadas medidas eletroquímicas por voltametria de pulso diferencial para determinar qual formulação seria capaz de fornecer a melhor resposta eletroquímica para análise de cloreto, um importante biomarcador da fibrose cística, conforme mencionado anteriormente. Uma imagem real do novo sensor eletroquímico é mostrada na Figura 3.3. A literatura demonstra que o uso de nanopartículas ou sensores impressos com tinta de prata tem sido aplicada com sucesso na detecção seletiva de cloreto, o qual diferentes estratégias podem ser adotadas<sup>308,314</sup>. O protocolo aqui proposto partiu da metodologia usada por

Xing et al.<sup>315</sup>. via eletrodeposição.



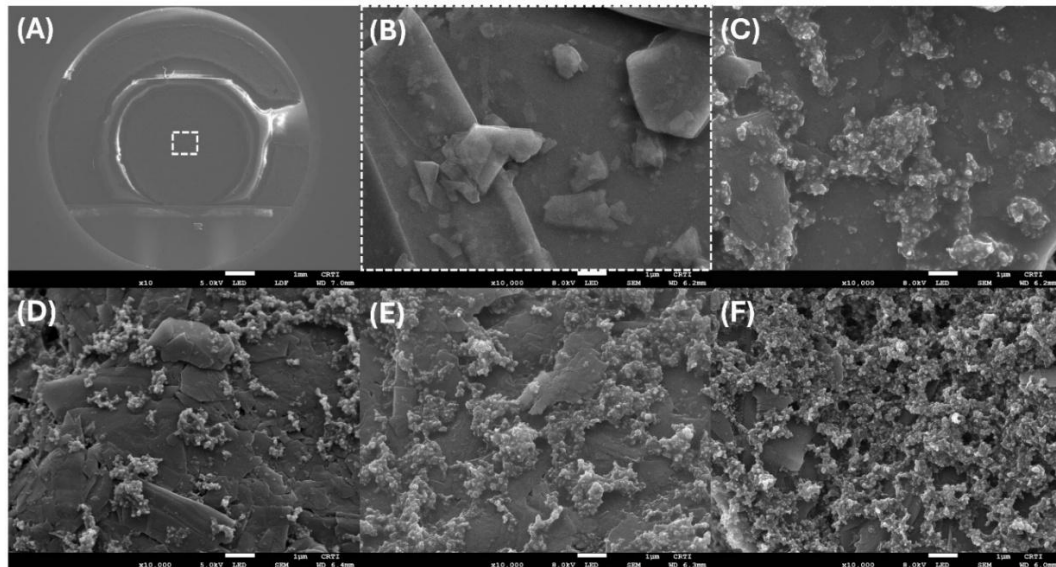
**Figura 3.3.** Imagem real de eletrodo de grafite-negro de fumo impresso em estêncil com 10% m/m de NF. Fonte: Autoria própria.

A Figura 3.4 A-B demonstra os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada formulação de tinta condutora estudada e o um gráfico de corrente *versus* a composição do condutor utilizada, respectivamente. É possível observar que os valores de corrente elétrica provenientes do pico de oxidação próximos ao potencial de -0,2 V vs C aumentam até a composição de 10% de negro de fumo. Posteriormente, ocorre uma diminuição considerável na magnitude da corrente elétrica. Assim, a formulação contendo 10% de NF foi fixada para experimentos subsequentes.



**Figura 3.4.** Otimização dos parâmetros de fabricação do sensor eletroquímico e modificação do eletrodo de trabalho com nanopartículas de prata. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos na presença de  $\text{Cl}^-$   $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 2,16$ ) para diferentes proporções de grafite e negro de fumo (100% grafite; 95% grafite/5% NF; 90% grafite/10% NF; 85% grafite/15% NF e 20% grafite/20% NF) na formulação da tinta condutora. Fonte: Autoria própria.

Para melhor compreensão a respeito da superfície do WE sob cada proporção entre grafite e negro de fumo avaliada na composição do material eletródico, foram obtidas micrografias por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura. De posse da Figura 3.5 A-B, que demonstra a morfologia da superfície do WE, é possível visualizar a célula eletroquímica e o WE, respectivamente, para o dispositivo contendo apenas grafite enquanto material condutor. O perfil apresentado assemelha-se a outros eletrodos alternativos de grafite, no qual é possível contemplar os flocos de grafite no material eletródico<sup>25,37,61</sup>. Por outro lado, para a Figura 3.5 C-F, o aumento da proporção de negro de fumo na formulação resultou em um acréscimo gradual na quantidade de nanopartículas desse material na superfície do WE.

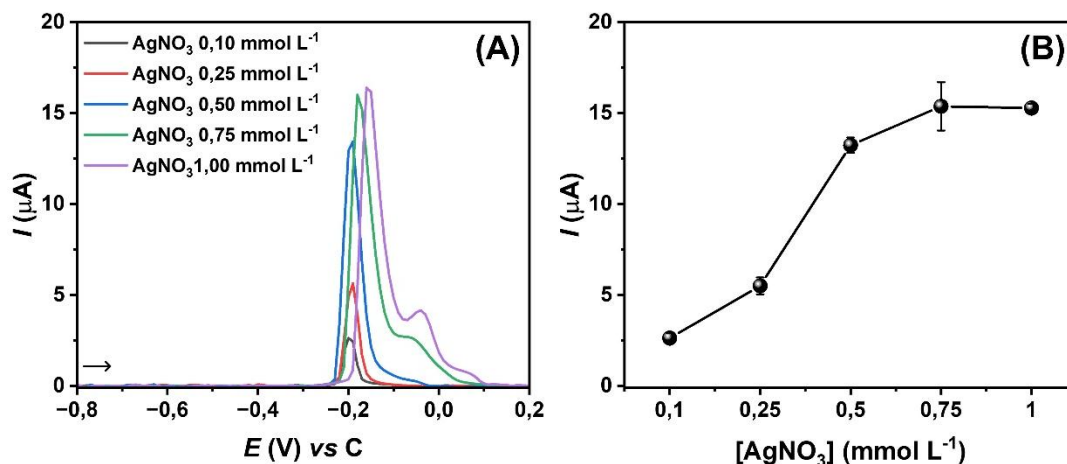


**Figura 3.5.** Micrografias obtidas para o novo sensor eletroquímico proposto à base de laca chinesa usando diferentes proporções entre grafite e negro de fumo. (A) Imagem mostrando a célula eletroquímica construída sobre o substrato de poliéster contendo o WE, RE e o AE, cuja composição é de grafite, além da barreira hidrofóbica de vinil adesivo, sob magnificação de 10 vezes. (B) Imagem do eletrodo de trabalho (magnificação de 10.000 vezes), contendo grafite na composição. (C) Imagem do WE do eletrodo cuja composição é de 95% de grafite e 5% de negro de fumo em relação aos componentes condutivos (magnificação de 10.000 vezes). (D) Imagem do WE do eletrodo com composição de 90% de grafite e 10% de negro de fumo (magnificação de 10.000 vezes). (E) Imagem do WE do eletrodo com composição de 85% de grafite e 15% de negro de fumo (magnificação de 10.000 vezes). (F) Imagem do WE do eletrodo com composição de 80% de grafite e 20% de negro de fumo (magnificação de 10.000 vezes). Fonte: Autoria própria.

A literatura reporta que o grafite, comumente na escala de dezenas de microns de comprimento, é uma estrutura plana em camadas que é condutora, principalmente ao longo desses planos. A estrutura química do grafite compreende basicamente de átomos de carbono hibridizados  $sp^2$  ligados covalentemente em uma estrutura hexagonal planar<sup>21,317</sup>. O negro de fumo, por outro lado, é uma partícula que detém elevada área superficial, da ordem de submicrométrica cujo formato é aproximadamente esférico. Quando se considera um ligante polimérico contendo esses dois materiais, há uma interação entre ambos os tipos de carbono que ocasiona uma matriz condutora que é consideravelmente mais condutiva do que se esses materiais fossem usados separadamente. As pequenas partículas de negro de fumo

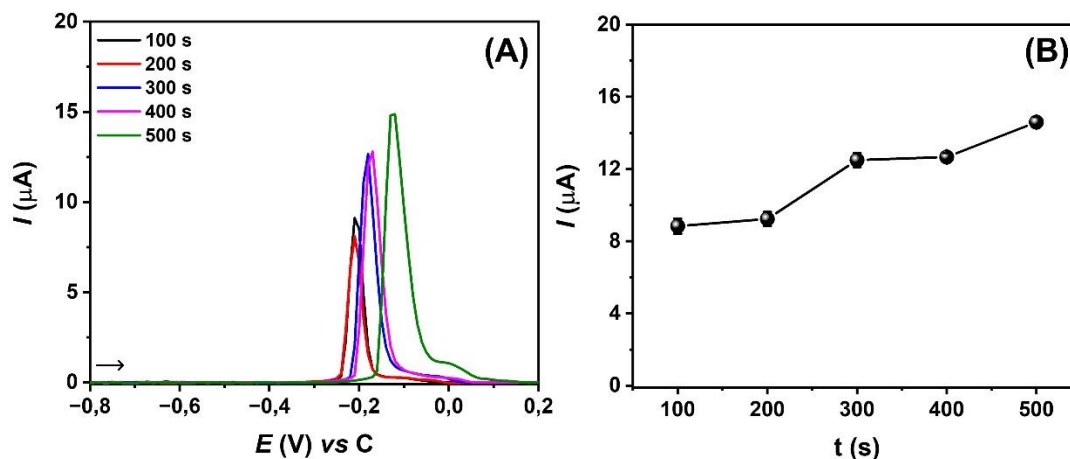
dispersam-se e formam pontes condutoras entre as áreas ricas em grafite da matriz composta<sup>317</sup>. Essa característica é substancialmente importante para a melhora do desempenho eletroquímico na detecção de inúmeros compostos. É importante destacar que o negro de fumo possui uma apreciável condutividade elétrica, dispersa-se adequadamente em inúmeros tipos de solvente, é funcionalizável, além de exibir uma cinética rápida de transferência de elétrons<sup>318–320</sup>.

Outro importante parâmetro avaliado foi o impacto da variação da concentração de nitrato de prata utilizada como solução precursora para a formação das nanopartículas via eletrodeposição. As condições testadas foram 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>, com concentração de cloreto fixada em 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Como demonstra a Figura 3.6 A-B, o aumento da concentração de AgNO<sub>3</sub> provoca um aumento no pico correspondente à prata próximo ao potencial de 0 V vs C, assim como resulta em uma maior intensidade de corrente para o pico referente ao Cl<sup>-</sup>. Quando a concentração AgNO<sub>3</sub> é menor do que a concentração de Cl<sup>-</sup>, praticamente todo o cloreto é consumida, não sendo possível visualizar claramente o pico referente à prata. Sob concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> tanto para Cl<sup>-</sup> quanto para AgNO<sub>3</sub> é possível visualizar o pico de prata com baixa intensidade. Por sua vez, quando a concentração de AgNO<sub>3</sub> é maior que a concentração de cloreto, apenas parte da prata é consumida, sendo possível visualizar tanto o pico referente ao cloreto quanto o pico que corresponde à oxidação da prata. Outro comportamento observado foi o leve deslocamento de potencial do pico referente ao Cl<sup>-</sup> para valores mais positivos à medida que a concentração de prata foi aumentada. Como as amostras de suor de pacientes com FC são obtidos em baixos volumes e espera-se detectar cloreto em baixas concentrações, através da diluição da amostra, a condição de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> foi estabelecida como condição ótima, uma vez que apresentou um sinal analítico com boa magnitude de corrente, além de não apresentar um sinal analítico expressivo referente à prata, o que poderia dificultar o processo de aquisição de dados.



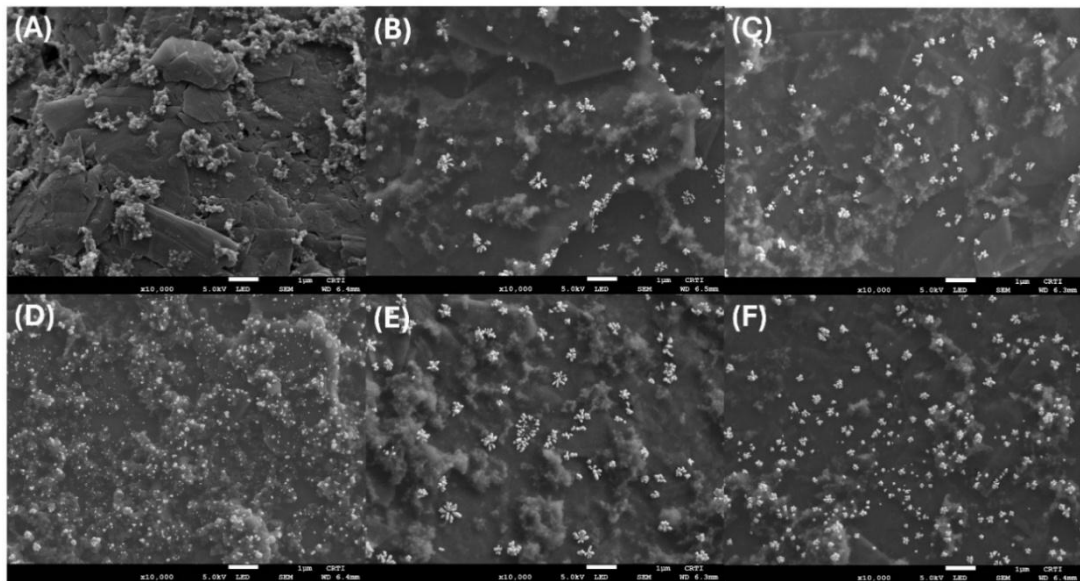
**Figura 3.6.** (A) Voltamogramas da VPD obtidos para diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00  $\text{mmol L}^{-1}$ ) na solução precursora das nanopartículas de prata. (B) Gráfico relacionando a intensidade de corrente obtida em função da concentração de  $\text{AgNO}_3$  empregada. Fonte: Autoria própria.

Alguns parâmetros relacionados ao protocolo de eletrodeposição de AgNPs via amperometria, adaptado de Xing et al.<sup>315</sup> e Renedo et al.<sup>321</sup>, também foram cuidadosamente avaliados. A eletrodeposição foi otimizada empregando-se diferentes tempos e valores de potencial. Os tempos estudados foram 100; 200; 300; 400 e 500 s de eletrodeposição sob potencial fixo de -0,8 V. Para melhor compreender a morfologia da superfície do WE sob essas diferentes condições, também foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura para cada condição citada. A Figura 3.7 A-B mostra os voltamogramas adquiridos para os experimentos de variação do tempo de eletrodeposição e o um gráfico correspondente à intensidade da corrente *versus* tempo.



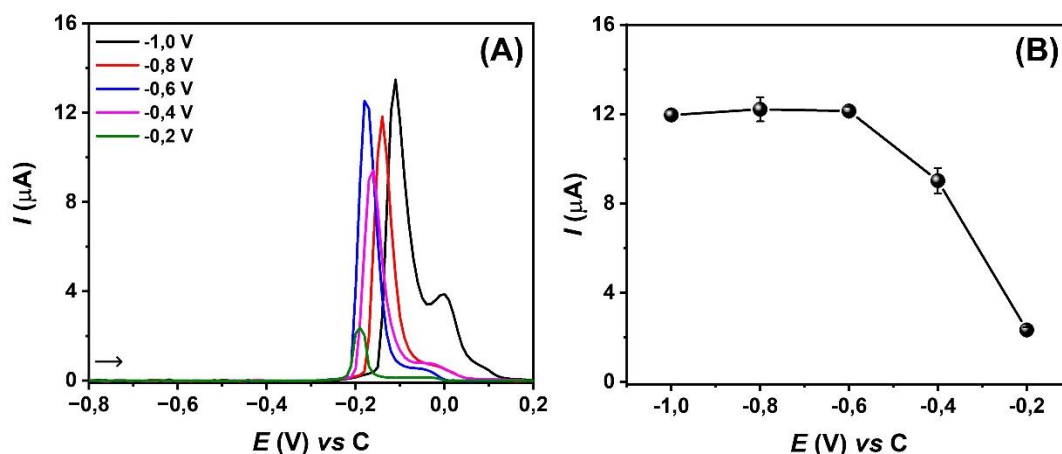
**Figura 3.7.** (A) Voltamogramas da VPD provenientes de diferentes tempos de eletrodeposição de nanopartículas de prata (100; 200; 300; 400 e 500 s) sobre o eletrodo de trabalho. (B) Gráfico referente à relação entre a magnitude de corrente e o tempo de aplicação de potencial usado na amperometria. Fonte: Autoria própria.

Conforme mostra a Figura 3.7 A-B, há um aumento na intensidade de corrente à medida que se aumenta o tempo de eletrodeposição. Concomitantemente, há um deslocamento de potencial para potenciais mais positivos conforme se aumenta o tempo. Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da quantidade de prata disponível na superfície do eletrodo de trabalho que, conseqüentemente, permite que a superfície se torne mais condutível e, portanto, apresente um maior sinal analítico. As imagens de MEV corroboram com este comportamento, uma vez que é possível identificar um considerável aumento na quantidade de nanopartículas distribuídas sobre a superfície do WE. Além disso, conforme o tempo de eletrodeposição torna-se maior, há também um aumento do tamanho das nanopartículas eletrodepositadas, conforme mostra a Figura 3.8 A-F. Esse comportamento foi similar ao encontrado por Renedo et al<sup>321</sup>. Sendo assim, visando um apreciável sinal analítico em um intervalo de tempo cuja eletrodeposição ocorra de maneira estável, fixou-se o tempo de 400 s, tal como outros trabalhos previamente reportados na literatura empregando diferentes tipos de nanopartículas e eletrodos<sup>315,321,322</sup>.



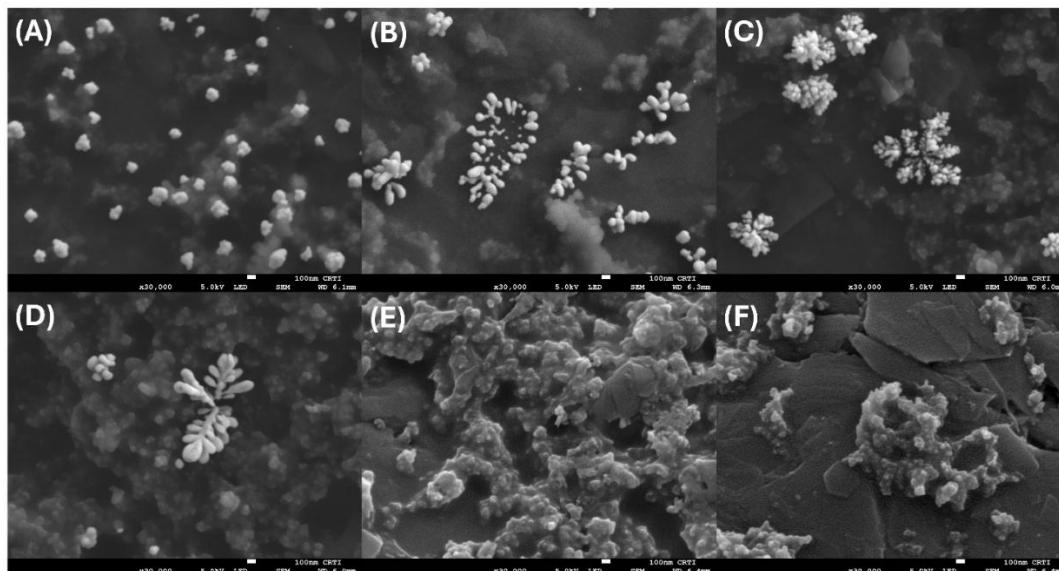
**Figura 3.8.** Micrografias adquiridas a partir da técnica de MEV-FEG usando a magnificação de 10.000 vezes. (A) Imagem do WE do dispositivo eletroquímico na ausência de modificação da superfície. (B) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 100 s (C). WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 200 s. (D) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 300 s. (E) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 400 s. (F) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o tempo de eletrodeposição de 500 s. O potencial de eletrodeposição utilizado foi de -0,8 V. Fonte: Autoria própria.

O efeito do potencial de eletrodeposição de eletrodeposição também foi investigado empregando-se os valores de -1,0; -0,8; -0,6; -0,4 e -0,2 V. A Figura 3.9 A-B mostra os voltamogramas e os gráficos de corrente em função do potencial avaliado, respectivamente. O comportamento apresentado demonstra que os maiores valores de correntes são obtidos para os valores de potenciais mais negativos (-1,0; -0,8 e -0,6 V), acompanhado de um aumento gradativo no que se refere ao pico de oxidação característico da prata. Esses resultados sugerem, portanto, que a diminuição do potencial ocasiona em uma maior quantidade de prata depositada na superfície. Por outro lado, o sinal de corrente elétrica cai consideravelmente para os potenciais de -0,4 e -0,2 V. Além disso, outro efeito observado é o deslocamento de potencial do pico anódico do cloreto para potenciais mais negativos à medida que se diminui o potencial da eletrodeposição.



**Figura 3.9.** (A) Voltamogramas da VPD provenientes de diferentes potenciais de eletrodeposição de nanopartículas de prata (-1,0; -0,8; -0,6; -0,4; -0,2 V) sobre o eletrodo de trabalho. (B) Gráfico mostrando a magnitude de corrente em função do potencial aplicado, mantido fixo durante a amperometria. Fonte: Autoria própria.

Análises de microscopia eletrônica de varredura para cada potencial de eletrodeposição foram adquiridas para melhor avaliar o comportamento do sistema. Conforme destaca a Figura 3.10 (A-F), há um aumento na quantidade e no tamanho das nanopartículas depositadas na superfície do WE. Uma vez que o sinal analítico é parecido para os potenciais de -1,0; -0,8 e -0,6, fixou-se o valor de -0,6 V a fim de se trabalhar sob condições mais brandas.



**Figura 3.10.** Micrografias adquiridas a partir da técnica de MEV-FEG usando a magnificação de 30.000 vezes. (A) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -1,0 V. (B) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,8 V. (C) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,6 V. (D) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,4 V. (E) WE após a eletrodeposição de AgNPs usando o potencial de eletrodeposição de -0,2 V. (F) Imagem do WE do sensor eletroquímico na ausência de modificação da superfície. O tempo de eletrodeposição utilizado foi de 400 s. Fonte: Autoria própria.

Conforme demonstra a Figura 3.10, a geometria das nanopartículas sobre algumas alterações mediante os diferentes valores de potencial usados no processo de eletrodeposição. Na Figura 3.10 A, por exemplo, no qual foi usado o potencial de -1,0 V, as AgNPs assumem uma morfologia relativamente esférica, com pequenos aglomerados. Já de acordo com as imagens disponíveis nas Figuras 3.10 B-D, que são empregados os valores de potencial de -0,8 V e -0,6 V, respectivamente, é possível observar uma expressiva alteração na morfologia das nanopartículas para nanoestruturas “dendríticas” cuja geometria ramificada possui formato semelhante a flores<sup>323–326</sup>. Por outro lado, através da Figura 3.10 E, é possível observar que sob potencial de -0,2 V, praticamente não se formaram nanopartículas. A Figura 3.10 F destaca a superfície do WE contendo flocos de grafite e nanopartículas de negro de fumo entremeadas no material eletrodico. Os parâmetros avaliados nas otimizações da eletrodeposição, bem como os valores ótimos

selecionados estão sumarizados na Tabela 3.1.

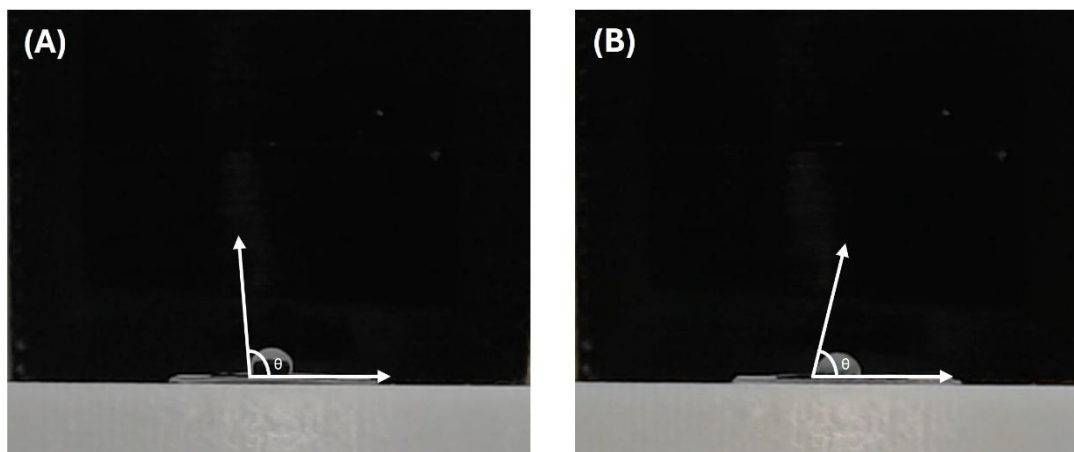
**Tabela 3.1.** Resumo dos parâmetros estudados e fixados para a construção do sensor eletroquímico, bem como a modificação do eletrodo de trabalho com nanopartículas de prata.

Parâmetro estudado	Faixa	Valor ótimo
	100% grafite	
Proporção grafite:negro de fumo	95% grafite /5% NF	90% grafite /10% NF
	90% grafite /10% NF	
	85% grafite /15% NF	
	80% grafite /20% NF	
[AgNO <sub>3</sub> ]	0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mmol L <sup>-1</sup>	0,50 mmol L <sup>-1</sup> AgNO <sub>3</sub>
Tempo de eletrodeposição	100; 200; 300; 400 e 500 s	400 s
Potencial de eletrodeposição	-1.0; -0.8; -0.6; -0.4 e -0.2 V	-0.6 V

### 3.4.2. Caracterizações

Diferentes formulações de tintas condutoras à base de carbono de baixo vez que promovem versatilidade e exibem desempenho eletroquímico apreciável<sup>14</sup>. Exemplos de aglutinantes incluem resina de poliéster<sup>61</sup>, verniz de vitral<sup>25</sup>, cola de silicone<sup>327</sup>, goma laca<sup>37</sup>, resíduos de acrilonitrila-butadieno-estireno<sup>34</sup> e esmalte de unha<sup>328</sup>. Até onde sabemos, propomos aqui, pela primeira vez, uma nova tinta condutora composta de grafite e negro de fumo (como materiais condutores), acetona como solvente e laca chinesa como aglutinante. Sobretudo, empregando-se uma subsequente etapa de modificação com AgNPs para detecção de Cl<sup>-</sup>. Nesse sentido, a Figura 3.11 A-B evidencia a mudança na molhabilidade da superfície do eletrodo de grafite-negro de fumo (EGR-NF) antes e após a modificação do com AgNPs (AgNPs/EGR-NF), o que corrobora com o sucesso da incorporação do nanomaterial sobre o WE via protocolo de eletrodeposição. Os valores de AC

foram calculados como  $87^\circ \pm 1^\circ$  e  $80^\circ \pm 2^\circ$ , para o EGR-NF e AgNPs/EGR-NF, respectivamente. Dessa maneira, aumentando o caráter da superfície para mais hidrofílico.



**Figura 3.11.** Imagens de ângulo de contato obtidas para o WE do EGR-NF (A) sem modificação na superfície e (B) após a eletrodeposição de AgNPs (AgNPs/EGR-NF). Fonte: Autoria própria.

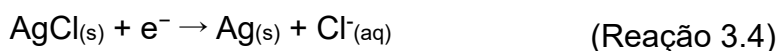
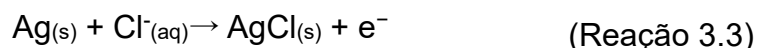
Outra técnica empregada para caracterizar o sensor eletroquímico foi a voltametria cíclica. Com o intuito de determinar a influência do uso das nanopartículas de prata na resposta eletroquímica, um experimento de controle foi realizado na ausência e presença de íons cloreto. Dessa forma, empregou-se tanto eletrodos não modificados de grafite-negro de fumo, quanto modificados com AgNPs. A Figura 3.12 A dispõe os voltamogramas cíclicos obtidos. Conforme pode ser visualizado, na ausência da modificação do eletrodo com AgNPs, tanto na presença do eletrólito suporte (tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 2,16$ ) quanto para o  $\text{Cl}^-$  não é possível a visualização de picos de oxidação ou redução entre os potenciais de  $-0,8$  a  $0,8 \text{ V}$  (vs C). Por outro lado, na presença do eletrodo modificado com AgNPs, via eletrodeposição, é possível visualizar dois picos referentes à modificação do WE na presença de tampão BR. O primeiro pico, considerando a varredura no sentido direto, ocorre próximo ao potencial  $0,0 \text{ V}$ , e, no sentido inverso, um pico de redução pode ser visualizado próximo ao potencial de  $-0,5 \text{ V}$  vs C. Esses processos eletroquímicos são compatíveis com outros estudos empregando modificações de WE usando nanopartículas de prata<sup>308,314,329</sup>.

O pico de oxidação bastante pronunciado refere-se à oxidação de um

elétron da prata metálica (reação 3.1) e o pico de redução corresponde à deposição do íon prata em prata metálica (reação 3.2):



Utilizando-se uma solução contendo 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup>, o eletrodo de grafite-negro de fumo modificado com nanopartículas de prata apresenta um novo pico de oxidação próximo ao potencial de -0,13 V vs C e um pico de redução aproximadamente no potencial de -0,35 V vs C. O pico de oxidação pode ser atribuído à conversão da prata presente no material do eletrodo proposto no precipitado cloreto de prata (AgCl) e está em conformidade com outros estudos<sup>314,330</sup>. O pico de redução na varredura reversa consiste na redução do cloreto de prata<sup>331</sup>. A reação de oxidação pode ser descrita como a seguir:

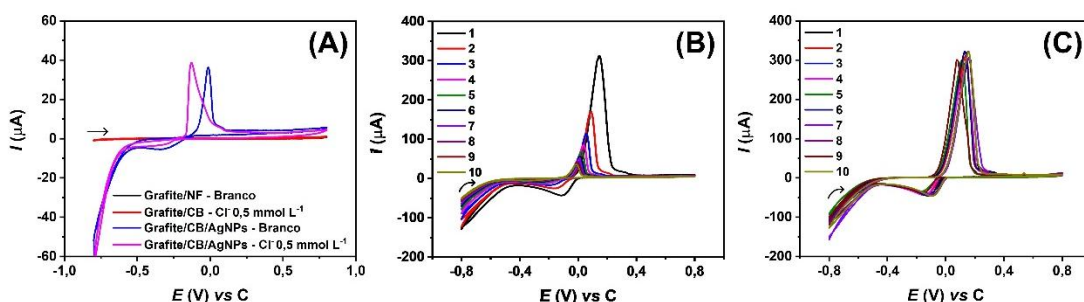


Vale ressaltar que a magnitude de corrente do primeiro pico de oxidação se correlaciona linearmente com a concentração de íons cloreto. Concomitantemente, observa-se um decréscimo na intensidade do pico de oxidação referente à prata metálica isoladamente (Figura 3.12 A) no segundo pico de oxidação, uma vez que parte da prata é consumida.

Outro estudo realizado foi referente à estabilização do sinal analítico proveniente do processo de modificação do WE com AgNPs. Conforme indicado na Figura 3.12 B, os valores dos potenciais de oxidação e de redução tornaram-se menos positivos com o aumento do número de ciclos. Além disso, houve um declínio gradativo na magnitude das correntes de pico anódica e catódica frente ao aumento do número de ciclos até a estabilização observada por volta do décimo ciclo. Dessa forma, fixou-se o uso de 10 ciclos de voltametria cíclica, na presença do eletrólito suporte sob velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>, a fim de garantir a estabilização do sinal de modificação antes do uso do sensor via VPD.

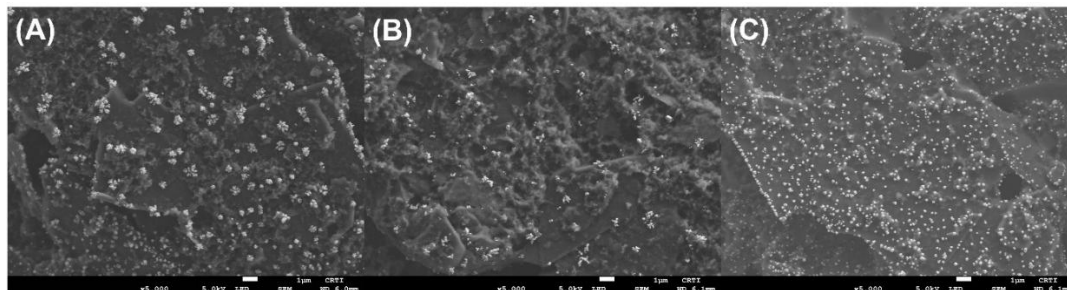
A reprodutibilidade do processo de modificação do WE foi avaliada por

voltametria cíclica considerando 10 eletrodos distintos, fabricados por meio do método proposto e modificados a partir do mesmo protocolo (Figura 3.12 C). Para tanto, foi considerado o primeiro ciclo de VC do processo de estabilização do sinal analítico. Com base nos valores das correntes dos picos de oxidação, o desvio padrão relativo foi de 3,58%, que é um valor considerado aceitável, o que atesta a eficiência e uma apreciável reprodutibilidade do método proposto para modificar a superfície do WE.



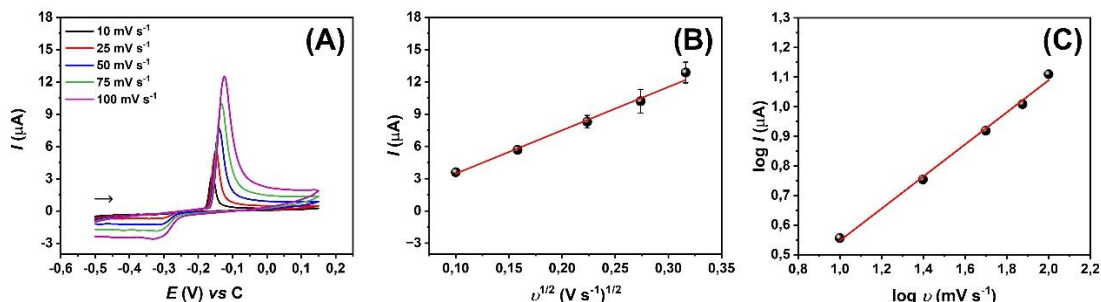
**Figura 3.12.** Medidas eletroquímicas usando a técnica de voltametria cíclica. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos na ausência e presença de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup> preparado em tampão BR 30 mmol L<sup>-1</sup> a 100 mV s<sup>-1</sup> utilizando eletrodo de grafite não modificado e modificado com AgNPs. (B) Estabilização do sinal analítico após o processo de modificação do WE, na presença de tampão BR 30 mmol L<sup>-1</sup>, sob velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>. (C) Reprodutibilidade da modificação do WE com AgNPs. Fonte: Autoria própria.

A Figura 3.13 A-C mostra imagens de MEV adquiridas para a superfície do WE para três dispositivos eletroquímicos. (i) Após modificação com nanopartículas de prata usando amperometria, (ii) após etapa de modificação seguida de 10 ciclos da voltametria cíclica e (iii) após a modificação, VC na presença do eletrólito e VC na presença de cloreto 1 mmol L<sup>-1</sup>. Como demonstra a Figura 3.13 A-B, há nanopartículas de geometria similares distribuídas ao longo de toda a superfície do WE de ambos os dispositivos. Como as duas imagens foram adquiridas usando a mesma magnificação, de modo qualitativo, observa-se que uma parte das nanopartículas fracamente aderidas podem ter sido removidas da superfície do WE após o processo de VC, seguido da limpeza com água. A Figura 3.13 C, por outro lado, demonstra uma alteração significativa sobre a superfície. Essa característica pode ser atribuída devido o processo de formação de AgCl.



**Figura 3.13.** Micrografias adquiridas do WE do dispositivo de grafite-negro de fumo sob magnificação de 5.000 vezes. (A) Sensor após modificação com AgNPs via amperometria. (B) Sensor após modificação com AgNPs via amperometria, seguido de estabilização usando VC. (C) Sensor após modificação com AgNPs, estabilização e após análise de  $\text{Cl}^-$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 2,16). Fonte: Autoria própria

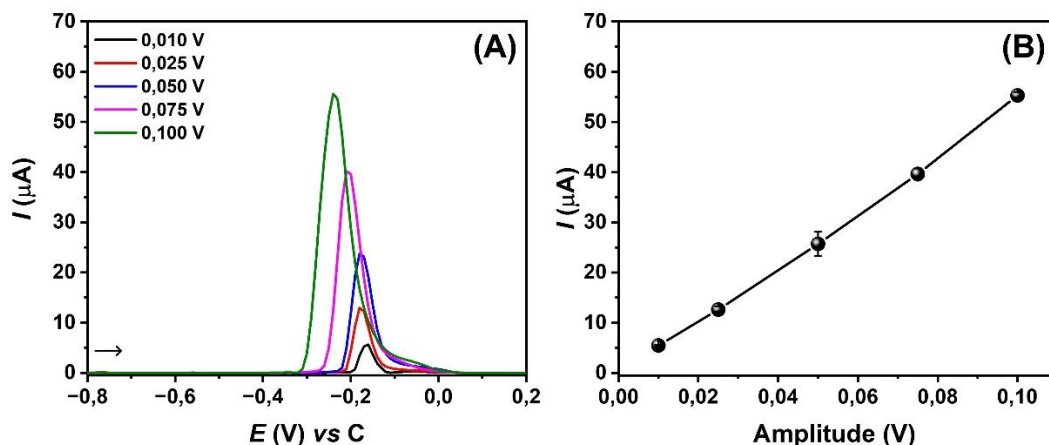
O controle do transporte de massa da reação de oxidação eletroquímica para a formação de AgCl foi investigado por meio do estudo do efeito da variação da velocidade de varredura. Para tanto, uma solução contendo  $\text{Cl}^-$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  de pH = 2,16 foi analisada usando VC sob velocidades de varredura de 10; 25; 50; 75 e  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . A Figura 3.14 A-C mostra os voltamogramas obtidos, um gráfico da corrente de pico anódica ( $i_{pa}$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura e a plotagem do logaritmo ( $\log$ ) da corrente em função do  $\log$  da velocidade de varredura. Conforme exibe o gráfico da Figura 3.14 A- B, as correntes de pico anódicas aumentaram com o incremento da velocidade de varredura e foram proporcionais à raiz quadrada da velocidade de varredura, com o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,990. Em relação ao gráfico que relaciona o  $\log i$  vs o  $\log$  da velocidade de varredura, o valor de inclinação da curva (coeficiente angular) foi de 0,54. A literatura reporta que valores de coeficiente angular em gráficos de  $\log i$  vs o  $\log v$  próximos à 0,5 trata-se de processos cujo transporte de massa para a superfície do eletrodo ocorre por difusão e, próximos à 1, por adsorção<sup>69</sup>. Dessa forma, a partir de ambos os gráficos, denota-se que o transporte de massa é predominantemente difusional<sup>314</sup>.



**Figura 3.14.** Caracterização eletroquímica do eletrodo AgNPs-GR/NF por voltametria cíclica. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cl}^-$  preparado em tampão BR  $30 \text{ mmol L}^{-1}$  registrados em diferentes velocidades de varredura. (B) Corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. (C)  $\log I$  vs  $\log v$  para o processo de oxidação de  $\text{Cl}^-$ . Fonte: Autoria própria.

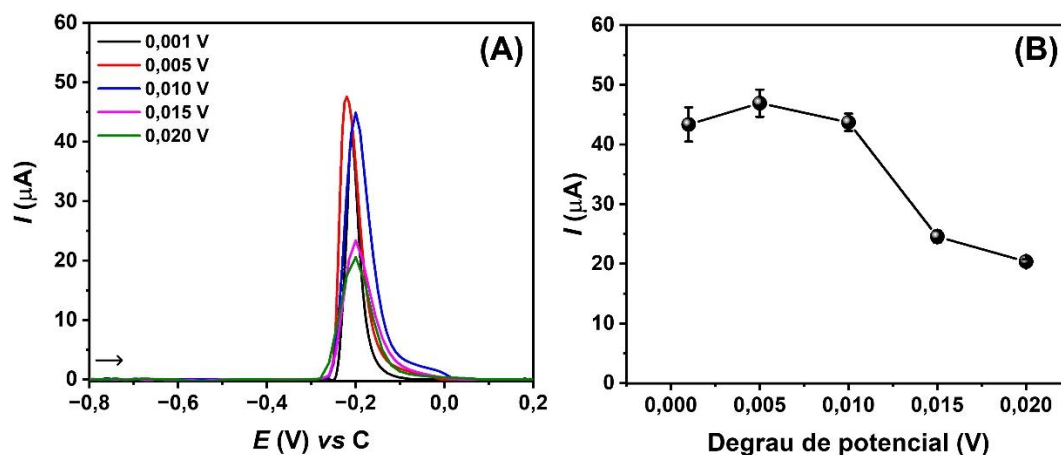
### 3.4.3. Otimizações eletroquímicas

Os parâmetros eletroquímicos, como o de degrau de potencial, a amplitude de pulso e tempo de pulso, foram estudados com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para a análise quantitativa e sensível de  $\text{Cl}^-$ , utilizando a técnica de VPD. Para amplitude de pulso, os valores estudados foram 0,010; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 V. Como pode ser visto na Figura 3.14 A-B, o aumento na amplitude do pulso promoveu um aumento da corrente faradaica, seguido por uma mudança discreta no potencial do pico anódico para valores mais negativos. Para evitar valores de corrente muito elevados, bem como visando evitar um sinal de fundo expressivo para o pico da prata, a amplitude de 0,075 V foi definida como a condição ótima.



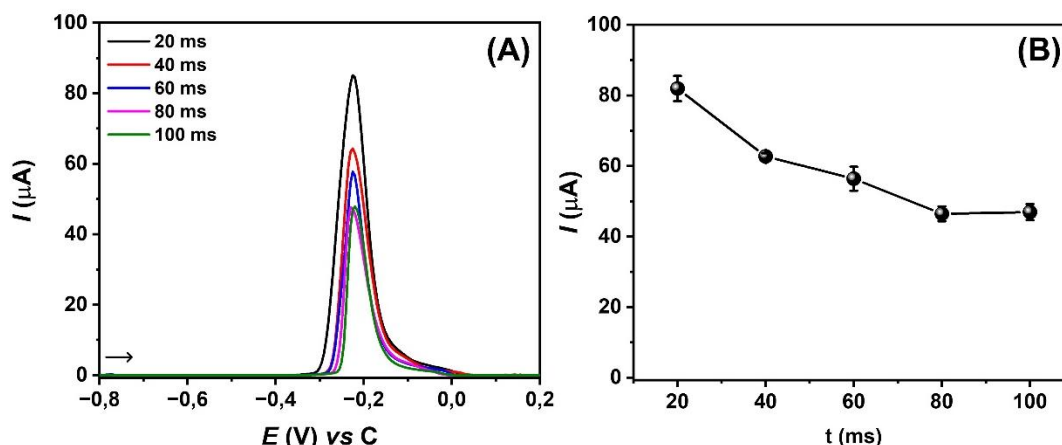
**Figura 3.15.** (A) Voltamogramas da otimização da amplitude de pulso da técnica de VPD visando a análise de  $\text{Cl}^-$ . (B) Gráfico relacionando os valores de corrente em função dos valores de amplitude. Fonte: Autoria própria.

Em relação ao degrau de potencial, os valores testados foram de 0,001, 0,005, 0,010, 0,015 e 0,020 V. Conforme mostrado na Figura 3.16 A-B, este parâmetro influencia tanto a largura do pico quanto a magnitude da corrente elétrica. Para os menores valores de degrau de potencial, os perfis voltamétricos apresentam picos finos e bem definidos. Em contraste, à medida que o degrau de potencial aumenta, observa-se um alargamento no pico anódico. Em termos de corrente faradaica, nota-se um aumento discreto entre os potenciais de 0,001 e 0,005 V, seguido de um declínio. Os valores diminuem ligeiramente em 0,010 V e depois mostram uma redução considerável no sinal analítico. Para garantir uma boa resolução de pico e um sinal de corrente apreciável, a condição de degrau de potencial selecionada foi 0,005 V.



**Figura 3.16.** (A) Voltamogramas da otimização do degrau de potencial da técnica de VPD visando a análise de  $\text{Cl}^-$ . (B) Gráfico relacionando os valores de corrente em função dos valores do degrau de potencial. Fonte: Autoria própria.

O efeito do tempo de aplicação do pulso também foi avaliado em relação à análise de cloreto. Para isso, o impacto variação do tempo de pulso de 100 ms para 20; 40; 60 e 80 ms foi examinado. Conforme dispõe a Figura 3.17 A-B, a redução no tempo de aplicação do pulso influencia diretamente no valor de corrente de pico anódica monitorada, aumentando-a. Outro aspecto observado é que, quanto menor o tempo de pulso, maior é a largura do pico. Com o intuito de manter uma boa resolução do pico, prevenir um sinal de corrente próximo de 100  $\mu\text{A}$ , além de evitar um valor de corrente elevado referente ao pico da prata, o tempo de 100 ms foi mantido como parâmetro ótimo.



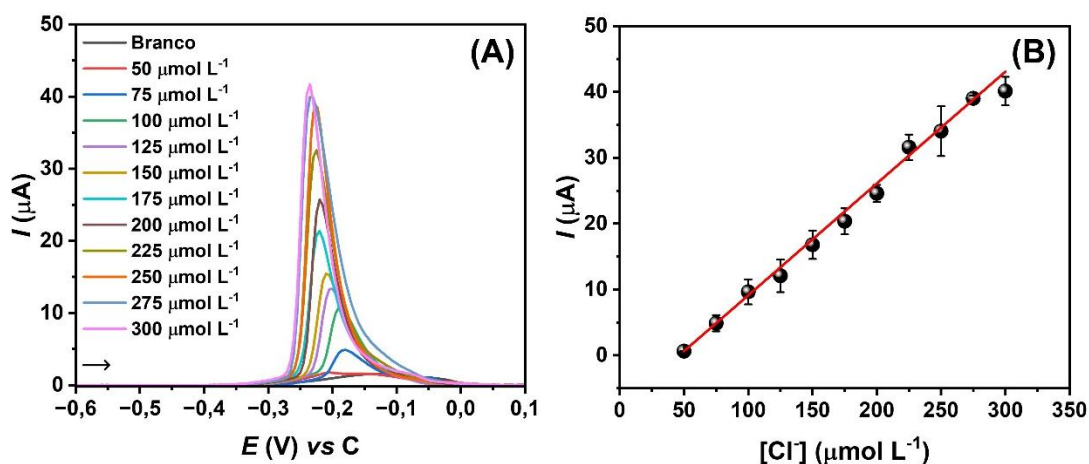
**Figura 3.17.** (A) Voltamogramas da otimização do tempo de pulso da técnica de VPD visando a análise de  $\text{Cl}^-$ . (B) Gráfico relacionando os valores de corrente em função dos valores do tempo de pulso. Fonte: Autoria própria.

#### 3.4.4. Desempenho analítico

Sob parâmetros experimentais otimizados, tanto em termos do procedimento de eletrodeposição de nanopartículas quanto em relação aos parâmetros eletroquímicos, a DPV foi empregada para avaliar a resposta do sensor para diferentes concentrações de cloreto. As Figuras 3.18 A-B demonstram os voltamogramas obtidos e a curva analítica para resposta do íon cloreto entre concentrações de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  com relação linear bem definida. A equação linear obtida foi  $y (\mu\text{A}) = (0,170 \pm 0,001)x (\mu\text{mol L}^{-1}) - (7,85 \pm 0,08)$ , com  $R^2$  igual a 0,999, para análise em triplicata. O limite de detecção (LOD) foi calculado como  $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  através da Equação 3.1<sup>332</sup>:

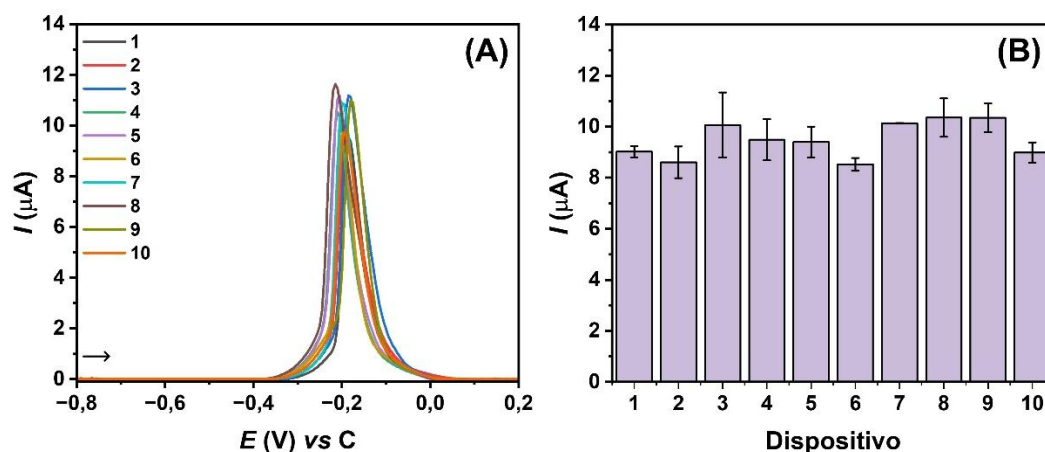
$$LOD = \frac{3S_b}{a} \quad \text{Equação 3.1}$$

Onde,  $S_b$  é o desvio padrão do coeficiente linear e  $a$  refere-se à inclinação da curva analítica.



