



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Franciele de Matos Morawski

Design aprimorado de suportes a base de quitosana:
Propriedades e funcionalidade para aplicações em eletroanálise

Florianópolis

2021

Franciele de Matos Morawski

Design aprimorado de suportes a base de quitosana:
Propriedades e funcionalidade para aplicações em eletroanálise

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em
Química da Universidade Federal de Santa Catarina para
a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Cristiane Luisa Jost
Coorientador: Prof. Dr. Andre Luis Barbosa Bafica

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da
Biblioteca Universitária da UFSC.

Morawski, Franciele de Matos

Design aprimorado de suportes a base de quitosana:
Propriedades e funcionalidade para aplicações em
eletroanálise / Franciele de Matos Morawski ;
orientadora, Cristiane Luisa Jost, coorientador, André
Luis Barbosa Bafica, 2021.

107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Quitosana. 3. Sensores eletroquímicos. 4.
Eletrodos modificados. 5. Nanopartículas. I. Jost,
Cristiane Luisa . II. Bafica, André Luis Barbosa . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Química. IV. Título.

Franciele de Matos Morawski

**Design aprimorado de suportes a base de quitosana:
Propriedades e funcionalidade para aplicações em eletroanálise**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof., Dr. Wallans Torres Pio dos Santos
Instituição Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha

Prof.(a), Dr.(a) Cecília de Carvalho Castro e Silva
Instituição Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof., Dr. Daniel Santos Mansur
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química com ênfase em Química Analítica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a), Dr.(a) Cristiane Luisa Jost
Orientadora

Florianópolis, 2021.

Dedico esse trabalho com todo o meu amor e reconhecimento a
minha família e a Deus.

AGRADECIMENTOS

Ser doutora em química é um sonho que começou muito distante da minha realidade, mas muitos foram os motivos e pessoas que me fizeram persistir e alcançar o sonhado objetivo, deixo aqui o meu singelo agradecimento a cada um destes:

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e amor incondicional. Por me mostrar a beleza do mundo e a paz no coração durante as adversidades. Por me amparar nos maiores desafios e obstáculos. “Tudo posso naquele que me fortalece”. Filipenses 4:13

Agradeço a minha mãe Marisa que é um exemplo de força, superação, coragem e generosidade. Nada disso seria possível sem o seu apoio incondicional, em todas as minhas aventuras, desde o meu primeiro dia de vida. Obrigada por me apoiar, encorajar, incentivar a ser melhor a cada dia. Você me ensinou através do exemplo, a sempre ir em busca dos meus sonhos e, a batalhar com garra e determinação pelos meus objetivos. Se cheguei até aqui, devo isso ao seu incentivo e acolhimento. Essa conquista também é sua.

Agradeço ao meu noivo Guilherme que acompanhou essa jornada em cada momento, desde o início. Você me motivou a continuar na pesquisa, me encorajando a trilhar caminhos desafiadores e, incentivando a colocar em prática todas as minhas ideias mais abstratas. Ofereceu ainda aconchego e, uma palavra de esperança nos momentos de saudade e desânimo. A caminhada se torna mais fácil quando compartilhada com alguém que nos admira e apoia. Muito obrigada por tudo e por tanto.

Agradeço a toda a minha família, especialmente vó Delia, pai, irmão Neto e irmã Sofia por todo o amor e carinho comigo. Sou abençoada por ter pessoas tão especiais comigo. Vocês são a base de tudo e a minha motivação para continuar.

Agradeço a minha orientadora Prof Dr^a Cristiane Jost por todos esses anos de ensinamentos em eletroanálise, que me fizeram evoluir muito como profissional. Você é uma inspiração como mulher, cientista e química. Durante esse tempo, foram muitas discussões científicas, colaborações, escrita de artigos, conselhos de didática e dicas de carreira. Em todos esses momentos, seja nas adversidades da pesquisa ou da vida, você me forneceu suporte. Obrigada por ser essa pessoa única e inexplicável. O doutorado se tornou mais leve e, o aprendizado mais fácil sob a sua orientação.

Agradeço também ao meu coorientador Prof Dr André Báfica por aceitar o desafio dos imunossensores. Obrigada por todos os ensinamentos em imunologia e bioanálise. Após cada reunião, a minha cabeça saía da sua sala borbulhando de novas ideias. Através da nossa colaboração, consegui tirar do papel um projeto que era um sonho. Obrigada por toda a confiança e dedicação para que esse trabalho acontecesse. Serei sempre imensamente grata.

Obrigada Prof Dr Alexandre Parize pelas colaborações frutíferas que resultaram da nossa pesquisa. Agradeço ao conhecimento e experiência compartilhadas, que foram essenciais durante o planejamento e design aprimorado das interfaces eletroquímicas. Agradeço também a Doutora Natália pelo desenvolvimento e síntese dos materiais magnéticos testados e, também pela disponibilidade e, ajuda nas caracterizações.

Obrigada a Doutora Greicy Dias por toda a paciência e colaboração nessa pesquisa. Aprendi muito sobre biologia, imunologia, validação e ELISA. Os momentos compartilhados no Lidi foram únicos. Imensamente grata pela nossa troca e parceria. Sem você, seria praticamente impossível alcançar os resultados obtivemos nesse trabalho. Agradeço ainda a todas as pessoas queridas que eu tive o prazer em dividir os dias nesse tempo de MIP. Tive meses muito divertidos e agradáveis na companhia de vocês que ficarão sempre nas boas memórias.

Agradeço ao professor Damien Arrigan por todo o suporte e assessoria incansáveis para me ensinar mais sobre eletroquímica líquido-líquido. Apesar de todos os percalços enfrentados na pandemia, aprendi muito com você. Todas as reuniões e, discussões de projetos foram fundamentais para o meu desenvolvimento científico.

Agradeço aos colegas e amigos do GEPEEA e Ampere: Caio, Edinho, Everton, Daniel, Ray, Marília, João, Belle, Giles, Andrezza, Rampanelli, Francisco, Pãmyla, Prof Almir e, todos os outros que passaram pelo grupo durante a minha caminhada. Os dias alegres e divertidos que passamos juntos durante esses quatro anos ficarão sempre guardados na memória. As trocas de experiência e discussões acadêmicas durante os nossos intervalos, muitas vezes bem “filosóficos”, foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e científico. Obrigada especialmente a amiga Kelline por todos os nossos momentos. “Mermã”, você apareceu durante essa trajetória e, rapidamente se tornou uma das pessoas mais importantes para mim.

Agradeço a todos do LSS, lugar em que iniciei a minha trajetória acadêmica. Carrego sempre no peito, os grandes amigos e momentos especiais que passei durante a graduação e mestrado. Especialmente a prof Leliz e prof Tânia, a quem tenho um carinho imenso. A ‘bagagem científica’ que construí sob a orientação de vocês contribuiu de maneira imensurável para o meu crescimento, tornando menores os meus desafios do doutorado. Aos amigos da UFRGS que guardo com muito carinho Camila, Dani, Monique e Andressa. De maneira única, os bons momentos compartilhados no DQI estarão sempre na minha memória.

Agradeço ainda ao Centro de Microscopia LCME da UFSC pela disponibilidade e esforço, mesmo durante a pandemia, com as análises de MEV e TEM.

Por fim, agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado e a UFSC pela infraestrutura e recursos disponibilizados para a realização dessa pesquisa.

“Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.” (Schopenhauer)

RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos novos materiais combinados a base de quitosana com design aprimorado para eletroanálise, visando sua aplicação como sensores e imunossensores eletroquímicos para a detecção de poluentes ambientais e biomarcadores clínicos. Os materiais usados na modificação dos eletrodos foram caracterizados por diferentes técnicas buscando avaliar suas propriedades texturais, morfológicas e estruturais. Para a investigação do comportamento eletroquímico, foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Primeiramente, a quitosana foi utilizada como estabilizante de nanopartículas de platina. O material resultante foi utilizado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo e, aplicado na determinação simultânea dos herbicidas diuron e isoproturon em amostras de água de rio. Adicionalmente, também estudou-se a viabilidade de aplicação de um novo material híbrido magnético a base de ferrita de manganês recoberta com quitosana. Esse material foi usado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo e, permitiu a detecção sensível e seletiva de pesticida da classe difenil éter em amostras de água da torneira e rio. Por fim, sistemas combinados de quitosana e genipina foram estudados de maneira inédita para o desenvolvimento de novos imunossensores. Filmes camada a camada foram construídos na superfície de um eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor e, aplicados na detecção eletroquímica direta do biomarcador interleucina-6. As análises foram realizadas a partir da técnica de voltametria de onda quadrada através do uso de uma sonda redox. O método permitiu alcançar limites de detecção na faixa de pg mL^{-1} , apresentando sensibilidade adequada para aplicações clínicas. O novo imunossensor desenvolvido foi utilizado para quantificar IL-6 em soro de indivíduos sépticos e pacientes com COVID-19. Dessa maneira, os materiais bioinspirados a base de quitosana desenvolvidos no presente trabalho apresentaram alta versatilidade e promissora resposta para aplicação no desenvolvimento de dispositivos bioeletrônicos aplicados ao diagnóstico clínico e, ao monitoramento ambiental.

Palavras-chave: Quitosana; Eletroanálise; Imunossensores eletroquímicos; eletrodos modificados; nanopartículas

ABSTRACT

In this work, novel chitosan-based combined materials were developed with improved design for electroanalysis, aiming the detection of environmental pollutants and clinical biomarkers. The synthesized materials were characterized by different techniques to evaluate their textural, morphological and structural properties. The chitosan-base supports were employed in the development of modified electrodes. To investigate the electrochemical behavior, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy techniques were employed after each modification step. First, a chitosan was used as a stabilizer agent for platinum nanoparticles. The resulting material was used in the manufacture of a modified glassy carbon electrode. The novel sensor was successfully applied in the simultaneous electrochemical determination of the herbicides diuron and isoproturon in river water samples. Additionally, it was studied the potential use of a new magnetic hybrid material made from manganese ferrite and coated with chitosan in electroanalysis. This material was used to develop a modified glassy carbon electrode for the sensitive and selective determination of nitro diphenyl ether herbicide in tap and river water samples. Finally, chitosan and genipin combined self-assembled films were investigated for the development of an innovative immunosensors. Layer-by-layer films were constructed on the surface of a fluorine-doped tin oxide electrode and applied for the label-free electrochemical determination of interleukin-6. The quantification was performed by square wave voltammetry in the presence of a redox probe. The novel methodology allowed to achieve detection limits in the range of pg mL^{-1} , suitable for clinical diagnosis. The novel immunosensor was used to quantify IL-6 in serum of septic and COVID-19 patients. Thus, the chitosan-based bioinspired showed high versatility and promising response for their application in the development of novel bioelectronic devices applied in clinical diagnosis and environmental monitoring.