**Figura 3.18.** (A) Voltamogramas referentes à análise de Cl<sup>-</sup> para diferentes concentrações usando o eletrodo AgNPs/EGR-NF. (B) Curva analítica para análise de Cl<sup>-</sup> entre as concentrações de 50 µmol L<sup>-1</sup> a 300 µmol L<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria.

A reprodutibilidade do método proposto foi avaliada com base no DPR dos valores de corrente de pico anódico para dez diferentes eletrodos, fabricados através da mesma abordagem e procedimento de eletrodeposição de AgNPs, sendo que cada sensor foi analisado em triplicata. A concentração de cloreto neste estudo foi fixada em 100 µmol L<sup>-1</sup> e preparada em 30 mmol L<sup>-1</sup> de tampão BR. O valor de DPR obtido foi de 7%, que é um valor aceitável, em comparação com outros métodos para análise de cloreto usando sensores voltamétricos miniaturizados. A Figura 3.19 A-B apresenta os voltamogramas obtidos, bem como um histograma relacionando os valores de corrente em função do número de sensores AgNPs/EGR-NF.



**Figura 3.19.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial referentes ao estudo de reprodutibilidade para a análise de cloreto usando o AgNPs-EGR/NF. (B) Histograma referente ao estudo de reprodutibilidade do método proposto mostrando os valores de corrente em função do número de eletrodos testados. Fonte: Autoria própria.

performance analítica do novo eletrodo foi comparada com os parâmetros analíticos de diferentes sensores reportados na literatura para determinação de  $\text{Cl}^-$ . Para tanto, foram avaliados o tipo de eletrodo, técnica utilizada, faixa linear e limite de detecção. A Tabela 3.2 sumariza os aspectos supramencionados.

**Tabela 3.2.** Comparação entre diferentes métodos eletroquímicos para a detecção de cloreto.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear	LOD	Referência
Tinta de Ag/papel office	VC	38 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7 $\mu\text{mol L}^{-1}$	331
AgNPs/SPE	VC	2 – 40 $\text{mmol L}^{-1}$	-	308
Eletrodo de AgNWs-Pt	VC	0,2 – 20,2 $\text{mmol L}^{-1}$	20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	333
SPPtE	CSV	0,76 $\text{mol L}^{-1}$ to 150 $\text{mmol L}^{-1}$	0,76 $\text{mmol L}^{-1}$	334
Tinta de Ag/PP	LSV	0,1 – 20 $\text{mmol L}^{-1}$	18,83 $\mu\text{mol L}^{-1}$	335
Tinta de Ag/papel filtro	VC	10 – 200 $\text{mmol L}^{-1}$	1 $\text{mmol L}^{-1}$	201
FeMeOH/SPE	VPD	70 $\text{mmol L}^{-1}$ to 600 $\text{mmol L}^{-1}$	10 $\text{mmol L}^{-1}$	336
Gr-Ag/EGR	VC	0,5 $\text{mmol L}^{-1}$ to 50 $\text{mmol L}^{-1}$	61 $\mu\text{mol L}^{-1}$	337
AgNPs/ZIF-8/GCE	VPD	5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 4 $\text{mmol L}^{-1}$	0,61 $\mu\text{mol L}^{-1}$	338
Ag-Mn/SPE	VPD	5 $\text{mmol L}^{-1}$ to 200 $\text{mmol L}^{-1}$	17 $\mu\text{mol L}^{-1}$	314
AgNPs-GR/NF	VPD	50 – 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Este estudo

Ag: Prata; AgNPs/SPE: Eletrodo serigrafado em substrato de poliéster com AgNPs; SPPtE:

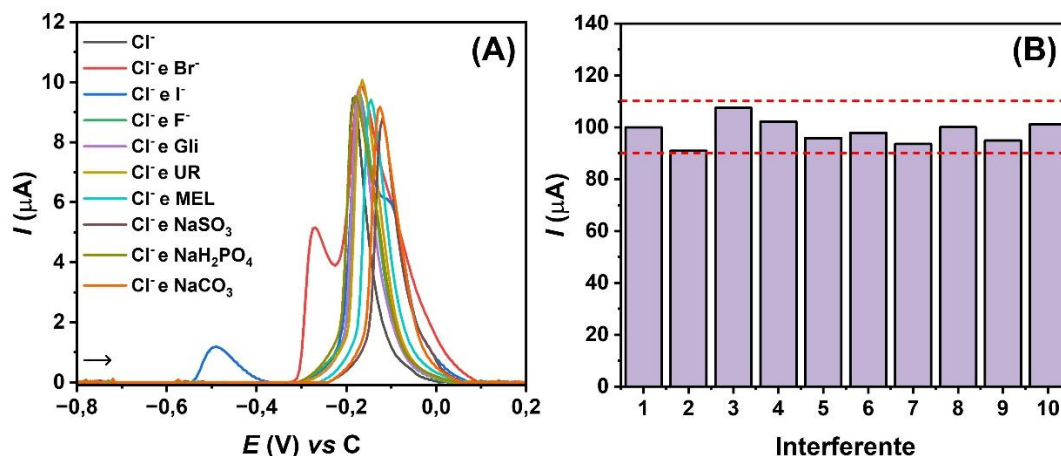
Eletrodo de platina serigrafado; CSV: Voltametria de redissolução catódica; FeMeOH/SPE: Eletrodo serigrafado assistido por ferrocenometanol; PP: polipropileno; LSV: Voltametria de varredura linear. Gr-Ag/EGR: Eletrodo de grafite modificado com compósito de grafeno-Ag; Ag NPs/ZIF-8/GCE: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de Ag decoradas em estrutura metal-orgânica; Ag-Mn/SPE: Eletrodo de carbono serigrafado modificado com nanocompósito de prata-manganês.

A partir dos dados apresentados na Tabela 3.2 é possível observar que os parâmetros analíticos do dispositivo proposto são comparáveis aos trabalhos apresentados na Tabela e, adicionalmente, consiste em um dos métodos voltamétricos mais sensíveis para a análise de cloreto, em termos de faixa linear e limite de detecção. Outro ponto a ser destacado é que não há muitos estudos explorando a técnica de VPD para a determinação de  $\text{Cl}^-$ . Além disso, o sensor proposto oferece simplicidade na construção, custo acessível (uma vez que utiliza materiais de baixo custo), e emprega um baixo volume de amostra na análise (50  $\mu\text{L}$ ). Vale ressaltar que, devido à elevada sensibilidade da técnica, amostras de suor da faixa clinicamente relevante para o diagnóstico de FC podem ser diluídas, o que é extremamente vantajoso, já que, frequentemente, no processo de coleta de suor, não há disponibilidade de grandes volumes de amostra.

#### **3.4.5. Estudo de seletividade**

Para avaliar a viabilidade do eletrodo AgNPs-GR/NF na detecção de cloreto na presença de compostos potencialmente interferentes, foi realizado um teste de seletividade. Para isso, foram avaliados componentes comumente encontrados no suor ou que pertencem ao mesmo grupo da tabela periódica do cloro (halogênios). A proporção de 1:5 (analito:interferente) foi estudada para glicose, ureia, melatonina, fluoreto de sódio, sulfato de sódio, fosfato de sódio monobásico, carbonato de sódio. Nesse caso, as concentrações usadas do analito foi de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e do interferente, 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O iodeto de potássio e o brometo de potássio foram analisados na proporção de 1:1 (analito:interferente), ou seja, 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{Cl}^-$  e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de interferente. Os valores percentuais obtidos em termos de interferência foram de 0,1% a 9,0%, o que demonstra interferência aceitável para sensores

alternativos e potencial para aplicações, principalmente de natureza biológica. A Figura 3.20 mostra o histograma contendo a porcentagem relativa de corrente para cada ensaio individual de cloreto na presença do agente interferente.



**Figura 3.20.** (A) Voltamogramas de pulso diferencial referente ao estudo de seletividade de potenciais compostos interferentes para análise na presença de  $\text{Cl}^-$ . (B) Histograma relacionando a porcentagem relativa de corrente obtida no estudo de seletividade, em função dos interferentes empregados na presença de  $\text{Cl}^-$ . Fonte: Autoria própria.

#### 3.4.6. Ensaio de recuperação e análise de amostras de suor sintético

Visando a detecção de cloreto em amostras de suor para triagem neonatal ou para o diagnóstico de fibrose cística, uma amostra de suor de um indivíduo saudável foi analisada e, posteriormente, enriquecida em dois níveis de concentração de  $\text{Cl}^-$  a fim de se avaliar a exatidão do método proposto. A concentração de  $\text{Cl}^-$  encontrada na amostra de suor foi de  $36,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , que está dentro da faixa esperada para uma pessoa saudável<sup>306</sup>. Assim, amostras diluídas para a concentração teórica de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram enriquecidas com um nível baixo e um nível alto de cloreto ( $80$  e  $130 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente) e analisadas. A Tabela 3.3 dispõe os valores de concentrações de cloreto adicionadas e os valores recuperados com suas respectivas porcentagens, com base na seguinte Equação 3.2, disponível no anexo II da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>339</sup>:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1) - (C_2)}{C_3} \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

Onde,  $C_1$  corresponde à concentração após a adição de padrão,  $C_2$  refere-se à concentração antes da adição de padrão e  $C_3$  é a concentração adicionada<sup>340</sup>.

Os valores obtidos para os dois níveis de  $\text{Cl}^-$  adicionados na amostra de suor foram de  $74 \pm 7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $114 \pm 5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com valores de recuperação de 92 e 88, respectivamente. De acordo com a ANVISA, por meio da RDC 166, os valores de recuperação não devem ser inferiores à 80% e nem superiores à 120%<sup>339</sup>. Sendo assim, os dados obtidos estão dentro dos limites aceitos, que é um indicativo de que o método proposto apresenta adequada exatidão.

**Tabela 3.3.** Dados do estudo da exatidão pelo método de adição e recuperação, em dois níveis, usando amostra real de suor.

Amostra	Nível	Concentração de $\text{Cl}^-$		Recuperação (%)
		Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	
1	#1	80	$74 \pm 7$	92
2	#2	130	$114 \pm 5$	88

Para avaliar se o método proposto é capaz de quantificar concentrações de cloreto em diferentes faixas de concentração no suor, uma amostra de suor sintético foi preparada usando concentrações de  $\text{Cl}^-$  de 15; 55 e 75  $\text{mmol L}^{-1}$  representando valores saudável, limítrofe e positivo para fibrose cística, respectivamente. As amostras foram diluídas para as concentrações teóricas de 54; 198 e 270  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, e uma análise foi conduzida via o método proposto. A Tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos, bem como o erro relativo, encontrado (em módulo), proveniente da comparação entre os valores teóricos e aqueles determinados experimentalmente, com base na Equação 3.3:

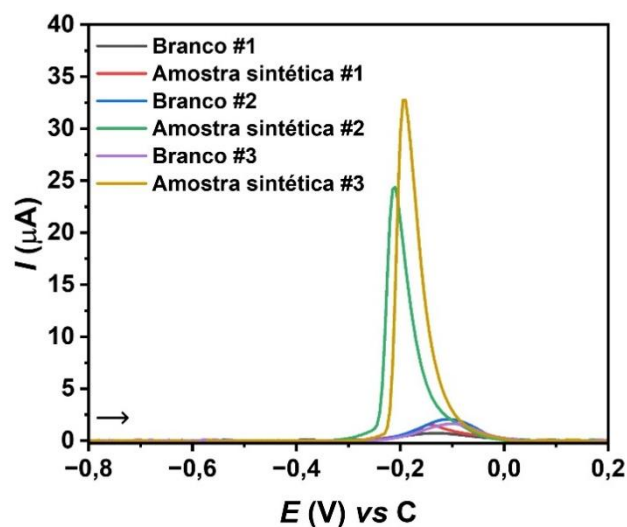
$$\text{Erro (\%)} = \left| \frac{V_e - V_t}{V_t} \right| \times 100 \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde,  $V_e$  é o valor experimental e  $V_t$  é o valor teórico.

**Tabela 3.4.** Concentrações de cloreto encontradas em amostras sintéticas de suor usando AgNPs/EGR-NF pelo método voltametria de pulso diferencial.

Amostra sintética	Concentração de $\text{Cl}^-$		Erro relativo (%)
	Teórico ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Experimental ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	
Saudável	15	$15,1 \pm 2,7$	0,7
Limítrofe	55	$51,5 \pm 1,4$	6,4
Positiva	75	$67,0 \pm 5,0$	10,7

Como apresenta a Tabela 3.4, os valores de erro relativo provenientes da comparação entre os valores teóricos e adquiridos experimentalmente pelo método proposto usando o eletrodo de AgNPs/EGR-NF foram de 0,7; 6,4 e 10,7%, para as amostras sintéticas de nível saudável, limítrofe e positiva, respectivamente. Os valores de erro indicam uma correlação aceitável entre os valores esperados para as concentrações e os valores de fato obtidos. A Figura 3.21 demonstra os voltamogramas referentes às amostras sintéticas acompanhadas da análise de seus respectivos brancos.



**Figura 3.21.** Voltamogramas referentes à análise de amostras sintéticas de suor contendo níveis de cloreto na faixa de concentração baixa, limítrofe e positiva para FC, acompanhadas das análises dos respectivos brancos. Fonte: Autoria própria.

#### 3.4.7. Análise real de amostras de suor e análise de referência

O comportamento linear fornecido pela curva analítica visando a determinação de  $\text{Cl}^-$  ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) é suficientemente aplicável para a o teste do pezinho e/ou o diagnóstico de FC, empregando-se o processo de diluição das amostras. Nesse sentido, 4 amostras de suor de crianças voluntárias foram coletadas, a partir do uso de pilocarpina, analisadas pelo teste do suor empregando um cloridrômetro e comparadas com os resultados obtidos usando o AgNPs/EGR-NF via voltametria de pulso diferencial. A Tabela 3.5 exibe os resultados obtidos.

**Tabela 3.5.** Amostras reais de suor analisadas a partir do sensor proposto e da técnica padrão ouro.

Amostra	Concentração de $\text{Cl}^-$		Erro relativo (%)
	Cloridrômetro ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Eletrodo de AgNPs-Gr/NF ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	
1	10	$10,5 \pm 0,4$	5,0
2	13	$11,6 \pm 0,2$	10,7
3	9	$8,9 \pm 0,6$	1,1
4	16	$15,0 \pm 0,3$	6,2

Conforme disposto na Tabela 3.5, as concentrações de  $\text{Cl}^-$  quantificadas nas amostras de suor dos doadores provenientes da triagem neonatal variaram de  $9 \text{ mmol L}^{-1}$  a  $16 \text{ mmol L}^{-1}$ , o que indica que todos os indivíduos participantes dessa análise não tinham fibrose cística. Os valores de erros relativos absolutos obtidos para as concentrações de cloreto encontradas nas amostras de suor, empregando-se o método proposto, foram de até 10,7%, quando comparado ao método do cloridrômetro. Esse valor está em conformidade com outros estudos descritos na literatura para análise de amostras reais de suor, que também indicam uma correlação entre as concentrações determinadas pelos respectivos métodos eletroquímicos propostos, com uma variação de até 10% em relação à métodos consolidados<sup>309,314</sup>. Os dados implicam, portanto, que o método proposto apresentou uma aceitável exatidão.

Nessa perspectiva, acredita-se que o novo dispositivo delineado especialmente com foco na quantificação de  $\text{Cl}^-$  seja promissor para a análises de amostras de suor, podendo auxiliar em análises de rotina, tais como a triagem de bebês, bem como o monitoramento e/ou acompanhamento de indivíduos com fibrose cística. Considerando que o método proposto é de baixo custo, detém princípios da química analítica verde, e é descartável, apresenta-se como uma excelente alternativa para o diagnóstico de FC à um custo acessível, relativa simplicidade, e elevada sensibilidade, o que permite usar um baixo volume de amostra (característica extremamente valiosa nessa aplicação).

### **3.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Uma nova formulação de tinta condutora baseada em grafite/negro de fumo e laca chinesa foi usada para construir dispositivos eletroquímicos miniaturizados. Além disso, o novo sensor eletroquímico foi modificado com nanopartículas de prata de um processo de eletrodeposição usando amperometria. O protocolo de síntese de AgNPs foi realizado usando um procedimento simples, de uma etapa e, com boa uniformidade. O sensor proposto foi caracterizado e aplicado com sucesso na análise de cloreto

visando o diagnóstico de fibrose cística. O dispositivo proposto mostrou boa sensibilidade, reprodutibilidade adequada necessária para sistemas de detecção descartáveis e seletividade para a determinação de  $\text{Cl}^-$ , permitindo o uso de um baixo volume de amostra. Como prova de conceito, amostras de suor sintéticas e reais foram analisadas com sucesso. As amostras de suor reais foram comparadas com a técnica padrão ouro demonstrando boa correlação, emergindo assim, como um sensor portátil, simples e de baixo custo para a detecção de  $\text{Cl}^-$  amostras biológicas. Além disso, a detecção do analito de interesse, por meio da resposta eletroquímica melhorada do sensor via voltametria de pulso diferencial, reduz a probabilidade de falsos positivos/negativos, que são prováveis de ocorrer na condutometria, no contexto do diagnóstico de FC.

**Capítulo 4 - Integração simples de dispositivos eletro-  
químicos baseados em papel e microfluídica digital  
para análise de L-cisteína**

## RESUMO

Esse capítulo propõe uma nova maneira de integrar a tecnologia de microfluídica digital (DMF, do inglês, *digital microfluidics*) à técnica de eletroquímica. Comumente, a literatura demonstra que o acesso entre a célula eletroquímica e o *chip* de DMF ocorre a partir da construção dos eletrodos diretamente na placa inferior, na placa superior, ou por meio de adaptações na placa superior do *chip*. Contudo, essas abordagens podem ser trabalhosas e/ou impossibilitar o reuso do *chip* de DMF. Nessa perspectiva, propõe-se, pela primeira vez, a integração entre a técnica de DMF e a eletroquímica, explorando-se dispositivos eletroquímicos analíticos baseados em papel (ePAD), cuja hifenação entre ambas as técnicas se baseia na simples inserção do sensor diretamente no eletrodo reservatório da DMF. Como prova de conceito, foi realizada a detecção eletroquímica de L-cisteína, um biomarcador de Alzheimer e componente usado em suplementos alimentares. Para a vertente farmacêutica, empregou-se um ePAD de grafite e, para a aplicação bioanalítica, utilizou-se um ePAD de negro de fumo, destacando-se a versatilidade da proposta. As técnicas analíticas exploradas foram a amperometria e a voltametria de onda quadrada (VOQ), respectivamente. A faixa linear obtida para a amperometria foi de 350 a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com LOD de 92,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para a VOQ, de 1,0 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com LOD de 0,54  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os estudos de reprodutibilidade apresentaram valores de desvio padrão relativo de até 7,3%. Além disso, os percentuais de interferência da análise de L-cisteína na presença de outros aminoácidos variaram de 0,18 a 4,6%, mostrando uma adequada seletividade. Estudos de adição e recuperação também foram executados para cápsulas e plasma apresentando valores de 83-105% e 83-108%, respectivamente. Por fim, amostras de suplemento alimentar e plasma (o qual foi preparado na DMF a partir de sangue e esferas magnéticas) foram analisadas com sucesso.

**Palavras-Chave:** integração, automação, eletrodos descartáveis, preparo de amostra, bioanalítica

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A microfluídica digital (DMF) é uma tecnologia multifuncional de manipulação de gotículas<sup>128,139</sup>. A partir dessa plataforma, é possível realizar procedimentos analíticos *lab-on-a-chip* que englobam desde o preparo de amostras biológicas a reações químicas, de maneira altamente controlada e automatizada<sup>116,177,180</sup>. Ademais, o sucesso da integração entre uma miríade de detectores de interesse e a instrumentação analítica da DMF está intimamente relacionado à realização de procedimentos analíticos complexos de maneira precisa e funcional, com mínima intervenção manual, o que auxilia na redução de erros operacionais e possibilita que a etapa de análise seja realizada na própria plataforma<sup>138,341</sup>.

A análise em linha proporciona que gotículas possam ser amostradas e examinadas nos *chips* de DMF sem a necessidade de instrumentação externamente. Esse aspecto pode reduzir drasticamente a complexidade dos procedimentos analíticos, bem como permitir o monitoramento de espécies de interesse em tempo real<sup>7,138</sup>.

No âmbito da hifenação entre a DMF e métodos de detecção, a eletroquímica, que passou a ser usada consideravelmente com essa finalidade, consiste em uma opção demasiadamente atrativa por possibilitar análises sensíveis, comumente rápidas, quantitativas e, ainda, versáteis, uma vez que pode ser utilizada para detectar espécies de inúmeras classes<sup>186,342,343</sup>. Outro aspecto a ser destacado é a compatibilidade dos sensores eletroquímicos com a miniaturização<sup>344,345</sup>, permitindo o uso concomitante entre as técnicas por diferentes vias. Dessa forma, abre caminhos para uma infinidade de estratégias de integração que podem ser exploradas.

Particularmente, no que tange à detecção eletroquímica, as principais estratégias abordadas na literatura para realizar-se o acoplamento entre ambas as técnicas são: (1) utilizar *chips* de placa única integrados com eletrodos a parte<sup>346</sup>; (2) adaptar o *top plate* para receber diferentes eletrodos<sup>186</sup>; (3) construir a célula eletroquímica no *bottom plate*<sup>151</sup>, (4) empregar o uso de uma plataforma auxiliar contendo os eletrodos em associação com dispositivos de DMF abertos<sup>347</sup>, e (5) construir a célula

eletroquímica diretamente no *top plate*<sup>348</sup>. Contudo, para cada uma dessas abordagens, há vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração, a fim de averiguar a melhor estratégia para a demanda de interesse.

Mediante o uso de *chips* de placa única, pode-se empregar eletrodos externos<sup>346</sup> ou fabricar os eletrodos direto no *bottom plate*<sup>349,350</sup>. Nesse caso, ao passo que se possibilita o tipo de integração entre dispositivos eletroquímicos e à DMF de modo relativamente simples, algumas operações intrínsecas à DMF como separação de gotículas e amostragem dos reservatórios são impossibilitadas.

A inteligente adaptação do *top plate* para receber eletrodos viabiliza que diferentes dispositivos eletroquímicos possam ser integrados à plataforma de DMF, como sensores comerciais ou fabricados alternativamente<sup>186</sup>. Entretanto, podem ser encontradas limitações na adaptação da placa superior caso o laboratório em questão não domine a técnica de produção dos *chips* de DMF ou não possua a instrumentação adequada, que por vezes, pode ser de alto custo e requer treinamento técnico especializado.

Construir a célula eletroquímica diretamente na placa inferior facilita as operações microfluídicas digitais e permite a utilização dos dispositivos de placa dupla, o que possibilita as operações de amostragem e separação de gotículas na DMF<sup>351,352</sup>. Além disso, é amplamente explorado na construção de biossensores. Por outro lado, limita a reutilização do *chip* de microfluídica digital, que, se fabricado utilizando os recursos de sala limpa, pode apresentar um custo relativamente alto e, conseqüentemente, influenciar no retardamento da democratização da microfluídica digital em países em desenvolvimento.

Empregar o uso de uma plataforma auxiliar em dispositivos de DMF abertos promove uma interconexão simplória entre as técnicas, que dispensam grandes adaptações no *layout* dos dispositivos<sup>347</sup>. Todavia, limita as operações e depende, de certa forma, de intervenção manual em algumas etapas.

Construir a célula eletroquímica diretamente no *top plate* de dispositivos de duas placas proporciona o aproveitamento de todas as

operações microfluídicas digitais, o fácil acesso do analito de interesse diretamente aos eletrodos e permite a construção de biossensores<sup>348,353</sup>. Por outro lado, comumente requer a remoção da placa superior para a fabricação dos eletrodos e englobam etapas que podem ser de alto custo e/ou dispendiosas, caso seja empregado o uso de sala limpa e fotolitografia, por exemplo. Ademais, geralmente não viabiliza o reuso do *chip* de DMF.

Neste contexto, acredita-se que uma estratégia capaz de unir a totalidade das operações microfluídicas digitais proporcionados pelo uso de *chips* de placa dupla à simplicidade e versatilidade do acoplamento com sensores eletroquímicos miniaturizados, de modo a não requerer mudanças drásticas no *top plate* ou no *bottom plate* do *chip*, seria bastante benéfica.

Diferentes tipos de sensores eletroquímicos foram utilizados para integrar a tecnologia de microfluídica digital com a detecção eletroquímica. Dentre eles, fios de ouro<sup>346</sup>, microeletrodos nanoestruturados<sup>151</sup>, eletrodos de ouro<sup>351</sup>, eletrodos de carbono<sup>347</sup>, dispositivos comerciais e dispositivos analíticos eletroquímicos baseados em papel (ePADs)<sup>186</sup>. Uma das vantagens do uso de alguns tipos de ePADs, ainda não explorada no âmbito da combinação entre a DMF e a eletroquímica, é a flexibilidade que esses sensores podem conferir<sup>354</sup>. Além disso, até onde se sabe, não foram relatados estudos focados na modificação de sensores eletroquímicos diretamente dentro do *chip*, visando a integração entre etapas de pré-tratamento de amostra, seguida da detecção do analito em uma mesma plataforma de maneira aprimorada.

A fabricação de ePADs ganhou bastante espaço dado à simplicidade despendida para produzir esses dispositivos, por meio de técnicas de fabricação de pintura direta, impressão a jato de tinta ou impressão por estêncil, por exemplo<sup>19,26,355</sup>. Para sensores produzidos por impressão por estêncil ou serigrafia, a ampla gama de substratos e tintas condutoras que podem ser usadas, o baixo custo e a possibilidade de criar sensores descartáveis têm sido grandes atrativos<sup>14</sup>. Como tal, pode-se ainda proceder com etapa de modificação da superfície do eletrodo de trabalho, visando melhorar a atividade catalítica da espécie alvo e, conseqüentemente, à melhoria da sensibilidade, a depender da modificação empregada<sup>356–359</sup>.

Alguns exemplos de modificação do eletrodo de trabalho de ePADs à base de carbono, como grafite e negro de fumo, incluem o uso de nanopartículas de ouro<sup>360</sup>, prata<sup>361</sup>, ferro<sup>362</sup>, polímeros condutores como nafion<sup>363</sup> e poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT)<sup>364</sup>, nanotubos de carbono<sup>365</sup>, óxido de grafeno<sup>366</sup> ou azul da Prússia<sup>367</sup>.

O azul da Prússia (AP), ou hexacianoferrato férrico consiste em um dos compostos de coordenação mais antigos, datando os primeiros registros no início do século XVII<sup>368</sup>. O AP é considerado como uma peroxidase artificial que apresenta notáveis propriedades eletroquímicas, o que comumente habilita sua aplicação no sensoriamento eletroquímico e eletrocatalise. Em relação à preparação do AP, ela pode ser realizada por diferentes rotas, dentre as quais, podem-se mencionar a síntese química e a eletrodeposição. A síntese química geralmente baseia-se em uma reação de precipitação envolvendo um sal de ferro e um complexo de hexacianoferrato<sup>369</sup>. No que se refere à síntese eletroquímica, frequentemente utiliza-se uma mistura estável de ferricianeto,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , e íons férricos,  $\text{Fe}^{3+}$ , via redução deste último<sup>370</sup>.

A literatura destaca o uso do AP na modificação de sensores eletroquímicos para potencializar e/ou auxiliar na detecção de analitos como peróxido de hidrogênio<sup>367,371</sup>, dopamina<sup>369</sup>, glicose<sup>372</sup>, marcadores tumorais de câncer de mama<sup>373</sup>, sarcosina<sup>374</sup> e L-cisteína<sup>375</sup>.

A cisteína é classificada como um aminoácido semiessencial, dado que pode ser obtida tanto da dieta quanto produzida pelo organismo humano. A forma mais abundante de cisteína em nosso corpo é a L-cisteína<sup>376,377</sup>. Ela contém enxofre em sua estrutura na forma de um grupo tiol (-SH) no final da sua cadeia lateral. Sendo assim, é o grupo responsável pela elevada reatividade desse aminoácido<sup>378</sup>. Dessa forma, é importante em inúmeros processos fisiológicos e biológicos do corpo, inclusive atuando como um dos blocos de construção necessários para a síntese de proteínas<sup>377</sup>.

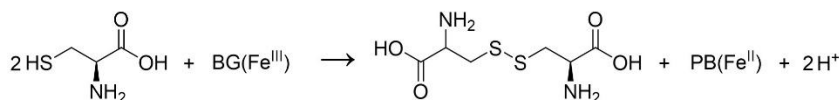
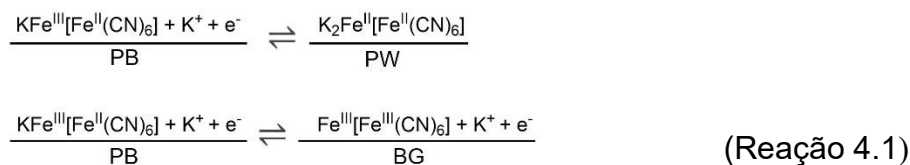
A concentração de L-cis encontrada no plasma humano é tipicamente em torno de 240-360  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo que níveis menores que 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  são considerados baixos, entre 250 e 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  são classificados como médio e maiores que 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$  são altos. Alterações na concentração de L-cis em matrizes biológicas, especialmente a diminuição de sua

concentração, podem ser indicativo de problemas de saúde como doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson<sup>375</sup>.

Além da L-cisteína ser encontrada no organismo humano, a suplementação dietética pode melhorar o metabolismo lipídico<sup>379</sup>. Além disso, diversos medicamentos fazem o uso da L-cisteína na composição. Logo, o monitoramento dos níveis de L-cis é importante tanto do ponto do diagnóstico clínico, quanto do mercado de medicamentos/suplementos visando a saúde humana<sup>378</sup>.

Bonacin et al.<sup>380</sup> utilizaram eletrodos serigrafados de grafite modificados com azul da Prússia, via dois diferentes métodos, empregando (i) o uso de uma gota sobre o eletrodo e (ii) incorporado o material diretamente na tinta condutiva para detectar L-cisteína. Após o procedimento de modificação, os eletrodos foram ativados empregando-se 25 ciclos de voltametria cíclica na presença de uma solução de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> contendo KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Ambas as estratégias apresentaram comportamento catalítico em relação à eletro-oxidação da cisteína. A faixa linear e o limite de detecção obtidos para a estratégia de incorporação do AP na tinta foram de 100-600 μmol L<sup>-1</sup> e 67,4 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando o uso de *drop-casting*, a faixa linear e o limite de detecção foram de 300-700 μmol L<sup>-1</sup> 98,9 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Kalinke et al.<sup>375</sup> propuseram um método de detecção de L-cisteína em amostras de soro sanguíneo enriquecidas, com sucesso, a partir do uso de um sensor eletroquímico de grafeno impresso em 3D modificado com nanopartículas de azul da Prússia. Para a síntese do AP foi empregado um protocolo de eletrodeposição aproveitando-se o ferro presente no filamento termoplástico em associação com uma solução de 2,5 mmol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. A técnica eletroquímica empregada para realizar a síntese foi a voltametria cíclica (VC) por intermédio de 50 ciclos consecutivos. A detecção seletiva de L-cisteína foi realizada por amperometria. A faixa linear e o LOD foram de 3,0 a 230 μmol L<sup>-1</sup> e 0,858 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os autores propuseram relataram o seguinte esquema reacional entre o AP e a L-cisteína:



Nessa perspectiva, este estudo teve como objetivo propor, pela primeira vez, a integração entre ePADs e *chips* de microfluídica digital de placa dupla, a partir da simples inserção do sensor eletroquímico dentro do eletrodo reservatório. Para tanto, explorou-se a característica relativamente flexível do ePAD para permitir sua integração com o *chip* de DMF a partir do uso de um dispositivo à base de carbono fabricado usando uma tinta alternativa de grafite e outro, empregando uma tinta condutiva comercial contendo negro de fumo para a detecção de L-cisteína. A fim de explorar as potencialidades que a DMF proporciona, estabeleceu-se um procedimento analítico composto pelo pré-tratamento de amostras de sangue (usando partículas magnéticas) e/ou diluição de suplemento alimentar, modificação do sensor eletroquímico e detecção eletroquímica. A etapa de modificação do eletrodo de trabalho do ePAD dentro do *chip* de DMF foi realizada pela primeira vez para aprimorar a detecção do analito alvo L-cisteína em amostras farmacêuticas e biológicas. Dessa maneira, possibilitando o reuso do *chip* de DMF. Acredita-se que o procedimento proposto possa ser estendido para outros analitos, além de abrir um leque de possibilidades de aplicações.

## 4.2. OBJETIVOS

### 4.2.1. Objetivo geral

Integrar dispositivos eletroquímicos baseados em papel (ePADs) com a técnica de microfluídica digital visando o preparo de amostra e detecção eletroquímica.

### 4.2.2. Objetivos específicos

- Fabricação de ePADs usando tinta condutora alternativa e comercial;

- Hifenação entre microfluídica digital e detecção eletroquímica a partir de uma nova abordagem;
- Efetuar a modificação de sensores eletroquímicos com azul da Prússia dentro do *chip* de microfluídica digital usando a técnica de amperometria;
- Caracterizar os sensores;
- Aplicar a estratégia proposta de integração entre os ePADs e microfluídica digital para a análise de L-cisteína visando as vertentes farmacêutica e clínica;
- Perfazer o preparo de amostra de sangue e realizar análise de L-cisteína em plasma.
- Analisar produto farmacêutico usando o método proposto.

### **4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **4.3.1. Materiais**

L-cisteína, ferricianeto de potássio, cloreto de potássio (KCl), cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Oakville, Canadá). Tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4) e água destilada foram fornecidas pela Thermo Fisher Scientific (Mississauga, Canadá). Tetronic 90R4 (BASF Corp., Alemanha) foi generosamente doado pela Brenntag Canada (Toronto, ON). Todas as soluções manipuladas dentro do dispositivo de DMF foram suplementadas com Tetronic 90R4 de concentração 0,1% (m/v).

Papel cromatográfico Whatman™ Grau 1 (200 × 200 cm) e papel de escritório (216 × 297; 75 g/m<sup>2</sup>) foram adquiridos da GE Healthcare (Mississauga, Canadá) e Canon (Toronto, Canadá), respectivamente. Grafite (<20 µm) e grafite artístico da General's foram obtidos da Sigma Aldrich (Oakville, Canadá) e uma papelaria local (Toronto, Canadá). Esmalte (Sinful Colors®) e verniz brilhante (Winsor & Newton) foram adquiridos em uma papelaria e uma farmácia local, respectivamente (Toronto, Canadá). O adesivo vinílico foi adquirido da Respect e a fita adesiva azul de baixa aderência foi obtida em uma loja local (Toronto, Canadá). O kit reagente de

depleção de hemácias EasySep™ para processamento de sangue total foi adquirido da Stemcell Technologies<sup>381</sup> (Vancouver, Canadá).

#### 4.3.2. Instrumentação

As máscaras dos eletrodos foram fabricadas usando uma impressora de corte Silhouette Cameo 3 (Lindon, EUA). Todas as análises eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente usando um potenciostato/galvanostato PalmSens3 da PalmSens (Houten, Holanda) e controlado pelo *software* PSTrace 5.10.

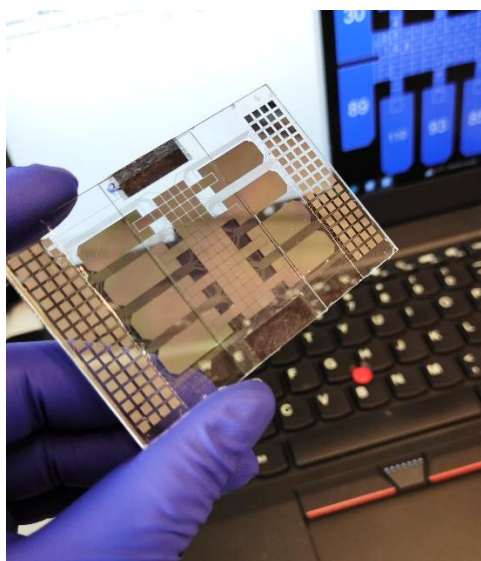
O agitador magnético (modelo 11-600-49SH) foi adquirido da Fisher Scientific (Ottawa, Canadá).

Os dispositivos de DMF foram gerenciados a partir do sistema DropBot de código aberto 190 versão 3.0<sup>382</sup>, e do MrBox equipado com um módulo magnético. O *software* de controle interfaceado com o DropBot para realizar as operações microfluídicas digitais foi o MicroDrop (versão 2.31.1). A tensão aplicada para movimentar as gotículas em protocolos pré-programados variaram de 100-120 V<sub>RMS</sub> a 10 kHz. O tempo de aplicação de potencial escolhido no software variou de 1 a 5 s. O número de eletrodos acionados simultaneamente foi de 1 a 4, a depender da operação.

#### 4.3.3. Fabricação de *chips* de microfluídica digital

Os *chips* microfluídicos digitais foram fabricados nas instalações do Centro de Nanofabricação da Universidade de Toronto, como reportado anteriormente<sup>186,383,384</sup>. Resumidamente, os dispositivos consistiram na configuração de duas placas e foram produzidos utilizando-se a técnica de fotolitografia. O substrato empregado tanto na placa superior (25,4 mm x 50,8 mm), quanto na placa inferior (50,8 mm x 76,2 mm), foi o vidro. Adicionalmente, a placa superior foi revestida com ITO transparente (comercialmente disponível; 8-12 ohms sq<sup>-1</sup>) para atuar como eletrodo de aterramento e Fluoropel PFC 1104V como camada hidrofóbica. No que se refere à camada inferior, os eletrodos foram produzidos em cromo (Cr) de alta refletividade. O *layout* da matriz de eletrodos consistiu em um arranjo contendo 8 eletrodos reservatórios, 8 eletrodos de distribuição e, 68 eletrodos

de atuação quadrados, dentre os quais 60 foram distribuídos em um arranjo de 15 x 4 eletrodos de condução. A conexão de cada eletrodo foi estabelecida por meio de trilhas condutoras em Cr que faziam interface com os pinos de contato na lateral dos dispositivos com o sistema DropBot. O revestimento dielétrico de Parileno C foi realizado empregando-se um instrumento dedicado à deposição de vapor químico, formando uma camada de aproximadamente 6  $\mu\text{m}$ . Em seguida, o lado condutor do substrato foi revestido com FluoroPel PFC 1101 V com concentração de 1% (m/v) por revestimento giratório a 2000 rpm por 30 s, seguido de cura a 160 °C por 20 min. Para estabelecer a conexão elétrica entre a placa superior e a placa inferior, foram utilizadas fitas condutoras de carbono e, para perfazer o gap entre ambas as placas, empregou-se duas camadas de fita adesiva dupla face. As gotas de unidade dupla manipuladas dentro do *chip* possuíam volume de aproximadamente 5  $\mu\text{L}$ . A Figura 4.1 mostra uma imagem real do dispositivo com o *software* MicroDrop ao fundo.

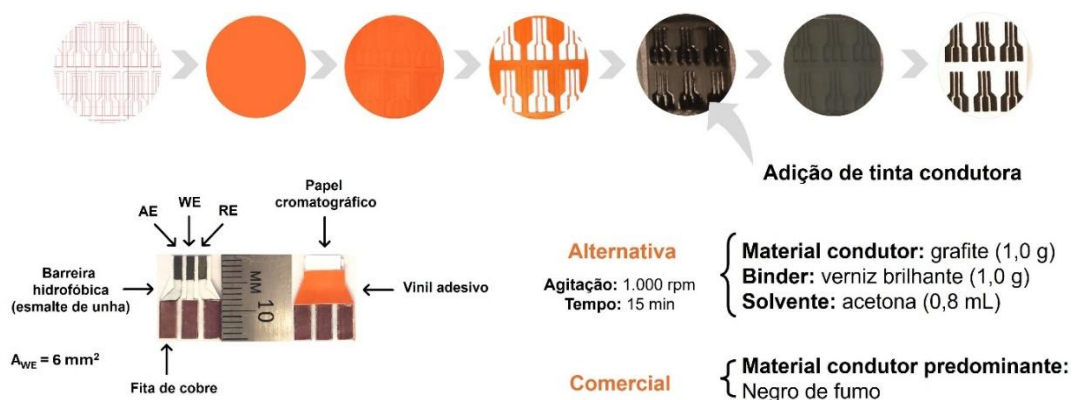


**Figura 4.1.** Imagem real do dispositivo de microfluídica digital em configuração de placa dupla. Fonte: Autoria própria.

#### **4.3.4 Fabricação de dispositivos eletroquímicos baseados em papel (ePADs)**

Os sensores eletroquímicos baseados em papel foram fabricados empregando-se tinta condutora alternativa de grafite e comercial de negro de fumo. Para a confecção dos dispositivos, primeiramente, a geometria dos

sensores foi elaborada no *software* gráfico Silhouette Studio. Em seguida, um substrato de papel office foi recoberto no lado inferior com uma camada de fita azul de baixa aderência. Duas camadas de vinil adesivo foram, então, adicionadas sobre o substrato de papel do lado livre de fita. O *layout* dos dispositivos foi recortado utilizando-se uma impressora de recorte Silhouette. Os padrões dos eletrodos foram removidos com o uso de uma pinça e, na sequência, a tinta condutiva de interesse foi adicionada sobre a máscara. Após cerca de 30 minutos, a máscara de vinil foi removida, juntamente com a fita de baixa aderência, perfazendo-se a célula eletroquímica. O eletrodo de referência foi pintado com tinta de prata e, por fim, uma barreira hidrofóbica de esmalte foi acrescentada no disposto tanto na frente, quanto atrás do substrato de papel para evitar que os contatos elétricos fossem molhados. O ePAD foi seco à temperatura ambiente e, finalmente, a fita de cobre foi adicionada nas conexões elétricas provenientes dos três eletrodos para estabelecer o contato elétrico com o potenciostato. Um pequeno pedaço de papel Whatman retangular (5,0 mm x 7,0 mm) foi então inserido na superfície dos três eletrodos e fixado com um pequeno pedaço de vinil adesivo para atuar como um coletor das gotículas. A Figura 4.2 esquematiza, de modo simplificado, as etapas utilizadas na construção dos dispositivos.



**Figura 4.2.** Representação esquemática da fabricação de sensores eletroquímicos baseados em papel. Fonte: Autoria própria.

A fabricação da tinta condutiva alternativa foi realizada misturando-se a quantidade de 1,0 g de grafite de artista com 1,0 g de verniz brilhante, seguido da adição de 800  $\mu$ L de acetona. A agitação foi realizada à 1.500 (rotações por minuto) rpm, durante 15 minutos. O protocolo empregado foi o

de Rocha et al.<sup>25</sup> com adaptações.

#### **4.3.5. Caracterizações**

Os dispositivos eletroquímicos foram caracterizados a partir das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) para obter micrografias e espectros, respectivamente, antes e após a modificação dos sensores eletroquímicos. O microscópio eletrônico de varredura empregado foi o modelo Jeol, JSM – 6610, equipado com espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), e obtido da Thermo Scientific NSS (Tóquio, Japão).

#### **4.3.6. Modificação eletroquímica *on-chip***

A síntese eletroquímica do azul da Prússia foi realizada por cronoamperometria com base no método proposto por Karyakin, com algumas adaptações<sup>385</sup>. Para esse propósito, uma gota de unidade dupla de 5  $\mu\text{L}$  contendo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  1,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$  1,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ,  $\text{HCl}$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$  e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) foi endereçada até ePAD por forças eletrostáticas, usando a técnica de microfluídica digital, até o coletor de papel cromatográfico. Sob condições otimizadas para o processo de eletrodeposição, o potencial e o tempo utilizados foram 0,4 V vs Ag e 80 s, respectivamente. Posteriormente, os ePADs foram ativados eletroquimicamente realizando 6 ciclos voltamétricos entre -0,5 a 1,2 V vs Ag usando 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{HCl}$  0,01  $\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{KCl}$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , suplementada com Tetronic 90R4 0,1% (m/v), a uma velocidade de varredura de 100  $\text{mV s}^{-1}$ . O acesso da gotícula até o eletrodo se deu por operações microfluídicas digitais usando uma tensão de aproximadamente 100  $V_{\text{RMS}}$ . Após o processo de ativação, o excesso de líquido foi removido com um pedaço de papel toalha.

#### **4.3.7. Medidas eletroquímicas integradas com DMF**

Para integrar os sensores eletroquímicos com a plataforma de microfluídica digital, os ePADs foram inseridos nos eletrodos reservatórios

(entre a placa superior e a placa inferior) e conectados ao potenciostato. As análises eletroquímicas usando a técnica de amperometria foram realizadas utilizando-se o ePAD de grafite. Para tanto, uma gotícula de unidade dupla (~ 5 µL) do branco, soluções de padrão analítico de L-cisteína ou amostra, foram analisadas. O tempo de equilíbrio fixado foi de 5 s e os parâmetros ótimos usados de potencial e tempo foram de -0,95 V e 80 s, respectivamente.

As medidas eletroquímicas empregando-se o ePAD de negro de fumo foram realizadas utilizando-se a voltametria de onda quadrada empregando os parâmetros otimizados de faixa de potencial, amplitude, *step* e frequência de 0,4 a 1,2 V; 0,05 V; 0,005 V e 10 Hz, respectivamente. Da mesma forma que para o ePAD de grafite, uma gotícula de unidade dupla (~ 5 µL) do branco, soluções de padrão analítico de L-cisteína ou amostra, foram analisadas.

Para a vertente farmacêutica utilizando-se os dispositivos de grafite, a faixa de concentração estudada de L-cisteína preparada em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) foi de 350 a 1000 µmol L<sup>-1</sup>. Por sua vez, no que se refere à aplicação bioanalítica, utilizou-se L-cisteína entre as concentrações de 1,0 a 100 µmol L<sup>-1</sup>, também preparadas em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v).

#### **4.3.8. Preparação da amostra usando DMF**

Para o procedimento de preparo de amostras farmacêuticas, primeiramente, 10 unidades de suplemento alimentar de L-cisteína provenientes de capsulas tiveram a película protetora removida e, em seguida, foram misturadas para formar uma amostra representativa. Então, uma solução de L-cis de concentração teórica de 1000 µmol L<sup>-1</sup> foi preparada em Tetronic 90R4 0,1% (m/v) para ser analisada na plataforma de DMF integrada com a eletroquímica por intermédio do uso do ePAD de grafite e a voltametria de onda quadrada.