Keywords: Chitosan; Electroanalysis; Electrochemical Immunosenors; Chemically modified electrodes; nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema representativo das reações de biossíntese da quitina em crustáceos | 4 |
| Figura 2. Esquema representativo da estrutura e grupos funcionais presentes na celulose, quitina e quitosana..... | 5 |
| Figura 3. Estrutura da quitosana..... | 6 |
| Figura 4. Representação esquemática do comportamento dos grupos amino da quitosana em função do pH. | 7 |
| Figura 5. Esquema representativo das interações inter e intramoleculares que ocorrem entre as cadeias poliméricas da quitosana..... | 7 |
| Figura 6. Representação do número de publicações com a biomolécula quitosana relacionado a área de aplicação. Dados retirados da plataforma scopus em 12 de setembro de 2021..... | 8 |
| Figura 7. Representação esquemática das reações de reconhecimento biológico na superfície do eletrodo de trabalho | 10 |
| Figura 8. Célula eletroquímica convencional de três eletrodos e representação do circuito aplicado pelo potenciostato | 11 |
| Figura 9. Representação da técnica de LBL aplicada na construção de filmes de quitosana para aplicação em sensores e biossensores eletroquímicos..... | 15 |
| Figura 10. Representação de dispersões de nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana | 18 |
| Figura 11. Representação de dispersões de nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana | 19 |
| Figura 12. Representação da ligação covalente formada entre a quitosana e agentes ligantes..... | 21 |
| Figura 13. Representação esquemática do programa de potencial aplicado na análise de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada. | 22 |
| Figura 14. Janela eletroquímica útil em meio aquoso na presença de diferentes eletrólitos e eletrodos | 24 |
| Figura 15. Estrutura química do ferroceno e ferrocianeto de potássio..... | 25 |
| Figura 16. Representação esquemática da detecção eletroquímica direta de proteínas | 26 |
| Figura 17. Esquema representativo da modificação do eletrodo de carbono vítreo e, análises voltamétricas aplicadas no presente capítulo..... | 40 |
| Figura 18. UV-vis das amostras A) $[PtCl_6]^{2-}/CS$ antes da adição do agente redutor e B) PtNPs/CS após a redução. | 41 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Difratomogramas de raios X das amostras CS e PtNPs/CS..... | 42 |
| Figura 20. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier no modo reflectância total atenuada das dispersões CS e CS/PtNPs. | 43 |
| Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão da amostra PtNPs/CS A) menor aproximação B) maior aproximação e C) histograma de distribuição do tamanho de partícula | 44 |
| Figura 22. Difração de elétrons por área selecionada da amostra PtNPs/CS com a atribuição dos planos cristalinos da platina através de comparação com o banco de dados. | 45 |
| Figura 23. CV comparativa dos eletrodos GCE, GCE/CS e GCE/CS/PtNPs $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ | 46 |
| Figura 24. EIS dos eletrodos GCE, CS/GCE e PtNPs/CS/GCE na presença de sonda redox $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; eletrólito suporte: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$. Inset: circuito equivalente..... | 47 |
| Figura 25. A) CV na presença de 2 mg L^{-1} de isotroturon na velocidade de 50 mV s^{-1} do GCE e PtNPs/CS/GCE. B) CV na presença de 2 mg L^{-1} de diuron velocidade de 50 mV s^{-1} do GCE e PtNPs/CS/GCE. C) DPV na presença de $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e isotroturon ($0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ BR}$ -buffer, $\text{pH } 2.0$, 20 mV s^{-1}). D) Intensidade de corrente do pico anódico obtida por DPV usando GCE, CS/GCE and PtNPs/CS/GCE. | 48 |
| Figura 26. DPV na presença de isotroturon e diuron em diferentes valores de pH na faixa de 2.0 - 6.0 usando tampão BR 0.1 mol L^{-1} | 50 |
| Figura 27. A) Intensidade de corrente de pico obtida por DPV na presença de $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e isotroturon em diferentes valores de pH e B) Relação linear entre pH potencial de pico obtidos por DPV. | 51 |
| Figura 28. A) CV na presença de 1 mg L^{-1} de isotroturon (0.1 mol L^{-1} em tampão BR, $\text{pH } 2.0$) a diferentes velocidades de varredura de 30 a 300 mV s^{-1} . B) CV na presença de 2 mg L^{-1} de diuron (0.1 mol L^{-1} tampão BR, $\text{pH } 2.0$) a diferentes velocidades de varredura de 30 a 300 mV s^{-1} . C) Relação linear entre I_p and $v^{1/2}$ obtida para isotroturon e diuron D) relação linear entre $\log i$ and $\log v$ obtida por CVs em diferentes velocidades de varredura..... | 52 |
| Figura 29. Otimização da técnica eletroanalítica na velocidade de 20 mV s^{-1} na presença de A) isotroturon e B) diuron. | 53 |
| Figura 30. Otimização de parâmetros da técnica de DPV A) velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} ; B) tempo de pulso de 1 a 5 ms e C) amplitude de pulso de 10 a 100 mV | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 31. Otimização dos parâmetros da voltametria adsortiva por pré-concentração A) potencial aplicado e B) tempo de deposição. | 54 |
| Figura 32. Determinação eletroquímica A) DPAdSV para isotroturon. B) curva de calibração do isotroturon. C) DPAdSV para o diuron. D) curva de calibração para diuron. Condições experimentais: tampão BR 0.1 mol L ⁻¹ pH 2.0..... | 55 |
| Figura 33. Determinação simultânea. A) DPAdSV na presença de diferentes concentrações de diuron e isotroturon. B) curva de calibração para o isotroturon por análise simultânea. C) curva de calibração para o diuron por análise simultânea. | 57 |
| Figura 34. Estudos de seletividade por DPAdSV em 800 µg L ⁻¹ de cada analito diuron e isotroturon antes e após a adição de interferentes A) Bifenox; B) 4-nitrofenol; C) Paration; D) Pendimetalina e E) Roxarsone. Tampão BR (pH 2,0) nas condições otimizadas. | 59 |
| Figura 35. ipa obtidos por diferentes eletrodos modificados na presença de 100 µg L ⁻¹ de diuron e isotroturon preparados A) no mesmo dia e B) durante 4 dias consecutivos..... | 60 |
| Figura 36. A) Curva de adição padrão para o isotroturon. B) Curva de adição padrão para o diuron. <i>Inset:</i> medidas de DPAdSV na amostra enriquecida aumentando concentração de diuron e isotroturon. | 61 |
| Figura 37. Caracterização dos materiais CS, MnFe ₂ O ₄ , e MnFe ₂ O ₄ @CS por diferentes técnicas. A) FTIR B) Difração de Raios X C) Microscopia eletrônica de transmissão. <i>Inset:</i> histograma do tamanho de partículas. D) Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução do material MnFe ₂ O ₄ @CS. E) Curvas termogravimétricas. F) Curvas de magnetização. | 66 |
| Figura 38. Caracterização eletroquímica na presença de 5 mmol L ⁻¹ [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} e 0.1 mol L ⁻¹ KCl dos eletrodos GCE, MnFe ₂ O ₄ /GCE e MnFe ₂ O ₄ @CS/GCE A) voltametria cíclica de -0.3V a +0.9 V velocidade= 20 mV s ⁻¹ e B) espectroscopia de impedância eletroquímica. | 68 |
| Figura 39. A) VC na presença de 8 mmol L ⁻¹ de bifenox velocidade= 50 mV s ⁻¹ . B) CV do eletrodo MnFe ₂ O ₄ @CTS/GCE na presença de 4 mmol L ⁻¹ de bifenox em diferentes velocidades de varredura de 20 a 100 mV s ⁻¹ . C) Dependência linear entre I and v ^{1/2} para o MnFe ₂ O ₄ @CTS/GCE. D) Relação entre log I versus log v para MnFe ₂ O ₄ @CTS/GCE. | 70 |
| Figura 40. A) CV em diferentes valores de pH na presença de 2 mmol L ⁻¹ de bifenox e B) relação linear entre Epa e Epc versus pH. | 72 |
| Figura 41. Influência da técnica voltamétrica aplicada para a quantificação de bifenox. Condições: 20 µmol L ⁻¹ bifenox; 0.1 mol L ⁻¹ de eletrólito suporte, pH 3.0 (v = 20 mV s ⁻¹). ... | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 42. Otimização dos parâmetros da SWV na presença de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de bifenox in 0.1 mol L^{-1} tampão B-R (pH 3.0). A) otimização da frequência na faixa de 10 a 100 Hz. B) Relação entre I_{sw} e frequência. C) Potencial de pulso variando os valores na faixa de 1 | 74 |
| Figura 43. A) SWV usando o $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ na presença de diferentes concentrações de bifenox na faixa de 0.3 to 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$. B) Relação entre corrente de pico anódico e concentração de bifenox. C) voltamogramas de SWV obtidos na faixa de 0.3 a 4.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. D) Curva de calibração do bifenox. faixa de 0.3 to 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$. B) Relação entre corrente de pico anódico e concentração de bifenox. | 75 |
| Figura 44. Testes de seletividade. A) Intensidade de corrente de pico por SWV para a) bifenox, b) isoproturon; c) diuron; d) pirimicarb; e) 4-nitrofenol and f) pendimetalin. B) Resposta de corrente de pico para cinco diferentes eletrodos $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ preparados no mesmo dia e em dias subsequentes. | 78 |
| Figura 45. Esquema mostrando os diferentes passos para a imobilização do anti-IL-6 A) mecanismo de imobilização proposto; B) sequência de procedimentos aplicados na preparação do FTO/CSG/anti-IL6. | 85 |
| Figura 46. Espectroscopia de infravermelho das diferentes amostras: A) comparação entre os filmes CS, CSG e anti-IL-6/CSG preparados em suporte de sílica. B) comparação do filme de genipina com a amostra de quitosana e genipina (CSG). | 86 |
| Figura 47. Imagens de MEV obtidas na voltagem de 10 kV com magnificação de 10.000x dos eletrodos modificados A) FTO/CS; B) FTO/CSG; C) FTO/CSG/anti-IL-6 e D) FTO/CSG/anti-IL-6/BSA. | 87 |
| Figura 48. A) CV realizada na velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} ; B) Diagrama de Nyquist na faixa de frequência de 0.01–50.000 Hz; realizados em solução 0.1 mol L^{-1} KCl contendo 5 mmol L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a) FTO, b) FTO/CS, c) FTO/CSG, d) FTO/CSG/Anti-IL6 and e) FTO/CSG/Anti-IL6/BSA; C) Realção linear entre I_p versus $v^{1/2}$ para o eletrodo FTO/CSG/Anti-IL-6; <i>Inset</i> : voltamogramas a diferentes velocidades de varredura de 25 a 300 mV s^{-1} e D) Relação linear entre $\log I_p$ versus $\log v$ obtidos para FTO/CSG/anti-IL-6. | 89 |
| Figura 49. Otimização das condições de montagem do filme camada a camada na superfície do FTO. A) CV dos filmes preparados com diferentes proporções de quitosana. B) intensidade do pico de corrente anódicas para as diferentes concentrações de quitosana. C) CV de filmes preparados com diferentes concentrações de genipina usando o eletrodo FTO/CS-1%. D) intensidade do pico de corrente anódica para as diferentes concentrações de genipina. | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figura 50. Otimização dos parâmetros da SWV usando o eletrodo modificado CSG/FTO na presença de 5 mmol L ⁻¹ [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em 0.1 mol L ⁻¹ KCl. A) amplitude de pulso de 10 a 100 mV. B) Relação entre <i>I</i> _{SW} e amplitude de pulso. C) Incremento de potencial na faixa de 1 a 10 mV. D) Relação entre <i>I</i> _{SW} e increment de potencial. E) frequência na faixa de 10 a 100 Hz. F) Relação entre <i>I</i> _{SW} e frequência. | 92 |
| Figura 51. Otimização das condições experimentais para a preparação do eletrodo FTO/CGS/anti-IL-6. A) CV dos eletrodos utilizando difetentes tempos de incubação para o anti-IL-6. B) relação entre <i>I</i> _{pc} e tempo de incubação do anti-IL-6. C) CV dos eletrodos incubados com a proteína antígeno IL-6 utilizando diferentes tempos de incubação. D) Relação entre <i>I</i> _{pc} e tempo de incubação da IL-6..... | 93 |
| Figura 52. A) SWV obtida para o FTO/CSG/anti-IL-6 na presença de 0.1 mol L ⁻¹ KCl contendo 5 mmol L ⁻¹ [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em diferentes concentrações de IL-6 - 0.05 to 1000 pg mL ⁻¹ B) Relação entre concentração de IL-6 e Δ <i>I</i> _{pc} obtida por SWV ajustada pelo medelo de Langmuir-Freundlich C) curva de calibração Δ <i>I</i> _{pc} <i>versus</i> Log [IL-6]. | 95 |
| Figura 53. A) Eletrodo CSG/BSA/FTO na ausência do anticorpo de detecção e B) eletrodo BSA/anti/IL-6/CSG/FTO; na presença de 5 pg mL ⁻¹ de IL-6. | 97 |
| Figura 54. A) SWV realizada na presença de 0.1 mol L ⁻¹ KCl e 5 mmol L ⁻¹ [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} para o eletrodo FTO/CSG/anti-IL-6 na presença de soro de camundong usando diferentes diluições B)Resposta de corrente de pico catódico para as diferentes diluições testadas por SWV; C) SWV do eletrodo na (a) ausência e (b) presença de interferentes; <i>Inset</i> : Resposta relativa de corrente de obtidas por SWV. | 98 |
| Figura 55. A) Análise de estabilidade do sinal eletroquímico e B) Sinal eletroquímico após reuso do eletrodo BSA/anti-IL-6/CSG/FTO | 100 |
| Figura 56. A) curva de calibração obtida por ELISA e B) gráfico comparativo das amostras de soro de camundongo quantificadas por ELISA e Eletroquímica. | 101 |
| Figura 57. Curva de calibração de IL-6 humana obtida por A) ELISA e B) SWV usando o sensor eletroquímico proposto neste trabalho. | 103 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Figuras de mérito para os herbicidas fenilureia diuron e isoproturon no GCE e PtNPs/CS/GCE obtidos a partir de diferentes medidas eletroquímicas (n=3). | 56 |
| Tabela 2. Comparação do desempenho analítico do PtNPs/CS/GCE com métodos eletroanalíticos encontrados na literatura. | 58 |
| Tabela 3. Determinação de diuron e isoproturon em água de rio usando o eletrodo PtNPs/CS/GCE (n=3). | 61 |
| Tabela 4. Desempenho analítico de diferentes métodos aplicados na determinação de bifenoX | 76 |
| Tabela 5. Quantificação de bifenoX em amostras de água potável e água de rio usando o eletrodo modificado $MnFe_2O_4@CS/GCE$ (n=3). | 79 |
| Tabela 6. Comparação de parâmetros analíticos de diferentes eletrodos encontrados na literatura para a determinação eletroquímica de IL-6..... | 96 |
| Tabela 7. Tabela de recuperação de IL-6 fortificada em amostras de soro de camundongo...99 | |
| Tabela 8. Dados analíticos comparativos entre as técnicas de ELISA e SWV | 102 |
| Tabela 9. Quantificação de IL-6 no soro de pacientes infectados com a COVID-19. Resultados comparativos entre as metodologias de ELISA e SWV..... | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATR- espectroscopia de refletância total atenuada (do inglês Attenuated Total Reflectance)
- CS- quitosana
- CV- voltametria cíclica (do inglês Cyclic voltammetry)
- DPV- voltametria de pulso diferencial (do inglês differential pulse voltammetry)
- ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês enzyme-linked immunosorbent assay)
- Ep- potencial de pico
- Epa- potencial de pico anódico
- Epc- potencial de pico catódico
- FTIR- espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier-transform infrared spectroscopy)
- GCE- eletrodo de carbono vítreo (do inglês glassy carbon electrode)
- ipa- corrente anódica
- ipc- corrente catódica
- LBL- técnica de construção de filmes em camadas (do inglês layer-by-layer)
- LD- limite de determinação
- LQ- limite de quantificação
- LSV- voltametria de varredura linear (do inglês linear sweep voltammetry)
- MEV- microscopia eletrônica de varredura
- ms- microsegundos
- PtNPs- nanopartículas de platina
- SWV- voltametria de onda quadrada (do inglês square wave voltammetry)
- TEM- microscopia eletrônica de transmissão (do inglês Transmission Electron Microscopy)
- td- tempo de deposição
- tp- tempo de pulso
- v- velocidade
- XRD- difração de raios X (do inglês X Ray Diffraction)
- ΔE_p - separação de picos que corresponde à diferença entre Epa e Epc
- MNPs- nanopartículas metálicas (do inglês metallic nanoparticles)