Para o viés bioanalítico, uma amostra de sangue O+ foi coletada com o auxílio de uma lanceta e armazenada em um mini tubo para coleta de sangue. O procedimento de preparo de plasma foi realizado a partir do protocolo presente no kit comercial de depleção de hemácias EasySep™, com adaptação<sup>381,386</sup>. Em seguida, uma alíquota de 50 µL de sangue foi transferida

para um frasco eppendorf, seguido da adição de 1,2  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e 48,8  $\mu\text{L}$  de soro bovino fetal (FBS, do inglês, *fetal bovine serum*) 2% (v/v) preparado em PBS de concentração. Posteriormente, 30  $\mu\text{L}$  da amostra diluída foi misturada com 30  $\mu\text{L}$  de Tetronic 90R4 0,2% (m/v). A solução resultante foi adicionada dentro do eletrodo reservatório para extrair-se o plasma. Para a realização do protocolo de extração de plasma utilizando a técnica de DMF, empregou-se o equipamento Mr-Box. Para isso, uma alíquota de amostra de sangue diluído de unidade dupla (5  $\mu\text{L}$ ) foi desprendida do reservatório e endereçada aos eletrodos de atuação. Concomitantemente, uma alíquota (5  $\mu\text{L}$ ) de partículas magnéticas comerciais<sup>381,386</sup> (previamente diluída 4x) foram deslocadas para os eletrodos de atuação, a partir de forças eletrostáticas da DMF. As duas gotículas foram misturadas em um arranjo “circular” ocupando cerca de 10 eletrodos, durante 5 minutos. Após este procedimento, a gota foi encaminhada para a extração de células vermelhas, mediante o acionamento do módulo magnético automatizado. Uma vez que as nanopartículas contendo uma porção expressiva de células vermelhas foram capturadas pelo ímã, a alíquota ausente das nanopartículas foi separada. Uma gota de unidade dupla de PBS em Tetronic 90R4 0,1% (m/v) foi usada para captar a gotícula descartada com as células vermelhas extraídas. A gotícula remanescente de sangue pré-tratado passou pelo procedimento de extração dentro do chip de DMF por mais duas vezes, repetindo-se o mesmo procedimento.

#### **4.3.9. Análise eletroquímica de L-cisteína em formulação farmacêutica e plasma**

Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da solução de concentração teórica de 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de L-cisteína foi adicionada ao eletrodo reservatório do *chip* de microfluídica digital e, em outro eletrodo reservatório, o eletrólito suporte foi inserido contendo concentrações dobradas (KCl 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ , tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v)). Ao efetuar a mistura entre a amostra farmacêutica e a solução diluente, e separá-la em duas gotículas de 5  $\mu\text{L}$  cada, usando procedimentos microfluídicos digitais automatizados, uma concentração teórica de L-cis de 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic

90R4 0,1% (m/v) foi obtida e seguiu para análise no ePAD.

Para a análise de plasma, cuja separação foi obtida diretamente na plataforma de microfluídica digital, utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  nas análises eletroquímicas. Para tanto, essa alíquota foi misturada de modo automatizado a uma solução de eletrólito suporte de KCl 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ , tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) e dividida em duas novas gotículas de unidade dupla, cada. Uma delas foi endereçada para o eletrodo reservatório de descarte, enquanto a outra foi direcionada para o papel coletor, a fim de que a solução chegasse até o eletrodo para ser analisada via VOQ.

#### **4.3.10. Estudo de adição de recuperação de L-cis em amostras farmacêutica e de plasma**

Para o estudo de adição e recuperação da vertente farmacêutica, amostras de padrão analítico de L-cis de 300; 500 e 700  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparadas KCl 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ , tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) foram utilizadas para abastecer o eletrodo reservatório. Sendo assim, 5  $\mu\text{L}$  de cada uma dessas soluções foram misturadas de modo automatizado com a amostra teórica de 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de L-cis em Tetronic 90R4 0,1% (m/v) e separadas, dando origem à duas gotículas contendo a amostra com metade da concentração adicionando-se metade da concentração de cada nível de adição de padrão (150; 250 e 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Sendo assim, as concentrações teóricas esperadas a serem obtidas seriam o somatório entre a concentração quantificada na amostra farmacêutica, e os valores adicionados de padrão analítico. As análises foram realizadas empregando o ePAD de grafite e a técnica de amperometria.

Para executar o estudo de adição e recuperação de enfoque bioanalítico, soluções padrão analítico de L-cis de 20; 60 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  preparadas KCl 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ , tampão PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) foram utilizadas para preencher o eletrodo reservatório. Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  de cada uma dessas soluções foram misturadas de modo automatizado com a amostra de plasma previamente preparada na plataforma de DMF, dando origem à duas gotículas contendo a amostra com metade da concentração (~ 17,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) adicionando-se metade da concentração de cada nível de

adição de padrão (10; 30 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Dessa maneira, as concentrações teóricas finais esperadas eram de aproximadamente 27,3; 47,3 e 67,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As análises foram realizadas empregando o ePAD de negro de fumo e técnica de VOQ.

## 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1. Fabricação de dispositivos eletroquímicos baseados em papel

A literatura demonstra que os procedimentos/estratégias mais usuais no contexto da integração entre a tecnologia de microfluídica digital e a detecção eletroquímica é estabelecer modificações diretamente na placa superior ou inferior dos *chips* de DMF<sup>186,348,351,353</sup>. Essas alterações podem estar relacionadas tanto em relação à confecção de células eletroquímicas diretamente no substrato inferior ou superior ou, ainda, recortes específicos na parte superior do *chip* para garantir o acesso de dispositivos eletroquímicos que podem ser integrados ao *chip* de DMF permitindo assim que as gotículas processadas na DMF possam chegar até o eletrodo de trabalho. Embora as estratégias supramencionadas sejam soberanas e elegantes, até o presente momento, apresentam algumas desvantagens como a impossibilidade de reuso dos dispositivos (quando os eletrodos são produzidos diretamente no *chip* de DMF) ou, no caso de acesso via recortes adaptados, a susceptibilidade a etapas laboriosas, além de um aumento considerável na complexidade da montagem dos dispositivos.

O arcabouço teórico/estado da arte mostra também que, embora alguns trabalhos tenham explorado a integração entre DMF e eletroquímica, nenhuma estratégia proposta até o presente momento dedicou-se à inserção dos sensores eletroquímicos diretamente no eletrodo reservatório, utilizando dispositivos de placa dupla. Acredita-se que essa estratégia simples e prática possa ser promissora para facilitar o acesso do eletrodo de trabalho às gotículas, permitir a reutilização do *chip* de microfluídica, além de evitar etapas tediosas de adaptação de *layout*.

Nessa perspectiva, os requisitos necessários para estabelecer essa sinergia entre as técnicas são: o dispositivo ser fino suficiente para adentrar ao *chip* de DMF entre a placa superior e a placa inferior, ser flexível suficiente

para permitir que os conectores estabeleçam contato com o potenciostato, além do material do dispositivo eletroquímico ser capaz de possibilitar o acesso da solução proveniente da DMF até o eletrodo de trabalho com volume de solução adequado para realizar as medidas eletroquímicas (uma vez que em DMF comumente se trabalha com volumes ~ 1 - 10  $\mu\text{L}$ , a depender do *layout* do dispositivo).

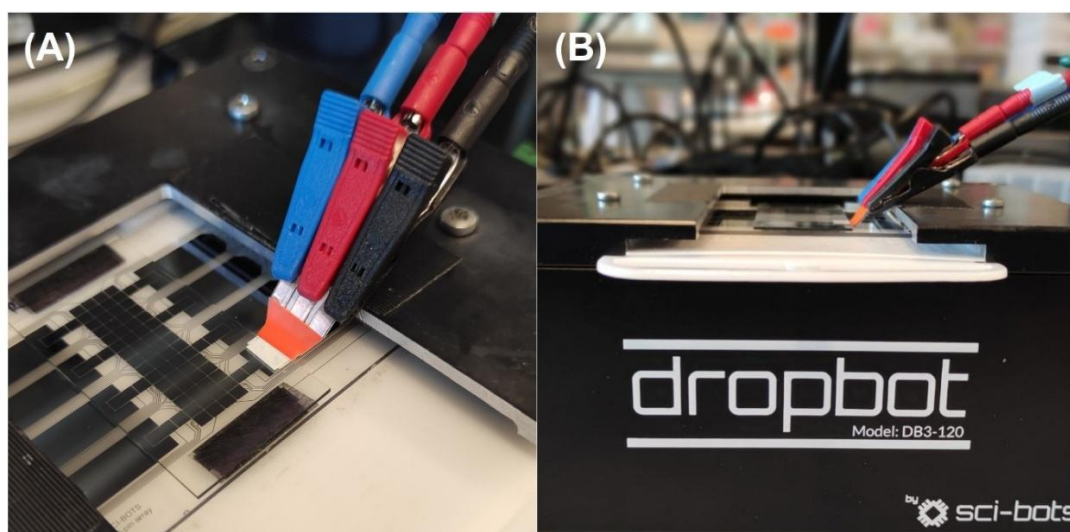
Atrelada às características desejáveis para possibilitar efetuar análises eletroquímicas acopladas com DMF, explorou-se a técnica de impressão por estêncil para fabricar os dispositivos eletroquímicos de modo personalizado. A fim de se obter sensores com baixa espessura, além de apresentar uma certa flexibilidade, o papel cromatográfico e o papel office foram avaliados como substrato empregando-se tanto o uso de uma tinta alternativa de grafite, quanto uma tinta comercial de negro de fumo. Além disso, parâmetros como tipo de grafite, volume de solvente na formulação da tinta alternativa e número de camadas de adesivo vinil (usado na máscara do sensor) foram estudados. Os parâmetros ótimos foram estabelecidos com base em critérios qualitativos de viscosidade da formulação da tinta, melhor resistência mecânica (flexibilidade) e adequada aderência ao substrato. A Tabela 4.1 dispõe os parâmetros avaliados, juntamente com as condições setadas para a construção do ePAD de grafite.

**Tabela 4.1.** Parâmetros estudados no processo de otimização da fabricação da tinta condutora de grafite.

Parâmetro	Faixa testada ou marca	Condição selecionada
Proporção (grafite/verniz brilhante)	40% grafite/60%verniz brilhante 50% grafite/50% verniz brilhante 60% grafite/40% verniz brilhante	50% grafite/50% verniz brilhante (1,0 g/1,0 g)
Solvente acetona (mL)	0,6 mL 0,8 mL 1,0 mL 1,2 mL	0,8 mL
Número de camadas de adesivo vinil	1 2	2
Tipo de grafite	Sigma Aldrich (< 20 $\mu\text{m}$ ) General's (produto de artista profissional)	General's
Substrato	Papel cromatográfico Papel sulfite	Papel sulfite

Os parâmetros ótimos para a construção dos ePADs do dispositivo eletroquímico alternativo foi usando a proporção grafite:aglutinante de 50:50, ou seja, 1,0 g de grafite e 1,0 g de verniz cristal. O volume de solvente para que a tinta não ficasse nem demasiadamente líquida e nem exageradamente pastosa, além de permitir a produção de dispositivos relativamente flexíveis foi usando o volume de 0,8 mL. O número de camadas de vinil e o tipo de grafite empregados foram duas e grafite artístico, respectivamente. Além disso, o substrato escolhido foi o papel sulfite, uma vez que possuía menor espessura, concomitante à produção de dispositivos mais flexíveis.

Uma vez que o substrato de papel sulfite não apresenta muita capilaridade para aspirar a solução trabalho, um pedaço retangular de papel cromatográfico foi usado sobre a superfície do eletrodo de trabalho para capturar as gotículas com o auxílio das forças eletrostáticas da DMF, além da ação capilar. A Figura 4.3 apresenta uma imagem real do dispositivo e a nova estratégia proposta para integrar sensores eletroquímicos e microfluídica digital.



**Figura 4.3.** (A) Imagem real da integração entre um dispositivo analítico baseado em papel e a técnica de microfluídica digital, a partir da inserção do ePAD dentro do eletrodo reservatório. (B) Vista frontal da integração entre o dispositivo de microfluídica digital e o sensor eletroquímico mostrando a angulação da dobragem necessária. Fonte: Autoria própria.

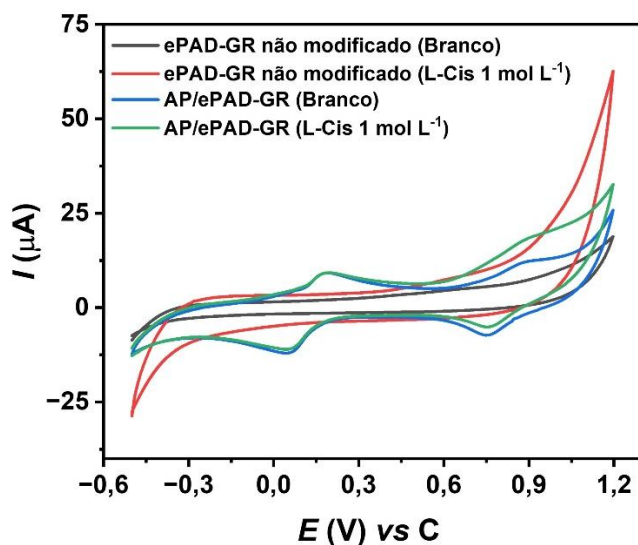
Conforme ressalta a imagem da Figura 4.3 A-B, a angulação do sensor empregando a estratégia necessita que o dispositivo seja utilizado de modo tensionado, com o ângulo de aproximadamente  $132 \pm 1^\circ$ , sendo, portando,

dobrado em aproximadamente 48°. Por essa razão, é imprescindível que, ao utilizar a abordagem proposta, o dispositivo eletroquímico seja relativamente flexível. É importante mencionar que, para permitir a entrada do sensor eletroquímico, foram usadas duas camadas de fita dupla face para estabelecer um *gap* fixo entre a placa superior e a placa inferior do *chip* de microfluídica digital.

As vantagens de empregar a integração proposta advém da simplicidade da integração que pode ocorrer tanto via inserção direta, quanto desconectando-se a placa superior e inferior para acomodar o dispositivo e depois conectando-as novamente. Ambas as maneiras são funcionais e permitem a reutilização do *chip*. Entretanto, a primeira maneira pode favorecer o surgimento de danos na camada dielétrica dentro dos eletrodos reservatórios. Outro aspecto a ser mencionado é que não há a necessidade de produção dos sensores eletroquímicos diretamente no *chip* de DMF, o que permite que diferentes geometrias, materiais eletródicos e substratos, possam ser explorados, de acordo com a necessidade do experimento e/ou analito alvo.

#### **4.4.2. Otimizações da modificação do eletrodo de trabalho com azul da Prússia**

Os ePADs fabricados tanto usando a tinta condutora de grafite quanto a de negro de fumo foram fabricados com o intuito de detectar L-cisteína nas vertentes farmacêutica e bioanalítica. A literatura demonstra que uma das estratégias de promover a determinação desse analito é modificar a superfície do eletrodo de trabalho com azul da Prússia<sup>375</sup>. Sendo assim, o ePAD de grafite (ePAD-GR) foi selecionado para ser submetido à etapa de otimização dos parâmetros de formação das nanopartículas via eletrodeposição. Conforme pode ser observado na Figura 4.4, na ausência da modificação do WE, não é possível detectar a L-cisteína efetivamente com boa resolução do pico de oxidação. Por outro lado, na presença da modificação usando azul da Prússia (AP/ePAD-GR), uma diferença notável entre os valores do branco e da L-cis pode ser visualizado.



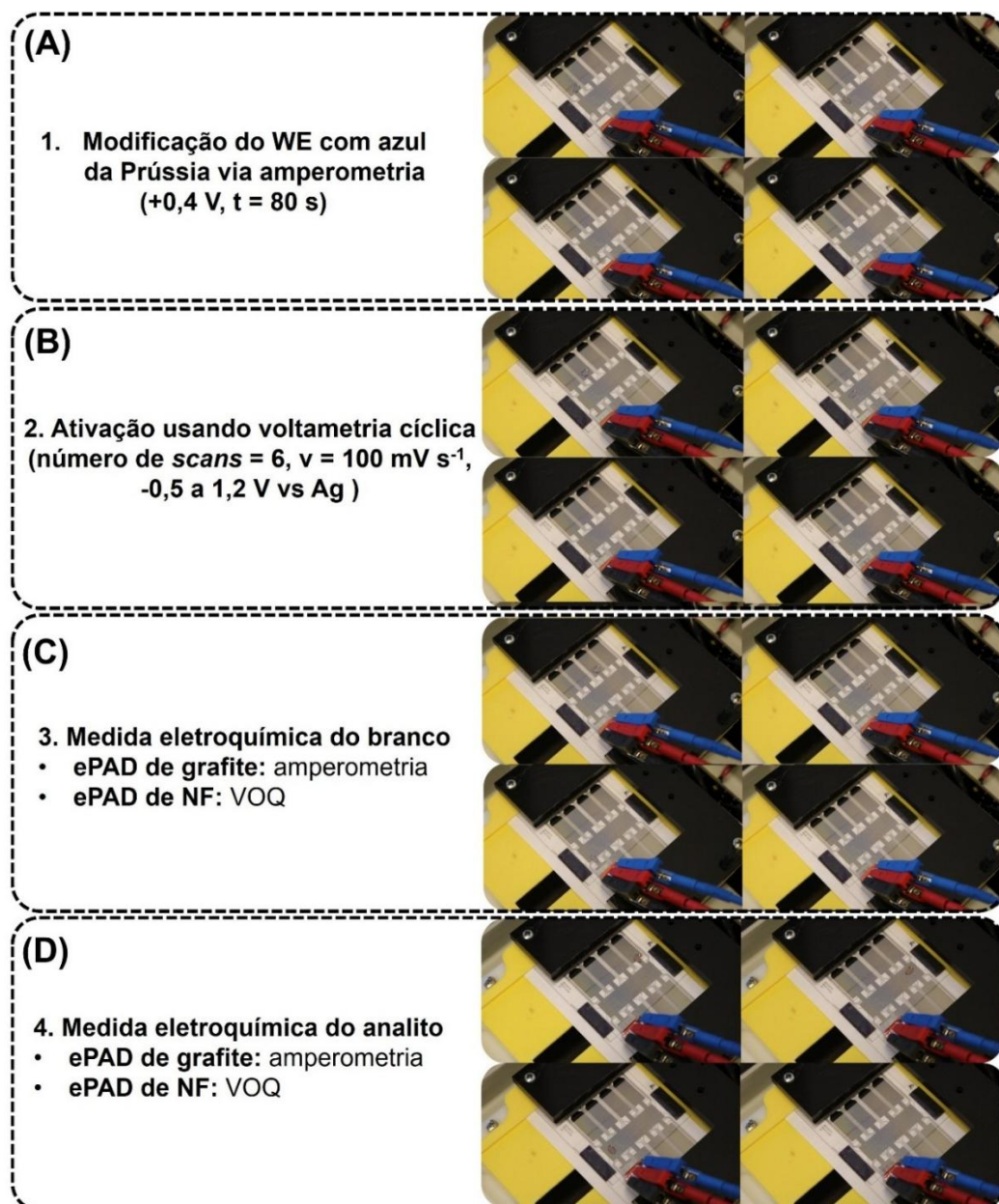
**Figura 4.4.** Respostas de VC obtidas na ausência e presença de L-cis  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  preparada em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS (pH = 7,4) e Tetronic 90R4  $0,1\%$  (m/v) com a faixa de potencial variando de  $-0,5$  a  $1,2 \text{ V vs C}$  sob velocidade de varredura de  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . A modificação do WE do ePAD-GR foi realizada previamente com a solução precursora da modificação contendo  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , HCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e Tetronic 90R4  $0,1\%$  (m/v), via amperometria ( $t = 80 \text{ s}$ ;  $0,4 \text{ V}$ ). Fonte: Autoria própria.

Visando aprimorar o processo de modificação da superfície do WE, buscando estabelecer análises relativamente rápidas e sensível suficiente para detectar o analito alvo nas matrizes de interesse farmacêutica, os parâmetros do processo de eletrodeposição foram otimizados a partir do uso do ePAD-GR. Os parâmetros estudados de concentração da solução precursora de AP e o tempo de eletrodeposição, além dos valores selecionados para cada parâmetro estão mostrados na Tabela 4.2. As condições experimentais fixadas foram selecionadas com base nas maiores diferenças entre os valores de corrente entre o branco e na presença de L-cisteína  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando-se a técnica de amperometria.

**Tabela 4.2.** Resumo dos parâmetros estudados no processo de otimização da eletrodeposição de AP no ePAD-GR, que incluem a concentração ([ ]) das espécies contendo Fe e tempo de eletrodeposição.

Parâmetro	Faixa testada	Condição selecionada
[FeCl <sub>3</sub> ] e [K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]] na solução precursora do AP (mmol L <sup>-1</sup> )	0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mmol L <sup>-1</sup>	FeCl <sub>3</sub> 1,5 mmol L <sup>-1</sup> e K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 1,5 mmol L <sup>-1</sup> preparados em KCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> , HCl 0,01 mol L <sup>-1</sup> e Tetric 90R4 0,1% (m/v)
Tempo de eletrodeposição (s)	30; 60; 80; 100 e 120 s	80 s

As etapas realizadas até a detecção da L-cisteína, em associação com a microfluídica digital, estão sumarizadas na Figura 4.5. O volume de solução usado tanto nas etapas de modificação do WE quanto de ativação, além das medidas eletroquímicas subsequentes, foi de 5 µL. Em cada etapa, a partir da ativação, a solução era aspirada com o auxílio de um papel. Uma maneira de aprimorar esse procedimento poderia ser a instalação de almofadas absorventes entre cada eletrodo reservatório.

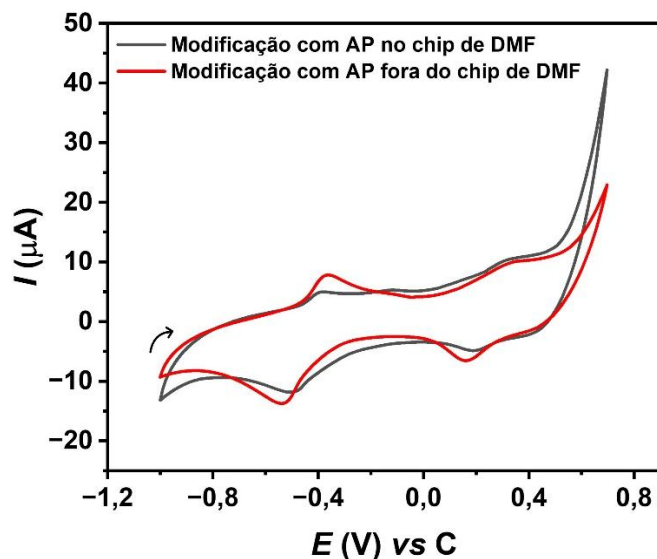


**Figura 4.5.** Procedimentos eletroquímicos integrados com a técnica de DMF utilizados no processo de modificação de ePADs de grafite e negro de fumo com AP, ativação do WE e detecção de L-cis. Fonte: Autoria própria.

O protocolo de modificação do dispositivo eletroquímico foi realizado empregando-se ePADs de grafite fora e dentro do chip de DMF (Figura 4.6) com o potencial vs C, na tentativa de reduzir uma etapa no processo de produção dos dispositivos. O voltamograma obtido por meio do sexto ciclo da etapa de ativação de cada ePAD-GR exibe picos de oxidação e redução referente à dois pares redox. O primeiro par redox engloba a oxidação do branco da Prússia (BP) em azul da Prússia próximo ao potencial de -0,36 V.

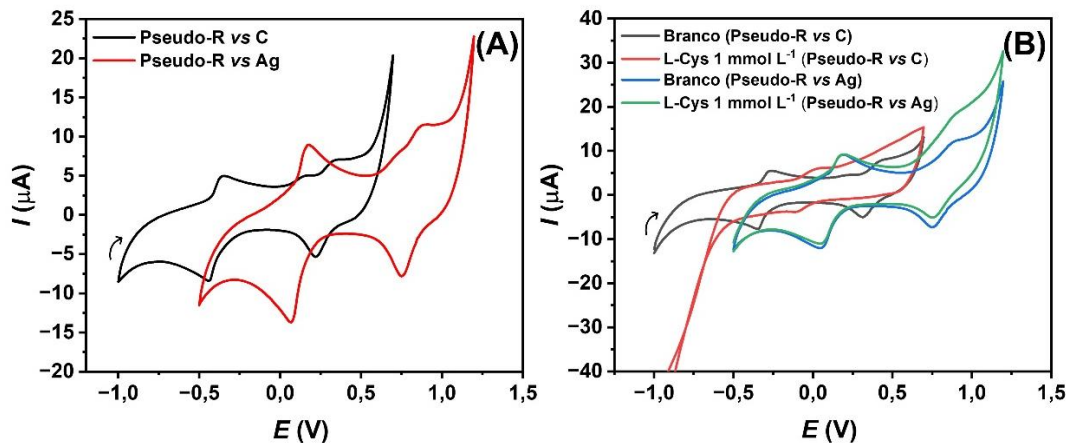
Já no outro sentido, a redução do AP em BP foi registrada próximo ao potencial de -0,53 V. Em relação ao segundo par redox, trata-se da oxidação de AP em verde de Berlim (VB), ou amarelo de Berlim (AB) no estado oxidado em +0,33 V. A redução de reação reversa foi atribuída ao potencial de +0,17 V. A literatura demonstrou comportamentos similares em relação à presença de dois pares redox em modificações de WE com AP<sup>369,371,372</sup>. Contudo, uma vez que os voltamogramas do presente experimento foram adquiridos com um eletrodo de *pseudo*-referência de carbono, os potenciais dos picos foram deslocados em comparação com sistemas usando eletrodos de referência de Ag/AgCl, por exemplo.

Conforme pode ser observado, não há uma perda de sinal de corrente significativa no segundo par redox (de interesse para a análise de L-cis) quando se utiliza a técnica de DMF acoplada à eletroquímica. Esse comportamento é particularmente vantajoso por favorecer que etapas de preparo de amostras automatizadas possam ser realizadas antes de procedimentos eletroquímicos ou/e em paralelo com o procedimento de modificação do WE. Vale ressaltar que, até onde se sabe, o presente estudo consiste no primeiro trabalho em DMF mostrando a modificação de ePADs a partir da eletrodeposição de nanopartículas.



**Figura 4.6.** Voltamogramas cíclicos referente ao sexto ciclo do processo de ativação, na presença de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> e KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, suplementada com Tetronic 90R4 0,1% (m/v), obtidos para o ePAD de grafite usando-se o sensor fora e dentro do chip de DMF. Fonte: Autoria própria.

Ao realizar as medidas eletroquímicas com eletrodo de referência de carbono, foi possível identificar um efeito expressivo de deslocamento de potencial durante as análises do analito de interesse. Sendo assim, estudou-se usar o ePAD com o eletrodo de referência pintado com tinta de prata novamente, a fim de obter análises com o potencial de pico anódico estáveis para a L-Cis. A Figura 4.7 A demonstra os voltamogramas cíclicos obtidos para o sexto ciclo do processo de ativação na presença de uma solução de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Tetronic 90R4 0,1% (m/v). Por sua vez, a Figura 4.7 B mostra os voltamogramas cíclicos do branco e para a L-cis na presença de tampão PBS (pH 7,4), KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Tetronic 90R4 0,1% (m/v), utilizando tanto o ePAD com o eletrodo de *pseudo*-referência de carbono, como pintado com tinta de prata.

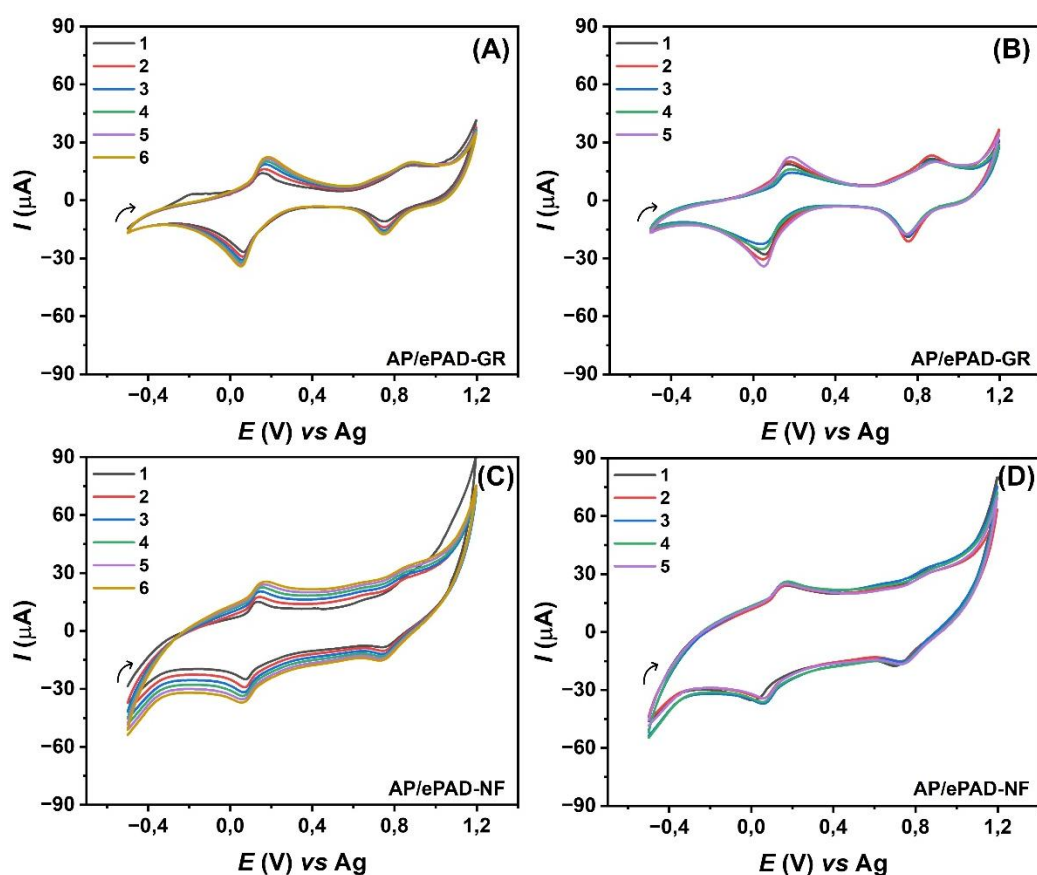


**Figura 4.7.** (A) Voltamogramas cíclicos do ePAD de grafite obtidos durante o processo de ativação na presença de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) usando eletrodo de referência de carbono e de prata. (B) Voltamogramas cíclico na presença e e ausência de L-cis em PBS usando eletrodos contendo o eletrodo de referência de carbono e de prata. A velocidade de varredura empregada foi de 100 mV s<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria.

Como exibe a Figura 4.7 A, é possível visualizar um deslocamento de potencial dos picos anódicos e catódicos referentes à modificação do WE com azul da Prússia para potenciais mais positivos, quando usado Ag. A partir da Figura 4.7 B é possível perceber, adicionalmente, que o segundo pico anódico, de interesse para a análise de L-cis, experimenta um deslocamento de potencial significativo quando empregado material eletródico de carbono como eletrodo de referência. Em contrapartida, o sinal analítico na presença do analito manteve-se estável em comparação com a análise do branco. Uma vez que essa condição forneceu voltamogramas mais estáveis, o uso da prata foi incorporado na fabricação dos sensores. Outro fator a ser destacado é o aumento do sinal analítico do pico de oxidação próximo ao potencial de +0,9 V.

Uma vez que os parâmetros da modificação do WE foram estabelecidos utilizando-se os parâmetros ótimos, a estabilização do sinal analítico na VC e a reprodutibilidade da modificação foram analisadas para o ePAD de grafite e de negro de fumo. A Figura 4.8 A e a Figura 4.8 C reportam os voltamogramas obtidos para o processo de estabilização mediante a etapa de ativação para o AP/ePAD-GR e o AP/ePAD-NF, respectivamente. Por outro lado, a Figura 4.8 B e a Figura 4.8 D apresentam os voltamogramas da

reprodutibilidade da modificação na presença do eletrólito suporte para o ambos os dispositivos, respectivamente.



**Figura 4.8.** (A) Voltamogramas cíclicos referentes à etapa de ativação do ePAD de grafite. (B) Voltamogramas cíclicos provenientes do estudo de reprodutibilidade da modificação do WE com AP de diferentes ePADs de grafite. (C) Voltamogramas cíclicos referentes à etapa de ativação do ePAD de negro de fumo. (D) Voltamogramas cíclicos provenientes do estudo de reprodutibilidade da modificação do WE com AP de diferentes ePADs de negro de fumo. Fonte: Autoria própria.

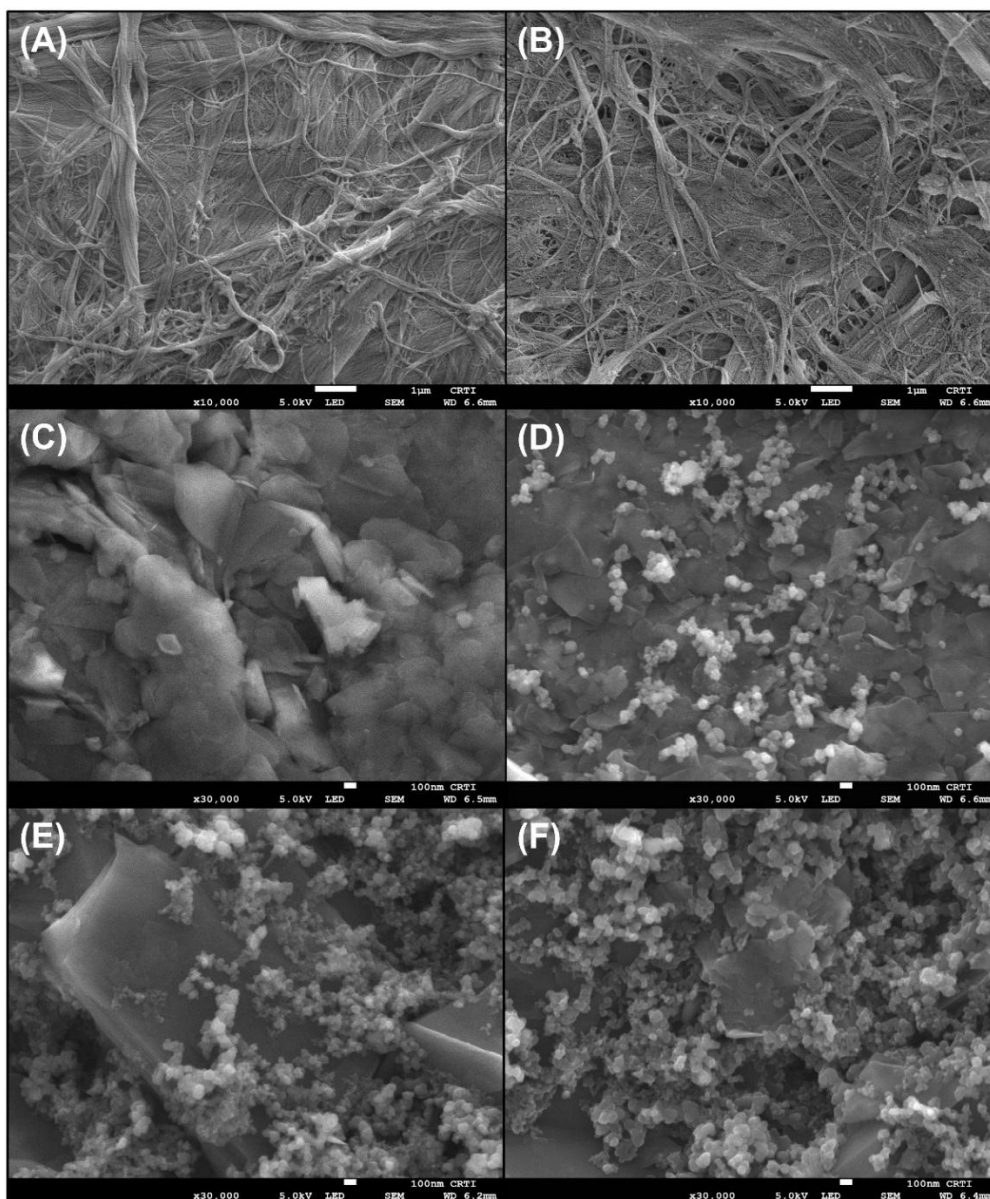
Conforme pode ser observado qualitativamente, o perfil voltamétrico da modificação do AP/ePAD-GR e do AP/ePAD-NF foram bastante similares, dentro de um mesmo grupo, sem discrepâncias de deslocamento de potencial para os pares redox, bem como grande variação na magnitude das correntes elétricas, destacando a potencialidade do método para produzir dispositivos modificados com uma apreciável reprodutibilidade. Contudo, a diferença entre os perfis obtidos para o sensor de grafite e o dispositivo de negro de fumo podem ser atribuídos a diferenças estruturais, uma vez que se trata de diferentes composições quanto ao material eletrodico.

Diferentemente de outros métodos empregando a modificação eletroquímica para a formação de AP que comumente empregam amperometria seguida de cerca de 20 ciclos para estabilização de azul da Prússia com um volume de solução da ordem de 50  $\mu\text{L}$  ou mais<sup>371,385</sup>, o método aqui proposto faz o uso de uma etapa de amperometria de 80 s e 6 ciclos de VC à 100  $\text{mV s}^{-1}$ , usando apenas 5  $\mu\text{L}$  de solução em cada etapa. Além disso, emprega um sensor eletroquímico de papel de baixo custo e miniaturizado que, por estar em linha com a DMF possui potencial para integrar o preparo de amostra antes de análises eletroquímicas.

#### **4.4.3. Caracterização morfológica**

A morfologia da superfície do WE dos ePADs de grafite e de negro de fumo foi investigada antes e após o procedimento de modificação com as nanopartículas de AP. A Figura 4.9 A-B exibe o papel coletor antes e depois da modificação da superfície do WE. Conforme pode ser observado, o substrato de papel cromatográfico apresenta o perfil esperado contendo um emaranhado de fibras interconectadas. Por sua vez, é possível identificar que algumas nanopartículas distribuídas podem ser visualizadas no substrato após o processo de modificação do WE, corroborando com o sucesso da etapa de eletrodeposição. A Figura 4.9 C-D demonstra a morfologia do ePAD-GR antes do procedimento de eletrodeposição das nanopartículas de AP e após. É possível identificar uma significativa diferença na superfície, quando comparado os dois dispositivos, evidenciada pelas partículas aderidas à superfície do WE. A morfologia das nanopartículas geradas é de formato esférico e apresentou uma boa distribuição. A Figura 4.9 E-F reporta as mudanças geradas no WE de um ePAD-NF. As imagens refletem a morfologia do material eletrodico antes da modificação, com uma considerável quantidade de nanopartículas de negro de fumo. Possivelmente, a tinta comercial pode conter na formulação uma quantidade de grafite, uma vez que algumas estruturas de material condutor em flocos podem ser identificadas. O aspecto do WE posterior à modificação com nanopartículas de AP mostrou um aumento significativo na quantidade de nanopartículas, evidenciando que ambos os eletrodos foram modificados com sucesso. É importante mencionar

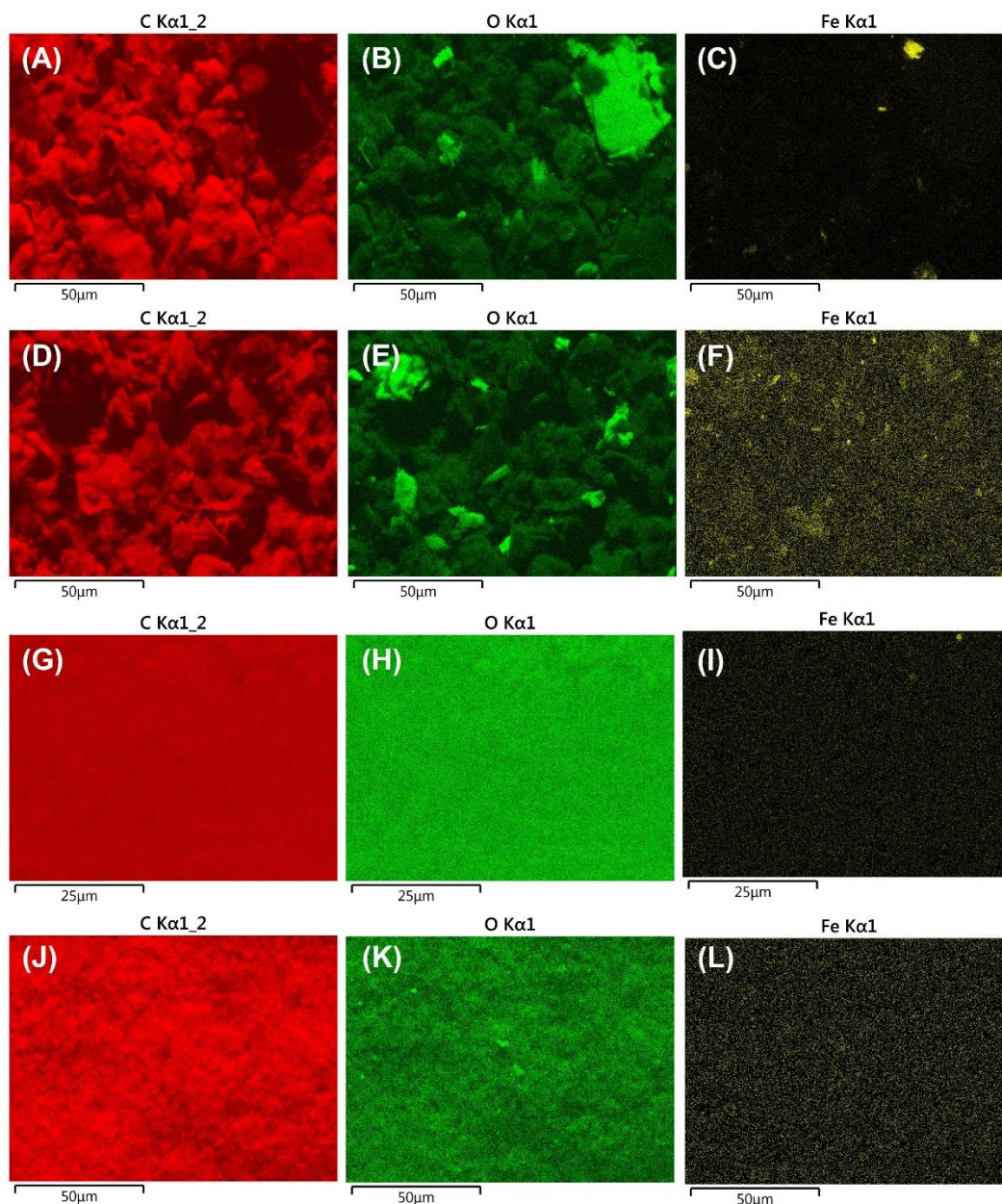
que, até onde se sabe, este consiste no primeiro procedimento de modificação de WE de um AP/ePAD com o auxílio da DMF.



**Figura 4.9.** Micrografias obtidas a partir da técnica de MEV-FEG usando a diferentes magnificações. (A) Papel coletor antes da modificação do ePAD (10.000X). (B) Papel coletor após a modificação do ePAD com AP (10.000X). (C) WE antes da eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de grafite (30.000X). (D) WE após a eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de grafite (30.000X). (E) WE antes da eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de GR-NF (30.000X). (F) WE após a eletrodeposição das nanopartículas de AP sobre o ePAD de GR-NF (30.000X). Fonte: Autoria própria.

Outra técnica empregada com o intuito de confirmar as alterações

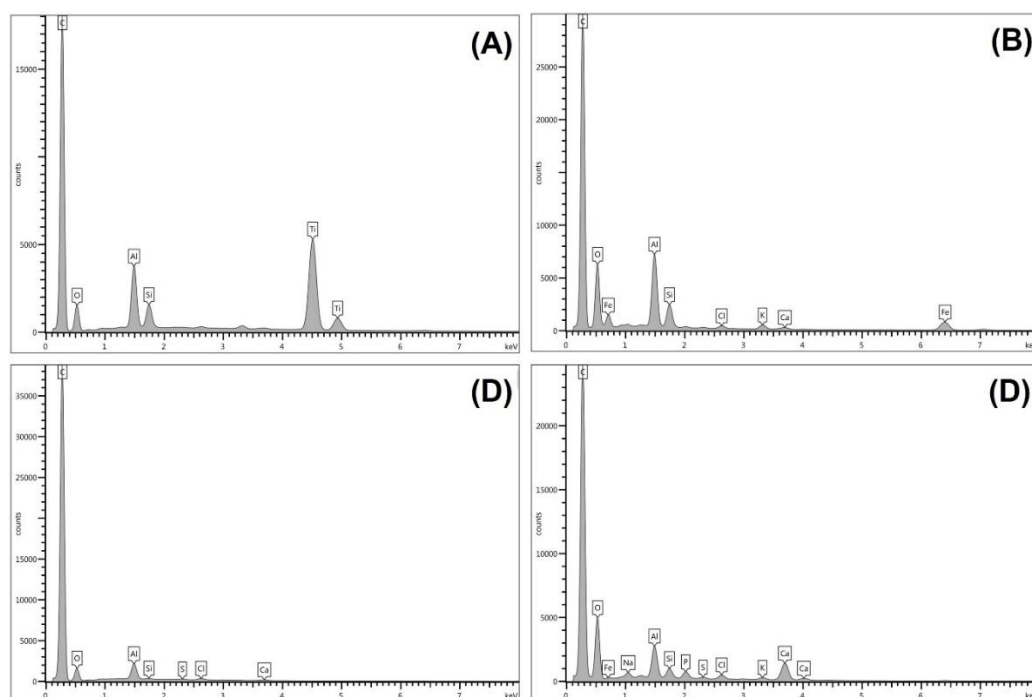
geradas na estrutura do sensor, de modo qualitativo, foi o EDS. A partir dessa técnica é possível visualizar, de modo simplificado, a composição elementar presente em um dado material. Nessa perspectiva, a Figura 4.10 mostra o mapa de EDS de parte do WE destacando algumas alterações na superfície do dispositivo em relação aos átomos de carbono, oxigênio e ferro para os dispositivos de grafite e negro de fumo antes e depois da etapa de eletrodeposição de nanopartículas de AP. É possível identificar que a superfície do eletrodo de grafite se difere consideravelmente do ePAD à base de negro de fumo. Enquanto a superfície do ePAD de grafite destaca-se pela topografia irregular, o ePAD de negro de fumo apresenta o aspecto mais liso. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de as partículas possuírem morfologias e tamanhos diferentes.



**Figura 4.10.** Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (A) carbono, (B) oxigênio e (C) ferro na superfície do WE do ePAD de grafite. Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (D) carbono, (E) oxigênio e (F) ferro na superfície do WE do ePAD de grafite modificado com AP. Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (G) carbono, (H) oxigênio e (I) ferro na superfície do WE do ePAD de NF. Mapas de EDS mostrando a presença de elementos (J) carbono, (K) oxigênio e (L) ferro na superfície do WE do ePAD de NF modificado com AP. Fonte: Autoria própria.

Como pode ser visto na Figura 4.10 A-L, as colorações vermelha, verde e amarela referem-se aos átomos de carbono, oxigênio e ferro, respectivamente. Em relação à fração de carbono e oxigênio, não há alterações demasiadamente expressivas em relação ao ePAD de grafite em

comparação com sua versão pós modificação (Figura 4.10 A-C e Figura 4.10 D-F). No tocante ao átomo de ferro, infere-se pelas Figuras 4.10 A, F, I, e L, que, após a etapa de eletrodeposição das nanopartículas de AP, é notória o aumento da presença do elemento ferro no eletrodo, tanto no ePAD de grafite quanto de negro de fumo, indicativo de que a formação das nanopartículas ocorreu conforme esperado e de maneira aparentemente uniforme. O espectro de EDS também foi processado para ambos os eletrodos, na ausência e na presença da imobilização das nanopartículas, como apresenta a Figura 4.11 Novamente, fica evidenciado o surgimento de ferro nos dispositivos após a etapa de síntese de nanopartículas de AP via amperometria.