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DA TESE

Artigos publicados

F. M. Morawski, N. B. Caon, K. A. P. Sousa, F. L. Faima, A. L. Parize, C. L. Jost. Hybrid chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles for electrochemical sensing of bifenoxy herbicide. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **2021**, 9, 106298.

F. M. Morawski, J. P. Winiarski, C. E. M. de Campos, A. L. Parize, C. L. Jost. Sensitive simultaneous voltammetric determination of the herbicides diuron and isoproturon at a platinum/chitosan bio-based sensing platform. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2020**, 206,111181.

Trabalhos apresentados em congresso

F. M. Morawski, J. P. Winiarski, C. L. Jost. Synthesis, characterization and electrochemical behavior of gold, platinum and palladium bionanocomposites. In: XVIII Brazil MRS Meeting, **2019**, Balneário Camboriú.

F. M. Morawski, J. P. Winiarski, C. L. Jost. Simultaneous voltammetric determination of diuron and isoproturon on a glassy carbon electrode modified with platinum nanoparticles. In: XXII SIBEE, **2019**, Ribeirão Preto.

F. M. Morawski, J. P. Winiarski, C. L. Jost. Determinação eletroquímica simultânea de herbicidas feniluréia em amostras de água. In: II Frontiers in Electrochemistry and Electroanalysis, Advances Made by Young Female Scientists, **2021**, Rio de Janeiro.

F. M. Morawski, N. B. Caon, K. L. A. Sousa, F. L. Faima, A. L. Parize, C. L. Jost. Hybrid biopolymer-coated MnFe_2O_4 nanoparticles applied to environmental analysis. In: XIX Brazilian MRS Meeting, **2021**, online conference.

Premiações

Primeiro lugar no evento Tech Women Paper Contest, categoria doutorado. **F. M. Morawski**, Eletrodo biocompatível aplicado ao monitoramento de pacientes com COVID-19, **2021**, Brasil.

Melhor trabalho apresentado na modalidade oral durante o XXIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica. **F. M. Morawski**, Core@shell magnetic nanoparticles for electrochemical determination of bifenoxy herbicide, **2021**, Brasil.

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 3 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 3 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 3 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 | Quitosana | 4 |
| 2.1.1 | Obtenção e estrutura | 4 |
| 2.1.2 | Propriedades e funcionalidade..... | 6 |
| 2.1.3 | Aplicações..... | 8 |
| 2.2 | SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS | 9 |
| 2.2.1 | Eletrodos modificados | 12 |
| 2.3 | VERSATILIDADE DA QUITOSANA EM ELETROANÁLISE | 14 |
| 2.3.1 | Filmes | 14 |
| 2.3.2 | Hidrogéis..... | 16 |
| 2.3.3 | Estabilização de nanopartículas metálicas..... | 17 |
| 2.3.4 | Sistemas híbridos: nanopartículas core-shell..... | 19 |
| 2.3.5 | Imobilização covalente de biorreceptores | 20 |
| 2.4 | DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA | 21 |
| 2.4.1 | Espécies eletroativas | 23 |
| 2.4.2 | Determinação indireta de moléculas não eletroativas | 24 |
| 2.5 | ELETROANÁLISE: VANTAGENS E TAMANHO DE MERCADO | 27 |
| 3 | PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 29 |
| 3.1 | REAGENTES | 29 |
| 3.2 | TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO | 30 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.1 | Difração de raios X..... | 30 |
| 3.2.2 | Microscopia eletrônica de varredura | 30 |
| 3.2.3 | Análises térmicas | 30 |
| 3.2.3 | Espectroscopia na região do UV-vis..... | 31 |
| 3.2.4 | Microscopia eletrônica de transmissão | 31 |
| 3.2.5 | Espectroscopia na região do infravermelho..... | 31 |
| 3.3 | ANÁLISES ELETROQUÍMICAS..... | 31 |
| 3.4 | PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO CAPÍTULO 1..... | 32 |
| 3.4.1 | Síntese das nanopartículas de platina | 32 |
| 3.4.2 | Preparo do eletrodo modificado Pt/CS/GCE | 32 |
| 3.4.3 | Análises voltamétricas | 32 |
| 3.4.4 | Análise da amostra..... | 33 |
| 3.5 | PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO CAPÍTULO 2..... | 33 |
| 3.5.1 | Síntese das nanopartículas $MnFe_2O_4@CS$ | 33 |
| 3.5.2 | Preparo do eletrodo modificado $MnFe_2O_4@CS/GCE$ | 34 |
| 3.5.3 | Análises eletroquímicas | 34 |
| 3.5.4 | Análise da amostra..... | 34 |
| 3.6 | PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO CAPÍTULO 3..... | 35 |
| 3.6.1 | Preparo dos eletrodos..... | 35 |
| 3.6.2 | Preparo das amostras de soro de murino induzidos a sepse | 36 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 37 |
| | CAPÍTULO I | 38 |
| 4.1 | Nanopartículas de platina estabilizadas em quitosana aplicadas na determinação simultânea de isotretinona e diuron | 38 |
| 4.1.1 | Intrdução ao capítulo | 39 |
| 4.1.2 | Caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas de platina..... | 40 |

| | | |
|---------------------------|---|-----------|
| 4.1.3 | Caracterização eletroquímica..... | 45 |
| 4.1.4 | Comportamento do eletrodo PtNPs/CS/GCE na presença de diuron e isoproturon..... | 48 |
| 4.1.5 | Efeito do pH e velocidade de varredura | 49 |
| 4.1.6 | Estudos de otimização | 52 |
| 4.1.7 | Determinação eletroanalítica de isoproturon e diuron..... | 54 |
| 4.1.8 | Seletividade e repetibilidade..... | 58 |
| 4.1.9 | Quantificação simultânea dos analitos em amostras de água | 60 |
| 4.1.10 | Conclusões parciais | 62 |
| CAPÍTULO II..... | | 63 |
| 4.2 | Nanopartículas de ferrita de manganês recobertas com quitosana aplicadas na determinação de bifenoX..... | 63 |
| 4.2.1 | Introdução ao capítulo | 64 |
| 4.2.2 | Caracterização das nanopartículas de MnFe ₂ O ₄ @CS | 65 |
| 4.2.3 | Caracterização eletroquímica..... | 67 |
| 4.2.4 | Comportamento eletroquímico na presença de bifenoX | 69 |
| 4.2.5 | Efeito do pH..... | 71 |
| 4.2.6 | Técnicas eletroanalíticas | 72 |
| 4.2.7 | Determinação eletroanalítica de bifenoX | 74 |
| 4.2.8 | Seletividade e repetibilidade..... | 77 |
| 4.2.9 | Determinação de bifenoX em amostras de água | 78 |
| 4.2.10 | Conclusões parciais | 79 |
| CAPÍTULO III | | 81 |
| 4.3 | Filmes de quitosana e genipina aplicados na construção de imunossensor eletroquímico para a determinação de interleucina-6..... | 81 |
| 4.3.1 | Introdução ao capítulo | 82 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.3.2 | Caracterização do filme quitosana/genipina/anti-IL-6 | 84 |
| 4.3.3 | Caracterização eletroquímica..... | 87 |
| 4.3.4 | Estudos de otimização | 90 |
| 4.3.5 | Desempenho analítico..... | 94 |
| 4.3.6 | Seletividade, precisão e estabilidade | 97 |
| 4.3.7 | Quantificação de IL-6 em indivíduos sépticos | 100 |
| 4.3.8 | Quantificação de IL-6 em pacientes de COVID-19 | 102 |
| 4.3.9 | Conclusões parciais | 105 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 106 |
| 6 | REFERENCIAS..... | 107 |

1 INTRODUÇÃO

Materiais bioinspirados a base de quitosana têm demonstrado promissora aplicação em áreas como: engenharia de tecidos, revestimentos antimicrobianos, adsorventes para aplicações ambientais e, construção de dispositivos bioeletrônicos. No contexto pandêmico, suportes combinados de quitosana têm sido explorados também como promissores antivirais no combate à COVID-19. A quitosana é o principal produto derivado da quitina, classificada como o segundo polissacarídeo mais abundante na terra. As suas maiores fontes de obtenção ocorrem através da extração e processamento da casca de crustáceos e, da biomassa de espécies de fungos, como cogumelos. O design e planejamento de suportes bioinspirados de quitosana permitem a adição de diferentes funcionalidades a sua estrutura, fornecendo o aprimoramento de propriedades e desempenho, de acordo com a aplicação de interesse. Esses materiais são ainda considerados uma alternativa de fonte renovável e biodegradável para a substituição de derivados de petróleo em aplicações industriais.

As propriedades físico-químicas e alta funcionalidade da quitosana explicam-se devido à presença de grupos funcionais em sua estrutura química. A rede polimérica formada por grupos hidroxil e amino de maneira intercalada, confere facilidade na manipulação e desenvolvimento de estruturas combinadas, através de interações eletrostáticas mediadas por alteração de fatores como pH e concentração. Por exemplo, em meios protonados os grupos amino apresentam papel fundamental na construção de filmes intercalados através de interações eletrostáticas. Dependendo da concentração, a quitosana forma também hidrogéis funcionais, mediada pela interação intermolecular entre suas cadeias poliméricas. A interação dos grupos amino com óxidos magnéticos e íons metálicos, confere a quitosana excelente alternativa na estabilização de nanopartículas e, formação de recobrimentos na síntese de nanomateriais do tipo *core-shell*. Adicionalmente, os grupos NH_2 permitem a imobilização covalente de aldeídos e cetonas através da formação de bases de Schiff.

Devido as suas características, a quitosana é considerada excelente suporte para a síntese de nanopartículas metálicas como ouro, prata, paládio e platina. Com base em processos de química verde, a quitosana atua como estabilizante através da efeitos estéricos e eletrostáticos. Nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana apresentam promissora resposta na detecção eletroanalítica de espécies orgânicas, devido ao pequeno diâmetro e elevada área, aliados as suas propriedades físico-químicas como: resistência mecânica, atividade catalítica e boa condutividade. Outra abordagem interessante consiste no design

aprimorado de nanomateriais recobertos com quitosana, denominados como estruturas *core-shell*. Esse processo de química fina permite a construção de superfícies com propriedades físico-químicas planejadas, ideal para aplicação em química analítica. Híbridos bioinorgânicos compostos por nanopartículas magnéticas, apresentam excelente condutividade, biocompatibilidade, aliados a rica química de superfície, possibilitando a ancoragem de moléculas de interesse. Na construção de sensores eletroquímicos, a superfície hidrofílica da quitosana aumenta a homogeneidade na dispersão de nanopartículas em meio aquoso e, conseqüentemente, melhora a reprodutibilidade das medidas eletroquímicas. As superfícies recobertas podem ainda aprimorar a seletividade dos sensores através de interações intermoleculares com analitos de interesse.

Nesse contexto, diferentes materiais planejados a base de quitosana podem ser utilizados para a construção de sensores eletroquímicos de alto desempenho, biocompatíveis e biodegradáveis. Os sensores eletroquímicos são uma importante ferramenta analítica, destacando-se quando comparados a outras técnicas por sua rápida resposta, baixo custo e portabilidade, porém nem sempre é possível alcançar a sensibilidade das técnicas de cromatografia gasosa e líquida acopladas ao detector de massas. Nesse contexto, a proposta do presente trabalho foi desenvolver diferentes suportes a base de quitosana, otimizando a proporção do polímero através da avaliação do comportamento eletroquímico. Após a determinação da proporção ideal, a quitosana foi usada como suporte de nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas e, na produção de filmes e hidrogéis para a produção de imunossensores. Os suportes foram empregados no desenvolvimento de eletrodos modificados para determinação simultânea de pesticidas e biomarcadores através de técnicas voltamétricas.

No capítulo 1, apresenta-se um novo sensor eletroquímico modificado com nanopartículas de platina aplicados na determinação de simultânea de isoproturon e diuron. No capítulo 2, a quitosana foi utilizada como recobrimento de nanopartículas magnéticas e, aplicada na construção de um sensor para bifeno. Por fim, no capítulo 3, sistemas combinados de quitosana e genipina foram montados na superfície do eletrodo, permitindo o desenvolvimento de um novo imunossensor através da imobilização efetiva do anticorpo no eletrodo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver novos suportes multifuncionais a base de quitosana com propriedades planejadas visando aumentar a sensibilidade e atividade eletrocatalítica de (bio)sensores eletroquímicos para a determinação de espécies de interesse biomédico e ambiental.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Preparar filmes combinados de quitosana e nanopartículas metálicas, utilizando a quitosana como estabilizante e agente modificador e, avaliar a sua aplicação na detecção simultânea de herbicidas da classe feniluréia em amostras de água;
- Estudar o comportamento eletroquímicos de sistemas híbridos *core-shell* a base de quitosana e nanopartículas magnéticas, avaliando a sua aplicação na detecção de poluentes ambientais;
- Desenvolver metodologias de imobilização de anticorpos para a construção de imunossensores a partir de sistemas combinados de quitosana e genipina, avaliando a potencial aplicação na determinação de interleucina-6 em amostras de soro.
- Sintetizar e caracterizar os diferentes suportes desenvolvidos através de análise morfológica, composição química, estrutural e comportamento eletroquímico;
- Validar as metodologias eletroanalíticas desenvolvidas para as diferentes amostras através de estudos de sensibilidade, faixa linear, limite de detecção, repetibilidade, precisão e exatidão;

2 REVISÃO DE LITERATURA

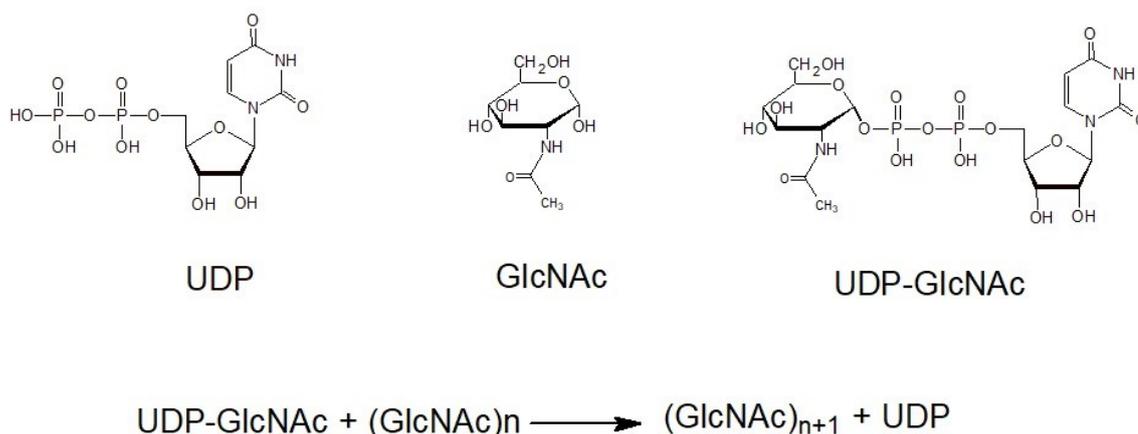
2.1 QUITOSANA

A quitosana é um polímero natural proveniente da reação de desacetilação da quitina, descoberta aproximadamente 30 anos antes da celulose. A quitina é o segundo polímero mais abundante na terra e, sua maior fonte de obtenção encontra-se no exoesqueleto de crustáceos como caranguejos, conchas e camarões. Aproximadamente 1 bilhão de toneladas de quitina podem ser encontradas por ano na biosfera, produzindo quantidades suficientes do biopolímero para aplicações industriais (Hahn et al., 2020).

2.1.1 Obtenção e estrutura

No organismo de crustáceos, o processo para a produção de quitina descreve-se a partir de um caminho bioquímico envolvendo a polimerização da N-acetilglucosamina (GlcNAc) que reage com o precursor ativado, uridina difosfato- N-glucosamina (UDP-GlcNAc) (Muzzarelli; Muzzarelli, 2005). Essa rota de biossíntese pode ser descrita a partir da equação apresentada na Figura 1.

Figura 1. Esquema representativo das reações de biossíntese da quitina em crustáceos.

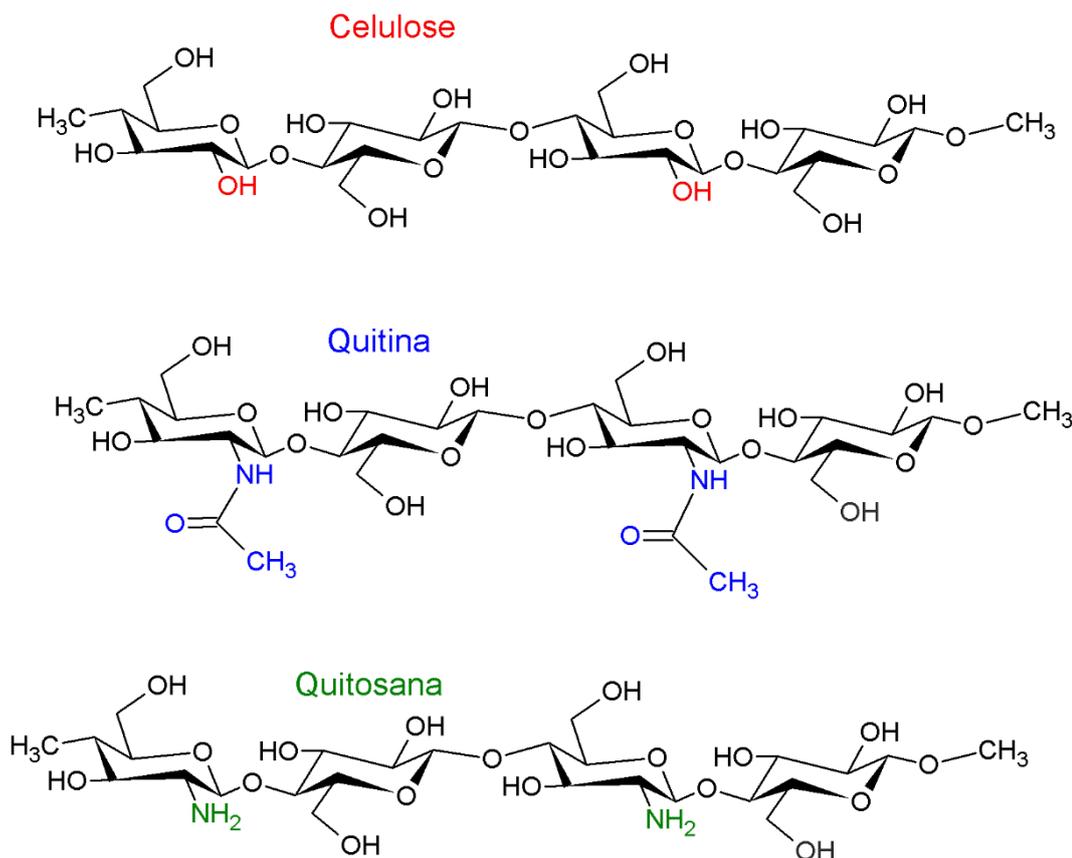


Fonte: figura produzida pela autora inspirada em (Muzzarelli; Muzzarelli, 2005).

Estruturalmente, a presença de grupos amino distingue a quitosana de outros biopolímeros, como a celulose e a quitina. A representação esquemática dos grupos funcionais presentes na estrutura dos biopolímeros mencionados estão apresentadas na Figura 2. Devido a

adição do grupo amino funcional, a quitosana apresenta propriedades únicas, exibindo maiores possibilidades de modificação através de reações orgânicas. A maior funcionalidade expande a aplicação da quitosana na síntese de novos materiais biotecnológicos.

Figura 2. Esquema representativo da estrutura e grupos funcionais presentes na celulose, quitina e quitosana.



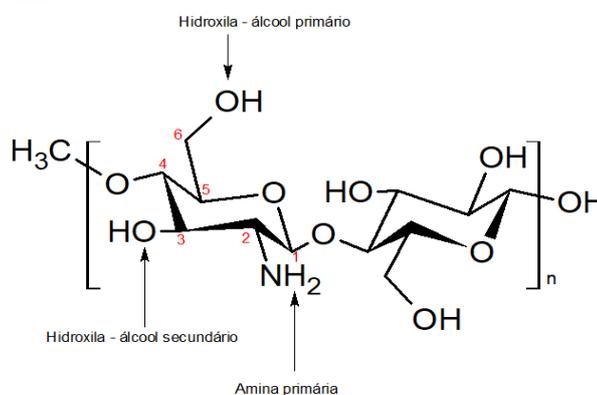
Fonte: produzido pela autora, com adaptação da referência Muzzarelli; Muzzarelli (2005)

O processo de extração da quitosana pode influenciar as suas propriedades como grau de desacetilação, peso molecular, cristalinidade, presença de grupos terminais reativos e pureza. Nesse contexto, o grau de desacetilação é um dos parâmetros mais importantes no processo de produção da quitosana, pois esse parâmetro influencia diretamente fatores como: solubilidade, funcionalidade e, biodegradabilidade do polímero final. O grau de desacetilação da quitosana comercial normalmente varia de 70 a 95%.