**Figura 4.11.** Espectros EDS mostrando os elementos químicos na superfície eletródica do ePAD de GR antes (A) e após (B) a modificação com AP. Espectros EDS mostrando os elementos químicos na superfície eletródica do ePAD de NF antes (C) e após (D) a modificação com AP. Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.4. Otimização de parâmetros experimentais e desempenho analítico

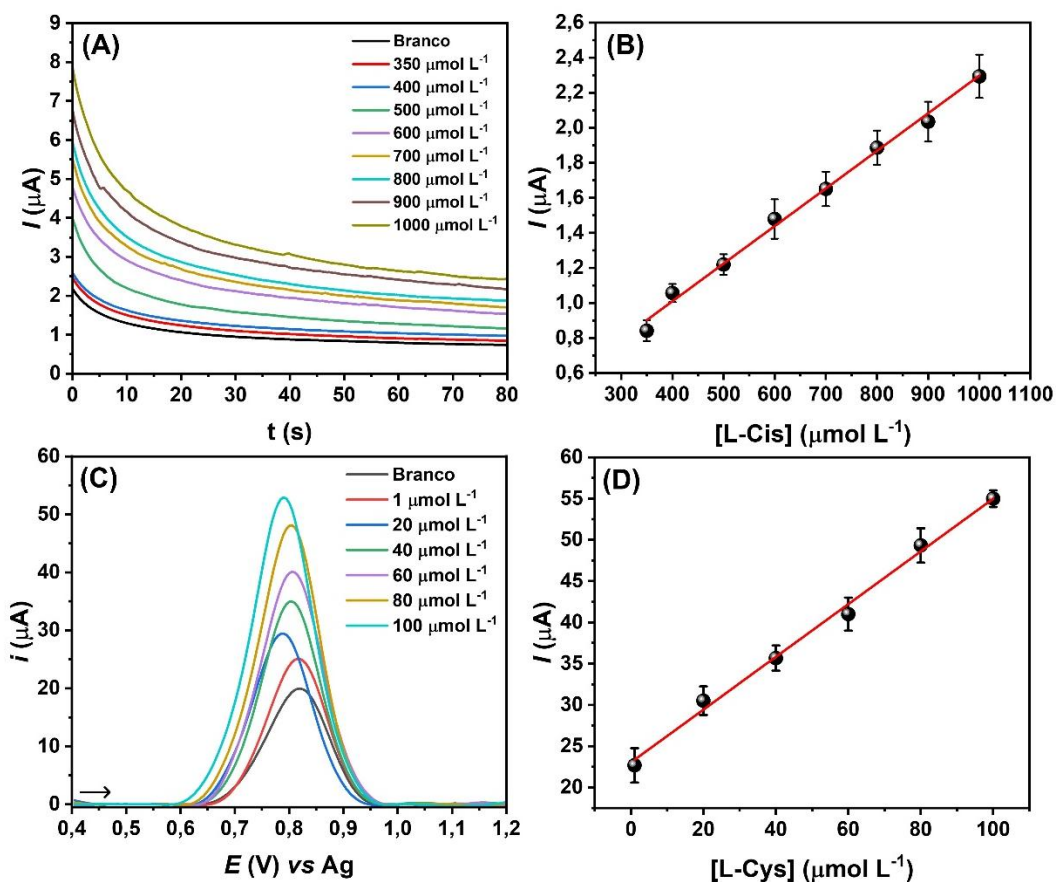
Com o objetivo de analisar L-cisteína viando aplicações farmacêuticas e clínicas, os parâmetros experimentais das técnicas de amperometria e

voltametria de onda quadrada foram avaliadas para se obter a melhor sensibilidade possível para cada ePAD, em particular. As condições mais favoráveis setadas para a execução dos experimentos estão esquematizadas na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3.** Parâmetros avaliados e selecionados no estudo de otimização de parâmetros da técnica de VOQ visando a detecção de L-cisteína.

<b>Técnica eletroquímica</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Faixa estudada</b>	<b>Valor ótimo</b>
<b>Amperometria</b>	Potencial	0,85; 0,90; 0,95; 1,0 e 1,05 V	0,95 V
	<i>Step</i>	0,0010; 0,0025; 0,0050; 0,0075 e 0,0100 V	0,0050 V
<b>Voltametria de onda quadrada</b>	Amplitude	0,010; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 V	0,05 V
	Frequência	4; 6; 8; 10; 12 Hz	10 Hz

Sob parâmetros otimizados, foi construída uma curva analítica usando o ePAD de grafite em associação com a técnica de amperometria e, uma curva analítica empregando o ePAD de negro de fumo por meio do uso da técnica de voltametria de onda quadrada. A Figura 4.12 A-D demonstra as curvas analíticas obtidas em triplicata.



**Figura 4.12.** (A) Amperogramas referentes à análise de L-cisteína para diferentes concentrações usando o eletrodo AP/ePAD-GR. (B) Curva analítica para análise de L-cis entre as concentrações de 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . (C) Voltamogramas de onda quadrada referentes à análise de L-cisteína para diferentes concentrações usando o eletrodo AP/ePAD-NF. (B) Curva analítica para análise de L-cis entre as concentrações de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Fonte: Autoria própria.

Conforme pode ser observado na Figura 53, o aumento da concentração do analito provoca um aumento proporcional na magnitude de corrente elétrica para ambas as técnicas. O comportamento linear usando o AP/ePAD-GR a técnica de amperometria foi de 350  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com  $R^2 = 0,989$ . A equação linear obtida foi de  $y = 0,0021x + 0,15$  e o limite de detecção foi calculado como 92,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . No que se refere à técnica de voltametria de onda quadrada e o AP/ePAD-NF de, a faixa de concentração linear foi entre 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com  $R^2 = 0,996$ . A equação de regressão linear foi  $y = 0,32x + 23,0$ . O limite de detecção foi estimado em 0,54  $\mu\text{mol L}^{-1}$  pela relação expressa na Equação 4.1:

$$LOD = \frac{3S_D}{s} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde,  $S_D$  é o desvio padrão do branco e  $s$  refere-se à sensibilidade analítica pela curva analítica<sup>67</sup>.

Acredita-se que a discrepância entre a sensibilidade dos métodos advém, principalmente, devido ao uso de diferentes materiais eletródicos. Comumente, dispositivos eletroquímicos contendo negro de fumo na composição experimentam uma maior taxa de transferência de elétrons e sensibilidade, em comparação aos sensores fabricados com puramente grafite de componente condutor. Ademais, a técnica de voltametria de onda quadrada permite a minimização da corrente capacitiva, o que melhora a sensibilidade do método.

Os desempenhos de ambos os dispositivos eletroquímicos baseados em papel foram comparados com sensores reportados em termos de tipo de eletrodo, técnica, faixa linear e limite de detecção. A Tabela 4 comporta os diferentes estudos compilados. O AP/ePAD-GR apresentou faixa linear com elevados valores de concentração de L-cis e LOD maior do que a maioria dos estudos. Por outro lado, o AP/ePAD-NF de negro de fumo demonstrou-se com desempenho comparável entre os parâmetros avaliados em outros estudos. É importante destacar que, embora os sensores não tenham apresentado sensibilidade tão apreciável quanto algumas abordagens mostradas na tabela, as células eletroquímicas aqui apresentadas são de baixo custo, podem ser utilizadas relativamente tensionadas, além de requerer um volume extremamente baixo de amostra. Ademais, é o único método reportado integrando DMF-eletroquímica para analisar L-cisteína.

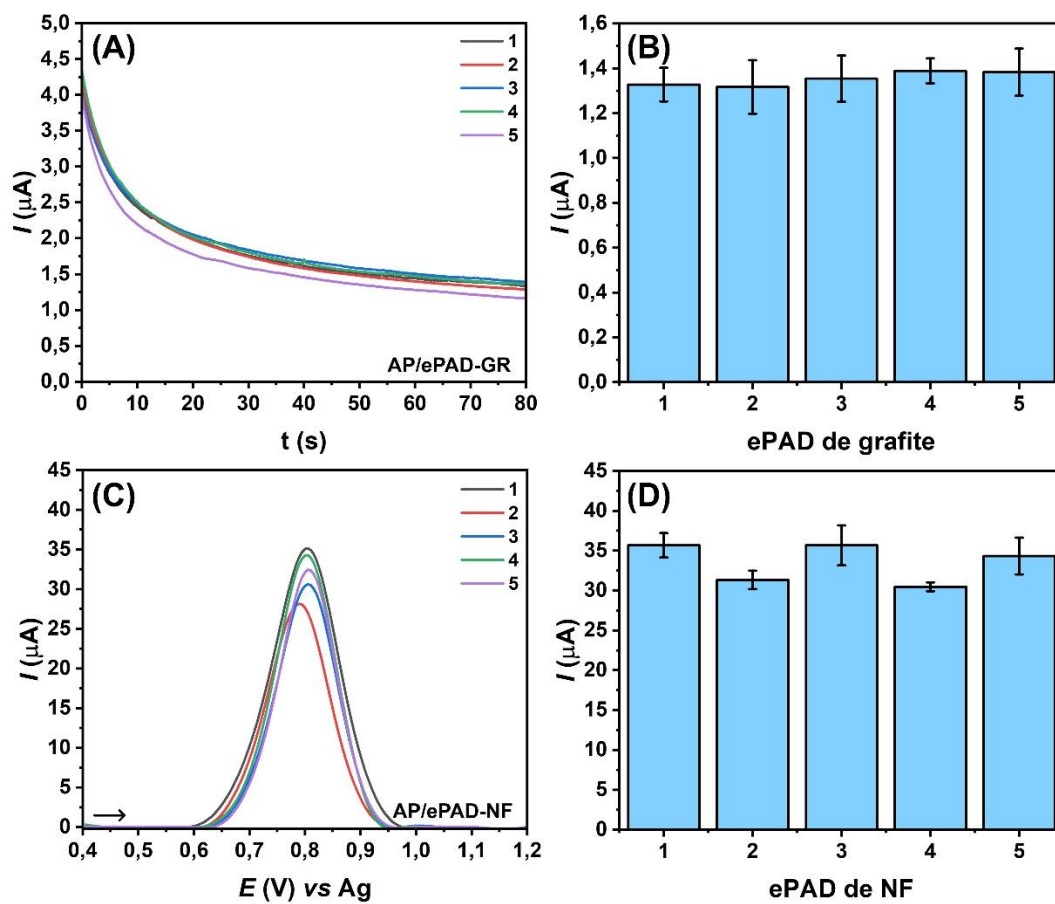
**Tabela 4.4.** Tabela comparativa para diferentes tipos de eletrodos empregados na análise de L-cisteína em termos de desempenho analítico.

Eletrodo	Técnica	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Referência
SPE/PB	Cronoamperometria	100 – 600	67,4	380
SPE/PB-A	Cronoamperometria	300 – 800	149	380
PLA-G <sub>DMF-EC</sub> +PB	Amperometria	3,0 – 230	0,858	375
GCE-Au	DPV	0,22 – 50	0,074	387
CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /rGO-Au	VC	50 – 400	0,383	388
AP/ePAD-GR	Amperometria	350 – 1000	92,2	Este trabalho
AP/ePAD-NF	VOQ	1,0 – 100	0,54	Este trabalho

VC: Voltametria cíclica; VPD: Voltametria de pulso diferencial. SPE/PB: Eletrodo serigrafado modificado com azul da Prússia; SPE/PB-A: Eletrodo serigrafado modificado com análogo de azul da Prússia; PLA-G<sub>DMF-EC</sub>+PB: Eletrodo impresso em 3D de ácido polilático-grafeno modificado com azul da Prússia; GCE-Au: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro; CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/rGO-Au: Eletrodo modificado com CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro.

#### 4.4.5 Estudos de reprodutibilidade

Para examinar a reprodutibilidade dos métodos propostos, cinco AP/ePADs-GR e cinco AP/ePADs-NF foram usados para realizar medições amperométricas e voltamétricas, respectivamente. Os desvios padrões relativos alcançados com base nos valores de intensidade de corrente elétrica foram de 2,3% e 7,3%, respectivamente, demonstrando um valor aceitável e comparável com estudos envolvendo o uso de ePADs para diferentes analitos<sup>9,354</sup>. A Figura 4.13 A-D mostra os amperogramas, histogramas relacionando os valores de corrente em função do número de dispositivos, além de voltamogramas de onda quadrada juntamente com o histograma correspondentes.

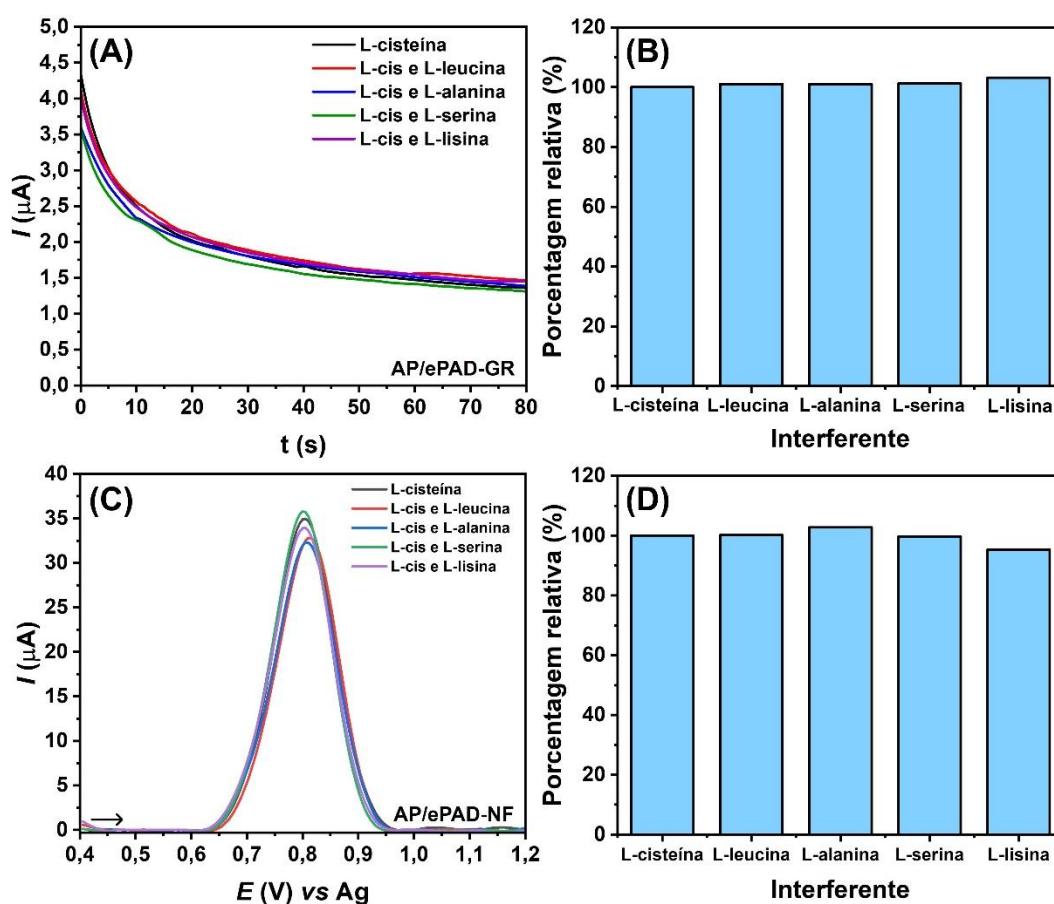


**Figura 4.13.** (A) Amperogramas referentes ao estudo de reprodutibilidade para a análise de L-cis  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4  $0,1\%$  (m/v) usando o eletrodo AP/ePAD-GR. (B) Histograma referente ao estudo de reprodutibilidade do método proposto mostrando os valores de corrente em função do número de AP/ePAD-GR testados. (C) Voltamogramas de onda quadrada referentes ao estudo de reprodutibilidade para a análise de L-cis  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4  $0,1\%$  (m/v) usando o eletrodo AP/ePAD-NF. (D) Histograma referente ao estudo de reprodutibilidade do método proposto mostrando os valores de corrente em função do número de AP/ePAD-NF testados. Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.6. Estudo de seletividade

A seletividade dos sensores propostos foi avaliada na presença de outros aminoácidos potencialmente interferentes, que podem estar presentes em matrizes biológicas ou em formulações farmacêuticas. A proporção usada no estudo foi de 1:1, no qual  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-cisteína foi analisado na presença de  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de interferente para o AP/ePAD-GR usando amperometria e  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-cis na presença  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de interferente, a partir do AP/ePAD-NF e, VOQ. As espécies químicas analisadas como

interferentes tanto usando a técnica de amperometria quanto a técnica de voltametria de onda quadrada foram L-leucina, L-alanina, L-serina e L-lisina. As respostas eletroquímicas e histogramas contendo porcentagem relativa de corrente em função do interferente estão dispostas na Figura 4.14 A-B. Os resultados mostraram que os percentuais de interferência das espécies estudadas foram entre 0,9% e 3,1% para o ePAD de grafite via amperometria e entre 0,18% e 4,6% empregando o dispositivo de negro de fumo com voltametria de onda quadrada. Dessa forma, infere-se que os outros aminoácidos não interferem significativamente na resposta do sensor em relação à L-cisteína, mesmo estando sob a mesma concentração, destacando, portanto, uma adequada seletividade do método proposto.



**Figura 4.14.** (A) Amperogramas provenientes do estudo de seletividade para a análise de L-cis  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4  $0,1\%$  (m/v) na presença de potenciais interferentes aminoácidos usando o AP/ePAD-GR. (B) Histograma relacionando a porcentagem relativa de corrente obtida no estudo de seletividade, em função dos interferentes empregados na presença de L-cis empregando

amperometria. (C) Voltamogramas de pulso diferencial referente ao estudo de seletividade de potenciais compostos interferentes para análise na presença de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , PBS (pH 7,4) e Tetronic 90R4 0,1% (m/v) na presença de potenciais interferentes aminoácidos usando o AP/ePAD-NF. (D) Histograma relacionando a porcentagem relativa de corrente obtida no estudo de seletividade, em função dos interferentes empregados na presença de L-cis. Fonte: Autoria própria.

#### 4.4.7 Análise da amostra e ensaio de adição e recuperação de L-cisteína

Devido a importância de detectar L-cisteína tanto no contexto de controle de qualidade de formulações farmacêuticas quanto em fluidos biológicos, a viabilidade do método proposto, foi avaliada empregando as duas abordagens propostas, sob parâmetros otimizados. A microfluídica digital foi utilizada, como anteriormente, para auxiliar na modificação do sensor eletroquímico, ativação e, adicionalmente, para diluir a amostra farmacêutica. No que se refere às análises clínicas, uma etapa de reparo automatizada de amostra de sangue para plasma usando partículas magnéticas foi introduzida antes das análises eletroquímicas.

Para a aplicação farmacêutica, analisaram-se cápsulas de suplemento alimentar de L-cisteína. A Tabela 4.5 dispõe a quantificação do *pool* de amostras. O valor determinado de massa de L-cisteína no comprimido foi de 478 mg, enquanto o valor tabelado no rótulo era de 500 mg. O erro relativo obtido na determinação da L-cisteína foi, portanto, de 4.4%, o que destaca uma boa correlação entre o valor tabelado e o valor dosado.

**Tabela 4.5.** Análise de cápsulas de L-cis a partir de um “*pool*” de 10 amostras usando a DMF e AP/ePAD-GR (n = 3).

Amostra	Tabelado (500 mg)	ePAD	
		(mg)	Erro relativo (%)
Cápsulas	500	$478 \pm 14$	4,4

Após a dosagem da cápsula de suplemento alimentar usando o AP/ePAD-GR, um estudo de adição e recuperação foi realizado em três níveis de concentração. Para tanto, a amostra de L-cisteína foi diluída para  $478 \mu\text{mol L}^{-1}$  e enriquecida com  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $350 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,

respectivamente. A Tabela 4.6 exibe as concentrações obtidas de L-cisteína e as respectivas porcentagens de recuperação<sup>340</sup>. Conforme os dados mostram, os valores de recuperação variaram de 83 a 105%, o que está em conformidade com as recomendações dos órgãos reguladores como a ANVISA que permitem uma recuperação entre 80 e 120%<sup>339</sup>.

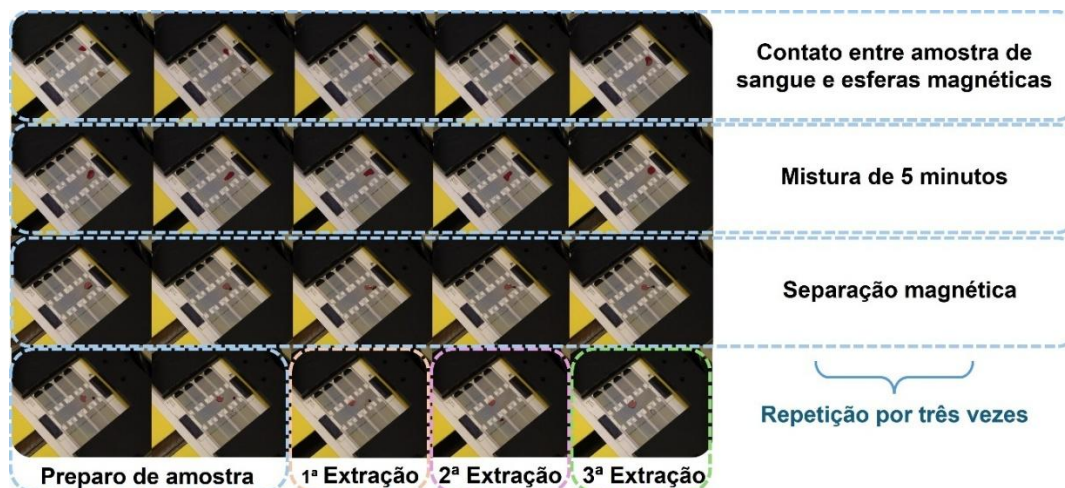
**Tabela 4.6.** Ensaio de adição e recuperação de L-cis em amostra de suplemento alimentar usando a técnica de DMF e o AP/ePAD-GR (n = 3).

Nível	Amostra ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração esperada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
#1	478	150	628	636 $\pm$ 19	105
#2	478	250	728	686 $\pm$ 38	83
#3	478	350	828	797 $\pm$ 35	91

Para a análise de L-cisteína em amostras biológicas, primeiramente, a amostra de sangue foi preparada para plasma usando a técnica de microfluídica digital. O procedimento empregado na DMF explorou o uso de partículas magnéticas para auxiliar na separação das células vermelhas do plasma<sup>381,386</sup>. De acordo com o fabricante do reagente de depleção de hemácias, o princípio de funcionamento baseia-se em um procedimento imunomagnético no qual os glóbulos vermelhos (hemácias) são extraídos de amostras de sangue sem a necessidade de centrifugação, sedimentação ou lise. Nesse procedimento, as hemácias são direcionadas com complexos de anticorpos tetraméricos que reconhecem a glicoforina A e as partículas magnéticas revestidas com dextrana. Dessa forma, uma vez que um ímã é acionado, as células rotuladas são separadas enquanto o restante da amostra permanece dispersa. Em outras palavras, o *kit* tem como alvo a remoção das hemácias a partir de anticorpos que reconhecem marcadores de superfície celular específicos. As células indesejadas são marcadas com anticorpos e partículas magnéticas e separadas na presença do ímã<sup>386</sup>.

A Figura 4.15 mostra algumas etapas envolvidas no preparo de amostra. O procedimento envolveu o preparo da amostra, contendo a extração durante três vezes. Basicamente, uma alíquota de sangue contendo

EDTA e FBS e misturado com as nanopartículas magnéticas. O tempo de incubação usando um procedimento de mistura durou 5 minutos. Após o acionamento do separador magnético as nanopartículas capturaram as células vermelhas extraindo o plasma que, na sequência foi misturado novamente com as nanopartículas, repetindo-se o procedimento. Por fim, mais uma extração foi realizada. A amostra foi então preparada no eletrólito suporte *on-chip* e analisada.



**Figura 4.15.** Esquema ilustrativo do protocolo automatizado de preparo de sangue para plasma utilizando a técnica de DMF. Fonte: Autoria própria.

A concentração de L-cisteína determinada na amostra foi de  $17,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , considerando as diluições realizadas. Um ensaio de adição e recuperação foi então executado em três níveis ( $10$ ;  $30$  e  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A Tabela 4.7 mostra os resultados obtidos empregando-se o ePAD de negro de fumo. Conforme pode ser visualizado, os valores de recuperação obtidos variaram entre 83 e 108%. Esse valor está de acordo com os valores permitidos, destacando a efetividade do método proposto para análise de L-cisteína em matriz biológica.

**Tabela 4.7.** Dados obtidos a partir do estudo de adição e recuperação em três níveis de L-cis em amostra de plasma. Fonte: Autoria própria.

Nível	Amostra ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração esperada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
#1	17,3	10	27,3	$27,8 \pm 4,8$	105
#2	17,3	30	47,3	$50 \pm 5,4$	108
#3	17,3	50	67,3	$58 \pm 2,0$	83

É importante destacar que, ambos os métodos propostos integrados com a técnica de microfluídica digital demonstraram boa performance analítica. A possibilidade de integração de preparo de amostra via diluição ou separação magnética, em associação com a automação da DMF facilitam e abrem caminhos para uma vasta gama de outras aplicações.

#### **4.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS**

Foi realizada uma nova abordagem para realizar a integração entre a microfluídica digital e detecção eletroquímica. A estratégia simples e versátil consistiu na inserção de dispositivos eletroquímicos baseados em papel diretamente no eletrodo reservatório. Além disso, o papel cromatográfico posicionado sobre os três eletrodos auxiliou no processo de aspiração da amostra para a superfície do sensor, uma vez que o substrato de papel sulfite não apresenta muita capilaridade. Esse procedimento simplificou o processo de acoplamento entre as técnicas sem a necessidade de alterar a estrutura o chip de microfluídica digital permitindo, ainda, que o chip possa ser reutilizado. Diferentes tintas condutivas foram exploradas, mostrando que diferentes tipos de sensores flexíveis podem ser empregados para estabelecer a integração de maneira satisfatória.

Os dispositivos eletroquímicos baseados em papel de grafite e utilizando-se negro de fumo foram modificados empregando a técnica de amperometria para formar nanopartículas de AP, com sucesso, permitindo a análise de L-cisteína. Os sensores foram caracterizados, demonstrando a presença das nanopartículas, mostrou-se seletivo para o analito alvo e apresentou resultados aceitáveis nos estudos de exatidão. A hifenação proposta possibilitou uma versátil aplicação nas áreas farmacêutica e clínica, estabelecendo a etapa de preparo de amostra interligada ao processo de detecção na mesma plataforma, o que agiliza os procedimentos e automatiza os processos analíticos. Em relação à performance analítica, o ePAD de grafite foi suficientemente aplicado na análise de formulação farmacêutica e o ePAD de negro de fumo foi explorado com sucesso para a análise de L-cisteína em amostra de plasma.

**Capítulo 5 - Abordagem ambientalmente amigável e portátil baseada em impressão 3D para detecção colorimétrica de inibidor de incrustação sulfonato assistida por *smartphone***

## RESUMO

Esse capítulo apresenta um dispositivo colorimétrico miniaturizado para detectar rapidamente inibidores de incrustação. A abordagem colorimétrica fornece resultados visuais diretos assistidos pelo aplicativo de celular gratuito Color Grab, eliminando a necessidade de instrumentação complexa. O dispositivo inclui uma pequena câmara para captura de imagem e um componente com seis micropoços para análises colorimétricas, ambos fabricados por impressão 3D. A função da câmara é manter o controle de luz estável. A avaliação de viabilidade do dispositivo foi conduzida usando vinil sulfonato de sódio (VS) como um composto modelo, em termos de inibidores de incrustação. As análises morfológicas e perfilométricas destacaram os padrões de impressão 3D e a preservação dos dispositivos após a reutilização. A curva analítica para VS exibiu um comportamento linear (0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0,991), com limites de detecção e quantificação de 0,10 mg L<sup>-1</sup> e 0,35 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A análise de amostra real demonstrou concordância estatística com o método espectrofotométrico. O estudo de seletividade revelou baixa interferência de compostos inorgânicos, espécies orgânicas e inibidores de incrustações de outras classes químicas. A análise da métrica verde usando o programa AGREE produziu pontuações de 0,73 e 0,81 para espectrofotometria e colorimetria, respectivamente. Assim, o método proposto prova ser uma abordagem promissora para monitorar efetivamente a água produzida, com potencial para análise no local de interesse.

**Palavras-Chave:** ensaio colorimétrico; Color grab; reutilizável; indústria petroquímica; água produzida; manufatura aditiva.

## 5.1. INTRODUÇÃO

A formação de incrustação nos sistemas de produção de petróleo é um desafio comum enfrentado pela indústria petrolífera. Durante o processo de extração de petróleo, a presença de impurezas como minerais e compostos orgânicos na água produzida pode resultar na formação de depósitos de incrustações nas superfícies internas de equipamentos e tubulações. Esses depósitos podem obstruir o fluxo de fluidos, reduzir a eficiência do processo e aumentar os custos operacionais<sup>389,390</sup>. Para atenuar este problema, uma abordagem eficaz é a utilização de agentes químicos com propriedades inibidoras contra a formação destes sais nas tubulações. Existem várias classes químicas de inibidores de incrustação disponíveis, como ésteres de fosfato, fosfonatos, polímeros como acrilatos, metacrilatos e copolímeros, bem como sulfonatos<sup>391</sup>. Inibidores de incrustação poliméricos são frequentemente usados devido à sua maior estabilidade térmica e natureza ecologicamente correta<sup>392-394</sup>.

O monitoramento preciso das concentrações de inibidores de incrustação é crucial para uma prevenção eficaz durante o tratamento de água produzida em operações de petróleo e gás<sup>395</sup>. Baixas concentrações de inibidor não são capazes de prevenir a formação de incrustações, enquanto um excesso pode levar à formação de pseudo-incrustações. Além disso, esses compostos podem causar impactos ambientais e desequilíbrios ecológicos<sup>389,396</sup>. Nesta perspectiva, o desenvolvimento de métodos analíticos para identificação e quantificação destes componentes químicos em efluentes de tratamento de águas residuais é de extrema importância<sup>397</sup>.

A análise de inibidores de incrustações é um tema amplamente explorado na literatura científica, onde diversos métodos têm sido empregados para esse fim. Dentre esses métodos, destacam-se abordagens baseadas em cromatografia e espectroscopia<sup>397-399</sup>. Embora estas abordagens tradicionais sejam eficazes, é importante destacar que podem ser dispendiosas, demoradas, exigir equipamento especializado, etapas de pré-tratamento de amostras e uma equipa técnica altamente qualificada<sup>399</sup>. Além disso, a complexidade, o alto custo e o tempo necessário para a realização das análises limitam sua aplicabilidade em ambientes industriais e de tempo

real.

A miniaturização dos sistemas analíticos totais (TAS) ocorrida na década de 2000 abriu caminho para novas abordagens no campo da química analítica<sup>400,401</sup>. Essa tendência, aliada aos avanços nos instrumentos de captura de imagens como câmeras, *scanners* e *smartphones*, tem contribuído para o aumento significativo do uso de sensores colorimétricos<sup>402</sup>. Esta evolução impulsionou o desenvolvimento de diversos dispositivos microanalíticos colorimétricos capazes de substituir ensaios tradicionalmente realizados em laboratórios por processos controlados em microescala<sup>403–405</sup>. O uso da análise colorimétrica, aliado à miniaturização dos dispositivos, oferece alternativas interessantes de detecção em diversas áreas, como análise de alimentos, monitoramento de medicamentos, diagnóstico médico, análise ambiental e ciência forense<sup>406–412</sup>. Com benefícios como tempo de análise reduzido, consumo mínimo de amostra (em torno de  $\mu\text{L}$ ), alto desempenho analítico e portabilidade, eles podem ser usados fora do ambiente laboratorial<sup>412,413</sup>.

Nesse sentido, o presente estudo descreve o desenvolvimento de um dispositivo colorimétrico miniaturizado para detecção rápida, sensível e fácil de usar para a detecção de inibidores de incrustações. A abordagem colorimétrica oferece a vantagem de fornecer resultados visuais diretos, eliminando a necessidade de instrumentação complexa. Dessa forma, propõe-se a fabricação de uma pequena câmara acoplada a um dispositivo que contém seis micropoços para reações de análise colorimétrica. A câmara desempenha um papel crítico no controle da luz ambiente, essencial para a obtenção de resultados precisos. A captura das imagens é realizada através de um *smartphone* com o aplicativo (App) Color Grab, disponível para sistemas Android, que permite capturar as cores das amostras e extrair os valores RGB. A fabricação dos dispositivos foi realizada utilizando a tecnologia de impressão 3D de modelagem por deposição fundida (FDM), conhecida por sua operação simples e baixo custo<sup>414</sup>. Neste método de impressão 3D, os filamentos termoplásticos aquecidos são depositados em camadas sucessivas através de um bico de extrusão até que a peça esteja completa. A plataforma de impressão é mantida a uma temperatura inferior ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) à do

bocal de extrusão (215 °C), permitindo que cada camada solidifique antes da deposição da camada seguinte, garantindo a adesão do objeto à plataforma de impressão.

A viabilidade analítica do dispositivo proposto foi avaliada utilizando vinilsulfonato de sódio (VS), um precursor dos inibidores de incrustações de sulfonatos, um dos principais inibidores do tipo sulfonato, pois apresenta desafios no monitoramento em comparação com outras classes de inibidores devido à sua menor reatividade<sup>415,416</sup>. A caracterização das propriedades ópticas e a otimização das condições do ensaio serão abordadas para garantir a precisão e seletividade do dispositivo. Adicionalmente, serão realizados testes em amostras reais de sistemas industriais para validar a eficácia do dispositivo desenvolvido. Ao fornecer um sistema miniaturizado para análise de inibidores de incrustação, acredita-se que esta ferramenta analítica possa oferecer alternativas práticas e acessíveis para empresas da indústria petrolífera monitorarem e controlarem a presença e concentração de inibidores na água produzida. Isto permite a identificação de problemas de incrustação, melhora os processos de tratamento de água e permite a implementação de medidas corretivas de forma mais eficiente. Como resultado, é possível melhorar a qualidade da água produzida, reduzir custos de tratamento e mitigar os riscos associados à incrustação na indústria petrolífera.

## **5.2. OBJETIVOS**

### **5.2.1. Objetivo geral**

Propor uma plataforma analítica portátil e reusável impressa em 3D para realizar detecção colorimétrica assistida por *smartphone*.

### **5.2.2. Objetivos específicos**

- Empregar a técnica de impressão 3D para construir uma plataforma analítica colorimétrica;
- Acoplar o protótipo analítico ao uso de um aplicativo de celular para efetuar as análises;

- Aplicar o dispositivo colorimétrico na análise de vinil sulfonato de sódio (VS) visando aplicações da indústria do petróleo em matrizes de água produzida;
- Avaliar quão de acordo com os princípios da Química verde a plataforma analítica é, a partir do uso do *software* de métrica analítica verde AGREE (do inglês *Analytical GREENness calculator*).

### 5.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1. Materiais e reagentes

O Azul de Nilo A sulfato (NB), azul de metileno (MB), azul de Coomassie brilhante (BB), azul de toluidina (TB), iodeto de potássio (KI), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de cobre (CuCl<sub>2</sub>), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), nitrato de chumbo (PbNO<sub>3</sub>), nitrato de bário (BaNO<sub>3</sub>), carbonato de cálcio (Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bicarbonato de cálcio (CaHCO<sub>3</sub>), acético ácido (CH<sub>3</sub>COOH) e monoetilenoglicol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Ácido bórico, ácido acético, ácido fosfórico e etanol foram adquiridos da Neon (Suzano, SP, Brasil). O vinilsulfonato de sódio (VS) foi obtido da Loja Química (São Paulo, SP, Brasil). Poldisperso HPMA e poldisperso A1 foram recebidas da Polyorganic Tecnologia Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Todos os reagentes foram usados como recebidos. Soluções estoque e padrão foram preparadas utilizando água ultrapura com resistividade de 18, 2 MΩ cm (Direct-Q 3, Millipore, Darmstadt, Alemanha). Filamentos termoplásticos de ácido polilático ( $\varnothing = 1,75$  mm) foram fornecidos pela 3D Fila (Belo Horizonte, MG, Brasil).

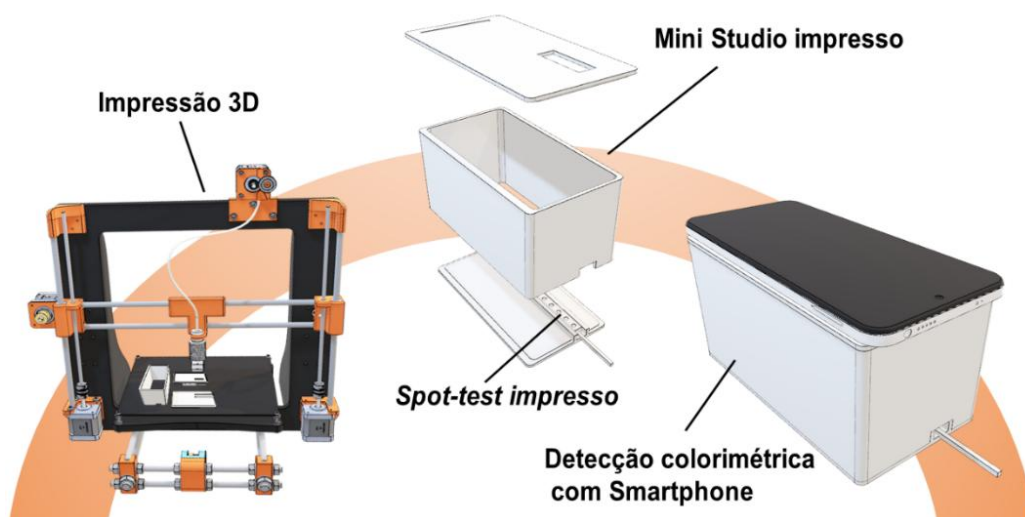
#### 5.3.2. Instrumentação

A plataforma portátil de detecção colorimétrica baseada em micropoços deslizantes foi impressa através de uma impressora 3D de mesa multimaterial modelo i3MK2 de código aberto da Prusa Research (Praga, República Tcheca). As câmeras dos *smartphones* Redmi Note lite (Xiaomi) e Moto G8 (Motorola) foram adquiridas em lojas locais (Goiânia, GO, Brasil). O espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-M51 foi obtido da Bel Photonics

(Piracicaba, SP, Brasil).

### 5.3.3. Fabricação de micropoços e mini estúdio

O sistema analítico portátil miniaturizado foi produzido utilizando a técnica de impressão 3D baseada em modelo de deposição por fusão (FDM)<sup>417</sup>. Para tanto, o desenho tridimensional foi criado no *software* gráfico AutoCAD® 2016 (Autodesk, San Rafael, CA, EUA) e impresso com o auxílio de uma impressora 3D Original Prusa i3 mk2/S (Prusa Research s.r.o., Praga, República Checa). A arquitetura do aparelho envolveu o acoplamento entre uma câmara de controle de luz e um dispositivo deslizante composto por 6 micropoços. A câmara foi composta por três peças de encaixe, incluindo a base, a parede e uma tampa para integrar-se aos micropoços e o *smartphone*. A dimensão total do dispositivo foi de aproximadamente 18,5 x 9,5 x 10,5 cm. Em termos dos micropoços, cada zona de reação colorimétrica do dispositivo deslizante possui diâmetro de 5 mm e uma altura de 1,5 mm. Todas as peças foram impressas com filamento de ácido polilático (PLA), um termoplástico biodegradável feito de recursos renováveis como amido de milho e cana-de-açúcar, adquirido da 3DX Filamentos (São Caetano do Sul, SP, Brasil). Uma ilustração esquemática do sistema de detecção colorimétrica está disponível na Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Esquema representativo da construção dos micropoços e mini estúdio via impressão 3D, bem como a montagem do sistema para efetuar detecção colorimétrica usando *smartphone*. Fonte: Autoria própria.

#### 5.3.4. Medições de microscopia óptica

A morfologia da superfície das áreas circulares nos dispositivos micropoços impressos foi analisada usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com um microscópio JEOL (modelo JSM-6610, Waltham, MA, EUA). As dimensões reais das áreas circulares foram medidas através de perfilometria óptica, empregando o microscópio confocal a laser Axio Imager Z2 (Carl Zeiss Co. Ltd., Alemanha).

#### 5.3.5. Otimização experimental

Otimizações experimentais foram realizadas para selecionar o corante metacromático, a concentração do tampão Britton-Robinson (BR), a concentração do agente cromogênico, definir a melhor condição de luminosidade e selecionar o tempo de aquisição da imagem. Nesse sentido, a concentração de VS foi fixada em  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e o volume utilizado nas análises foi de  $25 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra seguido da adição de  $5 \text{ }\mu\text{L}$  de agente cromogênico. Todos os experimentos de otimização foram realizados em sextuplicata e sob ativação de lanterna (exceto o experimento de otimização de iluminação). Além disso, toda a coleta de dados foi realizada por meio do aplicativo (app) de celular Color Grab com canal de cor vermelho (R).

Para a seleção do agente cromogênico foram utilizados diferentes compostos metacromáticos azul de Nilo sulfato A, azul de metileno, azul brilhante de Coomassie e azul de toluidina na concentração de  $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para tanto,  $5 \text{ }\mu\text{L}$  de cada cromogênio foram adicionados a  $25 \text{ }\mu\text{L}$  de VS  $5 \text{ mg L}^{-1}$  em BR  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 2,2) e analisados colorimetricamente com auxílio de um *smartphone*.

Para otimizar a concentração do tampão BR, sua concentração na solução VS variou entre 0,010; 0,015; 0,020 e  $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ . Neste ensaio foram adicionados  $25 \text{ }\mu\text{L}$  de VS em cada micropoço e, posteriormente,  $5 \text{ }\mu\text{L}$  de sulfato de NB na concentração de  $100 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Posteriormente, os micropoços foram analisadas por meio de aplicativo de celular.

Quanto à otimização da concentração de NB, foram testados 50; 100; 150 e  $200 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para VS, foi considerada uma solução de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de VS em tampão BR  $0,020 \text{ mol L}^{-1}$  (pH= 2,2).

Para avaliar a resposta colorimétrica sob diferentes condições de iluminação, a reação entre VS  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e BR  $0,020 \text{ mol L}^{-1}$  foram testadas sob iluminação de lanterna, ausência de iluminação, ajuste de luz em +1,5 e +2,0. Finalmente, o tempo para captura de imagem foi estudado entre o tempo 0 (imediatamente após a mistura de VS e cromogênio), 5; 10; 25; 20; 25 e 30 minutos sob iluminação +2,0 e as condições experimentais acima mencionadas.

### **5.3.6. Análise colorimétrica**

Para reações colorimétricas,  $25 \mu\text{L}$  de VS variando de  $0,5$  a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  preparado em tampão BR  $0,020 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 2,2$ ) foram adicionados ao micropoço, seguido de adição de  $5 \mu\text{L}$  de azul de Nilo sulfato A  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Imediatamente após a mistura da amostra e do cromógeno, o micropoço foi inserido no mini estúdio fabricado por impressão 3D. Posteriormente, uma imagem de cada micropoço (a partir do deslizamento horizontal) foi capturada individualmente usando o aplicativo móvel gratuito chamado Color Grab (versão 3.9.2, Loomatix<sup>®</sup>). Após aquisição da cor do produto da reação pelo aplicativo, uma paleta de cor contendo os valores RGB foi gerada. Para tratamento dos dados, os valores de R foram transferidos para uma tabela no Excel e posteriormente tratados no *software* Origin (versão *Student* 2023). Uma imagem esquematizando o processo de obtenção dos resultados está disponível na Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Representação esquemática do procedimento utilizado para aquisição de valores RGB utilizando o protótipo impresso em 3D e o aplicativo móvel Color Grab. Fonte: Autoria própria.

### 5.3.7. Preparo da amostra

Resumidamente, duas amostras diferentes de água produzida, denominadas #1 e #2, foram filtradas com o auxílio de um filtro de partículas de 22  $\mu\text{m}$  de diâmetro e uma seringa. A seguir, as amostras foram diluídas em água na proporção de 1:10 (amostra:solvente). Posteriormente, as amostras #1 e #2 foram enriquecidas com três diferentes níveis de concentração de VS (1,5, 2,5 e 3,5  $\text{mg L}^{-1}$ ), visando serem analisadas pelo método proposto e via espectrofotometria.

### 5.3.8. Análise comparativa

Para a análise comparativa, duas amostras de água produzida foram enriquecidas com três diferentes níveis de concentração de VS (1,5, 2,5 e 3,5  $\text{mg L}^{-1}$ ) em tampão BR 0,020  $\text{mol L}^{-1}$ . Para o experimento utilizando o dispositivo impresso em 3D, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de amostra aos micropoços, seguido da adição de 5  $\mu\text{L}$  de cromogênio NB. Imediatamente após a mistura, os dados de intensidade de cor foram obtidos no aplicativo Color Grab. Estas análises foram realizadas em triplicata.

Paralelamente, no que diz respeito à análise comparativa, foram realizados experimentos espectrofotométricos em comprimentos de onda entre 400 e 600 nm utilizando o protocolo adaptado de Myers et al.<sup>418</sup>. Para

obtenção da curva analítica preparou-se soluções padrão de VS nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0, 4,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> em tampão BR 0,020 mol L<sup>-1</sup>. Em seguida, a amostra e o cromógeno foram misturados utilizando-se 4,17 mL e 830 µL, respectivamente, em balão volumétrico de 5 mL para promover a mesma proporção utilizada nos ensaios colorimétricos miniaturizados. Finalmente, 3 mL das soluções resultantes foram adicionados a uma cubeta de quartzo.

## 5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1. Fabricação dos micropoços e do mini estúdio

Para desenvolver o sistema de detecção colorimétrica de inibidores de incrustação portátil, fabricou-se uma câmara para controle de luminosidade e um dispositivo de contendo micropoços em formato de tira deslizante por meio da técnica de impressão 3D. A câmara impressa consistiu em três partes correspondentes: base, parede e tampa.

Em relação à base, ela possui um *slot* que permite que o dispositivo de micropoços seja deslizado para frente e para trás, facilitando a captura individual da imagem de cada ponto de maneira controlada. Em relação à tampa da câmara, sua função é manter o sistema fechado para aprimorar o controle de luminosidade e viabilizar a integração com um *smartphone*, o qual funciona como detector colorimétrico quando conectado a um aplicativo móvel para captura de cores e/ou imagens. A distância entre a câmera do *smartphone* e o topo do micropoço foi estabelecida com base na altura da parede da câmara impressa, que era de aproximadamente 10,5 cm. Esta medição permitiu alcançar o ajuste de foco ideal para captura de imagem. O aparelho de detecção foi inteiramente fabricado pelo processo de impressão 3D FDM a partir de material termoplástico PLA com temperatura do bico de 215 °C e temperatura da plataforma de impressão de 60 °C. O tempo total de impressão foi de cerca de 15 horas, e o custo estimado de fabricação da câmara e do dispositivo de teste pontual foi de cerca de US\$ 8,00.

É importante ressaltar que a montagem do sistema impresso é extremamente simples e intuitiva, seguindo uma abordagem *plug-and-play*, não necessitando de colas, adesivos ou parafusos. Dessa forma, a

estruturação da instrumentação analítica proposta é prática, conveniente, e fabricada em uma única etapa, sendo necessária apenas a conexão das peças para habilitar o sistema para uso. Ademais, o filamento empregado na fabricação do dispositivo consiste em um material biodegradável, diferentemente de algumas resinas tóxicas comumente exploradas na área química.