Na estrutura da quitosana, as unidades de monômero contendo o grupo amina encontram-se distribuídas de maneira aleatória na cadeia polimérica. Essas unidades variam de

acordo com o grau de desacetilação do polímero. Somente são consideradas como quitosana, as cadeias poliméricas provenientes da quitina que apresentam um grau de desacetilação maior que 50%. A Figura 3 ilustra a estrutura da quitosana, indicando os seus respectivos grupos funcionais. A presença dos grupos hidroxila provenientes do álcool primário encontram-se localizados no carbono C6 da quitosana e, os grupos amino estão localizados na posição C2. Além disso, a quitosana também possui um álcool secundário na posição C3 (Ardean et al., 2021). Os grupos amino apresentam maior reatividade e tendência a formar interações inter e intramoleculares através de ligações de hidrogênio.

Figura 3. Estrutura da quitosana

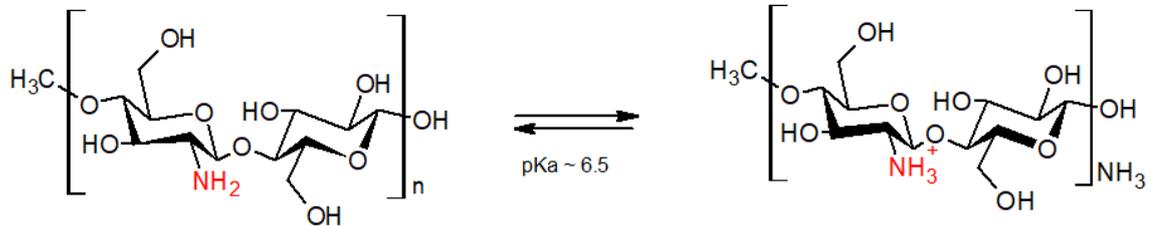


Fonte: produzido pela autora com adaptações da referência Ardean et al. (2021)

2.1.2 Propriedades e funcionalidade

Os grupos amino da quitosana funcionam como sítios para a imobilização covalente, facilitando as reações do polímero com biomoléculas, agentes ligantes e grupos funcionais de interesse (Lai et al., 2010). Esses grupos também possuem papel fundamental na solubilidade da quitosana, que pode ser facilmente controlada com a variação do pH através da protonação e desprotonação dos grupos NH₂ (Kim et al., 2015), conforme apresentado na Figura 4. Para que a protonação aconteça deve-se considerar o pK_a da quitosana, que pode variar de 6.3 a 6.5, dependendo do grau de desacetilação. Quando protonada, a quitosana apresenta natureza catiônica devido a formação do amônio quartenário positivamente carregados NH₃⁺. A superfície catiônica permite interações eletrostáticas com polímeros e espécies aniônicas, contendo grupos sulfatos e carboxilatos, originando complexos de polieletrólitos (Raj et al., 2018).

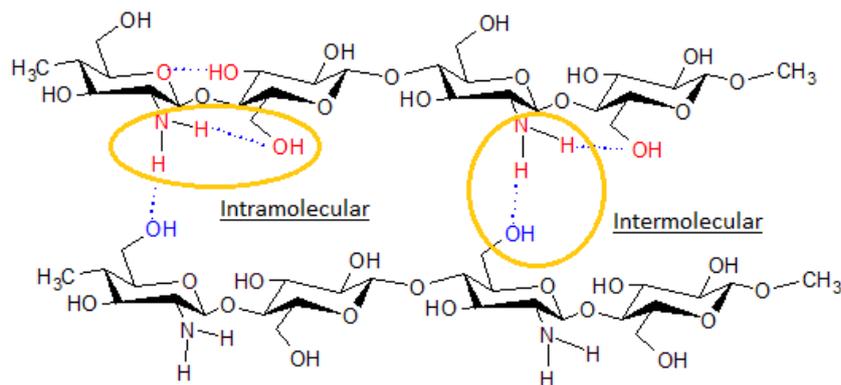
Figura 4. Representação esquemática do comportamento dos grupos amino da quitosana em função do pH.



Fonte: Figura produzida pela autora inspirada na referência Kim et al. (2015)

A viscosidade da quitosana pode aumentar significativamente em meios ácidos devido as interações inter e intramoleculares, ocasionadas principalmente pelos grupos NH_3^+ (Wani et al., 2021). Na maioria das vezes é difícil preparar soluções com concentrações maiores que 1.5% (m/m) do polímero. De acordo com os grupos funcionais, essas interações ocorrem através da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos amino e hidroxila presentes nas cadeias poliméricas, conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5. Esquema representativo das interações inter e intramoleculares que ocorrem entre as cadeias poliméricas da quitosana.



Fonte: produzido pela autora

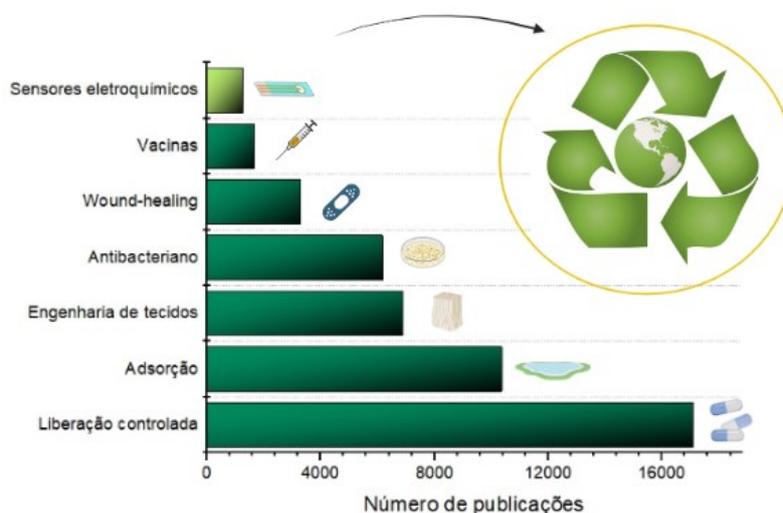
Outro fator importante é que a dissolução ocorre normalmente em meio aquoso acidificado na presença de ácido acético. O pH ácido somado a presença de íons acetato favorece a formação de interações eletrostáticas, aumentando a viscosidade do meio (Wani et

al., 2021). Além disso, a viscosidade também aumenta proporcionalmente com o grau de desacetilação da quitosana devido a presença de um maior número de grupos amino disponíveis para que essas interações ocorram. Em pHs ácidos, a alta interação intermolecular entre as cadeias poliméricas, favorece ainda a formação de redes tridimensionais, formando hidrogéis. Essas interações podem acontecer também com outros biopolímeros de natureza aniônica como o alginato, ácido hialurônico e carragenan (Raj et al., 2018).

2.1.3 Aplicações

Devido as suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, biocompatibilidade e baixa toxicidade, a quitosana apresenta potencialidade de aplicação em diferentes áreas como no tratamento de águas, liberação controlada de fármacos, indústria alimentícia, desenvolvimento de cosméticos e antimicrobianos (Ali; Ahmed, 2018; Manzoor et al., 2019; Mohandas et al., 2018). Além disso, recente avanço na fabricação de novos materiais bioinspirados a base de quitosana como filmes e hidrogéis, permitem também a sua aplicação como interface no desenvolvimento de dispositivos bioeletrônicos integrados (Koev et al., 2010). Comparativamente a outras áreas de aplicação, menor número de pesquisas pode ser observado em relação ao uso da quitosana no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, como mostrado na Figura 6.

Figura 6. Representação do número de publicações envolvendo a biomolécula quitosana relacionado a área de aplicação. Dados obtidos com o auxílio da plataforma scopus em 12 de setembro de 2021 utilizando a seguinte combinação de paravras chave na busca: chitosan and drug delivery; chitosan and adsorption; chitosan and tissue regeneration; chitosan and antibacterial; chitosan and wound-healing; chitosan and vaccines; chitosan and electrochemical sensors.



Fonte: produzido pela autora através de consulta no banco de dados SCOPUS

No desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, biocompósitos, filmes e hidrogéis a base de quitosana podem ser empregados na modificação de eletrodos visando melhorar o desempenho analítico. Por exemplo, eletrodos modificados com quitosana têm mostrado excelente sensibilidade para a determinação de pesticidas e disruptores endócrinos (Kaur et al., 2020; Santana et al., 2021). Adicionalmente, a biocompatibilidade e alta funcionalidade apresentam a quitosana como um suporte único para a imobilização de enzimas e biorreceptores (Morawski et al., 2018; Petrucci et al., 2021). Dentre as principais funcionalidades da quitosana em eletroanálise, destacam-se:

- 1) Suporte para a síntese, estabilização e recobrimento de nanomateriais;
- 2) Formação de filmes aderentes em superfícies porosas e negativamente carregadas;
- 3) Alta funcionalidade e biocompatibilidade para a imobilização de biorreceptores;
- 4) Formação de complexos e interações supramoleculares com analitos de interesse;

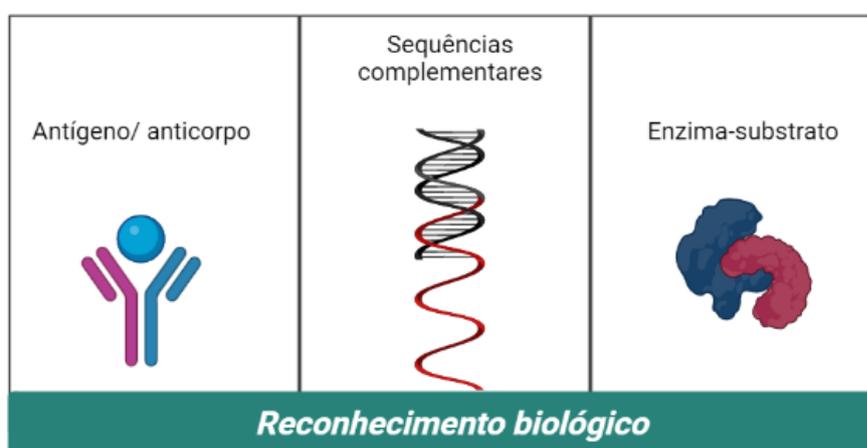
2.2 SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Sensores e biossensores eletroquímicos são dispositivos analíticos que visam determinar espécies de interesse com base nas reações redox e/ou fenômenos de transferência de carga que ocorrem na interface eletrodo/solução (Bakker; Qin, 2006). Na atualidade, os sensores eletroquímicos têm demonstrado crescente avanço em aplicações como monitoramento de contaminantes ambientais, controle de qualidade de fármacos e diagnóstico clínico (Govindhan et al., 2014; Labib et al. 2016; Sharifi et al. 2019). Comparada a técnicas convencionais, as metodologias eletroanalíticas destacam-se principalmente por: instrumentações simples e de baixo custo, alta precisão, seletividade e sensibilidade. Além disso, dispositivos eletroquímicos são facilmente miniaturizados, permitindo a leitura e transdução do sinal em dispositivos portáteis.

Os biossensores eletroquímicos são uma classe específica desses dispositivos, que utilizam reações de reconhecimento biológico entre bioreceptores e analito. Na construção de biossensores, as biomoléculas são imobilizadas na superfície do eletrodo de trabalho (Figura 7), como anticorpos, enzimas, DNA e aptâmeros (Drummond et al., 2003; H.R. Rezaie, L. Bakhtiari, 2015). Os bioreceptores catalisam reações de analitos específicos, aumentando a sensibilidade e seletividade das reações que ocorrem na interface do eletrodo de trabalho. Os biossensores eletroquímicos para a detecção de glicose foram uma das abordagens pioneiras na

utilização de reações enzimáticas na superfície de eletrodos modificados, através do uso da glicose oxidase (Wang, 2008). Ao longo dos anos, esses dispositivos têm demonstrado eficiência na determinação de biomarcadores, com potencial aplicação em triagens clínicas para detecção precoce de doenças, enfatizando a determinação de neurotransmissores e biomarcadores tumorais (Da Silva et al., 2017). Além disso, os biossensores também são ferramentas importantes no monitoramento ambiental e controle de qualidade de alimentos (Moro et al., 2019).

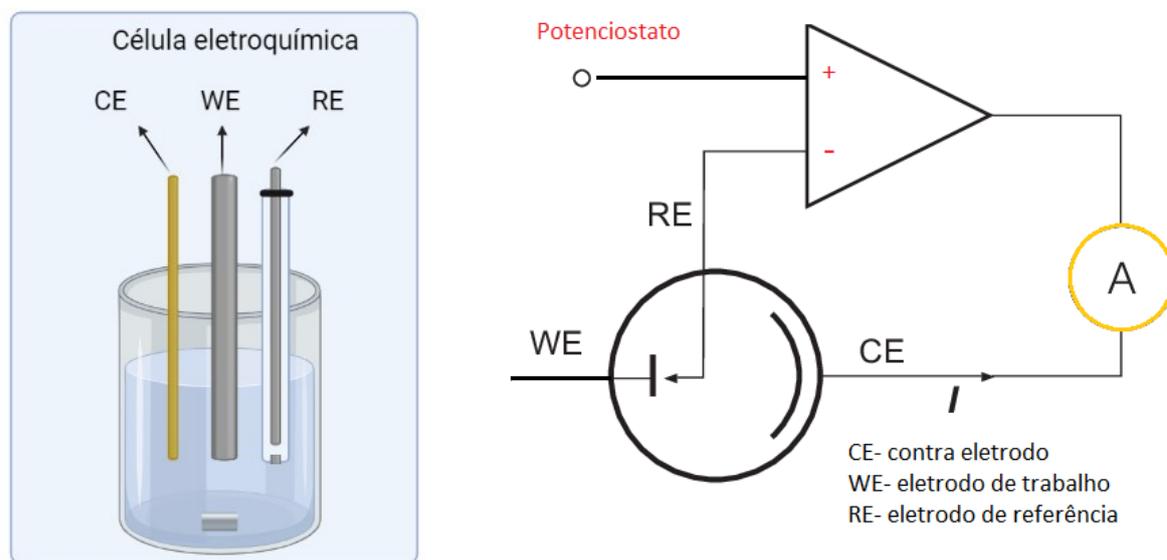
Figura 7. Representação esquemática das reações de reconhecimento biológico na superfície do eletrodo de trabalho



Fonte: produzido pela autora

Experimentalmente, um (bio)sensor eletroquímico voltamétrico, impedimétrico ou amperométrico, pode ser formado por um sistema contendo dois ou três eletrodos, contendo convencionalmente: um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar, submergidos em uma solução eletrolítica e, conectados a um potenciostato. A Figura 8 apresenta uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos. A aplicação de voltagem externa produz uma resposta do analito na solução, sendo que a natureza dessa resposta pode ser usada para identificar e/ou quantificar a espécie de interesse. No sistema eletroquímico, o eletrodo de trabalho é usado para monitorar a resposta do analito. O eletrodo de referência, por sua vez, fornece um potencial estável e conhecido, onde o potencial do eletrodo de trabalho é medido em relação a essa referência (Brett; Oliveira-Brett, 1999; Thomas; G. Henze, 2001).

Figura 8. Célula eletroquímica convencional de três eletrodos e representação do circuito aplicado pelo potenciostato



Fonte: produzido pela autora inspirada nas referências Brett; Oliveira-Brett (1999) e Thomas; G. Henze (2001)

O eletrodo de trabalho é o principal componente na célula eletroquímica, pois as reações de transferência de carga, posteriormente transformados em sinal elétrico, ocorrem na sua superfície. Dessa maneira, o tipo de eletrodo usado e a modificação da superfície influenciam diretamente a sensibilidade e seletividade da análise. Os eletrodos de trabalho podem ser construídos a partir de diferentes materiais como metais nobres (ouro, prata, platina), óxidos metálicos dopados (óxido de estanho dopado com flúor e índio) e suportes de carbono. Os eletrodos de carbono têm recebido maior ênfase devido ao baixo custo, biocompatibilidade, condutividade e ampla janela redox (Scida et al., 2011; Wang et al. 2019). Dentre os eletrodos de carbono, destacam-se os eletrodos de carbono vítreo, eletrodos de pasta de carbono, eletrodos carbono cerâmicos e, recentemente, eletrodos impressos de carbono. Esses eletrodos alcançar melhor desempenho analítico em termos de sensibilidade e seletividade, através da modificação de superfície com nanomateriais (Laghrib et al., 2019; Özcan et al., 2019; Silva et al., 2019).

Outro avanço recente, ainda pouco explorado, consiste no desenvolvimento de sensores eletroquímicos usáveis a partir da impressão de eletrodos em diferentes substratos como: roupa, pele e suportes flexíveis biocompatíveis (Kim et al., 2019). Esses eletrodos apresentam potencial aplicação em monitoramento de doenças. Alguns exemplos de eletrodos impressos podem ser encontrados na literatura em diferentes substratos flexíveis (Windmiller;

Wang, 2013). Além disso, a microeletrônica tem provado nos últimos anos a possibilidade de integração de bio/sensores eletroquímicos a smartphones, visando revolucionar a área de diagnóstico clínico. Nesse sentido, filmes e hidrogéis a base de quitosana podem ser utilizados também como nova oportunidade no desenvolvimento de modificações para diferentes substratos, com foco na biocompatibilidade e sustentabilidade (Ramirez Caballero et al., 2019 e Wu et al., 2018).

2.2.1 Eletrodos modificados

Os eletrodos quimicamente modificados surgiram no início da década de 80 (Murray; 1980). A modificação química tem como principal objetivo aumentar o desempenho dos métodos eletroanalíticos em termos de sensibilidade e seletividade, controlando as propriedades físico-químicas na interface eletrodo/solução (Dong; Wang; 1989). O aumento no desempenho eletroanalítico pode ser alcançado devido as interações químicas com a espécie de interesse, através de diferentes mecanismos como: pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes. Devido ao avanço na área de nanotecnologia e ciência dos materiais, os eletrodos modificados continuam evoluindo e, podem ser considerados como ponto chave na produção de dispositivos de alto desempenho (Baig et al.; 2018).

A modificação química consiste na imobilização de reagentes na superfície condutora do eletrodo. Diferentes estratégias podem ser empregadas na modificação do eletrodo como: adsorção de reagentes, ligação covalente, formação de filmes por aderência eletrostática e mistura física dos componentes (Scholz, 2010). Dentre as principais estratégias para a ancoragem de modificadores em eletrodos sólidos, destaca-se a formação de filmes poliméricos através de metodologias como: *drop-coating*, *dip-coating* e *spin coating*. Materiais poliméricos apresentam inúmeras vantagens na construção de sensores eletroquímicos devido formação de filmes finos e aderentes, baixo-custo e, facilidade de modificação, devido a disponibilidade de grupos funcionais (Dhanjai et al., 2019 e Spsychalska et al., 2020). Principalmente biopolímeros como a quitosana, alginato e carragenan, considerados alternativas ambientalmente corretas, apresentando propriedades promissoras para a construção de eletrodos descartáveis (Hummel et al., 2020 e Wei et al., 2021).

Os nanomateriais também são particularmente uma excelente estratégia na modificação de eletrodos, uma vez que eles apresentam uma alta área de superfície e atividade eletrocatalítica. O tamanho e morfologia das partículas imobilizadas no eletrodo de trabalho

podem contribuir para o aumento da área eletroativa, influenciando a relação sinal-ruído e aumentando a sensibilidade do método. De acordo com a equação de Randles–Sevcik, a área eletroativa de macroeletrodos pode ser estimada por:

$$I_p = 2.69 * 10^5 n^{3/2} D^{1/2} C_{bulk} v^{1/2} A$$

Na Eq 1. I_p = corrente de pico, n = número de elétrons envolvidos na reação redox, D = coeficiente de difusão, C = concentração de espécies ativas em solução, v = velocidade de varredura e A = área eletroativa (Bard; Faulkner, R., 2000). De acordo com a equação, pode-se inferir que o aumento da área eletroativa provoca consequente aumento na resposta de corrente faradaica em experimentos voltamétricos, Apesar da relação direta entre área e corrente faradaica, discussões recentes têm demonstrado que a equação de Randles–Sevcik apresenta erros consideráveis no cálculo da área eletroativa de eletrodos modificados com nanomateriais. Além disso, as propriedades sinérgicas de materiais nanométricos proporcionam um efeito electrocatalítico de complexo entendimento. Nesse sentido, o alto desempenho não seria um fator unicamente relacionado ao aumento de área (Paixão, 2020).

Além das propriedades electrocatalíticas, o custo de sensores modificados com nanopartículas também é um potencial atrativo, considerando que a quantidade de precursores é significativamente menor quando comparada a um macroeletrodo. Especialmente, no caso das nanopartículas metálicas, que têm sido extensivamente empregadas na construção de plataformas electroquímicas com excelente desempenho, como cobre, prata, ouro, platina, e paládio. Diferentemente da escala macro, em dimensões nanométricas os planos cristalinos ficam completamente expostos, aumentando a resposta de corrente e a electrocatálise (Campbell; Compton, 2010). Adicionalmente, o transporte de massas nas camadas porosas que se formam entre as nanopartículas pode fazer com que ocorra um deslocamento de potenciais tanto no sentido positivo quanto negativo (Menshykau; Compton, 2008). Compton sugere que esses sistemas ainda precisam de estudos teóricos complementares, permitindo maior entendimento a respeito dos fenômenos em interfaces electroquímicas nanoestruturadas (Campbell; Compton, 2010).

2.3 VERSATILIDADE DA QUITOSANA EM ELETROANÁLISE

A modificação de eletrodos com materiais poliméricos, como a quitosana, pode aumentar o desempenho e a funcionalidade dos sensores eletroquímicos. Dentre as principais vantagens, destacam-se a biocompatibilidade, formação de filmes e hidrogéis, alta funcionalidade para a complexação e imobilização de biorreceptores (Wongkaew et al., 2019). Adicionalmente, eletrodos modificados com hidrógeis biopoliméricos apresentam superfície rugosa e elevada porosidade, adequados para aplicações em bioeletrônicos (Dhanjai et al., 2019). Sensores eletroquímicos a base de quitosana classificam-se ainda como métodos analíticos sustentáveis, com base em processos de química verde, economia circular e, baixa geração de resíduos, através da utilização de matérias primas biodegradáveis.

Inúmeras são as aplicações de eletrodos modificados com a quitosana visando a detecção ultra-sensível de compostos farmacêuticos, antioxidantes, neurotransmissores, glicose, poluentes ambientais e biomarcadores (Annu; Raja, 2020). A forte interação e formação de complexos entre quitosana/íons metálicos também é uma excelente estratégia para a detecção de Hg^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em níveis de concentração na faixa de nmol L^{-1} (Sarikokba et al., 2020). Nesse sentido, eletrodos de carbono vítreo e, eletrodos de óxido de estanho dopado com flúor, podem ser facilmente modificados com filmes e hidrógeis a base de quitosana. Recentemente, na construção de hidrogéis, a quitosana tem sido ainda usada na fabricação de eletrodos molecularmente impressos, aumentando significativamente a seletividade através de sítios de interação supramolecular previamente moldados (Wang et al., 2021). Adicionalmente, a multifuncionalidade da quitosana pode ser explorada visando o aumento do desempenho eletroanalítico através da estabilização e recobrimento de nanopartículas metálicas e, no suporte para a imobilização de biorreceptores. Essas alternativas são descritas em detalhes abaixo.