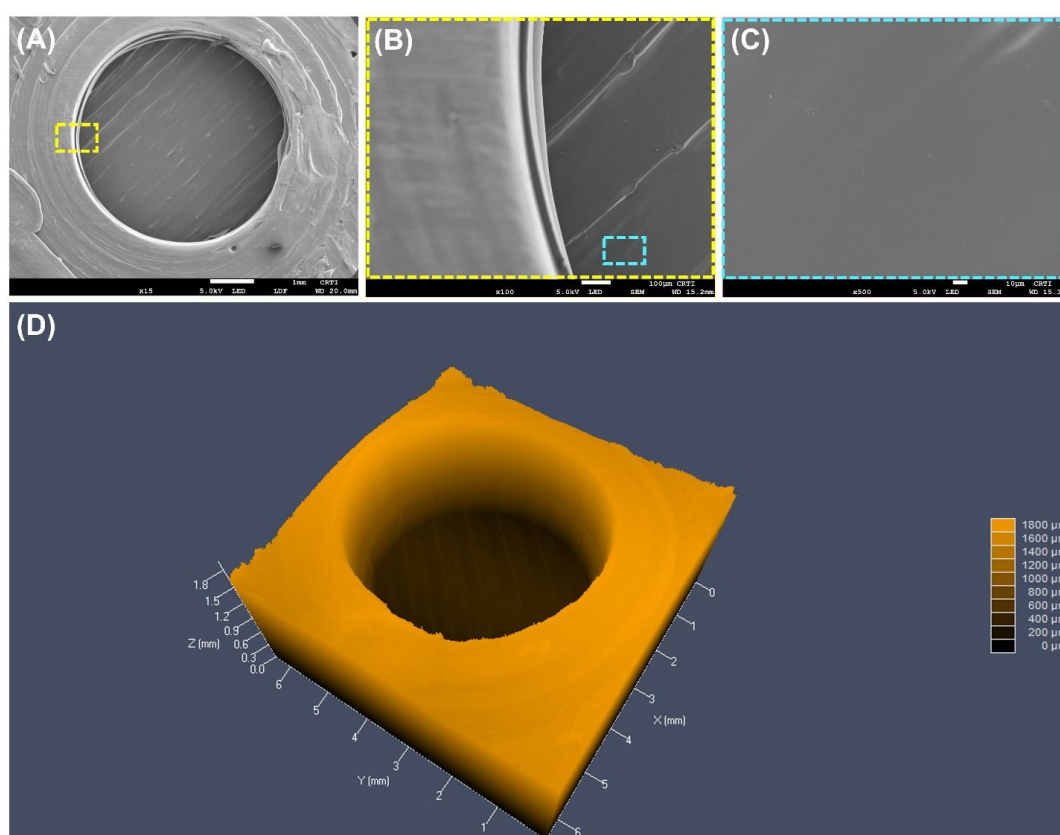
#### **5.4.2. Caracterização morfológica e perfilométrica**

Uma característica intrínseca da impressão FDM é a textura áspera que emerge na superfície do objeto impresso, resultante do trajeto do bico ao depositar o filamento termoplástico durante a fabricação. No contexto de dispositivos analíticos impressos em 3D, esta rugosidade pode promover a acumulação ou adsorção de reagentes, impulsionada pelo efeito memória entre análises, afetando potencialmente análises subsequentes. Diante desse cenário, investigou-se a possibilidade de reutilizar os dispositivos de teste pontual impressos em 3D. Para tanto, os dispositivos foram reutilizados inúmeras vezes, passando por lavagem com água, sabão e escovação, seguida de um enxágue com etanol após cada uso. Como resultado, não foi observada absorção de coloração de reagentes residuais da reação colorimétrica na superfície dos dispositivos impressos.

Nesse contexto, a microscopia eletrônica de varredura foi empregada para uma análise mais detalhada da superfície do dispositivo. As imagens de MEV apresentadas na Figura 5.3 A-C revelaram a presença de uma superfície em camadas nas áreas circulares impressas, característica da impressão 3D e, não foi possível a identificação de componentes reacionais adsorvidos. Esses resultados demonstram a preservação dos dispositivos após o uso, indicando sua durabilidade e viabilidade no que se refere à reutilização.

As reais dimensões dos micropoços deslizantes em termos de profundidade e o diâmetro das zonas de detecção impressas foram avaliados por microscopia óptica confocal. A Figura 5.3 D representa a microscopia óptica e o perfil medido da zona de detecção do dispositivo do micropoço impresso. A profundidade obtida foi de aproximadamente 1,49 mm, em linha com o valor de impressão projetado de 1,5 mm. O diâmetro medido foi de 4,77

mm, com erro relativo de 4,6% em relação ao valor inicialmente projetado de 5,0 mm. A ligeira divergência entre os valores esperados e reais das dimensões do dispositivo estão relacionadas às limitações de resolução do método de impressão FDM, que dependem de vários fatores, incluindo a resolução dos componentes da impressora e os parâmetros de impressão<sup>419</sup>. Uma vez que o erro relativo obtido é baixo, infere-se que a FDM se mostrou eficiente no projeto das estruturas tridimensionais enquanto plataforma analítica e que o dispositivo é, portanto, adequado para uso em análises, inclusive, reutilizando a plataforma.



**Figura 5.3.** (A) Imagens de MEV mostrando detalhes da superfície na zona de detecção do dispositivo em formato de micropoço. (D) Microscopia óptica e medidas perfilométricas da zona de teste. Fonte: Autoria própria.

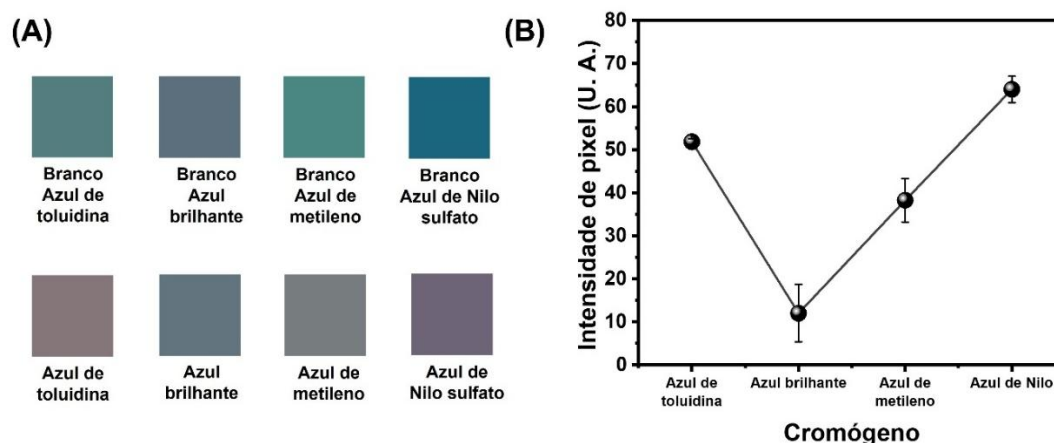
#### 5.4.3. Otimização de parâmetros experimentais

A reação química entre VS e o agente cromogênico (sulfato azul do Nilo) com propriedade metacromática foi explorada para avaliar a aplicabilidade do protótipo de detecção colorimétrica impresso em 3D proposto. Neste sistema, ocorre uma mudança de cor quando os polímeros aniônicos reagem com corantes metacromáticos sob condições ácidas (pH

<3). Assim, os grupos ácidos sulfônicos induzem alterações de cor metacromáticas que podem ser detectadas por meio de análise colorimétrica<sup>418</sup>.

Para melhorar o desempenho analítico, diferentes parâmetros operacionais foram otimizados. Espécies cromogênicas, concentração de tampão BR, concentração de cromógeno, ajuste de luminosidade e tempo de captura de imagem foram cuidadosamente avaliados.

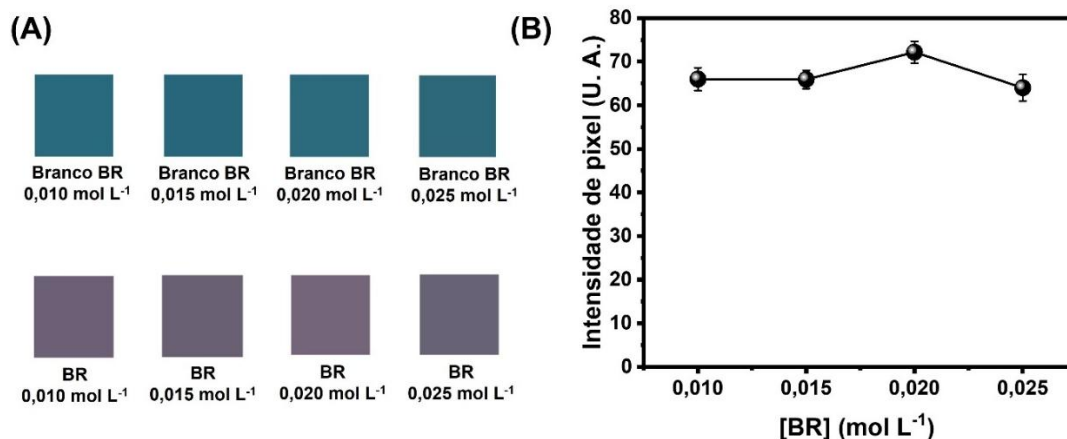
Para o estudo dos cromógenos, foram empregados diferentes corantes metacromáticos, como azul de toluidina, azul brilhante, azul de metileno e azul sulfato do Nilo, na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração de VS foi fixada em  $5 \text{ mg L}^{-1}$  em tampão BR  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . A Figura 5.4 A-B mostra uma representação gráfica referente à intensidade do sinal após a subtração do branco para cada cromógeno explorado e revela que o maior valor de intensidade de pixel para o VS ocorreu na presença de NB. Portanto, este cromógeno foi definido para experimentos subsequentes.



**Figura 5.4.** Otimização de cromógeno. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS usando diferentes cromógenos. (B) Representação gráfica do comportamento do VS versus diferentes cromógenos. Fonte: Autoria própria.

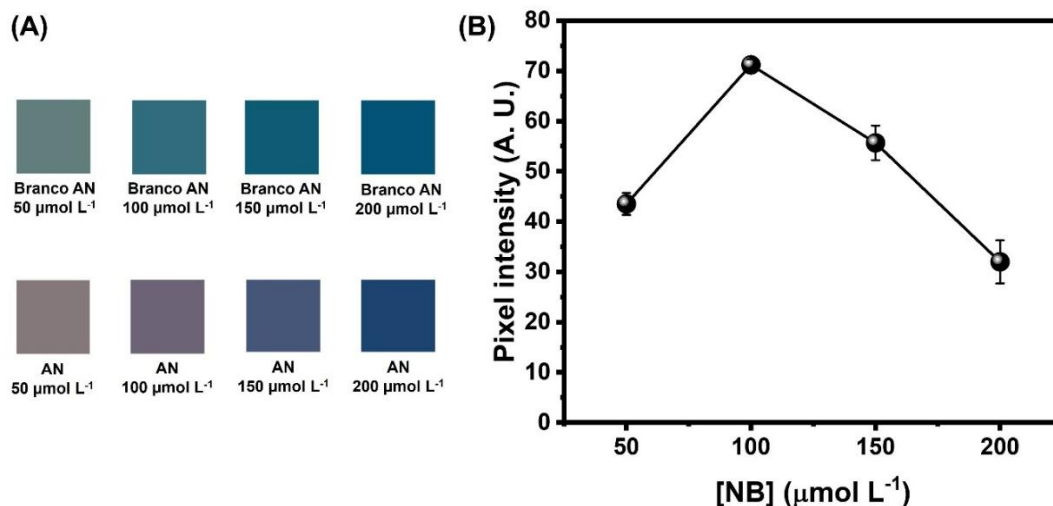
O próximo parâmetro estudado foi o efeito da variação da concentração do tampão BR na reação química. A Figura 5.5 A-B exhibe os resultados obtidos. Conforme demonstrado, a concentração do tampão BR (pH 2,2) não interfere muito na intensidade do sinal analítico, exceto por um ligeiro aumento na intensidade dos *pixels* obtido mediante o uso da concentração de  $0,020 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão BR. Sendo assim, a concentração do tampão selecionada

foi de  $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ .



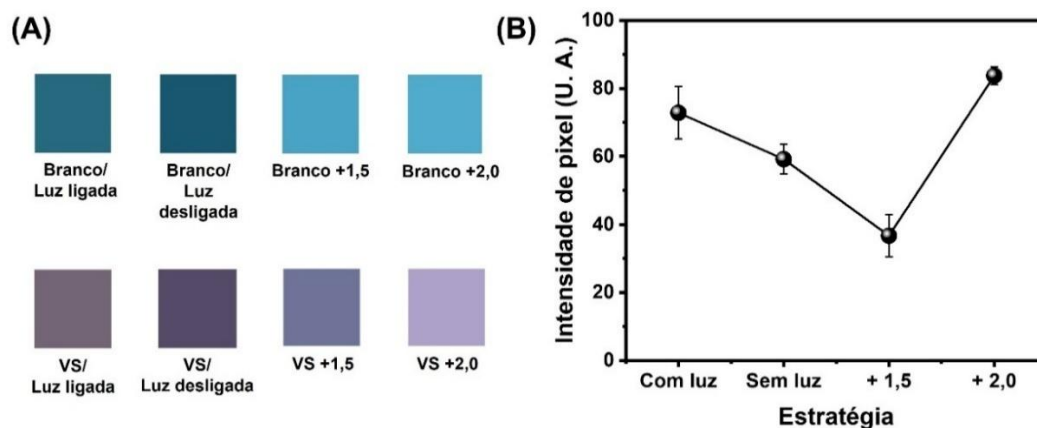
**Figura 5.5.** Otimização da concentração do tampão Britton-Robinson para análise VS usando sulfato de azul do Nilo. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS utilizando diferentes concentrações de tampão BR. (B) Representação gráfica do comportamento do VS frente a diferentes concentrações do tampão BR. Fonte: Autoria própria.

O impacto de alterações na concentração do cromogênio na reação empregada também foi averiguado. As concentrações de NB utilizadas neste estudo foram  $50$ ;  $100$ ;  $150$  e  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . A Figura 5.6 demonstra que a intensidade do sinal analítico aumenta consideravelmente quando a concentração é aumentada de  $50$  para até  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Além disso, para concentrações de  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  há diminuição na intensidade dos pixels. Portanto, optou-se por continuar trabalhando com o cromógeno NB na concentração de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ .



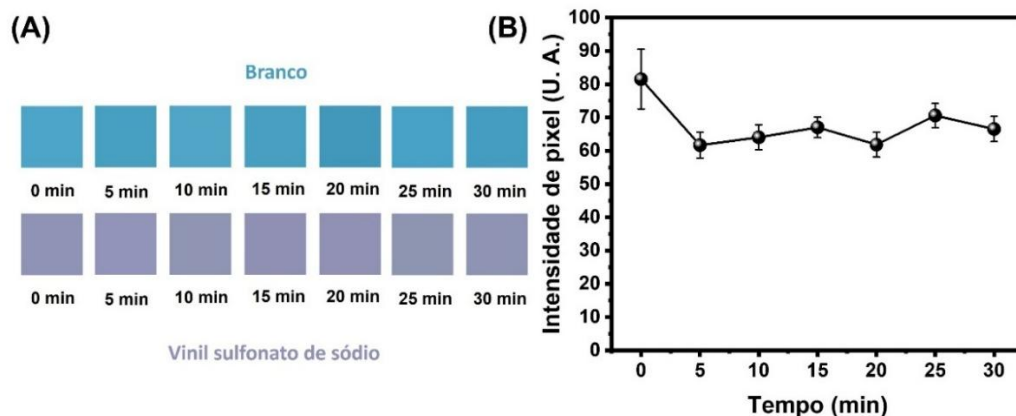
**Figura 5.6.** Otimização da concentração de azul de Nilo sulfato A para análise de VS. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS utilizando diferentes concentrações de azul de Nilo sulfato A. (B) Representação gráfica do comportamento do VS 5 mg L<sup>-1</sup> frente a diferentes concentrações de azul de Nilo sulfato A. Fonte: Autoria própria.

Um aspecto importante a considerar é que visualmente a reação entre o corante metacromático e o VS mudou a cor de azul para lilás. Porém, na condição de uso da lanterna (que pode ser acionada pelo aplicativo Color Grab), as paletas de cores geradas não se apresentavam fidedignas à cor observada a olho nu. Desta forma, o efeito de interferência das condições de controle de luz sob diferentes parâmetros foi avaliado sistematicamente. Para tanto, coletou-se os resultados sobre parâmetros otimizados na ausência do uso de lanterna de celular, presença de lanterna, bem como ajustes de iluminação em +1,5 e +2,0. Conforme indicado na Figura 5.7, a fonte de iluminação proporcionada pelo uso de lanterna apresentou uma apreciável magnitude de sinal analítico. Na ausência de qualquer iluminação, houve diminuição no valor da intensidade do *pixel*. Por sua vez, o aumento do controle de luminosidade de +1,5 e +2,0 no App permitiu que as cores da paleta se tornassem semelhantes à cor real observada nos micropoços. Como o parâmetro de iluminação +2,0 promoveu uma maior intensidade de pixels, além de um baixo desvio padrão nas análises, bem como uma cor mais próxima da observada a olho nu, este parâmetro foi selecionado para dar continuidade às análises.



**Figura 5.7.** Otimização de luz. (A) Paleta de cores referente ao branco e VS usando diferentes condições de iluminação. (B) Representação gráfica do comportamento do VS em relação a diferentes parâmetros de iluminação do aplicativo móvel Color Grab. Fonte: Autoria própria.

Por fim, a cinética da reação foi investigada imediatamente após a reação e monitorada até o intervalo de 30 minutos, com incremento de 5 minutos entre cada captura de imagem. A Figura 5.8 A-B demonstra os valores de intensidade de *pixel* em função do tempo. Pode-se observar que a reação prossegue com maior magnitude de sinal analítico imediatamente após a realização da reação colorimétrica. À medida que o tempo aumenta, a magnitude do sinal analítico sofre uma ligeira e discreta diminuição até 5 min, seguida de relativa estabilização. Nessa perspectiva, o tempo imediatamente após a reação foi selecionado visando a maior intensidade de sinal, além de garantir que a análise ocorra rapidamente.



**Figura 5.8.** Estudo da cinética de reação (A) Paleta de cores para branco e VS utilizando diferentes tempos de coleta de dados (B) Representação gráfica do comportamento do VS ao utilizar diferentes tempos de aquisição de imagem. Fonte: Autoria própria.

As condições experimentais de cromógeno, concentração do tampão BR, concentração do cromógeno, luminosidade e tempo para captura de dados, estabelecidos como condições ótimas para a reação química do VS, estão sumarizadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Estudo da otimização de parâmetros operacionais para detecção de VS.

Parâmetro	Condição ou faixa estudada	Parâmetro ótimo
Cromógeno	Azul de toluidina, azul brilhante, azul de metileno e sulfato de azul do Nilo	Azul de Nilo sulfato A
Concentração do tampão BR	0,010; 0,015; 0,020 e 0,025 mol L <sup>-1</sup>	0,020 mol L <sup>-1</sup>
Concentração do cromógeno AN	50; 100; 150 e 200 µmol L <sup>-1</sup>	100 µmol L <sup>-1</sup>
Luminosidade	Com lanterna, sem luz, +1,5 e +2,0	+2,0
Tempo para a captura de imagem	0; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 min	0 min

#### 5.4.4. Desempenho analítico

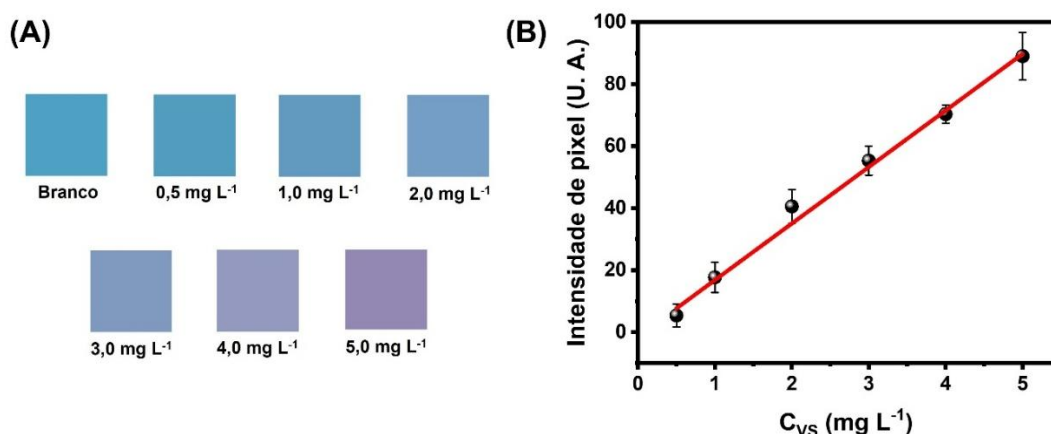
Após a otimização dos parâmetros operacionais, construiu-se uma

curva analítica para detecção de VS utilizando sextuplicata. A faixa do comportamento linear para diferentes concentrações de VS foi de 0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> com base no uso da câmera do *smartphone* como detector (Figura 5.9 A-B). A equação linear obtida foi  $y = 18,2x - 1$  com  $R^2 = 0,991$  para leituras de VS. O limite de detecção (LOD) foi calculado com base na equação abaixo<sup>67</sup>:

$$LOD = \frac{3S_D}{s} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde,  $S_D$  é o desvio padrão do branco ( $n = 10$ ) e  $s$  refere-se à inclinação fornecida pela curva analítica.

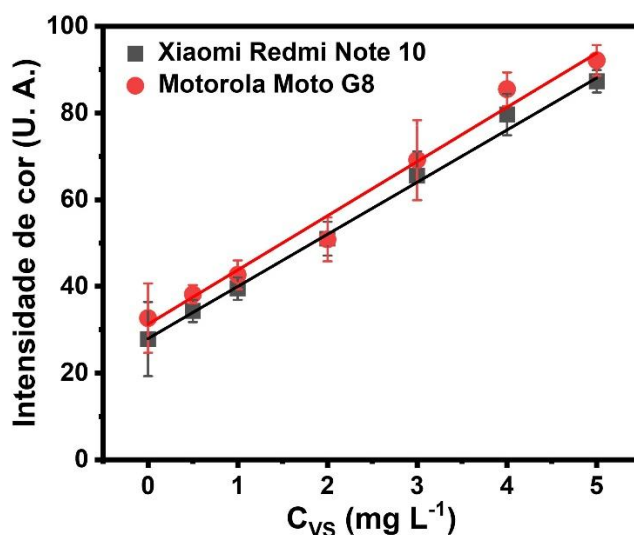
Os valores limites de detecção e quantificação (LQ) foram 0,10 mg L<sup>-1</sup> e 0,35 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A faixa linear obtida apresentou semelhanças com o comportamento observado com diferentes sulfonatos, como o benzeno sulfonato e o ácido 2-acrilamido-2-metil propil sulfônico via análise espectrofotométrica<sup>418</sup>.



**Figura 5.9.** (A) Paleta de cores referente às concentrações de 0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. (B) Curva analítica para VS de 0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Fonte: Autoria própria.

Para verificar a influência do uso de diferentes marcas de *smartphones* na resposta analítica do VS, foram realizados testes colorimétricos utilizando 2 celulares diferentes na ausência de ajuste de iluminação (para equalizar as condições de ambos os aparelhos). A faixa de concentração de VS testada foi de 0,5 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. A Figura 5.10 demonstra as curvas analíticas com análises em sextuplicatas obtidas para um dispositivo Xiaomi Redmi Note 10 lite e um Moto G8. Como pode ser observado, os dados coletados pelos diferentes celulares apresentaram uma ligeira variação na intensidade do sinal

considerando a mesma faixa linear e condições. As equações da reta e os coeficientes de correlação das curvas analíticas foram  $y = 12,0x + 0,3$  ( $R^2 = 0,996$ ) e  $y = 12,5x + 0,6$  ( $R^2 = 0,986$ ) para o Xiaomi Redmi Note 10 lite e o Moto G8, respectivamente. A sensibilidade analítica para a curva do Xiaomi foi de  $12,0 \text{ U.A./mg L}^{-1}$ , enquanto para a curva obtida do Moto G8 foi de  $12,5 \text{ U.A./mg L}^{-1}$ , sendo, portanto, os valores obtidos muito próximos. Embora a variação nas leituras colorimétricas do VS utilizando diferentes telefones celulares tenha sido consideravelmente semelhante, recomenda-se que o mesmo telefone celular seja usado para adquirir dados para um determinado experimento, uma vez que não se testou as demais marcas disponíveis no mercado.

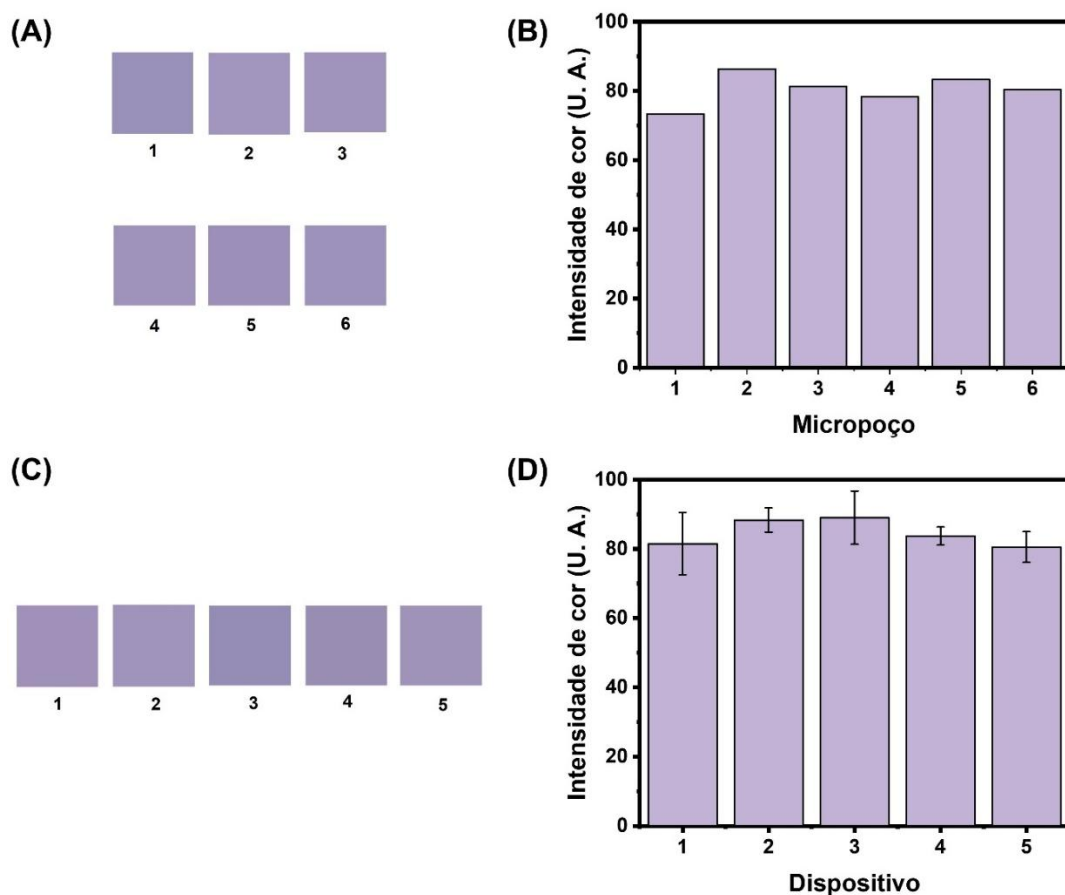


**Figura 5.10.** Curvas VS analíticas obtidas usando diferentes marcas de celulares nas mesmas condições experimentais e sem ajuste de iluminação. Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.5. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade

A repetibilidade e reprodutibilidade do método colorimétrico proposto para análise de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de VS em  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de tampão BR ( $\text{pH} = 2,2$ ) foram determinadas com base no desvio padrão relativo das intensidades de *pixels* obtidos. Quanto à repetibilidade, foi considerada a resposta colorimétrica de 6 micropoços do mesmo dispositivo. Por outro lado, para reprodutibilidade, foram consideradas para o cálculo as análises sextuplicadas de 5 dispositivos diferentes. Os valores DPR para repetibilidade

e reprodutibilidade foram 4,6% e 5,5%, respectivamente. A Figura 5.11 A-B demonstra os resultados de repetibilidade e a Figura 5.12 C-D mostra ensaios de reprodutibilidade. Os valores de DPR para o ensaio colorimétrico proposto apresentaram valores semelhantes a outros métodos colorimétricos utilizando o Color Grab App para diferentes plataformas analíticas e aplicações<sup>420-423</sup>, demonstrando que o método proposto é benéfico para a análise do VS de modo portátil.

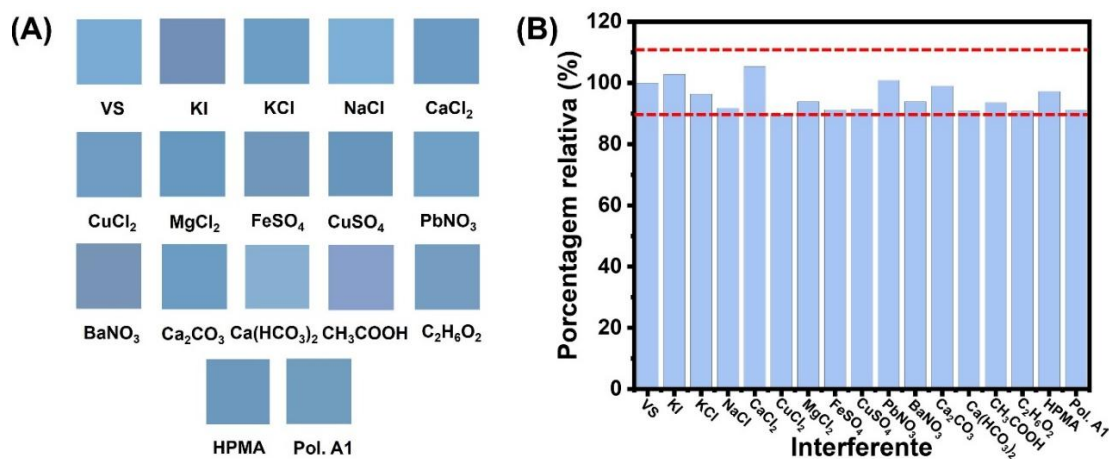


**Figura 5.11.** Testes analíticos referentes ao estudo de repetibilidade para seis micropoços de em única plataforma. (A) Paleta de cor proveniente da reação colorimétrica obtido para cada replicata. (B) Histograma referente ao teste de repetibilidade para análise de VS na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Testes analíticos referentes ao estudo de reprodutibilidade para seis micropoços diferentes. (C) Paleta de cores obtida para cada dispositivo. (D) Histograma referente ao ensaio de reprodutibilidade para análise de SV na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.6. Estudo interferente e análise de amostras reais

A seletividade do método proposto também foi testada por meio da análise de VS na presença de diferentes classes de compostos, como sais

inorgânicos (KI, KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, PbNO<sub>3</sub>, BaNO<sub>3</sub>, Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaH(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), solventes orgânicos (CH<sub>3</sub>COOH, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), além de outros inibidores de incrustações (HPMA e polidisperso A1). A relação analito:interferente neste estudo foi de 1:10, sendo as concentrações utilizadas de 5 mg L<sup>-1</sup> de VS e 50 mg L<sup>-1</sup> de interferente. Conforme mostrado na representação gráfica da Figura 5.12 A-B, por meio do histograma, os valores de interferência variaram entre 90% e 105%. Dessa forma, os resultados experimentais demonstraram que, na presença das classes de substâncias químicas supracitadas, que eventualmente podem estar presentes em matrizes de amostras complexas, não houve interferência significativamente grande, evidenciando a apreciável seletividade do estudo proposto.

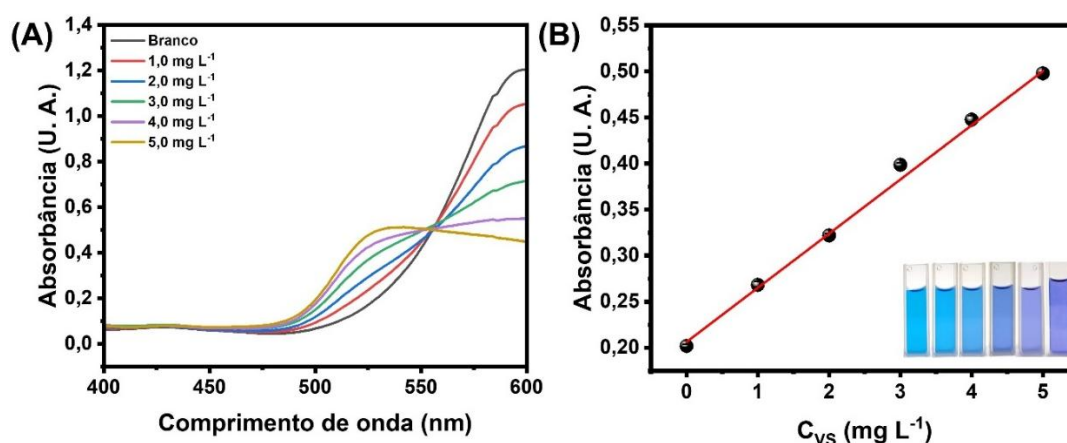


**Figura 5.12.** Estudo de seletividade na proporção de 1:10 (analito:interferente) utilizando iodeto de potássio (KI), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de cobre (CuCl<sub>2</sub>), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>), sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>), nitrato de chumbo (PbNO<sub>3</sub>), nitrato de bário (BaNO<sub>3</sub>), carbonato de cálcio (Ca<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), bicarbonato de cálcio (Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH), etilenoglicol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), HPMA polidisperso (HPMA) e A1 polidisperso (Pol. A1). Fonte: Autoria própria.

#### 5.4.7. Experimentos de adição e recuperação

Para investigar a aplicabilidade do método em uma aplicação real de interesse da indústria petroquímica, duas amostras diferentes de água produzida, denominadas #1, #2, foram analisadas. Entretanto, a presença de VS não foi identificada nas amostras (< LOD). Na sequência, realizou-se um

estudo de adição e recuperação considerando três níveis de concentrações de VS (1,5; 2,5 e 3,5 mg L<sup>-1</sup>) utilizando-se duas amostras de água produzida diluídas na proporção de 1:10. Os valores de recuperação para o método proposto variaram de 84 a 103% e estão dentro da faixa aceita. Para o método espectrofotométrico comparativo (cuja curva analítica pode ser vista na Figura 5.13), os valores de recuperação foram de 80 a 108%. Realizou-se, então, um teste *t* (teste *t* de Student pareado), resultando em valores *t* calculados variando de -2,62 a 1,29. Como esses valores ficam abaixo do valor *t*-crítico (2,92), pode-se inferir que o método proposto e a abordagem espectrofotométrica não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de confiança de 95%. A Tabela 5.2 exibe os resultados obtidos com o teste de adição e recuperação, bem como a comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e um método comparativo via espectrofotometria.



**Figura 5.13.** (A) Espectro de absorção para VS em diferentes concentrações entre comprimentos de onda de 400 a 600 nm. (B) Curva de calibração de VS usando espectrofotometria. Fonte: Autoria própria.

**Tabela 5.2.** Comparação da análise de VS em água produzida utilizando a técnica de colorimetria e espectrofotometria.

Amostra	VS adicionado (mg L <sup>-1</sup> )	Colorimetria		Espectrofotometria	
		(mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	(mg L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
Água produzida #1	1,5	1,4 ± 0,1	93	1,35 ± 0,08	90
Água produzida #1	2,5	2,1 ± 0,2	88	2,00 ± 0,02	80
Água produzida #1	3,5	3,2 ± 0,6	91	3,30 ± 0,04	94
Água produzida #2	1,5	1,6 ± 0,6	90	1,62 ± 0,04	108
Água produzida #2	2,5	2,4 ± 0,2	93	2,52 ± 0,04	101
Água produzida #2	3,5	3,3 ± 0,2	93	3,28 ± 0,05	93

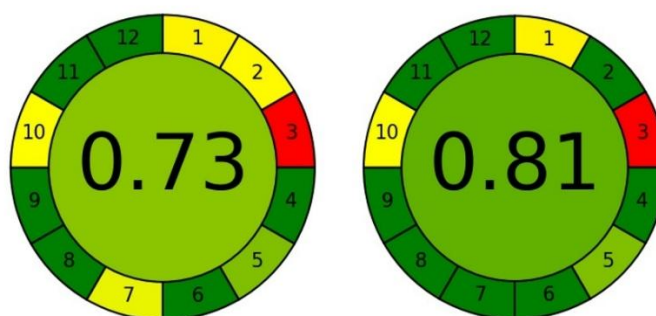
À luz dos resultados obtidos com o teste de adição e recuperação, infere-se que o método colorimétrico portátil proposto é uma estratégia analítica simples, acessível e extremamente versátil para ser aplicada em testes colorimétricos para análise de inibidores de incrustação no campo. Sobretudo, usando um baixo volume de amostra. É importante destacar que a plataforma analítica poderia ser explorada, ainda, em inúmeras vertentes desde que compatíveis com o material usado na impressão 3D.

#### 5.4.8. Análise AGREE

Para avaliar a métrica verde do método proposto em comparação com a técnica espectrofotométrica, foi utilizada a calculadora Analytical Greenness Metric (AGREE) baseada nos 12 princípios da química analítica. Os aspectos considerados são: (1) tratamento de amostra, (2) quantidade de amostra, (3) posicionamento do dispositivo, (4) etapas de preparação da amostra, (5) automação-miniaturização, (6) derivatização, (7) resíduos, (8) rendimento da análise, (9) consumo de energia, (10) fonte de reagentes, (11) toxicidade e (12) segurança do operador. Esta abordagem analítica possui um valor de pontuação geral que varia entre 0 e 1, de modo que quando mais próximo de 1, mais ecologicamente correto é o método<sup>424</sup>. Como pode ser observado na Figura 5.14 A-B, os valores obtidos foram de 0,73 e 0,81 para espectrofotometria e detecção colorimétrica, respectivamente. Sendo assim,

os valores de *score* obtidos apontam que o protocolo proposto é mais sustentável que o método convencional via espectrofotometria. Em relação aos princípios da química verde investigados, os parâmetros que apresentaram diferenças com maior impacto foram o volume da amostra e a produção de resíduos. Estas características são especialmente vantajosas para analisar amostras onde não há muito volume disponível. Ademais, os micropoços impressos em 3D associados ao uso de *smartphone* para a realização das análises proporcionam portabilidade, simplicidade ao analista e, principalmente, baseados nos princípios da química verde.

1. Tratamento de amostra
2. Quantidade de amostra
3. Posicionamento do dispositivo
4. Etapas de preparação da amostra
5. Automação-miniaturização
6. Derivatização
7. Resíduos
8. Rendimento da análise
9. Consumo de energia
10. Fonte de reagentes
11. Toxicidade
12. Segurança do operador



**Figura 5.14.** Análise métrica verde usando *software* AGREE. Fonte: Autoria própria.

## 5.5. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Este estudo apresentou um método inovador e sustentável para a detecção de vinil sulfonato de sódio, um precursor dos inibidores de incrustações de sulfonatos, através de uma abordagem colorimétrica portátil e ecologicamente correta. A utilização de uma plataforma deslizante de micropoços em conjunto com uma câmara impressa em 3D mostrou-se eficaz na promoção da reação entre um corante metacromático e o grupo sulfonato, possibilitando o monitoramento da mudança de cor do azul para o roxo através de um *smartphone*. As análises morfológicas e perfilométricas evidenciaram a preservação do dispositivo após múltiplas reutilizações, com dimensões próximas aos valores inicialmente projetados. A metodologia proposta atingiu limites de detecção e quantificação de  $0,10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, demonstrando uma boa sensibilidade para o método. A comparação dos resultados obtidos com amostras de água da indústria

petroquímica com o método de referência da espectrofotometria revelou concordância estatística, mostrando a eficácia prática da metodologia proposta. Além disso, a análise de seletividade mostrou baixa interferência de compostos inorgânicos, espécies orgânicas e inibidores de incrustações de outras classes químicas, reafirmando a real aplicabilidade do método. Além disso, a avaliação da métrica verde pelo programa AGREE atribuiu valores de 0,73 e 0,81 para espectrofotometria e colorimetria, respectivamente, destacando a abordagem proposta como ecologicamente correta.

Portanto, os resultados obtidos confirmam a eficiência do método colorimétrico portátil e verde desenvolvido, posicionando-o como uma alternativa promissora para monitoramento de espécies químicas em águas produzidas. Sua capacidade analítica no local o torna uma ferramenta valiosa para aplicações práticas, contribuindo para avanços significativos na detecção e controle de compostos relevantes em ambientes industriais. Ao fornecer um sistema miniaturizado para análise de inibidores de incrustação, acredita-se que esta ferramenta analítica pode oferecer uma alternativa prática e acessível para empresas da indústria petrolífera monitorarem e controlarem a presença e concentração de inibidores na água produzida. Isto permite a identificação de problemas de formação de incrustações, melhora os processos de tratamento de água e permite a implementação de medidas corretivas de forma mais eficiente. Como resultado, torna-se possível melhorar a qualidade da água produzida, reduzir custos de tratamento e mitigar os riscos associados à formação de incrustações na indústria petrolífera.

## **Capítulo 6 - Conclusões gerais**

## 6.1. CONCLUSÕES

Esta pesquisa de doutorado foi dedicada ao desenvolvimento de plataformas analíticas e métodos analíticos, em sua maioria, de custo acessível, ambientalmente amigável e com potencial para análises no campo, de maneira plural e multifacetada. As técnicas analíticas protagonistas exploradas englobaram, especialmente, a área da eletroquímica, da colorimetria e da microfluídica digital. Os maiores desafios encontrados estiveram relacionados a propor métodos analíticos que atendessem importantes demandas das áreas clínica, controle de produtos farmacêuticos e indústria do petróleo, com sensibilidade, seletividade e potencialidade suficiente para serem testadas frente às “aplicações reais” enfrentadas no dia a dia. Para alcançar o êxito do estudo, estratégias de personalização de tintas condutoras, modificação de sensores eletroquímicos com nanomateriais, exploração de materiais de elevada atividade catalítica e a proposição de uma plataforma analítica de detecção colorimétrica contendo controle de luz associada ao uso de *smartphone* foram fundamentais.

O capítulo 1 trouxe um vasto estado da arte, bem como arcabouço teórico, interconectando diversas subáreas inerentes à Química Analítica. Partiu-se do âmbito da microfabricação, explanou-se aspectos inerentes aos sensores eletroquímicos, colorimétricos e microfluídica digital e prosseguiu-se para a importância da realização de aplicações *point-of-care*. A construção do texto se deu via contextualização histórica, definições à luz da literatura, protocolos de fabricação de dispositivos, além de aplicações comumente encontradas em diversos campos de pesquisa em sensores analíticos portáteis, como os eletroquímicos, colorimétricos e *chips* de microfluídica digital. As aplicabilidades destacadas ocorreram no âmbito de análises clínicas, farmacêuticas e indústria do petróleo, devido à sua relevante importância no cenário mundial. Além disso, algumas lacunas presentes nas pesquisas que envolvem as áreas supramencionadas foram cuidadosamente discutidas.

A respeito do capítulo 2, apresentou-se uma nova tinta condutora à base de grafite e goma laca, a qual foi empregada para produzir sensores eletroquímicos descartáveis usando o protocolo de impressão por estêncil. O

novo sensor foi caracterizado eletroquimicamente, morfologicamente e estruturalmente, com sucesso. Para demonstrar a aplicabilidade do dispositivo foi proposto um imunossensor voltado para o diagnóstico de COVID-19 por meio da detecção da proteína *spike*. Amostras reais provenientes de *swab* nasofaríngeo de pacientes sintomáticos foram analisados e resultados obtidos demonstraram concordância com o método referência padrão ouro. Sendo assim, acredita-se que o dispositivo proposto seja uma alternativa promissora para aplicações bioanalíticas de diagnóstico clínico.

Em relação do capítulo 3, a nova formulação de tinta condutora de grafite/negro de fumo e laca chinesa usada na construção de dispositivos eletroquímicos miniaturizados apresentou uma resposta eletroquímica apreciável. A introdução da porção de negro de fumo diretamente na formulação, e não como modificação apenas do eletrodo de trabalho, contribui para um menor número de etapas na produção do dispositivo, bem como em um menor tempo de preparo, concomitantemente à melhora da condutividade elétrica da tinta. Ademais, o procedimento de eletrodeposição de AgNPs foi realizado utilizando um procedimento simples e com boa uniformidade. A combinação entre o uso de negro de fumo e a eletrodeposição controlada das nanopartículas possibilitou uma aprimorada resposta eletroquímica, que refletiu diretamente na elevada sensibilidade do método, em comparação com outros trabalhos reportados. Considerando o estado da arte, é importante ressaltar que o ineditismo do estudo advém também do fato de que nenhum outro trabalho empregando sensores à base de grafite/negro de fumo modificados com nanopartículas de prata (AgNPs) via o procedimento de eletrodeposição foi usado anteriormente para detectar cloreto via voltametria de pulso diferencial anteriormente. Embora haja inúmeras composições de tintas condutivas disponíveis, nenhuma parte dos mesmos materiais e procedimentos para destinar-se ao diagnóstico de fibrose cística. As vantagens inerentes ao presente estudo referem-se à nova formulação da tinta, os eletrodos ambientalmente amigáveis e, ainda, a praticidade do método de modificação da superfície do WE em comparação com outros estudos. É importante destacar que a detecção sensível do analito de

interesse, por meio da resposta eletroquímica aprimorada do sensor via voltametria de pulso diferencial, reduz a probabilidade de falsos positivos, que susceptíveis de ocorrer na condutimetria.

No capítulo 4, dois tipos de ePADs foram fabricados via impressão por estêncil em substrato de papel sulfite. O primeiro, utilizando uma tinta alternativa à base de grafite e verniz brilhante e, o segundo, empregando uma tinta condutora comercial à base de negro de fumo. Os sensores eletroquímicos foram integrados com *chips* de microfluídica digital utilizando um simples mecanismo de inserção do ePAD dentro do eletrodo reservatório, pela primeira vez. Os dispositivos eletroquímicos foram utilizados em associação com operações microfluídicas digitais automatizadas para proporcionarem a (i) modificação do sensor eletroquímico com nanopartículas de azul da prússia, (ii) ativação eletroquímica, (iii) preparo de amostra e (iv) detecção do analito de interesse L-cisteína. O tratamento de amostras foi realizado utilizando procedimentos de diluição para o viés de controle de qualidade de suplemento alimentar e preparação de sangue para plasma empregando partículas magnéticas visando aplicação bioanalítica. Os dispositivos foram caracterizados usando diferentes técnicas e aplicados em amostras reais, com sucesso. Acredita-se que o procedimento proposto possui características desejáveis para atuar na execução de procedimentos analíticos que requerem a integração de múltiplas etapas e em microescala, inclusive, estendendo-se para outros analitos alvos.

No que tange ao capítulo 5, um protótipo impresso a partir da técnica de impressão 3D possibilitou a criação de micropoços deslizantes e um ambiente de iluminação controlada para se efetuar detecção colorimétrica. O dispositivo portátil foi empregado na análise de vinil sulfonato de sódio, a partir do uso de uma reação colorimétrica empregando um corante metacromático e o analito de interesse, assistido pelo uso de um *smartphone*. O método miniaturizado proposto foi aplicado em amostras de água produzida enriquecidas e comparado com a técnica convencional via espectrofotometria. Os resultados adquiridos foram promissores e elenca alguns princípios da química verde, destacando uma enorme potencialidade para aplicações colorimétricas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Bui, T. H.; Thangavel, B.; Sharipov, M.; Chen, K.; Shin, J. H. Smartphone-Based Portable Bio-Chemical Sensors: Exploring Recent Advancements. *Chemosensors*. 2023. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11090468>.
- (2) Zhang, W.; Wang, R.; Luo, F.; Wang, P.; Lin, Z. Miniaturized Electrochemical Sensors and Their Point-of-Care Applications. *Chinese Chemical Letters* 2020, *31* (3), 589–600. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2019.09.022>.
- (3) Manz, A.; Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fettingner, J. C.; Lüdi, H.; Widmer, H. M. Miniaturization of Chemical Analysis Systems – A Look into Next Century’s Technology or Just a Fashionable Craze? *Chimia (Aarau)* 1991, *45* (4), 103. <https://doi.org/10.2533/chimia.1991.103>.
- (4) Lim, Y. C.; Kouzani, • A Z; Duan, • W. Lab-on-a-Chip: A Component View. <https://doi.org/10.1007/s00542-010-1141-6>.
- (5) Arora, A.; Simone, G.; Salieb-Beugelaar, G. B.; Kim, J. T.; Manz, A. Latest Developments in Micro Total Analysis Systems. *Anal Chem* 2010, *82* (12), 4830–4847. [https://doi.org/10.1021/AC100969K/ASSET/AC100969K.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/AC100969K/ASSET/AC100969K.FP.PNG_V03).
- (6) Silva-Neto, H. A.; Arantes, I. V. S.; Ferreira, A. L.; do Nascimento, G. H. M.; Meloni, G. N.; de Araujo, W. R.; Paixão, T. R. L. C.; Coltro, W. K. T. Recent Advances on Paper-Based Microfluidic Devices for Bioanalysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2023, *158*, 116893. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2022.116893>.
- (7) Jebrail, M. J.; Bartsch, M. S.; Patel, K. D. Digital Microfluidics: A Versatile Tool for Applications in Chemistry, Biology and Medicine. *Lab Chip* 2012, *12* (14), 2452–2463. <https://doi.org/10.1039/C2LC40318H>.
- (8) Martinez, A. W.; Phillips, S. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. *Angewandte Chemie* 2007, *119*, 1340–1342. <https://doi.org/10.1002/ange.200603817>.
- (9) Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S. Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Anal Chem* 2009, *81* (3), 5821–5826. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.002>.
- (10) Noviana, E.; McCord, C. P.; Clark, K. M.; Jang, I.; Henry, C. S. Electrochemical Paper-Based Devices: Sensing Approaches and Progress toward Practical

- Applications. *Lab Chip* 2020, 20 (1), 9–34. <https://doi.org/10.1039/c9lc00903e>.
- (11) Fu, L. M.; Wang, Y. N. Detection Methods and Applications of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. October 1, 2018, pp 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.018>.
- (12) Cardoso, T. M. G.; Garcia, P. T.; Coltro, W. K. T. Colorimetric Determination of Nitrite in Clinical, Food and Environmental Samples Using Microfluidic Devices Stamped in Paper Platforms. *Analytical Methods* 2015, 7 (17), 7311–7317. <https://doi.org/10.1039/c5ay00466g>.
- (13) Moreira, N. S.; Chagas, C. L. S.; Oliveira, K. A.; Duarte-Junior, G. F.; de Souza, F. R.; Santhiago, M.; Garcia, C. D.; Kubota, L. T.; Coltro, W. K. T. Fabrication of Microwell Plates and Microfluidic Devices in Polyester Films Using a Cutting Printer. *Anal Chim Acta* 2020, 1119, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.047>.
- (14) Camargo, J. R.; Orzari, L. O.; Araújo, D. A. G.; de Oliveira, P. R.; Kalinke, C.; Rocha, D. P.; Luiz dos Santos, A.; Takeuchi, R. M.; Munoz, R. A. A.; Bonacin, J. A.; Janegitz, B. C. Development of Conductive Inks for Electrochemical Sensors and Biosensors. *Microchemical Journal* 2021, 164, 105998. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.105998>.
- (15) Baranwal, J.; Barse, B.; Gatto, G.; Broncova, G.; Kumar, A. Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. *Chemosensors* 2022, Vol. 10, Page 363 2022, 10 (9), 363. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- (16) Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors Definitions and Classification. *Pure and Applied Chemistry* 1991, 63 (9), 1247–1250. <https://doi.org/10.1351/PAC199163091247/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- (17) Siripongpreda, T.; Rodthongkum, N.; Ummartyotin, S. A Critical Review on Cellulose Wastes as the Novel Substrates for Colorimetric and Electrochemical Sensors. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 2021, 4, 100190. <https://doi.org/10.1016/J.CRGSC.2021.100190>.
- (18) Yang, Y.; Gao, W. Wearable and Flexible Electronics for Continuous Molecular Monitoring. *Chem Soc Rev* 2019, 48 (6), 1465–1491. <https://doi.org/10.1039/C7CS00730B>.