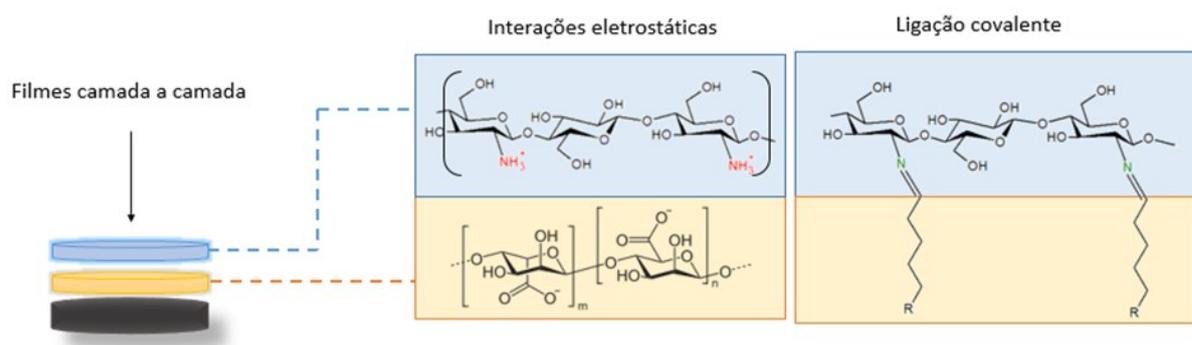
2.3.1 Filmes

Polímeros naturais como a quitosana fornecem a possibilidade de formação de filmes finos para aplicação em indústrias química, bioeletrônicos, biomédica e alimentícia (Aider, 2010 e Yoshida et al., 2018). Filmes de quitosana pura podem ser obtidos através da dissolução do biopolímero em meio ácido e, posterior secagem. Diversas estratégias podem ser adotadas para melhorar as propriedades físicas e mecânicas desses filmes como: a adição de componentes, agentes ligantes, irradiação e tratamento via ultrassom (Lepoittevin et al., 2019 e

Nataraj et al., 2018). Filmes de quitosana podem ser afetados pelo pH, peso molecular e grau de desacetilação.

Quando os filmes de quitosana são produzidos em meio ácido diluído, a protonação dos grupos NH_2 forma camadas solúveis em meio aquoso, dependendo das interações de superfície, limitando o seu uso para algumas aplicações. Nesse sentido, reações covalentes com agentes ligantes como genipina, formaldeído, glutaraldeído podem ser usados para aumentar a hidrofobicidade e, evitar a dissolução, produzindo suportes mecanicamente mais estáveis (Nataraj et al., 2018 e Rocha et al., 2021). Na modificação de eletrodos, a técnica de formação de camadas (do inglês *layer-by-layer* - LBL) permite o planejamento de filmes com propriedades combinadas através de interações eletrostáticas e/ou ligações covalentes com mediadores de elétrons e espécies eletrocatalíticas como: azocorantes, compostos aniônicos, nanoestruturas e biomacromoléculas (An et al., 2018; Pavinatto et al., 2015; Rydzek et al., 2015). Além disso, a rica química de superfície permite reações covalente com os grupos amino com tióis, aldeídos, epóxidos, haletos, entre outras. A Figura 9 ilustra a montagem de um eletrodo modificado utilizando a metodologia de montagem camada a camada, através de interações eletrostáticas e ligação covalentes.

Figura 9. Representação da técnica de LBL aplicada na construção de filmes de quitosana para aplicação em sensores e biossensores eletroquímicos



Fonte: imagem produzida pela autora inspirada nas referências An et al., 2018; Pavinatto et al., 2015 e Rydzek et al., 2015

Na literatura existem diferentes eletrodos produzidos através de filmes LBL de quitosana com materiais combinados utilizando diferentes técnicas de formação de filmes como imersão, *spin coating*, *spray drying* e deposição eletroquímica. Por exemplo, trabalho relata a

construção de um novo biossensor através da metodologia layer-by-layer para a ancoragem de múltiplos componentes. Nesse dispositivo, o eletrodo foi primeiramente modificado com um filme contendo nanotubos de carbono dispersos em quitosana e sarcosina oxidase. A modificação foi posteriormente recoberta com Nafion, que proporcionou maior estabilidade do filme, mantendo a permeabilidade e a atividade enzimática (Pannell et al., 2018).

2.3.2 Hidrogéis

Por definição os hidrógeis são redes poliméricas tridimensionais, formadas a partir de conexões físicas ou químicas. Esses compostos são capazes de reter grandes quantidades de água e/ou fluídos biológicos (Giri et al., 2019). A fabricação de hidrogéis, a partir de biopolímeros como a quitosana pode ser interessante devido a sua baixa toxicidade e biocompatibilidade, oferecendo ampla gama de aplicações (Bhattarai et al., 2010). Hidrogéis têm mostrado grande avanço na área de novos (bio)sensores, como substrato ideal na imobilização de biomoléculas, com particular ênfase em imunoenaios e bioanálise (Velayudham et al., 2021 e Xu et al., 2021). Esses suportes têm demonstrado alta estabilidade de biomoléculas imobilizadas e, sensibilidade considerável. Esses fatores são decorrentes da alta disponibilidade de sítios ativos na rede tridimensional aliada a excelente permeabilidade do meio. Por exemplo, trabalho recente relata a aplicação de um novo hidrogel com atividade catalítica para a determinação do biomarcador CA72-4 (importante biomarcador de câncer gástrico), apresentando limites de detecção na faixa de $\mu\text{U mL}^{-1}$ (Ma et al., 2021).

Devido à presença de grupos amino e a sua natureza catiônica, a quitosana tem a capacidade de formar hidrogéis biocompatíveis através de interações físicas ou ligações químicas (Dimida et al., 2015 e Huber et al., 2017). Por exemplo, as interações intermoleculares entre a quitosana e outros suportes podem ocorrer a partir de forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio. Esses hidrogéis não utilizam agentes ligantes tóxicos e apresentam facilidade de síntese, resultando em características ideais para aplicações biomédicas (Peers et al., 2022). Por outro lado, a baixa resistência mecânica muitas vezes limita as possibilidades de aplicação. Outra metodologia é a utilização de *cross-linkers* para a produção de hidrogéis de quitosana covalentemente ligados, que apresentam maior estabilidade química e conformacional, utilizando agentes como glutaraldeído, diglicidil éter e a genipina (Bratskaya et al., 2019 e Gao et al., 2016). Nesse sentido, as principais metodologias de obtenção de hidrogéis de quitosana estão descritas abaixo:

Método de evaporação do solvente: Nesse método a quitosana é solubilizada em meio ácido, normalmente ácido acético e adicionada sob uma superfície. O filme é seco em temperaturas de aproximadamente 65°C. Essa membrana é posteriormente neutralizada com solução de hidróxido de sódio (Nangia et al., 2018).

Método *cross-linking*: consiste na formação de ligações covalente com diferentes agentes ligantes como genipina e glutaraldeído. Após a adição do agente ligante, a solução é neutralizada para que os grupos amino possam reagir covalentemente (Frick et al., 2018).

Gelificação ionotrópica: consiste na formação de polieletrólitos através de interações eletrostáticas entre os grupos amino protonados NH^{3+} da quitosana com polímeros ou moléculas negativamente carregadas, como o carrageenan e alginato (Dumont et al., 2018 e Rassas et al., 2019).

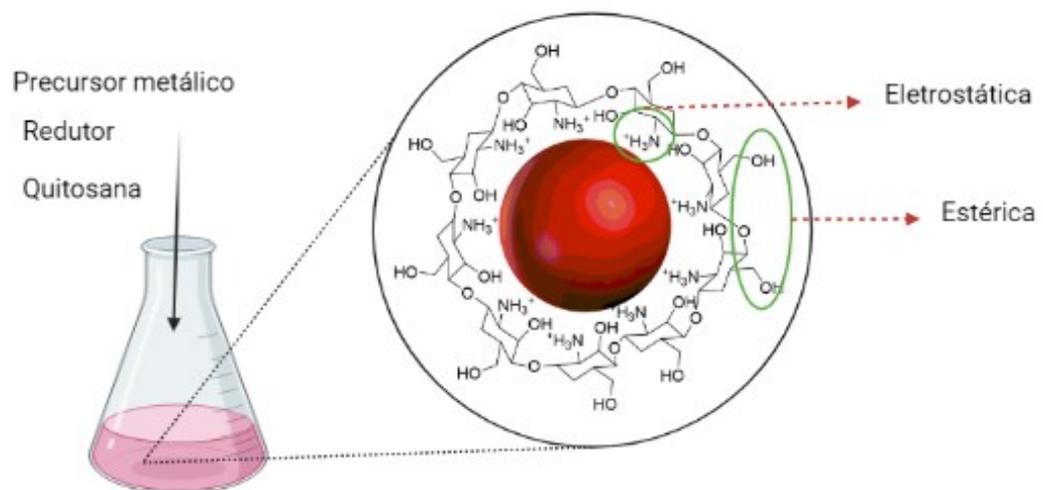
2.3.3 Estabilização de nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas podem ser quimicamente sintetizadas através da redução química dos precursores metálicos, formando estruturas com diferentes morfologias, na qual, ao menos uma das dimensões apresenta escala nanométrica entre 1 e 100 nm. Comparado a materiais *bulk*, nanopartículas metálicas apresentam propriedades químicas, ópticas e eletrônicas diferenciadas. Para aplicações eletroanalíticas, o pequeno tamanho e alta energia de superfície contribuem para a eletrocatalise e, na rápida cinética de transferência de elétrons, aumentando a sensibilidade e/ou seletividade dos sensores eletroquímicos. Dentre os principais desafios na síntese de nanopartículas metálicas, destacam-se: 1) obtenção de dispersões homogêneas com partículas monodispersas, assegurando a reprodutibilidade; 2) garantir o pequeno diâmetro, evitando a coalescência. Esses fatores podem ser controlados através do uso de agentes estabilizantes que podem atuar através de dois mecanismos: estérico e eletrostático (Kleijn et al., 2014).

A quitosana apresenta-se como excelente estabilizante de nanopartículas metálicas, podendo atuar através de um mecanismo estérico fornecido pelas cadeias poliméricas. A presença de grupos amino também auxilia a coordenar os íons metálicos na rede que são subsequentemente reduzidos o seu estado de valência zero com o auxílio de um agente redutor, formando partículas com alto grau de dispersão (Deon et al., 2019 e Morawski et al., 2021). Alguns trabalhos relatam também o uso da quitosana como agente redutor na síntese de nanopartículas de ouro (Huang; Yang, 2004). As interações eletrostáticas entre os íons AuCl_4^-

e os grupos NH_3^+ quitosana tem um papel fundamental na redução, devido a transferência de carga (Abrica-gonzález et al., 2019). As dispersões produzidas a partir nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana podem ser usadas na produção de filmes e hidrogéis nanocompósitos (Silva et al., 2021). A Figura 10 apresenta um esquema representativo de dispersões formadas a partir de quitosana e nanopartículas de ouro.

Figura 10. Representação de dispersões de nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana



Fonte: produzido pela autora inspirado na referência Tokarek et al. (2013)

Nas últimas décadas, as nanopartículas metálicas têm apresentado promissora resposta na detecção eletroanalítica de uma ampla variedade de espécies devido a sua alta elevada área e alta energia de superfície, aliadas as suas propriedades físico-químicas diferenciadas como resistência mecânica, atividade catalítica e boa condutividade (Campbell; Compton, 2010). No desenvolvimento de sensores, principalmente as nanopartículas de metais nobres, como ouro, paládio, prata e platina, apresentam estabilidade química numa ampla faixa de potencial, adequada para eletroanálise. Essas partículas são facilmente sintetizadas através da metodologia *bottom-up* através de redução química dos seus precursores metálicos na presença de redutores como o NaBH_4 (Wang, 2012).