- (19) Ataíde, V. N.; Mendes, L. F.; Gama, L. I. L. M.; De Araujo, W. R.; Paixão, T. R. L. C. Electrochemical Paper-Based Analytical Devices: Ten Years of Development. *Analytical Methods* 2020, 12, 1030–1054. <https://doi.org/10.1039/c9ay02350j>.
- (20) Pacheco, W. F.; Semaan, F. S.; De Almeida, V. G. K.; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q. Voltametricas: Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos. *Revista Virtual de Química* 2013, 5, 516–537. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>.
- (21) Ataíde, V. N.; Arantes, I. V. S.; Mendes, L. F.; Rocha, D. S.; Baldo, T. A.; Coltro, W. K. T.; Paixão, T. R. L. C. Review—A Pencil Drawing Overview: From Graphite to Electrochemical Sensors/Biosensors Applications. *J Electrochem Soc* 2022, 169 (4), 047524. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ac68a0>.
- (22) Mendes, L. F.; de Siervo, A.; Reis de Araujo, W.; Longo Cesar Paixão, T. R. Reagentless Fabrication of a Porous Graphene-like Electrochemical Device from Phenolic Paper Using Laser-Scribing. *Carbon N Y* 2020, 159, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2019.12.016>.
- (23) Garcia Cardozo, C.; Melo Cardoso, R.; Matheus Guimarães Selva, T.; Evaristo de Carvalho, A.; Torres Pio dos Santos, W.; Regis Longo Cesar Paixão, T.; Amorim Bezerra da Silva, R. Batch Injection Analysis-Multiple Pulse Amperometric Fingerprint: A Simple Approach for Fast On-Site Screening of Drugs. *Electroanalysis* 2017, 29 (12), 2847–2854. <https://doi.org/10.1002/elan.201700520>.
- (24) Moya, A.; Gabriel, G.; Villa, R.; Javier del Campo, F. Inkjet-Printed Electrochemical Sensors. *Curr Opin Electrochem* 2017, 3 (1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2017.05.003>.
- (25) Rocha, D.; Silva-Neto, H.; Oliveira, L.; Souza, S.; Santana, M.; Coltro, W. Disposable Stencil-Printed Carbon Electrodes for Electrochemical Analysis of Sildenafil Citrate in Commercial and Adulterated Tablets. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* 2021, 9 (34), 210–228. <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.ar-65-2021>.
- (26) Gholamalizadeh, N.; Mazinani, S.; Abdouss, M.; Bazargan, A. M.; Fatemi, F. Stencil Printing of a Highly Conductive Graphene Ink toward Flexible Electrochemical Biosensors for Glucose Monitoring. *Prog Org Coat* 2022, 172, 107083. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107083>.

- (27) Hong, H.; Jiang, L.; Tu, H.; Hu, J.; Yan, X. Formulation of UV Curable Nano-Silver Conductive Ink for Direct Screen-Printing on Common Fabric Substrates for Wearable Electronic Applications. *Smart Mater Struct* 2021, 30 (4). <https://doi.org/10.1088/1361-665X/abe4b3>.
- (28) da Silva, G. C.; de Oliveira, W. B. V.; Lisboa, T. P.; de Souza, C. C.; Oliveira, R. S.; de Jorge Duarte, E.; Matos, M. A. C.; Matos, R. C. Stencil-Printed Electrode Using Conductive Graphite-Based Ink: A Cost-Effective Approach for Electrochemical Determination of Dipyrone. *Journal of Solid State Electrochemistry* 2024, 29 (3), 1163–1172. <https://doi.org/10.1007/s10008-024-05938-y>.
- (29) Costa-Rama, E.; Fernández-Abedul, M. T. Paper-Based Screen-Printed Electrodes: A New Generation of Low-Cost Electroanalytical Platforms. *Biosensors* 2021, Vol. 11, Page 51 2021, 11 (2), 51. <https://doi.org/10.3390/BIOS11020051>.
- (30) Lamas-Ardisana, P. J.; Martínez-Paredes, G.; Añorga, L.; Grande, H. J. Glucose Biosensor Based on Disposable Electrochemical Paper-Based Transducers Fully Fabricated by Screen-Printing. *Biosens Bioelectron* 2018, 109, 8–12. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2018.02.061>.
- (31) 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* 2019, 195, 480–489. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.11.047>.
- (32) Smith, S.; Madzivhandila, P.; Ntuli, L.; Bezuidenhout, P.; Zheng, H.; Land, K. Printed Paper-Based Electrochemical Sensors for Low-Cost Point-of-Need Applications. *Electrocatalysis* 2019, 10 (4), 342–351. <https://doi.org/10.1007/S12678-019-0512-8/TABLES/2>.
- (33) Varodi, C.; Pogacean, F.; Gheorghe, M.; Mirel, V.; Coros, M.; Barbu-Tudoran, L.; van Staden, R. I. S.; Pruneanu, S. Stone Paper as a New Substrate to Fabricate Flexible Screen-Printed Electrodes for the Electrochemical Detection of Dopamine. *Sensors* 2020, Vol. 20, Page 3609 2020, 20 (12), 3609. <https://doi.org/10.3390/S20123609>.
- (34) Silva-Neto, H. A.; Duarte-Junior, G. F.; Rocha, D. S.; Bedioui, F.; Varenne, A.;

- Coltro, W. K. T. Recycling 3D Printed Residues for the Development of Disposable Paper-Based Electrochemical Sensors. *ACS Appl Mater Interfaces* 2023. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c00370>.
- (35) Camargo, J. R.; Andreotti, I. A. A.; Kalinke, C.; Henrique, J. M.; Bonacin, J. A.; Janegitz, B. C. Waterproof Paper as a New Substrate to Construct a Disposable Sensor for the Electrochemical Determination of Paracetamol and Melatonin. *Talanta* 2020, 208, 120458. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120458>.
- (36) Mazzaracchio, V.; Bagheri, N.; Chiara, F.; Fiore, L.; Moscone, D.; Roggero, S.; Arduini, F. A Smart Paper-Based Electrochemical Sensor for Reliable Detection of Iron Ions in Serum. *Anal Bioanal Chem* 2023, 415 (6), 1149–1157. <https://doi.org/10.1007/S00216-023-04537-6/FIGURES/5>.
- (37) Rocha, D. S.; Baldo, T. A.; Silva-Neto, H. A.; Duarte-Junior, G. F.; Bazílio, G. S.; Borges, C. L.; Parente-Rocha, J. A.; de Araujo, W. R.; de Siervo, A.; Paixão, T. L. R. C.; Coltro, W. K. T. Disposable and Eco-Friendly Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Talanta* 2024, 268, 125337. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2023.125337>.
- (38) Camargo, J. R.; Silva, T. A.; Rivas, G. A.; Janegitz, B. C. Novel Eco-Friendly Water-Based Conductive Ink for the Preparation of Disposable Screen-Printed Electrodes for Sensing and Biosensing Applications. *Electrochim Acta* 2022, 409, 139968. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2022.139968>.
- (39) Zhao, G.; Tran, T. T.; Modha, S.; Sedki, M.; Myung, N. V.; Jassby, D.; Mulchandani, A. Multiplexed Anodic Stripping Voltammetry Detection of Heavy Metals in Water Using Nanocomposites Modified Screen-Printed Electrodes Integrated With a 3D-Printed Flow Cell. *Front Chem* 2022, 10, 815805. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2022.815805/BIBTEX>.
- (40) Martín-Yerga, D.; Álvarez-Martos, I.; Blanco-López, M. C.; Henry, C. S.; Fernández-Abedul, M. T. Point-of-Need Simultaneous Electrochemical Detection of Lead and Cadmium Using Low-Cost Stencil-Printed Transparency Electrodes. *Anal Chim Acta* 2017, 981, 24–33. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.05.027>.
- (41) Pradela-Filho, L. A.; Andreotti, I. A. A.; Carvalho, J. H. S.; Araújo, D. A. G.; Orzari, L. O.; Gatti, A.; Takeuchi, R. M.; Santos, A. L.; Janegitz, B. C. Glass

- Varnish-Based Carbon Conductive Ink: A New Way to Produce Disposable Electrochemical Sensors. *Sens Actuators B Chem* 2020, 305, 127433. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127433>.
- (42) Carvalho, J. H. S.; Stefano, J. S.; Brazaca, L. C.; Janegitz, B. C. New Conductive Ink Based on Carbon Nanotubes and Glass Varnish for the Construction of a Disposable Electrochemical Sensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2023, 937, 117428. <https://doi.org/10.1016/J.JELECTHEM.2023.117428>.
- (43) Tran, T. S.; Dutta, N. K.; Choudhury, N. R. Graphene Inks for Printed Flexible Electronics: Graphene Dispersions, Ink Formulations, Printing Techniques and Applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2018, 261, 41–61. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2018.09.003>.
- (44) Wei, H.; Sun, J. J.; Xie, Y.; Lin, C. G.; Wang, Y. M.; Yin, W. H.; Chen, G. N. Enhanced Electrochemical Performance at Screen-Printed Carbon Electrodes by a New Pretreating Procedure. *Anal Chim Acta* 2007, 588 (2), 297–303. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2007.02.006>.
- (45) González-Sánchez, M. I.; Gómez-Monedero, B.; Agrisuelas, J.; Iniesta, J.; Valero, E. Highly Activated Screen-Printed Carbon Electrodes by Electrochemical Treatment with Hydrogen Peroxide. *Electrochem commun* 2018, 91, 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.ELECOM.2018.05.002>.
- (46) Alba, A. F.; Toticaguena-Gorriño, J.; Sánchez-Ilárduya, M. B.; Ruiz-Rubio, L.; Vilas-Vilela, J. L.; Lanceros-Méndez, S.; del Campo, F. J. Laser-Activated Screen-Printed Carbon Electrodes for Enhanced Dopamine Determination in the Presence of Ascorbic and Uric Acid. *Electrochim Acta* 2021, 399, 139374. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2021.139374>.
- (47) Wang, S. C.; Chang, K. S.; Yuan, C. J. Enhancement of Electrochemical Properties of Screen-Printed Carbon Electrodes by Oxygen Plasma Treatment. *Electrochim Acta* 2009, 54 (21), 4937–4943. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2009.04.006>.
- (48) Cumba, L. R.; Foster, C. W.; Brownson, D. A. C.; Smith, J. P.; Iniesta, J.; Thakur, B.; Do Carmo, D. R.; Banks, C. E. Can the Mechanical Activation (Polishing) of Screen-Printed Electrodes Enhance Their Electroanalytical Response? *Analyst* 2016, 141 (9), 2791–2799.

<https://doi.org/10.1039/C6AN00167J>.

- (49) Venkata Krishna Rao, R.; Venkata Abhinav, K.; Karthik, P. S.; Singh, S. P. Conductive Silver Inks and Their Applications in Printed and Flexible Electronics. *RSC Adv* 2015, 5 (95), 77760–77790. <https://doi.org/10.1039/C5RA12013F>.
- (50) Abhinav K, V.; Rao R, V. K.; Karthik, P. S.; Singh, S. P. Copper Conductive Inks: Synthesis and Utilization in Flexible Electronics. *RSC Adv* 2015, 5 (79), 63985–64030. <https://doi.org/10.1039/C5RA08205F>.
- (51) Stefano, J. S.; Orzari, L. O.; Silva-Neto, H. A.; de Ataíde, V. N.; Mendes, L. F.; Coltro, W. K. T.; Longo Cesar Paixão, T. R.; Janegitz, B. C. Different Approaches for Fabrication of Low-Cost Electrochemical Sensors. *Current Opinion in Electrochemistry*. Elsevier B.V. April 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100893>.
- (52) Silva-Neto, H. A.; Rocha, D. S.; Pradela-Filho, L. A.; Paixão, T. R. L. C.; Coltro, W. K. T. (Bio)Electrodes on Paper Platforms as Simple and Portable Analytical Tools for Bioanalytical Applications. *Advances in Bioelectrochemistry* 2022, 5, 181–202. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-10832-7\\_6/COVER](https://doi.org/10.1007/978-3-031-10832-7_6/COVER).
- (53) Baharfar, M.; Rahbar, M.; Tajik, M.; Liu, G. Engineering Strategies for Enhancing the Performance of Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Biosens Bioelectron* 2020, 167, 112506. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112506>.
- (54) Silva-Neto, H. A.; de Lima, L. F.; Rocha, D. S.; Ataíde, V. N.; Meloni, G. N.; Moro, G.; Raucci, A.; Cinti, S.; Paixão, T. R. L. C.; de Araujo, W. R.; Coltro, W. K. T. Recent Achievements of Greenness Metrics on Paper-Based Electrochemical (Bio) Sensors for Environmental and Clinical Analysis. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 2024, 174, 117675. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2024.117675>.
- (55) Odom, S. A.; Chayanupatkul, S.; Blaiszik, B. J.; Zhao, O.; Jackson, A. C.; Braun, P. V.; Sottos, N. R.; White, S. R.; Moore, J. S. A Self-Healing Conductive Ink. *Advanced Materials* 2012, 24 (19), 2578–2581. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201200196>.
- (56) Saidina, D. S.; Eawwiboonthanakit, N.; Mariatti, M.; Fontana, S.; Hérold, C. Recent Development of Graphene-Based Ink and Other Conductive Material-

- Based Inks for Flexible Electronics. *J Electron Mater* 2019, 48 (6), 3428–3450. <https://doi.org/10.1007/S11664-019-07183-W/METRICS>.
- (57) Laschi, S.; Palchetti, I.; Mascini, M. Gold-Based Screen-Printed Sensor for Detection of Trace Lead. *Sens Actuators B Chem* 2006, 114 (1), 460–465. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2005.05.028>.
- (58) Hatala, M.; Gemeiner, P.; Hvojník, M.; Mikula, M. The Effect of the Ink Composition on the Performance of Carbon-Based Conductive Screen Printing Inks. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 2019, 30, 1034–1044. <https://doi.org/10.1007/s10854-018-0372-7>.
- (59) Qin, Y.; Ouyang, X.; Lv, Y.; Liu, W.; Liu, Q.; Wang, S. A Review of Carbon-Based Conductive Inks and Their Printing Technologies for Integrated Circuits. *Coatings*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) October 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/coatings13101769>.
- (60) Rubianes, D.; Rivas, G. A. Carbon Nanotubes Paste Electrode. *Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors* 2003, 5, 689–694. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(03\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(03)00168-1).
- (61) Oliveira, L. C.; Rocha, D. S.; Silva-Neto, H. A.; Silva, T. A. C.; Coltro, W. K. T. Polyester Resin and Graphite Flakes: Turning Conductive Ink to a Voltammetric Sensor for Paracetamol Sensing. *Microchimica Acta* 2023, 190 (8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S00604-023-05914-9/FIGURES/6>.
- (62) Araújo, D. A. G.; Pradela-Filho, L. A.; Santos, A. L. R.; Faria, A. M.; Takeuchi, R. M.; Karimi-Maleh, H.; Santos, A. L. Uncured Polydimethylsiloxane as Binder Agent for Carbon Paste Electrodes: Application to the Quantification of Propranolol. *J Braz Chem Soc* 2019, 30 (9), 1988–1998. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190117>.
- (63) de Lima, L. F.; Ferreira, A. L.; Maciel, C. C.; Ferreira, M.; de Araujo, W. R. Disposable and Low-Cost Electrochemical Sensor Based on the Colorless Nail Polish and Graphite Composite Material for Tartrazine Detection. *Talanta* 2021, 227, 122200. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122200>.
- (64) Dimitriou, E.; Michailidis, N. Printable Conductive Inks Used for the Fabrication of Electronics: An Overview. *Nanotechnology* 2021, 32 (50), 502009. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ABEFFF>.
- (65) Htwe, Y. Z. N.; Abdullah, M. K.; Mariatti, M. Optimization of Graphene

Conductive Ink Using Solvent Exchange Techniques for Flexible Electronics Applications. *Synth Met* 2021, 274. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2021.116719>.

- (66) Migliorini, F. L.; dos Santos, D. M.; Soares, A. C.; Mattoso, L. H. C.; Oliveira, O. N.; Correa, D. S. Design of A Low-Cost and Disposable Paper-Based Immunosensor for the Rapid and Sensitive Detection of Aflatoxin B1. *Chemosensors* 2020, Vol. 8, Page 87 2020, 8 (3), 87. <https://doi.org/10.3390/CHEMOSENSORS8030087>.
- (67) Skoog; West; Holler; Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*, 8a edição.; 2006.
- (68) Baluta, S.; Meloni, F.; Halicka, K.; Szyszka, A.; Zucca, A.; Pilo, M. I.; Cabaj, J. Differential Pulse Voltammetry and Chronoamperometry as Analytical Tools for Epinephrine Detection Using a Tyrosinase-Based Electrochemical Biosensor. *RSC Adv* 2022, 12 (39), 25342–25353. <https://doi.org/10.1039/D2RA04045J>.
- (69) Compton, R. G.; Banks, C. E. Understanding Voltammetry. 2009, 371.
- (70) De Souza, D.; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. *Quim Nova* 2003, 26 (1), 81–89. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>.
- (71) Mihaela Baracu, A.; Alexandra Dinu Gugoasa, L.; Electrochem Soc, J. Review—Recent Advances in Microfabrication, Design and Applications of Amperometric Sensors and Biosensors. *J Electrochem Soc* 2021, 168 (3), 037503. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ABE8B6>.
- (72) Rocha, D. P.; Rocha, R. G.; Castro, S. V. F.; Trindade, M. A. G.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M.; Angnes, L. Posttreatment of 3D-Printed Surfaces for Electrochemical Applications: A Critical Review on Proposed Protocols. *Electrochemical Science Advances* 2022, 2 (5), e2100136. <https://doi.org/10.1002/ELSA.202100136>.
- (73) Mohanty, U. S. Electrodeposition: A Versatile and Inexpensive Tool for the Synthesis of Nanoparticles, Nanorods, Nanowires, and Nanoclusters of Metals. *J Appl Electrochem* 2011, 41 (3), 257–270. <https://doi.org/10.1007/S10800-010-0234-3/FIGURES/9>.
- (74) Xu, Q.; Pan, Y.; Li, W.; Yang, Z. Amperometric Sensors. *Fundamentals of Sensor Technology: Principles and Novel Designs* 2023, 123–145.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88431-0.00007-7>.

- (75) Adeloju, S. B. AMPEROMETRY. *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* 2005, 70–79. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00012-1>.
- (76) Amine, A.; Mohammadi, H. Amperometry. *Encyclopedia of Analytical Science* 2019, 85–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14204-0>.
- (77) Newman, J. D.; Turner, A. P. F. Home Blood Glucose Biosensors: A Commercial Perspective. *Biosens Bioelectron* 2005, 20 (12), 2435–2453. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2004.11.012>.
- (78) Ebralidze, I. I.; Laschuk, N. O.; Poisson, J.; Zenkina, O. V. Colorimetric Sensors and Sensor Arrays. *Nanomaterials Design for Sensing Applications* 2019, 1–39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814505-0.00001-1>.
- (79) Piriya V.S, A.; Joseph, P.; Daniel S.C.G., K.; Lakshmanan, S.; Kinoshita, T.; Muthusamy, S. Colorimetric Sensors for Rapid Detection of Various Analytes. *Materials Science and Engineering: C* 2017, 78, 1231–1245. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.05.018>.
- (80) Fernandes, G. M.; Silva, W. R.; Barreto, D. N.; Lamarca, R. S.; Lima Gomes, P. C. F.; Flávio da S Petrucci, J.; Batista, A. D. Novel Approaches for Colorimetric Measurements in Analytical Chemistry – A Review. *Anal Chim Acta* 2020, 1135, 187–203. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.07.030>.
- (81) Noviana, E.; Ozer, T.; Carrell, C. S.; Link, J. S.; McMahan, C.; Jang, I.; Henry, C. S. Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications. *Chem Rev* 2021, 121 (19), 11835–11885. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.0C01335>.
- (82) Cate, D. M.; Adkins, J. A.; Mettakoonpitak, J.; Henry, C. S. Recent Developments in Paper-Based Microfluidic Devices. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society January 6, 2015, pp 19–41. <https://doi.org/10.1021/ac503968p>.
- (83) Carrell, C.; Kava, A.; Nguyen, M.; Menger, R.; Munshi, Z.; Call, Z.; Nussbaum, M.; Henry, C. Beyond the Lateral Flow Assay: A Review of Paper-Based Microfluidics. *Microelectron Eng* 2019, 206, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.12.002>.
- (84) Tandey, K.; Shrivastava, K.; Sharma, A.; Kant, T.; Tejawani, A.; Tikeshwari; Kanti Deb, M.; Pervez, S.; Ghosh, K. K. Nanomaterial-Enabled Portable Paper-

- Based Colorimetric and Fluorometric Devices: Progress in Point-of-Care Diagnosis. *Coord Chem Rev* 2024, 514, 215919. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2024.215919>.
- (85) da Silva, G. O.; de Araujo, W. R.; Paixão, T. R. L. C. Portable and Low-Cost Colorimetric Office Paper-Based Device for Phenacetin Detection in Seized Cocaine Samples. *Talanta* 2018, 176, 674–678. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.082>.
- (86) Yamada, K.; Henares, T. G.; Suzuki, K.; Citterio, D. Paper-Based Inkjet-Printed Microfluidic Analytical Devices. *Angewandte Chemie International Edition* 2015, 54 (18), 5294–5310. <https://doi.org/10.1002/ANIE.201411508>.
- (87) Reynolds, M.; Duarte, L. M.; Coltro, W. K. T.; Silva, M. F.; Gomez, F. J. V.; Garcia, C. D. Laser-Engraved Ammonia Sensor Integrating a Natural Deep Eutectic Solvent. *Microchemical Journal* 2020, 157 (May), 105067. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105067>.
- (88) Lim, J. W.; Kim, T. Y.; Choi, S. W.; Woo, M. A. 3D-Printed Rolling Circle Amplification Chip for on-Site Colorimetric Detection of Inorganic Mercury in Drinking Water. *Food Chem* 2019, 300, 125177. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125177>.
- (89) Chan, H. N.; Shu, Y.; Xiong, B.; Chen, Y.; Chen, Y.; Tian, Q.; Michael, S. A.; Shen, B.; Wu, H. Simple, Cost-Effective 3D Printed Microfluidic Components for Disposable, Point-of-Care Colorimetric Analysis. *ACS Sens* 2016, 1 (3), 227–234. [https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.5B00100/SUPPL\\_FILE/SE5B00100\\_SI\\_003.MOV](https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.5B00100/SUPPL_FILE/SE5B00100_SI_003.MOV).
- (90) Lim, J. W.; Kim, T. Y.; Choi, S. W.; Woo, M. A. 3D-Printed Rolling Circle Amplification Chip for on-Site Colorimetric Detection of Inorganic Mercury in Drinking Water. *Food Chem* 2019, 300, 125177. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125177>.
- (91) Rajasulochana, P.; Ganesan, Y.; Kumar, P. S.; Mahalaxmi, S.; Tasneem, F.; Ponnuchamy, M.; Kapoor, A. Paper-Based Microfluidic Colorimetric Sensor on a 3D Printed Support for Quantitative Detection of Nitrite in Aquatic Environments. *Environ Res* 2022, 208, 112745. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2022.112745>.

- (92) Cruz, J.; Sáez-Hernández, R.; Armenta, S.; Morales-Rubio, A. E.; Cervera, M. L. 3D-Printed Portable Device for Illicit Drug Identification Based on Smartphone-Imaging and Artificial Neural Networks. *Talanta* **2024**, *276*, 126217. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.126217>.
- (93) Łabowska, M. B.; Krakos, A.; Kubicki, W. 3D Printed Hydrogel Sensor for Rapid Colorimetric Detection of Salivary PH. *Sensors* **2024**, *Vol. 24*, Page 3740 2024, *24* (12), 3740. <https://doi.org/10.3390/S24123740>.
- (94) Liu, T.; Chen, S.; Ruan, K.; Zhang, S.; He, K.; Li, J.; Chen, M.; Yin, J.; Sun, M.; Wang, X.; Wang, Y.; Lu, Z.; Rao, H. A Handheld Multifunctional Smartphone Platform Integrated with 3D Printing Portable Device: On-Site Evaluation for Glutathione and Azodicarbonamide with Machine Learning. *J Hazard Mater* **2022**, *426*, 128091. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.128091>.
- (95) Ni, Y.; Ji, R.; Long, K.; Bu, T.; Chen, K.; Zhuang, S. A Review of 3D-Printed Sensors. *Appl Spectrosc Rev* **2017**, *52* (7), 623–652. <https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1287082>.
- (96) Elhadad, A. A.; Rosa-Sainz, A.; Cañete, R.; Peralta, E.; Begines, B.; Balbuena, M.; Alcudia, A.; Torres, Y. Applications and Multidisciplinary Perspective on 3D Printing Techniques: Recent Developments and Future Trends. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2023**, *156*, 100760. <https://doi.org/10.1016/J.MSER.2023.100760>.
- (97) Singh, T.; Kumar, S.; Sehgal, S. 3D Printing of Engineering Materials: A State of the Art Review. *Mater Today Proc* **2020**, *28*, 1927–1931. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.05.334>.
- (98) Wang, X.; Jiang, M.; Zhou, Z.; Gou, J.; Hui, D. 3D Printing of Polymer Matrix Composites: A Review and Prospective. *Compos B Eng* **2017**, *110*, 442–458. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESB.2016.11.034>.
- (99) Gross, B.; Lockwood, S. Y.; Spence, D. M. Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing. *Anal Chem* **2017**, *89* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/ACS.ANALCHEM.6B04344.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/ACS.ANALCHEM.6B04344.FP.PNG_V03).
- (100) Nesterenko, P. N. 3D Printing in Analytical Chemistry: Current State and Future. *Pure and Applied Chemistry* **2020**, *92* (8), 1341–1355. [https://doi.org/10.1515/PAC-2020-0206/ASSET/GRAPHIC/J\\_PAC-2020-](https://doi.org/10.1515/PAC-2020-0206/ASSET/GRAPHIC/J_PAC-2020-)

0206\_FIG\_006.JPG.

- (101) , K. V.; Hernandez, A. A Review of Additive Manufacturing. *Int Sch Res Notices* 2012, 2012 (1), 208760. <https://doi.org/10.5402/2012/208760>.
- (102) Ambrosi, A.; Pumera, M. 3D-Printing Technologies for Electrochemical Applications. *Chem Soc Rev* 2016, 45 (10), 2740–2755. <https://doi.org/10.1039/C5CS00714C>.
- (103) Kristiawan, R. B.; Imaduddin, F.; Ariawan, D.; Ubaidillah; Arifin, Z. A Review on the Fused Deposition Modeling (FDM) 3D Printing: Filament Processing, Materials, and Printing Parameters. *Open Engineering* 2021, 11 (1), 639–649. [https://doi.org/10.1515/ENG-2021-0063/ASSET/GRAPHIC/J\\_ENG-2021-0063\\_FIG\\_003.JPG](https://doi.org/10.1515/ENG-2021-0063/ASSET/GRAPHIC/J_ENG-2021-0063_FIG_003.JPG).
- (104) Prabhakar, M. M.; Saravanan, A. K.; Lenin, A. H.; Leno, I. J.; Mayandi, K.; Ramalingam, P. S. A Short Review on 3D Printing Methods, Process Parameters and Materials. *Mater Today Proc* 2021, 45, 6108–6114. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2020.10.225>.
- (105) Silva-Neto, H. A.; Duarte, L. C.; Coltro, W. K. T. Additives in 3D Printing: From the Fabrication of Thermoplastics and Photoresin to Applications. *3D Printing: Fundamentals to Emerging Applications* 2023, 83–98. <https://doi.org/10.1201/9781003296676-6>.
- (106) Wu, F.; Wang, M. A Portable Smartphone-Based Sensing System Using a 3D-Printed Chip for On-Site Biochemical Assays. *Sensors* 2018, Vol. 18, Page 4002 2018, 18 (11), 4002. <https://doi.org/10.3390/S18114002>.
- (107) Vargas-Muñoz, M. A.; Morales, J.; Cerdà, V.; Ferrer, L.; Palacio, E. Paper Sensor-Based Method Using a Portable 3D-Printed Platform and Smartphone-Assisted Colorimetric Detection for Ammonia and Sulfide Monitoring in Anaerobic Digesters and Wastewater. *Microchemical Journal* 2023, 188, 108469. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2023.108469>.
- (108) CN218847956U - Portable sample solution colorimetric analysis device based on smartphone photographing function - Google Patents. <https://patents.google.com/patent/CN218847956U/en?q=CN+218847956+U> (accessed 2025-01-11).
- (109) Kant, T.; Shrivastava, K.; Tejawani, A.; Tandey, K.; Sharma, A.; Gupta, S. Progress in the Design of Portable Colorimetric Chemical Sensing Devices. *Nanoscale*

- 2023, 15 (47), 19016–19038. <https://doi.org/10.1039/D3NR03803C>.
- (110) Patel, S.; Jamunkar, R.; Sinha, D.; Monisha; Patle, T. K.; Kant, T.; Dewangan, K.; Shrivastava, K. Recent Development in Nanomaterials Fabricated Paper-Based Colorimetric and Fluorescent Sensors: A Review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 2021, 31, e00136. <https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2021.E00136>.
- (111) Fan, Y.; Li, J.; Guo, Y.; Xie, L.; Zhang, G. Digital Image Colorimetry on Smartphone for Chemical Analysis: A Review. *Measurement* 2021, 171, 108829. <https://doi.org/10.1016/J.MEASUREMENT.2020.108829>.
- (112) Böck, F. C.; Helfer, G. A.; da Costa, A. Ben; Dessuy, M. B.; Ferrão, M. F. PhotoMetrix and Colorimetric Image Analysis Using Smartphones. *J Chemom* 2020, 34 (12), e3251. <https://doi.org/10.1002/CEM.3251>.
- (113) Zhang, Y.; Xue, T.; Cheng, L.; Wang, J.; Shen, R.; Zhang, J. Smartphone-Assisted Colorimetric Biosensor for on-Site Detection of Cr<sup>3+</sup> Ion Analysis. *Anal Chim Acta* 2022, 1199, 339603. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2022.339603>.
- (114) Kehoe, E.; Penn, R. L. Introducing Colorimetric Analysis with Camera Phones and Digital Cameras: An Activity for High School or General Chemistry. *J Chem Educ* 2013, 90 (9), 1191–1195. <https://doi.org/10.1021/ed300567p>.
- (115) Shrikrishna, N. S.; Kaushik, A.; Gandhi, S. Smartphone-Assisted Detection of Monocrotophos Pesticide Using a Portable Nano-Enabled Chromagrid-Lightbox System towards Point-of-Care Application. *Chemosphere* 2023, 330, 138704. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138704>.
- (116) Rocha, D. S.; de Campos, R. P. S.; Silva-Neto, H. A.; Duarte-Junior, G. F.; Bedioui, F.; Coltro, W. K. T. Digital Microfluidic Platform Assembled into a Home-Made Studio for Sample Preparation and Colorimetric Sensing of S-Nitrosocysteine. *Anal Chim Acta* 2023, 1254, 341077. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2023.341077>.
- (117) Hanrahan, G.; Patil, D. G.; Wang, J. Electrochemical Sensors for Environmental Monitoring: Design, Development and Applications. *Journal of Environmental Monitoring* 2004, 6 (8), 657–664. <https://doi.org/10.1039/B403975K>.
- (118) Liu, B.; Zhuang, J.; Wei, G. Recent Advances in the Design of Colorimetric

Sensors for Environmental Monitoring. *Environ Sci Nano* 2020, 7 (8), 2195–2213. <https://doi.org/10.1039/D0EN00449A>.

- (119) Rotariu, L.; Lagarde, F.; Jaffrezic-Renault, N.; Bala, C. Electrochemical Biosensors for Fast Detection of Food Contaminants – Trends and Perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016, 79, 80–87. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.12.017>.
- (120) Kimmel, D. W.; Leblanc, G.; Meschievitz, M. E.; Cliffel, D. E. Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry*. January 17, 2012, pp 685–707. <https://doi.org/10.1021/ac202878q>.
- (121) Ghosh, S.; Banji, D.; Sushma, K. Role of Chemical and Analytical Reagents in Colorimetric Estimation of Pharmaceuticals-a Review. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Researchijmpr IJMPr* 2013, 1 (5), 433–445.
- (122) Rocha, D. S.; Duarte, L. C.; Silva-Neto, H. A.; Chagas, C. L. S.; Santana, M. H. P.; Antoniosi Filho, N. R.; Coltro, W. K. T. Sandpaper-Based Electrochemical Devices Assembled on a Reusable 3D-Printed Holder to Detect Date Rape Drug in Beverages. *Talanta* 2021, 232. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122408>.
- (123) de Araujo, W. R.; Cardoso, T. M. G.; da Rocha, R. G.; Santana, M. H. P.; Muñoz, R. A. A.; Richter, E. M.; Paixão, T. R. L. C.; Coltro, W. K. T. Portable Analytical Platforms for Forensic Chemistry: A Review. *Anal Chim Acta* 2018, 1034, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.014>.
- (124) Torres, M. D. T.; de Araujo, W. R.; de Lima, L. F.; Ferreira, A. L.; de la Fuente-Nunez, C. Low-Cost Biosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2 at the Point of Care. *Matter* 2021, 4 (7), 2403–2416. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.05.003>.
- (125) Mu, X.; Xin, X.; Fan, C.; Li, X.; Tian, X.; Xu, K. F.; Zheng, Z. A Paper-Based Skin Patch for the Diagnostic Screening of Cystic Fibrosis. *Chemical Communications* 2015, 51 (29), 6365–6368. <https://doi.org/10.1039/c5cc00717h>.
- (126) Shimizu, F. M.; Pasqualetti, A. M.; Carvalho, R. M.; Jr, L. S. C.; Fontes, R. A.; Piazzetta, M. H. O.; Gobbi, A. L.; Lima, R. S. Combining Advanced Oxidation Principles and Electrochemical Detection for Indirect Determination of Phosphonate in Scale Inhibitors Employed in the Oilfield. *Electrochim Acta*

- 2023, 463, 142859. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2023.142859>.
- (127) Sousa, L. R.; Silva-Neto, H. A.; Campos, P. P. E.; Duarte-Junior, G. F.; Medeiros Junior, I.; Carvalho, R. M.; Coltro, W. K. T. A Portable Tool for Colorimetric Detection of Corrosion Inhibitors Using Paper-Based Analytical Devices. *Microchemical Journal* 2022, 183, 108024. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.108024>.
- (128) Choi, K.; Ng, A. H. C.; Fobel, R.; Wheeler, A. R. Digital Microfluidics. *Annual Review of Analytical Chemistry*. July 2012, pp 413–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143028>.
- (129) Fair, R. B. Digital Microfluidics: Is a True Lab-on-a-Chip Possible? *Microfluidics and Nanofluidics*. June 2007, pp 245–281. <https://doi.org/10.1007/s10404-007-0161-8>.
- (130) Pollack, M. G.; Fair, R. B.; Shenderov, A. D. Electrowetting-Based Actuation of Liquid Droplets for Microfluidic Applications. *Appl Phys Lett* 2000, 77 (11), 1725–1726. <https://doi.org/10.1063/1.1308534>.
- (131) Lee, J.; Moon, H.; Fowler, J.; Schoellhammer, T.; Kim, C. J. Electrowetting and Electrowetting-on-Dielectric for Microscale Liquid Handling. *Sens Actuators A Phys* 2002, 95 (2–3), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0924-4247\(01\)00734-8](https://doi.org/10.1016/S0924-4247(01)00734-8).
- (132) Moon, I.; Kim, J. Using EWOD (Electrowetting-on-Dielectric) Actuation in a Micro Conveyor System. *Sens Actuators A Phys* 2006, 130–131 (SPEC. ISS.), 537–544. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2005.12.016>.
- (133) Ruan, Q.; Guo, J.; Wang, Y.; Zou, F.; Lin, X.; Wang, W.; Yang, C. Digital Microfluidics for Bioanalysis. *Nanotechnology for Microfluidics* 2019, 47–82. <https://doi.org/10.1002/9783527818341.CH2>.
- (134) Abdelgawad, M.; Wheeler, A. R. The Digital Revolution: A New Paradigm for Microfluidics. *Advanced Materials* 2009, 21 (8), 920–925. <https://doi.org/10.1002/ADMA.200802244>.
- (135) Samiei, E.; Tabrizian, M.; Hoorfar, M. A Review of Digital Microfluidics as Portable Platforms for Lab-on a-Chip Applications. *Lab Chip* 2016, 16 (13), 2376–2396. <https://doi.org/10.1039/C6LC00387G>.
- (136) Kirby, A. E.; Wheeler, A. R. Digital Microfluidics: An Emerging Sample Preparation Platform for Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2013, 85 (13), 6178–

6184. <https://doi.org/10.1021/ac401150q>.
- (137) Jebrail, M. J.; Wheeler, A. R. Let's Get Digital: Digitizing Chemical Biology with Microfluidics. *Curr Opin Chem Biol* 2010, 14 (5), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.187>.
- (138) Malic, L.; Brassard, D.; Veres, T.; Tabrizian, M. Integration and Detection of Biochemical Assays in Digital Microfluidic LOC Devices. *Lab Chip* 2010, 10 (4), 418–431. <https://doi.org/10.1039/B917668C>.
- (139) Freire, S. L. S. Perspectives on Digital Microfluidics. *Sens Actuators A Phys* 2016, 250, 15–28. <https://doi.org/10.1016/J.SNA.2016.08.007>.
- (140) Van Grinsven, K. L.; Ashtiani, A. O.; Jiang, H. Fabrication and Actuation of an Electrowetting Droplet Array on a Flexible Substrate. *Micromachines* 2017, Vol. 8, Page 334 2017, 8 (11), 334. <https://doi.org/10.3390/MI8110334>.
- (141) Dixon, C.; Ng, A. H. C.; Fobel, R.; Miltenburg, M. B.; Wheeler, A. R. An Inkjet Printed, Roll-Coated Digital Microfluidic Device for Inexpensive, Miniaturized Diagnostic Assays. *Lab Chip* 2016, 16 (23), 4560–4568. <https://doi.org/10.1039/C6LC01064D>.
- (142) Drygiannakis, A. I.; Papathanasiou, A. G.; Boudouvis, A. G. On the Connection between Dielectric Breakdown Strength, Trapping of Charge, and Contact Angle Saturation in Electrowetting. *Langmuir* 2009, 25 (1), 147–152. [https://doi.org/10.1021/LA802551J/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA-2008-02551J\\_0008.GIF](https://doi.org/10.1021/LA802551J/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA-2008-02551J_0008.GIF).
- (143) Srinivasan, V.; Pamula, V. K.; Fair, R. B. An Integrated Digital Microfluidic Lab-on-a-Chip for Clinical Diagnostics on Human Physiological Fluids. *Lab Chip* 2004, 4 (4), 310–315. <https://doi.org/10.1039/B403341H>.
- (144) Fobel, R.; Kirby, A. E.; C Ng, A. H.; Farnood, R. R.; Wheeler, A. R.; Fobel, R.; C Ng, A. H.; Wheeler, A. R.; Kirby, A. E.; Farnood, R. R. Paper Microfluidics Goes Digital. 2014. <https://doi.org/10.1002/adma.201305168>.
- (145) Raccurt, O.; Berthier, J.; Clementz, P.; Borella, M.; Plissonnier, M. On the Influence of Surfactants in Electrowetting Systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2007, 17 (11), 2217. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/17/11/007>.
- (146) Li, J.; Ha, N. S.; Liu, T. 'Leo'; van Dam, R. M.; 'CJ' Kim, C. J. Ionic-Surfactant-Mediated Electro-Dewetting for Digital Microfluidics. *Nature* 2019 572:7770

- 2019, 572 (7770), 507–510. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1491-x>.
- (147) Abdelgawad, M.; Park, P.; Wheeler, A. R. Optimization of Device Geometry in Single-Plate Digital Microfluidics. *J Appl Phys* 2009, 105 (9). <https://doi.org/10.1063/1.3117216/147109>.
- (148) Cho, S. K.; Moon, H.; Kim, C. J. Creating, Transporting, Cutting, and Merging Liquid Droplets by Electrowetting-Based Actuation for Digital Microfluidic Circuits. *Journal of Microelectromechanical Systems* 2003, 12 (1), 70–80. <https://doi.org/10.1109/JMEMS.2002.807467>.
- (149) Cooney, C. G.; Chen, C. Y.; Emerling, M. R.; Nadim, A.; Sterling, J. D. Electrowetting Droplet Microfluidics on a Single Planar Surface. *Microfluid Nanofluidics* 2006, 2 (5), 435–446. <https://doi.org/10.1007/S10404-006-0085-8/FIGURES/10>.
- (150) Abdelgawad, M.; Freire, S. L. S.; Yang, H.; Wheeler, A. R. All-Terrain Droplet Actuation. *Lab Chip* 2008, 8 (5), 672–677. <https://doi.org/10.1039/B801516C>.
- (151) Rackus, D. G.; Dryden, M. D. M.; Lamanna, J.; Zaragoza, A.; Lam, B.; Kelley, S. O.; Wheeler, A. R. A Digital Microfluidic Device with Integrated Nanostructured Microelectrodes for Electrochemical Immunoassays. *Lab Chip* 2015, 15 (18), 3776–3784. <https://doi.org/10.1039/C5LC00660K>.
- (152) Liu, K.; He, Y.; Lu, Z.; Xu, Q.; Wang, L.; Liu, Z.; Khou, J.; Ye, J.; Liu, C.; Zhang, T. Laser-Induced Graphene-Based Digital Microfluidics (GDMF): A Versatile Platform with Sub-One-Dollar Cost. *Lab Chip* 2024, 24 (12), 3125–3134. <https://doi.org/10.1039/D4LC00258J>.
- (153) Yafia, M.; Shukla, S.; Najjaran, H. Fabrication of Digital Microfluidic Devices on Flexible Paper-Based and Rigid Substrates via Screen Printing. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2015, 25 (5), 057001. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/25/5/057001>.
- (154) Fan, Y.; Kong, X.; Chai, D.; Wei, B.; Zhang, Y. Low-Cost and Flexible Film-Based Digital Microfluidic Devices. *Micro Nano Lett* 2020, 15 (3), 163–165. <https://doi.org/10.1049/MNL.2019.0382>.
- (155) Abdelgawad, M.; Wheeler, A. R. Low-Cost, Rapid-Prototyping of Digital Microfluidics Devices. *Microfluid Nanofluidics* 2008, 4 (4), 349–355. <https://doi.org/10.1007/S10404-007-0190-3/FIGURES/4>.
- (156) Eswar, R.; Brodie, C. H.; Reguigui, H.; Collier, C. M. An Integrated and

- Automated Digital Microfluidic Device for Dairy Milk Droplet Actuation. *Microsystem Technologies* 2023, 29 (9), 1389–1398. <https://doi.org/10.1007/S00542-023-05522-W/FIGURES/9>.
- (157) Coelho, B. J.; Pinto, J. V.; Martins, J.; Rovisco, A.; Barquinha, P.; Fortunato, E.; Baptista, P. V.; Martins, R.; Igreja, R. Parylene C as a Multipurpose Material for Electronics and Microfluidics. *Polymers (Basel)* 2023, 15 (10), 2277. <https://doi.org/10.3390/POLYM15102277/S1>.
- (158) Li, C.; Jiang, H. Electrowetting-Driven Variable-Focus Microlens on Flexible Surfaces. *Appl Phys Lett* 2012, 100 (23). <https://doi.org/10.1063/1.4726038/282071>.
- (159) Sathyanarayanan, G.; Haapala, M.; Sikanen, T. Interfacing Digital Microfluidics with Ambient Mass Spectrometry Using Su-8 as Dielectric Layer. *Micromachines (Basel)* 2018, 9 (12). <https://doi.org/10.3390/mi9120649>.
- (160) Abadian, A.; Sepehri Manesh, S.; Jafarabadi Ashtiani, S. Hybrid Paper-Based Microfluidics: Combination of Paper-Based Analytical Device (MPAD) and Digital Microfluidics (DMF) on a Single Substrate. *Microfluid Nanofluidics* 2017, 21 (4), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10404-017-1899-2>.
- (161) Chen, S.; He, Z.; Choi, S.; Novosselov, I. V. Characterization of Inkjet-Printed Digital Microfluidics Devices. *Sensors* 2021, 21 (9), 3064. <https://doi.org/10.3390/S21093064/S1>.
- (162) Samiei, E.; Luka, G. S.; Najjaran, H.; Hoorfar, M. Integration of Biosensors into Digital Microfluidics: Impact of Hydrophilic Surface of Biosensors on Droplet Manipulation. *Biosens Bioelectron* 2016, 81, 480–486. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2016.03.035>.
- (163) Abadian, A.; Jafarabadi-Ashtiani, S. Paper-Based Digital Microfluidics. *Microfluid Nanofluidics* 2014, 16 (5), 989–995. <https://doi.org/10.1007/S10404-014-1345-7/FIGURES/7>.
- (164) Cai, J.; Jiang, J.; Jiang, J.; Tao, Y.; Gao, X.; Ding, M.; Fan, Y. Fabrication of Transparent and Flexible Digital Microfluidics Devices. *Micromachines (Basel)* 2022, 13 (4), 498. <https://doi.org/10.3390/MI13040498/S1>.
- (165) Jain, V.; Raj, T. P.; Deshmukh, R.; Patrikar, R. Design, Fabrication and Characterization of Low Cost Printed Circuit Board Based EWOD Device for Digital Microfluidics Applications. *Microsystem Technologies* 2017, 23 (2),

389–397. <https://doi.org/10.1007/s00542-015-2680-7>.

- (166) Srigunapalan, S.; Eydellant, I. A.; Simmons, C. A.; Wheeler, A. R. A Digital Microfluidic Platform for Primary Cell Culture and Analysis. *Lab Chip* 2011, *12* (2), 369–375. <https://doi.org/10.1039/C1LC20844F>.
- (167) Fair, R. B.; Khlystov, A.; Taylor, T. D.; Ivanov, V.; Evans, R. D.; Srinivasan, V.; Pamula, V. K.; Pollack, M. G.; Griffin, P. B.; Zhou, J. Chemical and Biological Applications of Digital-Microfluidic Devices. *IEEE Design and Test of Computers* 2007, *24* (1), 10–24. <https://doi.org/10.1109/MDT.2007.8>.
- (168) Knipes, A. K.; Summers, A.; Sklavounos, A. A.; Lamanna, J.; de Campos, R. P. S.; Narahari, T.; Dixon, C.; Fobel, R.; Ndjakani, Y. D.; Lubula, L.; Magazani, A.; Muyembe, J. J.; Lay, Y.; Pukuta, E.; Waku-Kouomou, D.; Hao, L.; Kayembe, J. K.; Fobel, C.; Dahmer, J.; Lee, A.; Ho, M.; Valenzuela, J. G. C.; Rackus, D. G.; Shih, R.; Seale, B.; Chang, A.; Paluku, G.; Rota, P. A.; Wheeler, A. R.; Scobie, H. M. Use of a Rapid Digital Microfluidics-Powered Immunoassay for Assessing Measles and Rubella Infection and Immunity in Outbreak Settings in the Democratic Republic of the Congo. *PLoS One* 2022, *17* (12), e0278749. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0278749>.
- (169) Tong, Z.; Xu, X.; Shen, C.; Yang, D.; Li, Y.; Li, Q.; Yang, W.; Xu, F.; Wu, Z.; Zhou, L.; Zhan, C.; Mao, H. All-in-One Multiple Extracellular Vesicle MiRNA Detection on a Miniaturized Digital Microfluidic Workstation. *Biosens Bioelectron* **2025**, *270*, 116976. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116976>.
- (170) Gu, Z.; Wu, M. L.; Yan, B. Y.; Wang, H. F.; Kong, C. Integrated Digital Microfluidic Platform for Colorimetric Sensing of Nitrite. *ACS Omega* 2020, *5* (19), 11196–11201. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01274>.
- (171) Elsayed, M.; Bodo, L.; Gairan, C.; Keuhnelian, P.; Dosajh, A.; Luk, V.; Schwandt, M.; French, J. L.; Ghosh, A.; Erickson, B.; Charlesworth, A. G.; Millman, J.; Wheeler, A. R. Toward Analysis at the Point of Need: A Digital Microfluidic Approach to Processing Multi-Source Sexual Assault Samples. *Advanced Science* 2024, *11* (41), 2405712. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202405712>.
- (172) Chen, Y.; Xia, L.; Liang, R.; Lu, Z.; Li, L.; Huo, B.; Li, G.; Hu, Y. Advanced Materials for Sample Preparation in Recent Decade. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2019, *120*, 115652. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.115652>.

- (173) Mitra, D.; Roy, S.; Bhattacharjee, S.; Chakrabarty, K.; Bhattacharya, B. B. On-Chip Sample Preparation for Multiple Targets Using Digital Microfluidics. *IEEE Transactions on Computer-Aided Design of Integrated Circuits and Systems* 2014, 33 (8), 1131–1144. <https://doi.org/10.1109/TCAD.2014.2323200>.
- (174) Steinbach, M. K.; Leipert, J.; Matzanke, T.; Tholey, A. Digital Microfluidics for Sample Preparation in Low-Input Proteomics. *Small Methods* 2024, 2400495. <https://doi.org/10.1002/SMTD.202400495>.
- (175) Ly, K.; Pathan, A.; Rackus, D. G. A Review of Electrochemical Sensing in Droplet Systems: Droplet and Digital Microfluidics. *Anal Chim Acta* **2025**, 1347, 343744. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2025.343744>.
- (176) Dixon, C.; Lamanna, J.; Wheeler, A. R. Direct Loading of Blood for Plasma Separation and Diagnostic Assays on a Digital Microfluidic Device. *Lab Chip* 2020, 20 (10), 1845–1855. <https://doi.org/10.1039/D0LC00302F>.
- (177) Narahari, T.; Dahmer, J.; Sklavounos, A.; Kim, T.; Satkauskas, M.; Clotea, I.; Ho, M.; Lamanna, J.; Dixon, C.; Rackus, D. G.; Silva, S. J. R. da; Pena, L.; Pardee, K.; Wheeler, A. R. Portable Sample Processing for Molecular Assays: Application to Zika Virus Diagnostics. *Lab Chip* 2022, 22 (9), 1748–1763. <https://doi.org/10.1039/D1LC01068A>.
- (178) *Inline, Online, Atline, and Offline concepts - REMBE® Kersting GmbH*. <https://www.rembe-kersting.com/en/knowledge-expertise/sampling-glossary/glossary-topic/inline-online-atline-and-offline-concepts> (accessed 2025-01-11).
- (179) He, Y.; Lu, Z.; Liu, K.; Wang, L.; Xu, Q.; Fan, H.; Liu, C.; Zhang, T. Photofabricated Channel-Digital Microfluidics (PCDMF): A Promising Lab-on-a-Chip Platform for Fully Integrated Digital PCR. *Sens Actuators B Chem* 2024, 399, 134851. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2023.134851>.
- (180) Ho, M.; Sathishkumar, N.; Sklavounos, A. A.; Sun, J.; Yang, I.; Nichols, K. P.; Wheeler, A. R. Digital Microfluidics with Distance-Based Detection – a New Approach for Nucleic Acid Diagnostics. *Lab Chip* 2023, 24 (1), 63–73. <https://doi.org/10.1039/D3LC00683B>.
- (181) Malic, L.; Veres, T.; Tabrizian, M. Nanostructured Digital Microfluidics for Enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging. *Biosens Bioelectron* 2011, 26 (5), 2053–2059. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.09.001>.

- (182) Yang, B.; Shi, L.; Tang, Q.; Liu, W.; Li, B.; Yang, C.; Jin, Y. Automated and Label-Free Detection of HIV DNA via Digital Microfluidics-Chemiluminescence Analysis. *Sens Actuators B Chem* 2023, 389, 133905. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2023.133905>.
- (183) Zhang, Y.; Liu, Y. Advances in Integrated Digital Microfluidic Platforms for Point-of-Care Diagnosis: A Review. *Sensors & Diagnostics* 2022, 1 (4), 648–672. <https://doi.org/10.1039/D2SD00031H>.
- (184) Velasco, L. G.; Rocha, D. S.; de Campos, R. P. S.; Coltro, W. K. T. Integration of Paper-Based Analytical Devices with Digital Microfluidics for Colorimetric Detection of Creatinine. *Analyst* 2024, 150 (1), 60–68. <https://doi.org/10.1039/D4AN00688G>.
- (185) Xu, X.; Cai, L.; Liang, S.; Zhang, Q.; Lin, S.; Li, M.; Yang, Q.; Li, C.; Han, Z.; Yang, C. Digital Microfluidics for Biological Analysis and Applications. *Lab Chip* 2023, 23 (5), 1169–1191. <https://doi.org/10.1039/D2LC00756H>.
- (186) De Campos, R. P. S.; Rackus, D. G.; Shih, R.; Zhao, C.; Liu, X.; Wheeler, A. R. “plug-n-Play” Sensing with Digital Microfluidics. *Anal Chem* 2019, 91 (3), 2506–2515. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05375>.
- (187) Vo, P. Q. N.; Husser, M. C.; Ahmadi, F.; Sinha, H.; Shih, S. C. C. Image-Based Feedback and Analysis System for Digital Microfluidics. *Lab Chip* 2017, 17 (20), 3437–3446. <https://doi.org/10.1039/c7lc00826k>.
- (188) Huang, Y.; Xu, J.; Liu, J.; Wang, X.; Chen, B. Disease-Related Detection with Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* 2017, Vol. 17, Page 2375 2017, 17 (10), 2375. <https://doi.org/10.3390/S17102375>.
- (189) Monošik, R.; Stred'ansky, M.; Šturdík, E. Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis. *J Clin Lab Anal* 2012, 26 (1), 22–34. <https://doi.org/10.1002/JCLA.20500>.
- (190) Karunakaran, C.; Rajkumar, R.; Bhargava, K. Introduction to Biosensors. *Biosens Bioelectron* 2015, 1–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>.
- (191) Ravina, X.; Kumar, D.; Prasad, M.; Mohan, H. Biological Recognition Elements. *Electrochemical Sensors: From Working Electrodes to Functionalization and Miniaturized Devices* 2022, 213–239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823148-7.00008-8>.

- (192) Naresh, V.; Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* 2021, Vol. 21, Page 1109 2021, 21 (4), 1109. <https://doi.org/10.3390/S21041109>.
- (193) Justino, C. I. L.; Freitas, A. C.; Pereira, R.; Duarte, A. C.; Rocha Santos, T. A. P. Recent Developments in Recognition Elements for Chemical Sensors and Biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2015, 68, 2–17. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.03.006>.
- (194) Krejcová, L.; Hýnek, D.; Adam, V.; Hubálek, J.; Kizek, R. Electrochemical Sensors and Biosensors for Influenza Detection. *Int J Electrochem Sci* 2012, 7 (11), 10779–10801. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)16902-1](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)16902-1).
- (195) Dhal, A.; Kalyani, T.; Ghorai, S.; Sahu, N. K.; Jana, S. K. Recent Development of Electrochemical Immunosensor for the Diagnosis of Dengue Virus NSI Protein: A Review. *Sensors International* 2020, 1, 100030. <https://doi.org/10.1016/J.SINTL.2020.100030>.
- (196) George, A.; Amrutha, M. S.; Srivastava, P.; Sai, V. V. R.; Sunil, S.; Srinivasan, R. Label-Free Detection of Chikungunya Non-Structural Protein 3 Using Electrochemical Impedance Spectroscopy. *J Electrochem Soc* 2019, 166 (14), B1356–B1363. <https://doi.org/10.1149/2.1081914JES/XML>.
- (197) Ilkhani, H.; Farhad, S. A Novel Electrochemical DNA Biosensor for Ebola Virus Detection. *Anal Biochem* 2018, 557, 151–155. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2018.06.010>.
- (198) Kaushik, A.; Tiwari, S.; Jayant, R. D.; Vashist, A.; Nikkhah-Moshaie, R.; El-Hage, N.; Nair, M. Electrochemical Biosensors for Early Stage Zika Diagnostics. *Trends Biotechnol* 2017, 35 (4), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.10.001>.
- (199) Halvaei, P.; Zandi, S.; Zandi, M. Biosensor as a Novel Alternative Approach for Early Diagnosis of Monkeypox Virus. *Int J Surg* 2023, 109 (1), 50–52. <https://doi.org/10.1097/JS9.000000000000115>.
- (200) Adel, S.; Firoozbakhtian, A.; Rabbani, H.; Hosseini, M.; Pebdeni, A. B.; Sadeghi, N.; Gilnezhad, J.; Ganjali, M. R. COVID-19 Electrochemical Immunosensor with Ag-MOF: Rapid and High-Selectivity Nasal Swab Testing for Effective Detection. *Anal Biochem* 2024, 689, 115500. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2024.115500>.

- (201) Cinti, S.; Fiore, L.; Massoud, R.; Cortese, C.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Arduini, F. Low-Cost and Reagent-Free Paper-Based Device to Detect Chloride Ions in Serum and Sweat. *Talanta* 2018, *179* (July 2017), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.030>.
- (202) Carter, L. J.; Garner, L. V.; Smoot, J. W.; Li, Y.; Zhou, Q.; Saveson, C. J.; Sasso, J. M.; Gregg, A. C.; Soares, D. J.; Beskid, T. R.; Jervey, S. R.; Liu, C. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci* 2020, *6* (5), 591–605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>.
- (203) Giri, B.; Pandey, S.; Shrestha, R.; Pokharel, K.; Ligler, F. S.; Neupane, B. B. Review of Analytical Performance of COVID-19 Detection Methods. *Anal Bioanal Chem* 2020, *413* (1), 35–48. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02889-x/Published>.
- (204) Balkourani, G.; Brouzgou, A.; Archonti, M.; Papandrianos, N.; Song, S.; Tsiakaras, P. Emerging Materials for the Electrochemical Detection of COVID-19. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2021, *893* (April), 115289. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115289>.
- (205) Song, Q.; Sun, X.; Dai, Z.; Gao, Y.; Gong, X.; Zhou, B.; Wu, J.; Wen, W. Point-of-Care Testing Detection Methods for COVID-19. *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry May 7, 2021, pp 1634–1660. <https://doi.org/10.1039/d0lc01156h>.
- (206) Paiva, E. L. S. de; Suzuki, E. M.; Gama, B. P. da S.; Lima, I. C. de; Carvalho, M. M. de; Paiva, A. C. de A.; Rodrigues, D. P.; Dias, T. da S.; Castro, N. J. C. de; Parente, A. T. Fibrose Cística No Contexto Pediátrico Hospitalar. *Revista Eletrônica Acervo Saúde* 2024, *24* (1), e14735–e14735. <https://doi.org/10.25248/REAS.E14735.2024>.
- (207) Mendes, I. C.; Pinheiro, D. da S.; Rebelo, A. C. S.; Carneiro, L. C.; Jesuino, R. S. A. Aspectos Gerais Da Triagem Neonatal No Brasil: Uma Revisão. *Revista Médica de Minas Gerais* 2020, *30*, e30008.
- (208) *Mental health: neurological disorders*. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/mental-health-neurological-disorders> (accessed 2025-01-11).
- (209) Kumar, M.; Bhatia, R.; Rawal, R. K. Applications of Various Analytical Techniques in Quality Control of Pharmaceutical Excipients. *J Pharm Biomed*

- Anal* 2018, 157, 122–136. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2018.05.023>.
- (210) Johnston, A.; Holt, D. W. Substandard Drugs: A Potential Crisis for Public Health. *Br J Clin Pharmacol* 2014, 78 (2), 218–243. <https://doi.org/10.1111/bcp.12298>.
- (211) Ozkan, S. A. Analytical Method Validation: The Importance for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Sciences*. Tabriz University of Medical Sciences March 1, 2018, pp 1–2. <https://doi.org/10.15171/PS.2018.01>.
- (212) *Drug Quality Sampling and Testing Programs | FDA*. <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/drug-quality-sampling-and-testing-programs> (accessed 2023-11-18).
- (213) Fibigr, J.; Šatínský, D.; Solich, P. Current Trends in the Analysis and Quality Control of Food Supplements Based on Plant Extracts. *Anal Chim Acta* 2018, 1036, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2018.08.017>.
- (214) Smriga, M. International Regulations on Amino Acid Use in Foods and Supplements and Recommendations to Control Their Safety Based on Purity and Quality. *J Nutr* 2020, 150, 2602S-2605S. <https://doi.org/10.1093/JN/NXAA093>.
- (215) Smriga, M. International Regulations on Amino Acid Use in Foods and Supplements and Recommendations to Control Their Safety Based on Purity and Quality. *J Nutr* 2020, 150, 2602S-2605S. <https://doi.org/10.1093/JN/NXAA093>.
- (216) Siddiqui, M. R.; AlOthman, Z. A.; Rahman, N. Analytical Techniques in Pharmaceutical Analysis: A Review. *Arabian Journal of Chemistry* 2017, 10, S1409–S1421. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2013.04.016>.
- (217) Westenberger, B. J.; Ellison, C. D.; Fussner, A. S.; Jenney, S.; Kolinski, R. E.; Lipe, T. G.; Lyon, R. C.; Moore, T. W.; Revelle, L. K.; Smith, A. P.; Spencer, J. A.; Story, K. D.; Toler, D. Y.; Wokovich, A. M.; Buhse, L. F. Quality Assessment of Internet Pharmaceutical Products Using Traditional and Non-Traditional Analytical Techniques. *Int J Pharm* 2005, 306 (1–2), 56–70. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2005.08.027>.
- (218) Oliveira, L. C.; Rocha, D. S.; Silva-Neto, H. A.; Silva, T. A. C.; Coltro, W. K. T. Polyester Resin and Graphite Flakes: Turning Conductive Ink to a Voltammetric Sensor for Paracetamol Sensing. *Microchimica Acta* 2023, 190

- (8), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S00604-023-05914-9/FIGURES/6>.
- (219) Goud, K. Y.; Satyanarayana, M.; Hayat, A.; Gobi, K. V.; Marty, J. L. Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors in Pharmaceutical Applications. *Nanoparticles in Pharmacotherapy* 2019, 195–216. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816504-1.00015-6>.
- (220) Qinqin, C.; Jia, Q.; Yuan, Z.; Huang, L. Environmental Risk Source Management System for the Petrochemical Industry. *Process Safety and Environmental Protection* 2014, 92 (3), 251–260. <https://doi.org/10.1016/J.PSEP.2013.01.004>.
- (221) Sharma, A.; Sharma, P.; Sharma, A.; Tyagi, R.; Dixit, A. Mini Review Recent Adv Petrochem Sci Hazardous Effects of Petrochemical Industries: A Review. *Recent Adv Petrochem Sci* 2017, 3 (2).
- (222) Ropital, F. Current and Future Corrosion Challenges for a Reliable and Sustainable Development of the Chemical, Refinery, and Petrochemical Industries. *Materials and Corrosion* 2009, 60 (7), 495–500. <https://doi.org/10.1002/MACO.200805171>.
- (223) Li, J.; Tang, M.; Ye, Z.; Chen, L.; Zhou, Y. Scale Formation and Control in Oil and Gas Fields: A Review. *J Dispers Sci Technol* 2017, 38 (5), 661–670. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1185953>.
- (224) Rosa, C. M. da; Menger, R. K.; Gomes, M. T.; Oliveira, C. Comportamento de Reagentes Inibidores de Incrustação Aplicados Na Perfuração de Poços de Petróleo. *Revista Materia* 2015, 20 (2), 514–522. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620150002.0051>.
- (225) Reis, M. I. P.; Da Silva, F. D. C.; Romeiro, G. A.; Rocha, A. A.; Ferreira, V. F. Mineral Scale Deposition in Surfaces: Problems and Opportunities in the Oil Industry. *Revista Virtual de Química* 2011, 3 (1), 2–13. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20110002>.
- (226) Maniego, A. R.; Sutton, A. T.; Gaborieau, M.; Castignolles, P. Assessment of the Branching Quantification in Poly(Acrylic Acid): Is It as Easy as It Seems? *Macromolecules* 2017, 50 (22), 9032–9041. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01411>.
- (227) dos Santos, E. V.; Bezerra Rocha, J. H.; de Araújo, D. M.; de Moura, D. C.; Martínez-Huitle, C. A. Decontamination of Produced Water Containing

- Petroleum Hydrocarbons by Electrochemical Methods: A Minireview. *Environmental Science and Pollution Research* 2014, 21 (14), 8432–8441. <https://doi.org/10.1007/S11356-014-2780-4/FIGURES/4>.
- (228) Rocha, J. H. B.; Gomes, M. M. S.; Fernandes, N. S.; Da Silva, D. R.; Martínez-Huitle, C. A. Application of Electrochemical Oxidation as Alternative Treatment of Produced Water Generated by Brazilian Petrochemical Industry. *Fuel Processing Technology* 2012, 96, 80–87. <https://doi.org/10.1016/J.FUPROC.2011.12.011>.
- (229) John A. Veil; Markus G. Puder; Deborah Elcock; Robert J. Redweik, Jr. *A white paper describing produced water from production of crude oil, natural gas, and coal bed methane*.
- (230) Antony, A.; Low, J. H.; Gray, S.; Childress, A. E.; Le-Clech, P.; Leslie, G. Scale Formation and Control in High Pressure Membrane Water Treatment Systems: A Review. *J Memb Sci* 2011, 383 (1–2), 1–16. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2011.08.054>.
- (231) WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. World Health Organization. <https://covid19.who.int/> (accessed 2023-03-10).
- (232) Nações Unidas Brasil. *Chefe da Organização Mundial da Saúde declara o fim da COVID-19 como uma emergência de saúde global | As Nações Unidas no Brasil*. <https://brasil.un.org/pt-br/230307-chefe-da-organiza%C3%A7%C3%A3o-mundial-da-sa%C3%BAde-declara-o-fim-da-covid-19-como-uma-emerg%C3%Aancia-de-sa%C3%BAde> (accessed 2025-01-12).
- (233) Samper, I. C.; McMahon, C. J.; Schenkel, M. S.; Clark, K. M.; Khamcharoen, W.; Anderson, L. B. R.; Terry, J. S.; Gallichotte, E. N.; Ebel, G. D.; Geiss, B. J.; Dandy, D. S.; Henry, C. S. Electrochemical Immunoassay for the Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein in Nasopharyngeal Samples. *Anal Chem* 2022, 94 (11), 4712–4719. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04966>.
- (234) Singh, B.; Datta, B.; Ashish, A.; Dutta, G. A Comprehensive Review on Current COVID-19 Detection Methods: From Lab Care to Point of Care Diagnosis. *Sensors International*. KeAi Communications Co. January 1, 2021, p 100119. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100119>.

- (235) U.S. Food & Drug Administration. FDA. 2023.
- (236) Corman, V. M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D. K. W.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M. L.; Mulders, D. G. J. C.; Haagmans, B. L.; Van Der Veer, B.; Van Den Brink, S.; Wijsman, L.; Goderski, G.; Romette, J. L.; Ellis, J.; Zambon, M.; Peiris, M.; Goossens, H.; Reusken, C.; Koopmans, M. P. G.; Drosten, C. Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-NCoV) by Real-Time RT-PCR. *Eurosurveillance* 2020, 25 (3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- (237) Ong, D. S. Y.; de Man, S. J.; Lindeboom, F. A.; Koeleman, J. G. M. Comparison of Diagnostic Accuracies of Rapid Serological Tests and ELISA to Molecular Diagnostics in Patients with Suspected Coronavirus Disease 2019 Presenting to the Hospital. *Clinical Microbiology and Infection* 2020, 26 (8), 1094.e7-1094.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.028>.
- (238) St John, A.; Price, C. P. Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. *Point-of-Care Testing Technologies Clin Biochem Rev* 2014, 35 (3), 155–167.
- (239) Mahmoudinobar, F.; Britton, D.; Montclare, J. K. Protein-Based Lateral Flow Assays for COVID-19 Detection. *Protein Engineering, Design and Selection*. Oxford University Press 2021, pp 1–10. <https://doi.org/10.1093/protein/gzab010>.
- (240) Stefano, J. S.; Orzari, L. O.; Silva-Neto, H. A.; de Ataíde, V. N.; Mendes, L. F.; Coltro, W. K. T.; Longo Cesar Paixão, T. R.; Janegitz, B. C. Different Approaches for Fabrication of Low-Cost Electrochemical Sensors. *Current Opinion in Electrochemistry*. Elsevier B.V. April 1, 2022, p 100893. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100893>.
- (241) Cardoso, R. M.; Kalinke, C.; Rocha, R. G.; dos Santos, P. L.; Rocha, D. P.; Oliveira, P. R.; Janegitz, B. C.; Bonacin, J. A.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Additive-Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensors: A Critical Review. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V. June 29, 2020, pp 73–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.028>.
- (242) Yáñez-Sedeño, P.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M. Electrochemical (Bio)Sensors: Promising Tools for Green Analytical Chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. Elsevier B.V. October 1, 2019,

pp 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.01.004>.

- (243) Singh, A.; Sharma, A.; Ahmed, A.; Sundramoorthy, A. K.; Furukawa, H.; Arya, S.; Khosla, A. Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope. *Biosensors*. MDPI September 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11090336>.
- (244) Yang, A.; Yan, F. Flexible Electrochemical Biosensors for Health Monitoring. *ACS Applied Electronic Materials*. American Chemical Society January 26, 2021, pp 53–67. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.0c00534>.
- (245) Hosseini, M.; Sobhanie, E.; Salehnia, F.; Xu, G.; Rabbani, H.; Naghavi Sheikholeslami, M.; Firoozbakhtian, A.; Sadeghi, N.; Hossein Farajollah, M.; Reza Ganjali, M.; Vosough, H. Development of Sandwich Electrochemiluminescence Immunosensor for COVID-19 Diagnosis by SARS-CoV-2 Spike Protein Detection Based on Au@BSA-Luminol Nanocomposites. *Bioelectrochemistry* 2022, 147, 108161. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEM.2022.108161>.
- (246) De Lima, L. F.; Ferreira, A. L.; Torres, M. D. T.; De Araujo, W. R.; De La Fuente-Nunez, C. Minute-Scale Detection of SARS-CoV-2 Using a Low-Cost Biosensor Composed of Pencil Graphite Electrodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2021, 118 (30), 2106724118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106724118/-/DCSupplemental>.
- (247) Ferreira, L. M. C.; Reis, I. F.; Martins, P. R.; Marcolino-Junior, L. H.; Bergamini, M. F.; Camargo, J. R.; Janegitz, B. C.; Vicentini, F. C. Using Low-Cost Disposable Immunosensor Based on Flexible PET Screen-Printed Electrode Modified with Carbon Black and Gold Nanoparticles for Sensitive Detection of SARS-CoV-2. *Talanta Open* 2023, 100201. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2023.100201>.
- (248) Asadzadeh-Firouzabadi, A.; Zare, H. R. Application of Cysteamine-Capped Gold Nanoparticles for Early Detection of Lung Cancer-Specific MiRNA (MiR-25) in Human Blood Plasma. *Analytical Methods* 2017, 9 (25), 3852–3861. <https://doi.org/10.1039/c7ay01098b>.
- (249) Ferreira, A. L.; de Lima, L. F.; Moraes, A. S.; Rubira, R. J. G.; Constantino, C. J. L.; Leite, F. L.; Delgado-Silva, A. O.; Ferreira, M. Development of a Novel Biosensor for Creatine Kinase (CK-MB) Using Surface Plasmon Resonance

- (SPR). *Appl Surf Sci* 2021, 554, 149565. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149565>.
- (250) Silva-Neto, H. A.; Cardoso, T. M. G.; McMahon, C. J.; Sgobbi, L. F.; Henry, C. S.; Coltro, W. K. T. Plug-and-Play Assembly of Paper-Based Colorimetric and Electrochemical Devices for Multiplexed Detection of Metals. *Analyst* 2021, 146 (11), 3463–3473. <https://doi.org/10.1039/d1an00176k>.
- (251) da Silva, V. A. O. P.; Tartare, V. A. P.; Kalinke, C.; de Oliveira, P. R.; de Souza, D. C.; Bonacin, J. A.; Janegitz, B. C. LAB-MADE 3D-PRINTED CONTACT ANGLE MEASUREMENT ADJUSTABLE HOLDER. *Quimica Nova*. Sociedade Brasileira de Quimica September 1, 2020, pp 1312–1319. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170624>.
- (252) Wagner, C. D.; Davis, L. E.; Zeller, M. V.; Taylor, J. A.; Raymond, R. H.; Gale, L. H. Empirical Atomic Sensitivity Factors for Quantitative Analysis by Electron Spectroscopy for Chemical Analysis. *Surface and Interface Analysis* 1981, 3 (5), 211–225. <https://doi.org/10.1002/SIA.740030506>.
- (253) Ryaguzov, A. P.; Yermekov, G. A.; Nurmamyrov, T. E.; Nemkayeva, R. R.; Guseinov, N. R.; Aliaskarov, R. K. Visible Raman Spectroscopy of Carbon Films Synthesized by Ion-Plasma Sputtering of Graphite. *J Mater Res* 2016, 31 (1), 127–136. <https://doi.org/10.1557/jmr.2015.391>.
- (254) Dias, A. A.; Chagas, C. L. S.; Silva-Neto, H. D. A.; Lobo-Junior, E. O.; Sgobbi, L. F.; De Araujo, W. R.; Paixaõ, T. R. L. C.; Coltro, W. K. T. Environmentally Friendly Manufacturing of Flexible Graphite Electrodes for a Wearable Device Monitoring Zinc in Sweat. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019, 11 (43), 39484–39492. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b12797>.
- (255) Maciel, C. C.; de Lima, L. F.; Ferreira, A. L.; de Araujo, W. R.; Ferreira, M. Development of a Flexible and Disposable Electrochemical Sensor Based on Poly (Butylene Adipate-Co-Terephthalate) and Graphite for Hydroquinone Sensing. *Sensors and Actuators Reports* 2022, 4. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100091>.
- (256) Silva-Neto, H. A.; Santhiago, M.; Duarte, L. C.; Coltro, W. K. T. Fully 3D Printing of Carbon Black-Thermoplastic Hybrid Materials and Fast Activation for Development of Highly Stable Electrochemical Sensors. *Sens Actuators B Chem* 2021, 349. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130721>.

- (257) de Araujo, W. R.; Frasson, C. M. R.; Ameku, W. A.; Silva, J. R.; Angnes, L.; Paixão, T. R. L. C. Single-Step Reagentless Laser Scribing Fabrication of Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Angewandte Chemie* 2017, 56 (47), 15113–15117. <https://doi.org/10.1002/anie.201708527>.
- (258) Duarte, L. C.; Baldo, T. A.; Silva-Neto, H. A.; Figueredo, F.; Janegitz, B. C.; Coltro, W. K. T. 3D Printing of Compact Electrochemical Cell for Sequential Analysis of Steroid Hormones. *Sens Actuators B Chem* 2022, 364, 131850. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131850>.
- (259) Zhao, T.; Jiang, L. Contact Angle Measurement of Natural Materials. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018, 161, 324–330. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.10.056>.
- (260) Poli, T.; Piccirillo, A.; Zoccali, A.; Conti, C.; Nervo, M.; Chiantore, O. The Role of Zinc White Pigment on the Degradation of Shellac Resin in Artworks. *Polym Degrad Stab* 2014, 102 (1), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.026>.
- (261) Wang, J.; Chen, L.; He, Y. Preparation of Environmental Friendly Coatings Based on Natural Shellac Modified by Diamine and Its Applications for Copper Protection. *Prog Org Coat* 2008, 62 (3), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2008.01.006>.
- (262) Wang, X.; Yu, D.-G.; Li, X.-Y.; Bligh, S. W. A.; Williams, G. R. Electrospun Medicated Shellac Nanofibers for Colon-Targeted Drug Delivery. *Int J Pharm* 2015, 490 (1–2), 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.077>.
- (263) Ntsendwana, B.; Mamba, B. B.; Sampath, S.; Arotiba, O. A. *Electrochemical Detection of Bisphenol a Using Graphene-Modified Glassy Carbon Electrode*; 2012; Vol. 7. [www.electrochemsci.org](http://www.electrochemsci.org).
- (264) Ganguly, A.; Sharma, S.; Papakonstantinou, P.; Hamilton, J. Probing the Thermal Deoxygenation of Graphene Oxide Using High-Resolution in Situ X-Ray-Based Spectroscopies. *Journal of Physical Chemistry C* 2011, 115 (34), 17009–17019. <https://doi.org/10.1021/jp203741y>.
- (265) Smith, T. E.; McCrory, S.; Dunzik-Gougar, M. Lou. Limited Oxidation of Irradiated Graphite Waste to Remove Surface Carbon-14. *Nuclear Engineering and Technology* 2013, 45 (2), 211–218. <https://doi.org/10.5516/NET.06.2012.025>.

- (266) Chen, J.; Tang, J.; Yan, F.; Ju, H. A Gold Nanoparticles/Sol-Gel Composite Architecture for Encapsulation of Immunoconjugate for Reagentless Electrochemical Immunoassay. *Biomaterials* 2006, 27 (10), 2313–2321. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.004>.
- (267) Rastogi, S.; Kumari, V.; Sharma, V.; Ahmad, F. J. Colorimetric Detection of Oxytocin in Bottle Gourd Using Cysteamine Functionalized Gold Nanoparticle (Cys-AuNPs). *Food Anal Methods* 2022, 15 (11), 2972–2983. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02350-y>.
- (268) Eskiköy Bayraktepe, D.; İnal, E. K.; Yazan, Z. Preparation and Characterization of a Pencil Graphite Electrode Modified with Gold Nanoparticles Decorated Poly (L-Methionine) and Its Use in the Simultaneous Sensitive Electrochemical Analysis of Ascorbic Acid, Acetaminophen, Chlorpheniramine Maleate, and Caffeine. *Microchemical Journal* 2021, 171. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106812>.
- (269) Oloketuyi, S.; Mazzega, E.; Zavašnik, J.; Pungjunun, K.; Kalcher, K.; de Marco, A.; Mehmeti, E. Electrochemical Immunosensor Functionalized with Nanobodies for the Detection of the Toxic Microalgae *Alexandrium Minutum* Using Glassy Carbon Electrode Modified with Gold Nanoparticles. *Biosens Bioelectron* 2020, 154. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112052>.
- (270) Pingarrón, J. M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. Gold Nanoparticle-Based Electrochemical Biosensors. *Electrochim Acta* 2008, 53 (19), 5848–5866. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005>.
- (271) Abolhasan, R.; Khalilzadeh, B.; Yousefi, H.; Samemaleki, S.; Chakari-Khiavi, F.; Ghorbani, F.; Pourakbari, R.; Kamrani, A.; Khataee, A.; Rad, T. S.; Rashidi, M. R.; Yousefi, M.; AghebatiMaleki, L. Ultrasensitive and Label Free Electrochemical Immunosensor for Detection of ROR1 as an Oncofetal Biomarker Using Gold Nanoparticles Assisted LDH/RGO Nanocomposite. *Sci Rep* 2021, 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94380-5>.
- (272) Layqah, L. A.; Eissa, S. An Electrochemical Immunosensor for the Corona Virus Associated with the Middle East Respiratory Syndrome Using an Array of Gold Nanoparticle-Modified Carbon Electrodes. *Microchimica Acta* 2019, 186 (4). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3345-5>.
- (273) Ionescu, R. E. Use of Cysteamine and Glutaraldehyde Chemicals for Robust

Functionalization of Substrates with Protein Biomarkers - an Overview on the Construction of Biosensors with Different Transductions. *Biosensors*. MDPI August 1, 2022, p 581. <https://doi.org/10.3390/bios12080581>.

- (274) Torres, M. D. T.; de Lima, L. F.; Ferreira, A. L.; de Araujo, W. R.; Callahan, P.; Dávila, A.; Abella, B. S.; de la Fuente-Nunez, C. Detection of SARS-CoV-2 with RAPID: A Prospective Cohort Study. *iScience* 2022, 25 (4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104055>.
- (275) Beduk, T.; Beduk, D.; de Oliveira Filho, J. I.; Zihnioglu, F.; Cicek, C.; Sertoz, R.; Arda, B.; Goksel, T.; Turhan, K.; Salama, K. N.; Timur, S. Rapid Point-of-Care COVID-19 Diagnosis with a Gold-Nanoarchitecture-Assisted Laser-Scribed Graphene Biosensor. *Anal Chem* 2021, 93 (24), 8585–8594. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c01444>.
- (276) Otieno, B. A.; Krause, C. E.; Jones, A. L.; Kremer, R. B.; Rusling, J. F. Cancer Diagnostics via Ultrasensitive Multiplexed Detection of Parathyroid Hormone-Related Peptides with a Microfluidic Immunoarray. *Anal Chem* 2016, 88 (18), 9269–9275. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02637>.
- (277) Carvajal, S.; Fera, S. N.; Jones, A. L.; Baldo, T. A.; Mosa, I. M.; Rusling, J. F.; Krause, C. E. Disposable Inkjet-Printed Electrochemical Platform for Detection of Clinically Relevant HER-2 Breast Cancer Biomarker. *Biosens Bioelectron* 2018, 104, 158–162. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2018.01.003>.
- (278) Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W. A.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; MCGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A. Bioanalytical Method Validation - a Revisit with a Decade of Progress. *Pharm Res* 2000, 17 (12), 1551–1557.
- (279) Valenga, M. G. P.; Martins, G.; Martins, T. A. C.; Didek, L. K.; Gevaerd, A.; Marcolino-Junior, L. H.; Bergamini, M. F. Biochar: An Environmentally Friendly Platform for Construction of a SARS-CoV-2 Electrochemical Immunosensor. *Science of the Total Environment* 2023, 858. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159797>.
- (280) Yakoh, A.; Pimpitak, U.; Rengpipat, S.; Hirankarn, N.; Chailapakul, O.; Chaiyo, S. Paper-Based Electrochemical Biosensor for Diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 Antibodies and Antigen. *Biosens Bioelectron* 2021, 176. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112912>.

- (281) Zhao, J.; Zhao, F.; Li, H.; Xiong, Y.; Cai, S.; Wang, C.; Chen, Y.; Han, N.; Yang, R. Magnet-Assisted Electrochemical Immunosensor Based on Surface-Clean Pd-Au Nanosheets for Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Electrochim Acta* 2022, 404. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139766>.
- (282) Zhai, Q.; Wang, X.; Hu, C.; Zhu, L.; Zhang, C.; Dai, L. Label-Free Electrochemical Immunosensor for Highly Sensitive COVID-19 Spike Protein Detection. *Sensors and Actuators Reports* 2022, 4, 100124. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2022.100124>.
- (283) Ferreira, A. L.; De Lima, L. F.; Torres, M. D. T.; De Araujo, W. R.; De La Fuente-Nunez, C. Low-Cost Optodiagnostic for Minute-Time Scale Detection of SARS-CoV-2. *ACS Nano* 2021, 15 (11), 17453–17462. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c03236>.
- (284) Mehmandoust, M.; Gumus, Z. P.; Soylak, M.; Erk, N. Electrochemical Immunosensor for Rapid and Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Antigen in the Nasal Sample. *Talanta* 2022, 240, 123211. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123211>.
- (285) Brazaca, L. C.; Imamura, A. H.; Gomes, N. O.; Almeida, M. B.; Scheidt, D. T.; Raymundo-Pereira, P. A.; Oliveira, O. N.; Janegitz, B. C.; Machado, S. A. S.; Carrilho, E. Electrochemical Immunosensors Using Electrodeposited Gold Nanostructures for Detecting the S Proteins from SARS-CoV and SARS-CoV-2. *Anal Bioanal Chem* 2022, 414 (18), 5507–5517. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03956-1>.
- (286) Nandeshwar, R.; Kumar, M. S.; Kondabagil, K.; Tallur, S. Electrochemical Immunosensor Platform Using Low-Cost ENIG PCB Finish Electrodes: Application for SARS-CoV-2 Spike Protein Sensing. *IEEE Access* 2021, 9, 154368–154377. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2021.3128668>.
- (287) Rahmati, Z.; Roushani, M.; Hosseini, H.; Choobin, H. Electrochemical Immunosensor with Cu<sub>2</sub>O Nanocube Coating for Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein. *Microchimica Acta* 2021, 188 (3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00604-021-04762-9/TABLES/2>.
- (288) Liu, X. Y.; Timar, M. C.; Varodi, A. M. Chinese Lacquer – Short Overview of Traditional Techniques and Material Characterisation for Conservation Purposes. *Pro Ligno* 2014, 10 (4), 25–34.

- (289) Brommelle, N.; Smith, P. *Urushi: proceedings of the urushi study group*.  
[https://books.google.ca/books?hl=pt-BR&lr=&id=uo5OAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA155&dq=Scientific+approach+to+traditional+lacquer+art.+In:+Urushi+%E2%80%93+Proceedings+of+Urushi+study+group,+10-27+June+1985&ots=QLXGxxVYrl&sig=nol8D4QTGPzrGuZdxzjkNs3ne6A&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Scientific%20approach%20to%20traditional%20lacquer%20art.%20In%3A%20Urushi%20%E2%80%93%20Proceedings%20of%20Urushi%20study%20group%2C%2010-27%20June%201985&f=false](https://books.google.ca/books?hl=pt-BR&lr=&id=uo5OAgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA155&dq=Scientific+approach+to+traditional+lacquer+art.+In:+Urushi+%E2%80%93+Proceedings+of+Urushi+study+group,+10-27+June+1985&ots=QLXGxxVYrl&sig=nol8D4QTGPzrGuZdxzjkNs3ne6A&redir_esc=y#v=onepage&q=Scientific%20approach%20to%20traditional%20lacquer%20art.%20In%3A%20Urushi%20%E2%80%93%20Proceedings%20of%20Urushi%20study%20group%2C%2010-27%20June%201985&f=false)  
 (accessed 2024-06-16).
- (290) Lu, R.; Miyakoshi, T. *Lacquer Chemistry and Applications*. Elsevier.  
[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=J\\_ReBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Technical+Studies+of+Chinese+Lacquer%E2%80%99,+in+Urushi:+Proceedings+of+the+1985+Urushi+Study+Group&ots=5w8AOmp-pZ&sig=jFhu06U\\_nEKCCSMHy7rnPc19HrY#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=J_ReBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Technical+Studies+of+Chinese+Lacquer%E2%80%99,+in+Urushi:+Proceedings+of+the+1985+Urushi+Study+Group&ots=5w8AOmp-pZ&sig=jFhu06U_nEKCCSMHy7rnPc19HrY#v=onepage&q&f=false)  
 (accessed 2024-06-16).
- (291) CN102189890A. Chinese Lacquer Color Painting, 2010.  
[https://patents.google.com/patent/CN102189890A/en?q=Chinese+lacquer+color+painting+\(CN102189890A\)](https://patents.google.com/patent/CN102189890A/en?q=Chinese+lacquer+color+painting+(CN102189890A)) (accessed 2024-06-16).
- (292) JP5013582B2. Lacquer-Based Paint, Its Production Method and Lacquer Coating Material, June 21, 2006.
- (293) Bakker, E.; Telting-Diaz, M. Electrochemical Sensors. *Anal Chem* 2002, 74 (12), 2781–2800. <https://doi.org/10.1021/AC0202278>.
- (294) Nery, E. W.; Kubota, L. T. Sensing Approaches on Paper-Based Devices: A Review. *Anal Bioanal Chem* 2013, 405 (24), 7573–7595. <https://doi.org/10.1007/S00216-013-6911-4/FIGURES/9>.
- (295) Kim, Y.; Lee, B.; Yang, S.; Byun, I.; Jeong, I.; Cho, S. M. Use of Copper Ink for Fabricating Conductive Electrodes and RFID Antenna Tags by Screen Printing. *Current Applied Physics* 2012, 12 (2), 473–478. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2011.08.003>.
- (296) da Silva, E. T. S. G.; Souto, D. E. P.; Barragan, J. T. C.; de F. Giarola, J.; de Moraes, A. C. M.; Kubota, L. T. Electrochemical Biosensors in Point-of-Care

- Devices: Recent Advances and Future Trends. *ChemElectroChem*. Wiley-VCH Verlag April 1, 2017, pp 778–794. <https://doi.org/10.1002/celc.201600758>.
- (297) Mohan, J. M.; Amreen, K.; Javed, A.; Dubey, S. K.; Goel, S. Emerging Trends in Miniaturized and Microfluidic Electrochemical Sensing Platforms. *Curr Opin Electrochem* 2022, 33, 100930. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2021.100930>.
- (298) Zhang, Y.; Zhou, N. Electrochemical Biosensors Based on Micro-Fabricated Devices for Point-of-Care Testing: A Review. *Electroanalysis* 2022, 34 (2), 168–183. <https://doi.org/10.1002/ELAN.202100281>.
- (299) Teymourian, H.; Barfidokht, A.; Wang, J. Electrochemical Glucose Sensors in Diabetes Management: An Updated Review (2010–2020). *Chem Soc Rev* 2020, 49 (21), 7671–7709. <https://doi.org/10.1039/D0CS00304B>.
- (300) Madhurantakam, S.; Muthukumar, S.; Prasad, S. Emerging Electrochemical Biosensing Trends for Rapid Diagnosis of COVID-19 Biomarkers as Point-of-Care Platforms: A Critical Review. *ACS Omega*. American Chemical Society April 19, 2022, pp 12467–12473. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00638>.
- (301) Khanmohammadi, A.; Aghaie, A.; Vahedi, E.; Qazvini, A.; Ghanei, M.; Afkhami, A.; Hajian, A.; Bagheri, H. Electrochemical Biosensors for the Detection of Lung Cancer Biomarkers: A Review. *Talanta* 2020, 206, 120251. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.120251>.
- (302) An, R.; Huang, Y.; Man, Y.; Valentine, R. W.; Kucukal, E.; Goreke, U.; Sekyonda, Z.; Piccone, C.; Owusu-Ansah, A.; Ahuja, S.; Little, J. A.; Gurkan, U. A. Emerging Point-of-Care Technologies for Anemia Detection. *Lab Chip* 2021, 21 (10), 1843–1865. <https://doi.org/10.1039/D0LC01235A>.
- (303) Saddique, Z.; Faheem, M.; Habib, A.; UIHasan, I.; Mujahid, A.; Afzal, A. Electrochemical Creatinine (Bio)Sensors for Point-of-Care Diagnosis of Renal Malfunction and Chronic Kidney Disorders. *Diagnostics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) May 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13101737>.
- (304) *Cuidado Neonatal — Ministério da Saúde*. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/saude-da-crianca/cuidado-neonatal> (accessed 2025-01-12).

- (305) Cutting, G. R. Cystic Fibrosis Genetics: From Molecular Understanding to Clinical Application. *Nat Rev Genet* 2015, 16 (1), 45–56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>.
- (306) Ďurč, P.; Foret, F.; Pokojová, E.; Homola, L.; Skříčková, J.; Herout, V.; Dastyh, M.; Vinohradská, H.; Kubáň, P. New Approach for Cystic Fibrosis Diagnosis Based on Chloride/Potassium Ratio Analyzed in Non-Invasively Obtained Skin-Wipe Sweat Samples by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductometric Detection. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409 (14), 3507–3514. <https://doi.org/10.1007/S00216-017-0318-6/FIGURES/4>.
- (307) Kubáň, P.; Greguš, M.; Pokojová, E.; Skříčková, J.; Foret, F. Double Opposite End Injection Capillary Electrophoresis with Contactless Conductometric Detection for Simultaneous Determination of Chloride, Sodium and Potassium in Cystic Fibrosis Diagnosis. *J Chromatogr A* 2014, 1358, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.091>.
- (308) Toh, H. S.; Batchelor-Mcauley, C.; Tschulik, K.; Compton, R. G. Electrochemical Detection of Chloride Levels in Sweat Using Silver Nanoparticles: A Basis for the Preliminary Screening for Cystic Fibrosis. *Analyst* 2013, 138 (15), 4292–4297. <https://doi.org/10.1039/C3AN00843F>.
- (309) Gonzalo-Ruiz, J.; Mas, R.; de Haro, C.; Cabruja, E.; Camero, R.; Alonso-Lomillo, M. A.; Muñoz, F. J. Early Determination of Cystic Fibrosis by Electrochemical Chloride Quantification in Sweat. *Biosens Bioelectron* 2009, 24 (6), 1788–1791. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.051>.
- (310) Ray, T. R.; Ivanovic, M.; Curtis, P. M.; Franklin, D.; Guventurk, K.; Jeang, W. J.; Chafetz, J.; Gaertner, H.; Young, G.; Rebollo, S.; Model, J. B.; Lee, S. P.; Ciraldo, J.; Reeder, J. T.; Hourlier-Fargette, A.; Bandodkar, A. J.; Choi, J.; Aranyosi, A. J.; Ghaffari, R.; McColley, S. A.; Haymond, S.; Rogers, J. A. Soft, Skin-Interfaced Sweat Stickers for Cystic Fibrosis Diagnosis and Management. *Sci Transl Med* 2021, 13 (587). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd8109>.
- (311) Hammond, K. B.; Turcios, N. L.; Gibson, L. E. Clinical Evaluation of the Macroduct Sweat Collection System and Conductivity Analyzer in the Diagnosis of Cystic Fibrosis. *J Pediatr* 1994, 124 (2), 255–260. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(94\)70314-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(94)70314-0).

- (312) Taghizadeh-Behbahani, M.; Hemmateenejad, B.; Shamsipur, M.; Tavassoli, A. A Paper-Based Length of Stain Analytical Device for Naked Eye (Readout-Free) Detection of Cystic Fibrosis. *Anal Chim Acta* 2019, *1080*, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.06.050>.
- (313) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *Journal of Physical Chemistry* 1982, *86* (17), 3391–3395. [https://doi.org/10.1021/J100214A025/ASSET/J100214A025.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/J100214A025/ASSET/J100214A025.FP.PNG_V03).
- (314) Kumar, P. A.; Pradeep, A.; Nair, B. K. G.; Babu, T. G. S.; Suneesh, P. V. Silver-Manganese Nanocomposite Modified Screen-Printed Carbon Electrode in the Fabrication of an Electrochemical, Disposable Biosensor Strip for Cystic Fibrosis. *Microchimica Acta* 2022, *189* (9), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00604-022-05431-1/TABLES/1>.
- (315) Xing, S.; Xu, H.; Chen, J.; Shi, G.; Jin, L. Nafion Stabilized Silver Nanoparticles Modified Electrode and Its Application to Cr(VI) Detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2011, *652* (1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2010.03.035>.
- (316) *Dosagem de cloreto no suor*. <https://www.apaeaps.org.br/wp-content/uploads/2024/06/Teste-do-suor.pdf> (accessed 2025-01-12).
- (317) Phillips, C.; Al-Ahmadi, A.; Potts, S. J.; Claypole, T.; Deganello, D. The Effect of Graphite and Carbon Black Ratios on Conductive Ink Performance. *J Mater Sci* 2017, *52* (16), 9520–9530. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1114-6>.
- (318) Arduini, F.; Di Giorgio, F.; Amine, A.; Cataldo, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Electroanalytical Characterization of Carbon Black Nanomaterial Paste Electrode: Development of Highly Sensitive Tyrosinase Biosensor for Catechol Detection. *Anal Lett* 2010, *43* (10–11), 1688–1702. <https://doi.org/10.1080/00032711003653932>.
- (319) Vicentini, F. C.; Ravanini, A. E.; Figueiredo-Filho, L. C. S.; Iniesta, J.; Banks, C. E.; Fatibello-Filho, O. Imparting Improvements in Electrochemical Sensors: Evaluation of Different Carbon Blacks That Give Rise to Significant Improvement in the Performance of Electroanalytical Sensing Platforms. *Electrochim Acta* 2015, *157*, 125–133. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2014.11.204>.
- (320) Cinti, S.; Arduini, F.; Carbone, M.; Sansone, L.; Cacciotti, I.; Moscone, D.;

- Palleschi, G. Screen-Printed Electrodes Modified with Carbon Nanomaterials: A Comparison among Carbon Black, Carbon Nanotubes and Graphene. *Electroanalysis* 2015, 27 (9), 2230–2238. <https://doi.org/10.1002/ELAN.201500168>.
- (321) Renedo, O. D.; Julia Arcos Martínez, M. A Novel Method for the Anodic Stripping Voltammetry Determination of Sb(III) Using Silver Nanoparticle-Modified Screen-Printed Electrodes. *Electrochem commun* 2007, 9 (4), 820–826. <https://doi.org/10.1016/J.ELECOM.2006.11.016>.
- (322) Safavi, A.; Farjami, F. Electrodeposition of Gold–Platinum Alloy Nanoparticles on Ionic Liquid–Chitosan Composite Film and Its Application in Fabricating an Amperometric Cholesterol Biosensor. *Biosens Bioelectron* 2011, 26 (5), 2547–2552. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2010.11.002>.
- (323) Khodashenas, B.; Ghorbani, H. R. Synthesis of Silver Nanoparticles with Different Shapes. *Arabian Journal of Chemistry* 2019, 12 (8), 1823–1838. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2014.12.014>.
- (324) Abbas, A.; Amin, H. M. A. Silver Nanoparticles Modified Electrodes for Electroanalysis: An Updated Review and a Perspective. *Microchemical Journal* 2022, 175, 107166. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.107166>.
- (325) Mukherji, S.; Bharti, S.; Shukla, G.; Mukherji, S. Synthesis and Characterization of Size- And Shape-Controlled Silver Nanoparticles. *Physical Sciences Reviews* 2019, 4 (1). [https://doi.org/10.1515/PSR-2017-0082/ASSET/GRAPHIC/J\\_PSR-2017-0082\\_FIG\\_004.JPG](https://doi.org/10.1515/PSR-2017-0082/ASSET/GRAPHIC/J_PSR-2017-0082_FIG_004.JPG).
- (326) Preethi, S.; Sangaranarayanan, M. V. Shape-Controlled Electrodeposition of Silver Using Chitosan as Structure-Directing Agent on Disposable Pencil Graphite Electrodes: Low-Cost Electrocatalysts for the Detection of Hydrogen Peroxide and Hydrazine Hydrate. *Journal of Solid State Electrochemistry* 2020, 24 (11–12), 2773–2788. <https://doi.org/10.1007/S10008-020-04579-1/TABLES/3>.
- (327) Castro, L. F.; Silva-Neto, H. A.; Sousa, L. R.; de Araujo, W. R.; Coltro, W. K. T. Silicone Glue-Based Graphite Ink Incorporated on Paper Platform as an Affordable Approach to Construct Stable Electrochemical Sensors. *Talanta* 2023, 251, 123812. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2022.123812>.
- (328) Pradela-Filho, L. A.; Araújo, D. A. G.; Takeuchi, R. M.; Santos, A. L. Nail Polish

- and Carbon Powder: An Attractive Mixture to Prepare Paper-Based Electrodes. *Electrochim Acta* 2017, 258, 786–792. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.11.127>.
- (329) Chen, H.; Zhang, Z.; Cai, D.; Zhang, S.; Zhang, B.; Tang, J.; Wu, Z. A Hydrogen Peroxide Sensor Based on Ag Nanoparticles Electrodeposited on Natural Nano-Structure Attapulgite Modified Glassy Carbon Electrode. *Talanta* 2011, 86 (1), 266–270. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.09.011>.
- (330) Choi, Y.-J.; Luo, T.-J. M. Electrochemical Properties of Silver Nanoparticle Doped Aminosilica Nanocomposite. *International Journal of Electrochemistry* 2011, 2011 (1), 404937. <https://doi.org/10.4061/2011/404937>.
- (331) De Araujo, W. R.; Paixão, W. R. Fabrication of Disposable Electrochemical Devices Using Silver Ink and Office Paper. *Analyst* 2014, 139 (11), 2742–2747. <https://doi.org/10.1039/c4an00097h>.
- (332) de Lima, L. F.; de Araujo, W. R. Laser-Scribed Graphene on Polyetherimide Substrate: An Electrochemical Sensor Platform for Forensic Determination of Xylazine in Urine and Beverage Samples. *Microchimica Acta* 2022, 189 (12), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S00604-022-05566-1/TABLES/2>.
- (333) Qin, X.; Wang, H.; Miao, Z.; Wang, X.; Fang, Y.; Chen, Q.; Shao, X. Synthesis of Silver Nanowires and Their Applications in the Electrochemical Detection of Halide. *Talanta* 2011, 84 (3), 673–678. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.01.064>.
- (334) Cunha-Silva, H.; Julia Arcos-Martinez, M. Development of a Selective Chloride Sensing Platform Using a Screen-Printed Platinum Electrode. *Talanta* 2019, 195 (September 2018), 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.008>.
- (335) Chiu, M. H.; Cheng, W. L.; Muthuraman, G.; Hsu, C. T.; Chung, H. H.; Zen, J. M. A Disposable Screen-Printed Silver Strip Sensor for Single Drop Analysis of Halide in Biological Samples. *Biosens Bioelectron* 2009, 24 (10), 3008–3013. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2009.03.004>.
- (336) Bujes-Garrido, J.; Arcos-Martínez, M. J. Disposable Sensor for Electrochemical Determination of Chloride Ions. *Talanta* 2016, 155, 153–157. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2016.04.038>.
- (337) Yu, M.; Liu, P.; Zhang, S.; Liu, J.; An, J.; Bulletin, S. L.-M. R.; 2012, undefined.

Preparation of Graphene–Ag Composites and Their Application for Electrochemical Detection of Chloride. *Elsevier M Yu, P Liu, S Zhang, J Liu, J An, S Li Materials Research Bulletin, 2012•Elsevier.*

- (338) Bin, Q.; Wang, M.; Wang, L. Ag Nanoparticles Decorated into Metal-Organic Framework (Ag NPs/ZIF-8) for Electrochemical Sensing of Chloride Ion. *Nanotechnology* 2020, 31 (12), 125601. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/AB5CDE>.
- (339) *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 166, de 24/07/2017.* [https://anvisa.gov.br/legis/comunicacao/ato/ato\\_rdc\\_166\\_2017.html](https://anvisa.gov.br/legis/comunicacao/ato/ato_rdc_166_2017.html) (accessed 2025-01-12).
- (340) *Full text of "Appendix F Guidelines For Standard Method AOAC 2016."* [https://archive.org/stream/AppendixFGuidelinesForStandardMethodAOAC2016/Appendix%20F%20-%20Guidelines%20for%20Standard%20Method%20-%20AOAC%202016\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/AppendixFGuidelinesForStandardMethodAOAC2016/Appendix%20F%20-%20Guidelines%20for%20Standard%20Method%20-%20AOAC%202016_djvu.txt) (accessed 2025-01-12).
- (341) Dryden, M. D. M.; Wheeler, A. R. DStat: A Versatile, Open-Source Potentiostat for Electroanalysis and Integration. *PLoS One* 2015, 10 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140349>.
- (342) Zhang, Y.; Liu, Y. Advances in Integrated Digital Microfluidic Platforms for Point-of-Care Diagnosis: A Review. *Sensors & Diagnostics* 2022, 1 (4), 648–672. <https://doi.org/10.1039/d2sd00031h>.
- (343) Farzbod, A.; Moon, H. Integration of Reconfigurable Potentiometric Electrochemical Sensors into a Digital Microfluidic Platform. *Biosens Bioelectron* 2018, 106, 37–42. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2018.01.048>.
- (344) Dei, M.; Muñoz, X. Electrochemical Miniaturized Devices. *Micro- and Nanotechnology Enabled Applications for Portable Miniaturized Analytical Systems* 2022, 109–140. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823727-4.00014-6>.
- (345) Orzari, L. O.; Kalinke, C.; Silva-Neto, H. A.; Rocha, D. S.; Camargo, J. R.; Coltro, W. K. T.; Janegitz, B. C. Screen-Printing vs Additive Manufacturing Approaches: Recent Aspects and Trends Involving the Fabrication of Electrochemical Sensors. *Anal Chem* **2025**.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c05786>

- (346) Karuwan, C.; Sukthang, K.; Wisitsoraat, A.; Phokharatkul, D.; Patthanasettakul, V.; Wechsator, W.; Tuantranont, A. Electrochemical Detection on Electrowetting-on-Dielectric Digital Microfluidic Chip. *Talanta* 2011, *84* (5), 1384–1389. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.03.073>.
- (347) Ruecha, N.; Lee, J.; Chae, H.; Cheong, H.; Soum, V.; Preechakasedkit, P.; Chailapakul, O.; Tanev, G.; Madsen, J.; Rodthongkum, N.; Kwon, O. S.; Shin, K. Paper-Based Digital Microfluidic Chip for Multiple Electrochemical Assay Operated by a Wireless Portable Control System. *Adv Mater Technol* 2017, *2* (3), 1600267. <https://doi.org/10.1002/ADMT.201600267>.
- (348) Zhang, Y.; Liu, J.; Lo, T. W.; Kim, Y.; Lucien, F.; Dong, H.; Liu, Y. A Digital Microfluidic Device Integrated with Electrochemical Sensor and 3D Matrix for Detecting Soluble PD-L1. *Biosens Bioelectron X* 2024, *19*, 100490. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSX.2024.100490>.
- (349) Ugsornrat, K.; Saenkhamai, A.; Chantaraklud, A.; Pasakon, P.; Karuwan, C.; Sriprachuabwong, C.; Atthi, N.; Wisitsoraat, A.; Tuantranont, A. Electrochemical Sensing Performances of Screen-Printed Graphene-Carbon-Paste Electrodes on Digital Microfluidic Chips. *IEEE Sens J* 2023, *23* (23), 28613–28625. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2023.3327827>.
- (350) Ugsornrat, K.; Maturos, T.; Pasakon, P.; Karuwan, C.; Pogfay, T.; Sriprachuabwong, C.; Wisitsoraat, A.; Tuantranont, A. Electrowetting-on-Dielectric Chip with Integrated Screen-Printed Electrochemical Sensor for Rapid Chemical Analysis. *Materials Science and Engineering: B* 2018, *238–239*, 36–41. <https://doi.org/10.1016/J.MSEB.2018.12.011>.
- (351) Dryden, M. D. M.; Rackus, D. D. G.; Shamsi, M. H.; Wheeler, A. R. Integrated Digital Microfluidic Platform for Voltammetric Analysis. *Anal Chem* 2013, *85* (18), 8809–8816. [https://doi.org/10.1021/AC402003V/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AC-2013-02003V\\_0006.GIF](https://doi.org/10.1021/AC402003V/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AC-2013-02003V_0006.GIF).
- (352) Shamsi, M. H.; Choi, K.; Ng, A. H. C.; Dean Chamberlain, M.; Wheeler, A. R. Electrochemiluminescence on Digital Microfluidics for MicroRNA Analysis. *Biosens Bioelectron* 2016, *77*, 845–852. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2015.10.036>.

- (353) de Campos, R. P. S.; Aggarwal, D.; Chan, N. W. C.; Jemere, A. B. An Integrated Digital Microfluidic Electrochemical Impedimetric Lipopolysaccharide Sensor Based on Toll-like Receptor-4 Protein. *Biosens Bioelectron X* 2024, 16, 100433. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSX.2023.100433>.
- (354) Rocha, D. S.; Duarte, L. C.; Silva-Neto, H. A.; Chagas, C. L. S.; Santana, M. H. P.; Antoniosi Filho, N. R.; Coltro, W. K. T. Sandpaper-Based Electrochemical Devices Assembled on a Reusable 3D-Printed Holder to Detect Date Rape Drug in Beverages. *Talanta* 2021, 232. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122408>.
- (355) Oh, J.-M.; Chow, K.-F. Recent Developments in Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Methods* 2015, 7, 7951–7960. <https://doi.org/10.1039/c5ay01724f>.
- (356) Baharfar, M.; Rahbar, M.; Tajik, M.; Liu, G. Engineering Strategies for Enhancing the Performance of Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Biosens Bioelectron* 2020, 167, 112506. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2020.112506>.
- (357) Mettakoonpitak, J.; Boehle, K.; Nantaphol, S.; Teengam, P.; Adkins, J. A.; Srisa-Art, M.; Henry, C. S. Electrochemistry on Paper-Based Analytical Devices: A Review. *Electroanalysis* 2016, 28 (7), 1420–1436. <https://doi.org/10.1002/elan.201501143>.
- (358) Zhang, H.; Li, X.; Zhu, Q.; Wang, Z. The Recent Development of Nanomaterials Enhanced Paper-Based Electrochemical Analytical Devices. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2022, 909, 116140. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2022.116140>.
- (359) Caratelli, V.; Di Meo, E.; Colozza, N.; Fabiani, L.; Fiore, L.; Moscone, D.; Arduini, F. Nanomaterials and Paper-Based Electrochemical Devices: Merging Strategies for Fostering Sustainable Detection of Biomarkers. *J Mater Chem B* 2022, 10 (44), 9021–9039. <https://doi.org/10.1039/D2TB00387B>.
- (360) Mahmoudi, Z.; Tashkhourian, J.; Hemmateenejad, B. A Disposable Paper-Based Microfluidic Electrochemical Cell Equipped with Graphite-Supported Gold Nanoparticles Modified Electrode for Gallic Acid Determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2022, 920, 116626. <https://doi.org/10.1016/J.JELECHEM.2022.116626>.

- (361) Anzar, N.; Suleman, S.; Kumar, R.; Rawal, R.; Pundir, C. S.; Pilloton, R.; Narang, J. Electrochemical Sensor for Bilirubin Detection Using Paper-Based Screen-Printed Electrodes Functionalized with Silver Nanoparticles. *Micromachines* 2022, Vol. 13, Page 1845 2022, 13 (11), 1845. <https://doi.org/10.3390/MI13111845>.
- (362) Pereira, D. F.; Santana, E. R.; Spinelli, A. Electrochemical Paper-Based Analytical Devices Containing Magnetite Nanoparticles for the Determination of Vitamins B2 and B6. *Microchemical Journal* 2022, 179, 107588. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2022.107588>.
- (363) e Silva, R. F.; Longo Cesar Paixão, T. R.; Der Torossian Torres, M.; de Araujo, W. R. Simple and Inexpensive Electrochemical Paper-Based Analytical Device for Sensitive Detection of Pseudomonas Aeruginosa. *Sens Actuators B Chem* 2020, 308, 127669. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2020.127669>.
- (364) Kumar, S.; Umar, M.; Saifi, A.; Kumar, S.; Augustine, S.; Srivastava, S.; Malhotra, B. D. Electrochemical Paper Based Cancer Biosensor Using Iron Oxide Nanoparticles Decorated PEDOT:PSS. *Anal Chim Acta* 2019, 1056, 135–145. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2018.12.053>.
- (365) Koo, Y.; Shanov, V. N.; Yun, Y. Carbon Nanotube Paper-Based Electroanalytical Devices. *Micromachines* 2016, Vol. 7, Page 72 2016, 7 (4), 72. <https://doi.org/10.3390/MI7040072>.
- (366) Figueredo, F.; Jesús González-Pabón, M.; Cortón, E. Low Cost Layer by Layer Construction of CNT/Chitosan Flexible Paper-Based Electrodes: A Versatile Electrochemical Platform for Point of Care and Point of Need Testing. *Electroanalysis* 2018, 30 (3), 497–508. <https://doi.org/10.1002/ELAN.201700782>.
- (367) Jomma, E. Y.; Bao, N.; Ding, S. N. A Pencil Drawn Microelectrode on Paper and Its Application in Two-Electrode Electrochemical Sensors. *Analytical Methods* 2017, 9 (23), 3513–3518. <https://doi.org/10.1039/C7AY00605E>.
- (368) Karyakin, A. A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications.
- (369) Li, J.; Jiang, Y.; Zhai, Y.; Liu, H.; Li, L. Prussian Blue/Reduced Graphene Oxide Composite for the Amperometric Determination of Dopamine and Hydrogen Peroxide. *Anal Lett* 2015, 48 (17), 2786–2798.

<https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1052141>.

- (370) Karyakin, A. A. Advances of Prussian Blue and Its Analogues in (Bio)Sensors. *Curr Opin Electrochem* 2017, 5 (1), 92–98. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2017.07.006>.
- (371) Matias, T. A.; de Faria, L. V.; Rocha, R. G.; Silva, M. N. T.; Nossol, E.; Richter, E. M.; Muñoz, R. A. A. Prussian Blue-Modified Laser-Induced Graphene Platforms for Detection of Hydrogen Peroxide. *Microchimica Acta* 2022, 189 (5), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S00604-022-05295-5/TABLES/3>.
- (372) Kalinke, C.; de Oliveira, P. R.; Marcolino-Júnior, L. H.; Bergamini, M. F. Nanostructures of Prussian Blue Supported on Activated Biochar for the Development of a Glucose Biosensor. *Talanta* 2024, 274, 126042. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.126042>.
- (373) Kongkaew, S.; Cotchim, S.; Kanatharana, P.; Thavarungkul, P.; Limbut, W. Disposable Label-Free Electrochemical Immunosensor Based on Prussian Blue Nanocubes for Four Breast Cancer Tumor Markers. *Talanta* 2023, 255, 124229. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2022.124229>.
- (374) Rajarathinam, T.; Kwon, M.; Thirumalai, D.; Kim, S.; Lee, S.; Yoon, J. H.; Paik, H. jong; Kim, S.; Lee, J.; Ha, H. K.; Chang, S. C. Polymer-Dispersed Reduced Graphene Oxide Nanosheets and Prussian Blue Modified Biosensor for Amperometric Detection of Sarcosine. *Anal Chim Acta* 2021, 1175, 338749. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2021.338749>.
- (375) Kalinke, C.; de Oliveira, P. R.; Janegitz, B. C.; Bonacin, J. A. Prussian Blue Nanoparticles Anchored on Activated 3D Printed Sensor for the Detection of L-Cysteine. *Sens Actuators B Chem* 2022, 362. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131797>.
- (376) Yin, J.; Ren, W.; Yang, G.; Duan, J.; Huang, X.; Fang, R.; Li, C.; Li, T.; Yin, Y.; Hou, Y.; Kim, S. W.; Wu, G. L-Cysteine Metabolism and Its Nutritional Implications. *Mol Nutr Food Res* 2016, 60 (1), 134–146. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201500031>.
- (377) Sameem, B.; Khan, F.; Niaz, K. L-Cysteine. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* 2019, 53–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00007-2>.
- (378) Clemente Plaza, N.; Reig García-Galbis, M.; Martínez-Espinosa, R. M. Effects

of the Usage of L-Cysteine (l-Cys) on Human Health. *Molecules* 2018, 23 (3), E575–E575. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23030575>.

- (379) Rehman, T.; Shabbir, M. A.; Inam-Ur-Raheem, M.; Manzoor, M. F.; Ahmad, N.; Liu, Z. W.; Ahmad, M. H.; Siddeeg, A.; Abid, M.; Aadil, R. M. Cysteine and Homocysteine as Biomarker of Various Diseases. *Food Sci Nutr* 2020, 8 (9), 4696–4707. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1818>.
- (380) Bonacin, J. A.; Dos Santos, P. L.; Katic, V.; Foster, C. W.; Banks, C. E. Use of Screen-Printed Electrodes Modified by Prussian Blue and Analogues in Sensing of Cysteine. *Electroanalysis* 2018, 30 (1), 170–179. <https://doi.org/10.1002/ELAN.201700628>.
- (381) *EasySep™ Red Blood Cell (RBC) Depletion Reagent | STEMCELL Technologies*. <https://www.stemcell.com/products/easysep-rbc-depletion-reagent.html> (accessed 2025-01-13).
- (382) Fobel, R.; Fobel, C.; Wheeler, A. R. DropBot: An Open-Source Digital Microfluidic Control System with Precise Control of Electrostatic Driving Force and Instantaneous Drop Velocity Measurement. *Appl Phys Lett* 2013, 102 (19). <https://doi.org/10.1063/1.4807118>.
- (383) Ng, A. H. C.; Choi, K.; Luoma, R. P.; Robinson, J. M.; Wheeler, A. R. Digital Microfluidic Magnetic Separation for Particle-Based Immunoassays. *Anal Chem* 2012, 84 (20), 8805–8812. [https://doi.org/10.1021/AC3020627/SUPPL\\_FILE/AC3020627\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/AC3020627/SUPPL_FILE/AC3020627_SI_001.PDF).
- (384) Choi, K.; Ng, A. H. C.; Fobel, R.; Chang-Yen, D. A.; Yarnell, L. E.; Pearson, E. L.; Oleksak, C. M.; Fischer, A. T.; Luoma, R. P.; Robinson, J. M.; Audet, J.; Wheeler, A. R. Automated Digital Microfluidic Platform for Magnetic-Particle-Based Immunoassays with Optimization by Design of Experiments. *Anal Chem* 2013, 85 (20), 9638–9646. [https://doi.org/10.1021/AC401847X/SUPPL\\_FILE/AC401847X\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/AC401847X/SUPPL_FILE/AC401847X_SI_001.PDF).
- (385) Katic, V.; Dos Santos, P. L.; Dos Santos, M. F.; Pires, B. M.; Loureiro, H. C.; Lima, A. P.; Queiroz, J. C. M.; Landers, R.; Muñoz, R. A. A.; Bonacin, J. A. 3D Printed Graphene Electrodes Modified with Prussian Blue: Emerging Electrochemical Sensing Platform for Peroxide Detection. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019, 11 (38), 35068–35078. <https://doi.org/10.1021/ACSAMI.9B09305/ASSET/IMAGES/LARGE/AM9B09>

305\_0007.JPEG.

- (386) EasySep™ RBC Depletion Reagent.
- (387) Dey, M.; Kumar, S.; Chemistry, A. S.-J. of E.; 2017, undefined. Probing Adsorptive/Desorptive Redox Processes and Detection of Cysteine: A Voltammetric and Scanning Electrochemical Microscopy Study. *Elsevier*.
- (388) Atacan, K. CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Reduced Graphene Oxide Nanocomposite Decorated with Gold Nanoparticles as a New Electrochemical Sensor Material for L-Cysteine Detection. *J Alloys Compd* 2019, 791, 391–401. <https://doi.org/10.1016/J.JALLCOM.2019.03.303>.
- (389) Azizi, J.; Shadizadeh, S. R.; Khaksar Manshad, A.; Mohammadi, A. H. A Dynamic Method for Experimental Assessment of Scale Inhibitor Efficiency in Oil Recovery Process by Water Flooding. *Petroleum* 2019, 5 (3), 303–314. <https://doi.org/10.1016/J.PETLM.2018.07.004>.
- (390) Fan, C.; Kan, A. T.; Zhang, P.; Lu, H.; Work, S.; Yu, J.; Tomson, M. B. Scale Prediction and Inhibition for Unconventional Oil and Gas Production. *Society of Petroleum Engineers - 10th SPE International Conference on Oilfield Scale 2010* 2010, 247–268. <https://doi.org/10.2118/130690-MS>.
- (391) Li, J.; Tang, M.; Ye, Z.; Chen, L.; Zhou, Y. Scale Formation and Control in Oil and Gas Fields: A Review. *J Dispers Sci Technol* 2017, 38 (5), 661–670. <https://doi.org/10.1080/01932691.2016.1185953>.
- (392) Husna, U. Z.; Elraies, K. A.; Shuhili, J. A. B. M.; Elryes, A. A. A Review: The Utilization Potency of Biopolymer as an Eco-Friendly Scale Inhibitors. *J Pet Explor Prod Technol* 2022, 12 (4), 1075–1094. <https://doi.org/10.1007/s13202-021-01370-4>.
- (393) Yan, C.; Kan, A. T.; Wang, W.; Wang, L.; Tomson, M. B. Synthesis and Size Control of Monodispersed Al-Sulfonated Polycarboxylic Acid Nanoparticles and Their Transport in Porous Media. *SPE Journal* 2013, 18 (04), 610–619. <https://doi.org/10.2118/155627-PA>.
- (394) Yan, C.; Kan, A. T.; Wang, W.; Yan, F.; Wang, L.; Tomson, M. B. Synthesis and Sorption Study of AlOOH Nanoparticle Cross-Linked Polymeric Scale Inhibitors and Their Squeeze Performance in Porous Media. *Proceedings - SPE International Symposium on Oilfield Chemistry* 2013, 1, 448–459. <https://doi.org/10.2118/164086-MS>.

- (395) Liu, Y.; Kan, A.; Zhang, Z.; Yan, C.; Yan, F.; Zhang, F.; Bhandari, N.; Dai, Z.; Ruan, G.; Wang, L.; Greenberg, J.; Tomson, M. An Assay Method to Determine Mineral Scale Inhibitor Efficiency in Produced Water. *J Pet Sci Eng* 2016, *143*, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.PETROL.2016.02.024>.
- (396) Maniego, A. R.; Sutton, A. T.; Gaborieau, M.; Castignolles, P. Assessment of the Branching Quantification in Poly(Acrylic Acid): Is It as Easy as It Seems? *Macromolecules* 2017, *50* (22), 9032–9041. [https://doi.org/10.1021/ACS.MACROMOL.7B01411/SUPPL\\_FILE/MA7B01411\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.MACROMOL.7B01411/SUPPL_FILE/MA7B01411_SI_001.PDF).
- (397) Wang, S.; Sun, S.; Shan, C.; Pan, B. Analysis of Trace Phosphonates in Authentic Water Samples by Pre-Methylation and LC-Orbitrap MS/MS. *Water Res* 2019, *161*, 78–88. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2019.05.099>.
- (398) Graham, G. M.; Munro, I.; Harvison, N.; Marshall, K.; Kyle, M. Improved Scale Inhibitor Assay for Sulphonated Polymers in Oilfield Brines. *Society of Petroleum Engineers - 10th SPE International Conference on Oilfield Scale 2010* 2010, 426–446. <https://doi.org/10.2118/131100-MS>.
- (399) Thompson, A.; Heath, S.; Gundersen, T. E.; Andresen, A. T.; Dahlgren, P. A.; Juliussen, B. Emerging 4th Generation Analytical Technology for the Individual Analysis of Multiple Families of Co-Mingled Scale Inhibitors in Deepwater Wells. *Society of Petroleum Engineers - SPE International Conference and Exhibition on Oilfield Scale 2012* 2012, 422–433. <https://doi.org/10.2118/155171-MS>.
- (400) Harrison, D. J.; Manz, A.; Lüdi, H.; Widmer, H. M.; Fan, Z. Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip. *Anal Chem* 1992, *64* (17), 1926–1932. [https://doi.org/10.1021/AC00041A030/ASSET/AC00041A030.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/AC00041A030/ASSET/AC00041A030.FP.PNG_V03).
- (401) Manz, A.; Graber, N.; Widmer, H. M. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: A Novel Concept for Chemical Sensing. *Sens Actuators B Chem* 1990, *1* (1–6), 244–248. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-I](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-I).
- (402) Rios, A.; Escarpa, A.; Simonet, B. Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications. *Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications* 2009, 1–371. <https://doi.org/10.1002/9780470748091>.

- (403) Xu, Y.; Liu, M.; Kong, N.; Liu, J. Lab-on-Paper Micro- and Nano-Analytical Devices: Fabrication, Modification, Detection and Emerging Applications. *Microchimica Acta* 2016 183:5 2016, 183 (5), 1521–1542. <https://doi.org/10.1007/S00604-016-1841-4>.
- (404) Soda, Y.; Bakker, E. Quantification of Colorimetric Data for Paper-Based Analytical Devices. *ACS Sens* 2019, 4 (12), 3093–3101. [https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.9B01802/ASSET/IMAGES/LARGE/E9B01802\\_0008.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.9B01802/ASSET/IMAGES/LARGE/E9B01802_0008.JPEG).
- (405) Morbioli, G. G.; Mazzu-Nascimento, T.; Stockton, A. M.; Carrilho, E. Technical Aspects and Challenges of Colorimetric Detection with Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) - A Review. *Anal Chim Acta* 2017, 970, 1–22. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.03.037>.
- (406) Ameku, W. A.; de Araujo, W. R.; Rangel, C. J.; Ando, R. A.; Paixão, T. R. L. C. Gold Nanoparticle Paper-Based Dual-Detection Device for Forensics Applications. *ACS Appl Nano Mater* 2019, 2 (9), 5460–5468. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01057>.
- (407) Li, F.; You, M.; Li, S.; Hu, J.; Liu, C.; Gong, Y.; Yang, H.; Xu, F. Paper-Based Point-of-Care Immunoassays: Recent Advances and Emerging Trends. *Biotechnol Adv* 2020, 39. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2019.107442>.
- (408) Almeida, M. I. G. S.; Jayawardane, B. M.; Kolev, S. D.; McKelvie, I. D. Developments of Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) for Water Analysis: A Review. *Talanta* 2018, 177, 176–190. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2017.08.072>.
- (409) Sharma, N.; Barstis, T.; Giri, B. Advances in Paper-Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2018, 111, 46–56. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2017.09.031>.
- (410) Sriram, G.; Bhat, M. P.; Patil, P.; Uthappa, U. T.; Jung, H. Y.; Altalhi, T.; Kumeria, T.; Aminabhavi, T. M.; Pai, R. K.; Madhuprasad; Kurkuri, M. D. Paper-Based Microfluidic Analytical Devices for Colorimetric Detection of Toxic Ions: A Review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2017, 93, 212–227. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.06.005>.
- (411) Hu, J.; Wang, S. Q.; Wang, L.; Li, F.; Pingguan-Murphy, B.; Lu, T. J.; Xu, F.

Advances in Paper-Based Point-of-Care Diagnostics. *Biosens Bioelectron* 2014, *54*, 585–597. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2013.10.075>.

- (412) Chen, J. L.; Njoku, D. I.; Tang, C.; Gao, Y.; Chen, J.; Peng, Y.-K.; Sun, H.; Mao, G.; Pan, M.; Fung, N.; Tam, Y.; Chen, J. L.; Njoku, D. I.; Tang, C.; Gao, Y.; Chen, J.; Pan, M.; Tam, F.-Y.; Peng, Y.-K.; Sun, H. Advances in Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs): Design, Fabrication, and Applications. *Small Methods* **2024**, *8* (11), 2400155. <https://doi.org/10.1002/SMTD.202400155>.
- (413) Chen, T.; Sun, C.; Abbas, S. C.; Alam, N.; Qiang, S.; Tian, X.; Fu, C.; Zhang, H.; Xia, Y.; Liu, L.; Ni, Y.; Jiang, X. Multi-Dimensional Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (MPADs) for Noninvasive Testing: A Review of Structural Design and Applications. *Anal Chim Acta* **2024**, *1321*, 342877. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2024.342877>.
- (414) Gross, B.; Lockwood, S. Y.; Spence, D. M. Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing. *Anal Chem* 2017, *89* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/ACS.ANALCHEM.6B04344.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/ACS.ANALCHEM.6B04344.FP.PNG_V03).
- (415) Rabaioli, M. R.; Lockhart, T. P. Solubility and Phase Behavior of Polyacrylate Scale Inhibitors. *J Pet Sci Eng* 1996, *15* (2–4), 115–126. [https://doi.org/10.1016/0920-4105\(96\)00008-3](https://doi.org/10.1016/0920-4105(96)00008-3).
- (416) Demadis, K. D.; Lykoudis, P. Chemistry of Organophosphonate Scale Growth Inhibitors: 3. Physicochemical Aspects of 2-Phosphonobutane-1,2,4-Tricarboxylate (PBTC) and Its Effect on CaCO<sub>3</sub> Crystal Growth. *Bioinorg Chem Appl* 2005, *3* (3–4), 135–149. <https://doi.org/10.1155/BCA.2005.135>.
- (417) Gross, B.; Lockwood, S. Y.; Spence, D. M. Recent Advances in Analytical Chemistry by 3D Printing. *Anal Chem* 2017, *89* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/ACS.ANALCHEM.6B04344.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/ACS.ANALCHEM.6B04344.FP.PNG_V03).
- (418) Myers, R. R.; Fink, J. E. Method for the Colorimetric Determination of Sulfonates in Aqueous Systems. 1990.
- (419) Quero, R. F.; Domingos Da Silveira, G.; Fracassi Da Silva, J. A.; Jesus, D. P. De. Understanding and Improving FDM 3D Printing to Fabricate High-Resolution and Optically Transparent Microfluidic Devices. *Lab Chip* 2021, *21*

- (19), 3715–3729. <https://doi.org/10.1039/D1LC00518A>.
- (420) Arsawiset, S.; Teepoo, S. Ready-to-Use, Functionalized Paper Test Strip Used with a Smartphone for the Simultaneous on-Site Detection of Free Chlorine, Hydrogen Sulfide and Formaldehyde in Wastewater. *Anal Chim Acta* 2020, 1118, 63–72. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.04.041>.
- (421) Christian Gomes Morais Nascimento, M.; Carolina Robaina Vieira, M.; R. P. Rocha, F.; Almeida Silva, T.; Toito Suarez, W. Flow-Based Green Ceramics Microdevice with Smartphone Image Colorimetric Detection for Free Chlorine Determination in Drinking Water. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2023, 287, 122096. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2022.122096>.
- (422) Peng, B.; Zhou, J.; Xu, J.; Fan, M.; Ma, Y.; Zhou, M.; Li, T.; Zhao, S. A Smartphone-Based Colorimetry after Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for Rapid Quantification of Calcium in Water and Food Samples. *Microchemical Journal* 2019, 149, 104072. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.104072>.
- (423) Li, Q.; Ren, S.; Peng, Y.; Lv, Y.; Wang, W.; Wang, Z.; Gao, Z. A Colorimetric Strip for Rapid Detection and Real-Time Monitoring of Histamine in Fish Based on Self-Assembled Polydiacetylene Vesicles. *Anal Chem* 2020, 92 (1), 1611–1617. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04927>.
- (424) Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal Chem* 2020, 92 (14), 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.

## **CURRICULUM VITAE**

## **CURRICULUM VITAE**

### **1 – Informações Pessoais**

**Nome Completo:** Danielly Santos Rocha

**Endereço eletrônico:** daniellysr@outlook.com

**Naturalidade:** Santa Bárbara de Goiás – GO

**Data de Nascimento:** 20/05/1995

### **2 – Formação Acadêmica**

Técnico integrado ao ensino médio em Química (2011-2014)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás – IFG  
Inhumas – Goiás

Bacharelado em Química (2015-2018)

Universidade Federal de Goiás – UFG  
Goiânia – Goiás

Mestrado em Química (2019-2021)

Universidade Federal de Goiás – UFG  
Goiânia – Goiás

Licenciatura em Química (2021-2024)

Universidade Federal de Goiás – UFG  
Goiânia – Goiás

Doutorado sanduíche (2024)

University of Toronto – UofT  
Toronto – ON, Canadá

Doutorado em Química (2021-2025)

Universidade Federal de Goiás - UFG  
Goiânia – Goiás

### 3 – Artigos publicados

1. Rocha, D. S., Duarte, L. C., Silva-Neto, H. A., Chagas, C. L., Santana, M. H., Antoniosi Filho, N. R., Coltro, W. K. T. (2021). Sandpaper-based electrochemical devices assembled on a reusable 3D-printed holder to detect date rape drug in beverages. *Talanta*, 232, 122408.
2. Rocha, D. S., Silva-Neto, H. A., de Oliveira, L. C., Souza, S. G. G., Santana, M. H. P., Coltro, W. K. T. (2022). Disposable stencil-printed carbon electrodes for electrochemical analysis of sildenafil citrate in commercial and adulterated tablets. *Braz. J. Anal. Chem*, 9, 210-228.
3. Ataide, V. N., Arantes, I. V., Mendes, L. F., Rocha, D. S., Baldo, T. A., Coltro, W. K.T., Paixão, T.R.L.C. (2022). A Pencil Drawing Overview: From Graphite to Electrochemical Sensors/Biosensors Applications. *Journal of The Electrochemical Society*, 169(4), 047524.
4. Souza, L. K., Silva-Neto, H. A., Rocha, D. S., de Abreu, F. C., Silva, A. C., Dantas, N. O., Garcia, P. T. (2023). Disposable sensor based on carbon electrodes modified with cobalt-doped titanium dioxide nanocrystals for electrochemical detection of amoxicillin. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 117587.
5. Oliveira, L. C., Rocha, D. S., Silva-Neto, H. A., Silva, T. A., Coltro, W. K. T. (2023). Polyester resin and graphite flakes: turning conductive ink to a voltammetric sensor for paracetamol sensing. *Microchimica Acta*, 190(8), 324.
6. Silva-Neto, H. A., Duarte-Junior, G. F., Rocha, D. S., Bedioui, F., Varenne, A., Coltro, W. K. T. (2023). Recycling 3D Printed Residues for the Development of Disposable Paper-Based Electrochemical Sensors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(11), 14111-14121.
7. Rocha, D. S., de Campos, R. P. S., Silva-Neto, H. A., Duarte-Junior, G. F., Bedioui, F., Coltro, W. K. T. (2023). Digital microfluidic platform assembled into a home-made studio for sample preparation and colorimetric sensing of S-nitrosocysteine. *Analytica Chimica Acta*, 1254, 341077.

8. Rocha, D. S., Baldo, T. A., Silva-Neto, H. A., Duarte-Junior, G. F., Bazílio, G. S., Borges, C. L., Coltro, W. K. T. (2024). Disposable and eco-friendly electrochemical immunosensor for rapid detection of SARS-CoV-2. *Talanta*, 268, 125337.
9. Silva-Neto, H. A., de Lima, L. F., Rocha, D. S., Ataíde, V. N., Meloni, G. N., Moro, G., Coltro, W. K. T. (2024). Recent achievements of greenness metrics on paper-based electrochemical (bio) sensors for environmental and clinical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117675.
10. Paiva, J. V. F., Rocha, D. S., Paula, D. S., Sgobbi, L. F., Coltro, W. K. T. (2024). Paper-based Sensing Devices for Point-of-care Testing: Current Advances. *Material Matters*, 19.1.
11. Souza, S. G., Silva - Neto, H. A., Rocha, D. S., de Siervo, A., Paixão, T. R., Coltro, W. K. T. (2024). Hybrid Paper/Polyester - Based Laser - Induced Graphene Electrodes for Electrochemical Detection of Tadalafil. *Analysis & Sensing*, e202400016.
12. Silva-Neto, H. A., Jaime, J. C., Rocha, D. S., Sgobbi, L. F., Coltro, W. K. T. (2024). Fabrication of paper-based analytical devices using stencil-printed glass varnish barriers for colorimetric detection of salivary  $\alpha$ -amylase. *Analytica Chimica Acta*, 1297, 342336.
13. Velasco, L. G., Rocha, D. S., de Campos, R. P., Coltro, W. K. T. (2025). Integration of paper-based analytical devices with digital microfluidics for colorimetric detection of creatinine. *Analyst*, 150, 60-68.
14. Orzari, L. O., Kalinke, C., Silva-Neto, H. A., Rocha, D. S., Camargo, J. R., Coltro, W. K. T. and Janegitz, B. C. (2025) Screen-printing vs. additive manufacturing approaches: an overview of recent aspects and trends involving the fabrication of electrochemical sensors. *Analytical Chemistry*, 97, 1482-1494

#### **4 – Artigos submetidos e/ou em redação**

1. Rocha, D. S., Duarte, L. C., Junior, I. M., Couto, B. C., Carvalho, R. M. and Coltro, W. K. T. (2025). Environmentally friendly and portable approach based on 3D-printing for colorimetric sensing of sulfonate scale inhibitors assisted by *smartphone*. In preparation.
2. Rocha, D. S., Sgobbi, L. F., Costa, L. D. C. and Coltro, W. K. T. Enhanced chloride sensing using stencil-printed graphite/carbon black stencil printed electrode modified with silver nanoparticles for cystic fibrosis diagnosis. (2025) In preparation.
3. Rocha, D. S., Narayanaswamy, S., Coltro, W. K. T. and Wheeler, A. R. Simple integration between digital microfluidics and paper-based electrochemical devices for L-cysteine detection (2025). In preparation.
4. Souza, L. K. A., Rocha, D. S., Romanholo, P. V. V., Sgobbi, L. F. and Coltro, W. K. T. Lab-in-a-pen: automated manufacturing and deposition of bioink and reagents (2025). In preparation.
5. Pereira, M. M. L., Rocha, D. S., Silva-neto, H. A. and Coltro, W. K. T. Glass film as an alternative substrate for fabricating enhanced electrochemical sensors (2025). In preparation.
6. Paula, D. S., Rocha, D. S. and Coltro, W. K. T. Distance-based paper microfluidic devices for colorimetric determination of chloride for portable diagnosis of cystic fibrosis (2025). In preparation.
7. Oliveira, L. C., Silva-Neto, H. A., Rocha, D. S., Paixão, T. R. L. C., Coltro, W. K. T. (2025). Development of environmentally friendly electrochemical sensors for epinephrine detection. In preparation.

## **5 – Capítulo de livro**

1. Silva-Neto, H. A., Rocha, D. S., Pradela-Filho, L. A., Paixão, T. R. L. C. & Coltro, W. K. T. (Bio)electrodes on Paper Platforms as Simple and Portable Analytical Tools for Bioanalytical Applications. *Advances in Bioelectrochemistry Volume 5: Emerging Techniques and Materials, Biodevice Design and Reactions*. Cham: Springer International Publishing, 2022, 181-

202.

2. Silva-Neto, H. A., Rocha, D. S., Souza, L. K. A. & Coltro, W. K. T. (2024) Biodegradable and sustainable Sensors: Material and Applications. *Nature-Derived Sensors*. Elsevier, 2025, 201-222.

## **6 – Pedidos de patente**

1. Rocha, D. S., Sgobbi, L. F. e Coltro, W. K. T. Método de preparo e aplicação de tinta condutora à base de laca chinesa na construção de sensores eletroquímicos para diagnóstico de fibrose cística. 2024, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020240206266. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 04/10/2024.

2. Pereira, M. M. L., Rocha, D. S., Silva-Neto, H. A. e Coltro, W. K. T. Película de vidro como substrato para fabricação de trilhas condutoras, circuitos eletrônicos e sensores eletroquímicos. 2024, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020240206304. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 04/10/2024.

3. Paula, D. S., Rocha, D. S. e Coltro, W. K. T. Sensor microfluídico portátil para diagnóstico de fibrose cística e processo de preparação do sensor. 2024, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020240207548. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/10/2024.

4. Rocha, D. S., Duarte, L. C., Campos, P. P. E., Couto, B. C., Carvalho, R. M. e Coltro, W. K. T. Dispositivo colorimétrico portátil para detecção de produtos químicos. 2024, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR2020240170038. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 20/08/2024.

## **7 – Popularização da ciência**

1. Rocha, D. S., Duarte, L. C., Silva-Neto, H. A., Chagas, Cyro L.S., Coltro, W. K. T. Uso de lápis escolar e papel de lixa aliados ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos para detecção de “boa noite, Cinderela” em bebidas. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência/Regional Goiás - 8º prêmio SBPC/GO de popularização da ciência: edição 2021. Goiânia: Cegraf UFG, 2022, p. 21-28.

2. Oliveira, L. C., Rocha, D. S., Silva-Neto, H. A., Coltro, W. K. T. Controle de qualidade e monitoramento de medicamento no organismo a partir de sensores eletroquímicos em papel. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência/Regional Goiás - 9º prêmio SBPC/GO de popularização da ciência: edição 2022. Goiânia: Cegraf UFG, 2022, p. 50-56.

## **8 – Prêmios**

1. Primeiro lugar na categoria pós-graduação no III Workshop da Pós-graduação em Química, XX Semana da Química e na II Semana da Engenharia Química, Instituto de Química – UFG (2019).

2. Primeiro lugar da categoria Ciências Exatas e da Terra no VIII Prêmio SBPC/GO de Popularização da Ciência, A Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) - Regional Goiás (2021).

3. Tony B. Academic Travel Award, Dublin, Ireland., Society for Laboratory Automation and Screening - SLAS Europe (2022).

3. Quarto lugar da categoria Ciências Exatas e da Terra no IX Prêmio SBPC/GO de Popularização da Ciência, A Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) - Regional Goiás (2022).

5. Tony B. Academic Travel Award, San Diego, United States., Society for Laboratory Automation and Screening - SLAS (2023).

6. Honra ao Mérito pela apresentação oral do trabalho intitulado “Digital microfluidics as lab-on-a-chip: from sample preparation to colorimetric sensing of s-nitrosocysteine” na XVII Semana da Química e IV workshop da pós-

graduação da Universidade Federal de Goiás (2023).

7. 1º lugar da categoria Ciências Exatas e da Terra no X Prêmio SBPC/GO de Popularização da Ciência, A Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) - Regional Goiás (2024).

8. Bolsa de viagem da Chemical and Biological Microsystems Society (CBMS) para MicroTAS (2024).

### **9 – Coorientações de alunos de iniciação científica concluídas**

1. Laísa Cristina de Oliveira. Fabricação de eletrodos descartáveis em substratos de baixo custo para aplicações no controle de qualidade de formulações farmacêuticas. Início: 2021. Iniciação científica (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2. Shellyda Gonçalves Guimarães Souza. Fabricação de dispositivos eletroquímicos em plataforma de papel para aplicações de interesse farmacêutico. Início: 2021. Iniciação científica (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

3. Laísa Cristina de Oliveira. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos vestíveis alternativos. Início: 2022. Iniciação científica (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

4. Shellyda Gonçalves Guimarães Souza. Fabricação de múltiplos dispositivos analíticos em papel usando gravação a laser. Início: 2022. Iniciação científica (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

5. Jordana Costa Jaime. Desenvolvimento de dispositivos analíticos integráveis para detecção colorimétrica e eletroquímica. 2022. Iniciação Científica. (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

6. Laísa Cristina de Oliveira. Detecção colorimétrica visando a análise de suplemento hormonal. Início: 2023. Iniciação científica (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

7. Shellyda Gonçalves Guimarães Souza. Fabricação de dispositivos microfluídicos em papel usando gravação a *laser* para detecção colorimétrica de formulações farmacêuticas. Início: 2023. Iniciação científica (Graduada em Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

8. Daniel Santos de Paula. Diagnóstico alternativo usando dispositivos portáteis e descartáveis. Início: 2023. Iniciação científica (Graduando em Química com atribuições Tecnológicas) - Universidade Federal de Goiás, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica PIT/EBSERH/CNPq.

9. Maurício Matheus Lucio Pereira. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos usando gravação a laser. Início: 2023. Iniciação científica voluntária (Graduado em Química com atribuições Tecnológicas) - Universidade Federal de Goiás, PETROBRAS.

## **10 – Revisões de periódicos**

1. Analytical Methods

2. Sensors & Actuators B: Chemical

3. RSC Advances

4. Analytica Chimica Acta

## **11 – Convite para capa**

Analytical Methods com o artigo “Integration of paper-based analytical devices with digital microfluidics for colorimetric detection of creatinine” (2025).