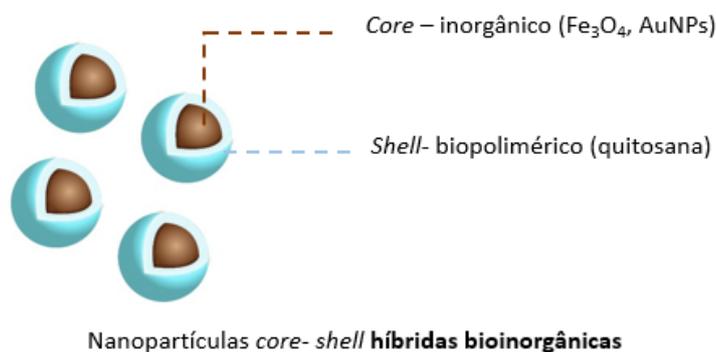
As nanopartículas de ouro são principalmente exploradas na área de bioanalítica devido à ligação de tióis em ouro (Au-SH), permitindo a imobilização covalente de biorreceptores como anticorpos e fragmentos de DNA (Garifullina; Shen, 2019). Além disso,

as nanopartículas de metais nobres podem ser usadas como alternativa de amplificação do sinal na construção de imunossensores eletroquímicos, substituindo a necessidade de uso de enzimas (Abdullah; Uddin, 2016). Nesse sentido, nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana podem ser utilizadas na construção de eletrodos modificados aumentando o desempenho analítico de (bio)sensores eletroquímicos.

2.3.4 Sistemas híbridos: nanopartículas core-shell

Nanopartículas do tipo *core-shell* são compósitos formados por um centro (*core*) recobertos total ou parcialmente por uma ou mais camadas de outro material (*shell*). Partículas *core-shell* podem ser divididas em diferentes categorias, formadas por dois ou mais materiais orgânicos, inorgânicos ou híbridos organo-inorgânicos (Ghosh Chaudhuri; Paria, 2012). O recobrimento de nanopartículas pode fornecer diversas vantagens como: 1) sinergia entre os materiais aumentando o efeito eletrocatalítico 2) aumento da biocompatibilidade através do recobrimento com biopolímeros 3) aumento na estabilidade e dispersão de nanopartículas no meio de interesse (Chatterjee et al., 2014 e Kalambate et al., 2019). Nessas estruturas, a quitosana pode ser utilizada no recobrimento de nanopartículas magnéticas e, outros óxidos metálicos, originando sistemas *core-shell* híbridos bioinorgânicos com diferenciada química de superfície (Lahouti; Naeimi, 2020), como apresentado na Figura 11.

Figura 11. Representação de dispersões de nanopartículas metálicas estabilizadas em quitosana



Fonte: produzido pela autora

O recobrimento de nanopartículas magnéticas com a quitosana confere uma característica hidrofílica as nanopartículas magnéticas, aumentando a dispersão e,

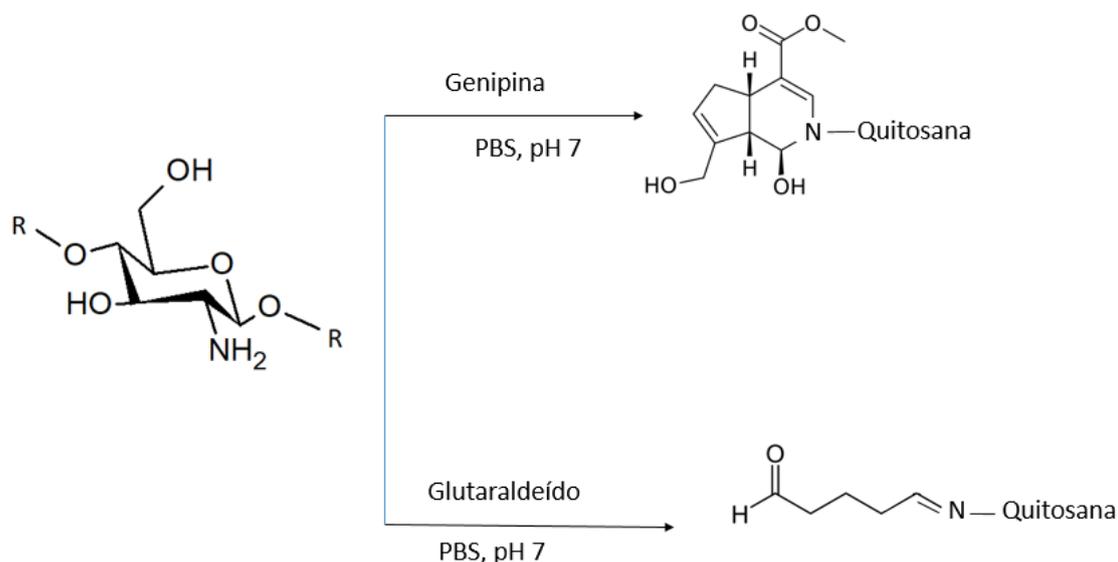
consequentemente ajudando na formação de filmes homogêneos. Outra característica importante consiste no aumento da estabilidade dessas partículas em diferentes meios, aumentando o tempo de vida do eletrodo e as possibilidades de aplicação (El-Sherbiny et al., 2016 e Mani et al., 2017). Além dessas vantagens, sistemas *core-shell* podem melhorar o desempenho analítico de sensores, uma vez que o recobrimento apresenta grupos funcionais e dopantes específicos, que seletivamente interagem com o analito de interesse. Por exemplo, nanopartículas de magnetita recobertas com quitosana apresentaram alta seletividade e sensibilidade e eficiente resposta eletroquímica na detecção voltamétrica de metais pesados, devido ao design aprimorado impressão de íons na superfície da nanopartícula, visando formar cavidades específicas para a complexação dessas espécies (Wei et al., 2020). As mesmas estratégias e interações podem ser exploradas também para detectar seletivamente outras moléculas.

2.3.5 Imobilização covalente de biorreceptores

Devido à não toxicidade e alta funcionalidade, a quitosana apresenta-se como estratégia única para a imobilização de biorreceptores como anticorpos, aptâmeros e enzimas. No caso dos imunossensores, anticorpos imobilizados na superfície do eletrodo de trabalho são responsáveis por reconhecer especificamente a molécula de interesse, que são comumente biomarcadores clínicos ou poluentes ambientais (George et al., 2020 e Kalyani et al., 2021). Com o objetivo de aumentar a afinidade e as interações químicas, agentes ligantes podem ser covalentemente ancorados nos grupos NH_2 , como o glutaraldeído, genipina e o par EDC/NHS (Laranjo et al., 2019). A Figura 12 apresenta os tipos de reações combinadas que podem acontecer entre a quitosana e o glutaraldeído para a imobilização de enzimas e anticorpos.

Além de permitir uma interação efetiva, esses agentes podem ainda atuar como braços espaçadores, através de reações de base de Schiff, permitindo a maior disponibilidade dos sítios ativos de enzimas e anticorpos (Kurita, 2006). Em eletroanalítica, esses suportes têm apresentado excelente sensibilidade e seletividade, devido à imobilização efetiva dos biorreceptores (Suginta et al., 2013). A efetiva imobilização pode ainda aumentar proporcionalmente ao grau de desacetilação da quitosana, permitindo o maior número de grupos amino disponíveis para interação. Outro fator importante consiste na significativa estabilidade de biorreceptores imobilizados em suportes à base de quitosana, aumentando a relevância desses dispositivos voltados para aplicações práticas (Suginta et al., 2013).

Figura 12. Representação da ligação covalente formada entre a quitosana e agentes ligantes



Fonte: produzido pela autora

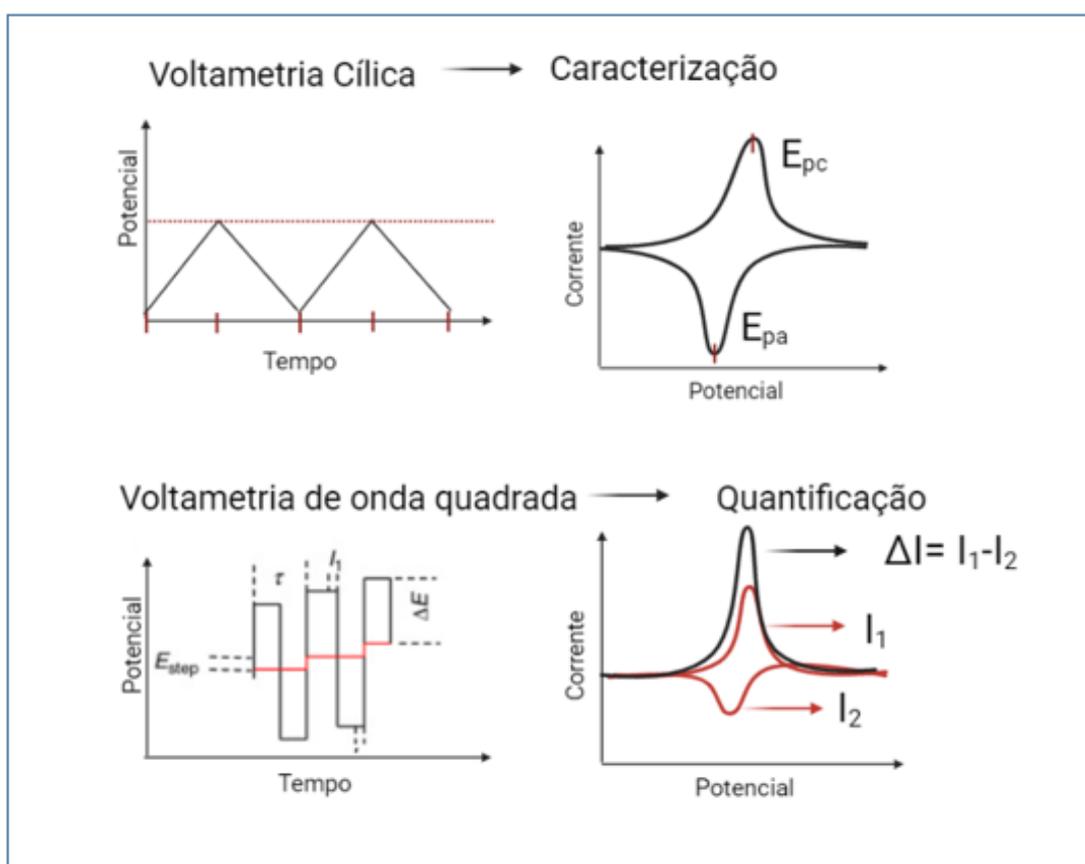
Além de permitir uma interação efetiva, esses agentes podem ainda atuar como braços espaçadores, através de reações de base de Schiff, permitindo a maior disponibilidade dos sítios ativos de enzimas e anticorpos (Kurita, 2006). Em eletroanalítica, esses suportes têm apresentado excelente sensibilidade e seletividade, devido a imobilização efetiva dos biorreceptores (Suginta et al., 2013). A efetiva imobilização pode ainda aumentar proporcionalmente ao grau de desacetilação da quitosana, permitindo o maior número de grupos amino disponíveis para interação. Outro fator importante consiste na significativa estabilidade de biorreceptores imobilizados em suportes a base de quitosana, aumentando a relevância desses dispositivos voltados para aplicações práticas (Suginta et al., 2013). Nesse sentido, agentes de ligação verde como a genipina, também podem ser uma excelente estratégia no desenvolvimento de sensores eletroquímicos verdes biocompatíveis e biodegradáveis, podendo apresentar tendência na área de bioeletrônicos usáveis.

2.4 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA

As técnicas voltamétricas se baseiam na aplicação de um potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, enquanto a corrente que flui é medida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar como resultados das reações redox que acontecem na interface

eletrodo/solução. Cada técnica voltamétrica possui sua especificidade, algumas são preferencialmente indicadas na quantificação de baixas concentrações de analito devido à alta sensibilidade, enquanto outras são ferramentas úteis na investigação do comportamento eletroquímico de espécies, mecanismos de reação e parâmetros cinéticos (Scholz, 2010). Algumas das técnicas voltamétricas mais usadas são: voltametria cíclica (CV), voltametria de varredura linear (LSV), voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de pulso diferencial (DPV).

Figura 13. Representação esquemática do programa de potencial aplicado na análise de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.



Fonte: produzido pela autora

A técnica voltamétrica mais empregada na caracterização eletroquímica é a voltametria cíclica (CV), normalmente aplicada para determinar a natureza das reações redox que ocorrem em uma solução. Essa técnica não é tão sensível como técnicas voltamétricas de pulso, porém é útil na caracterização e rastreamento do comportamento redox de analitos. A CV é usada como uma ferramenta para aquisição de parâmetros físico-químicos, relacionados

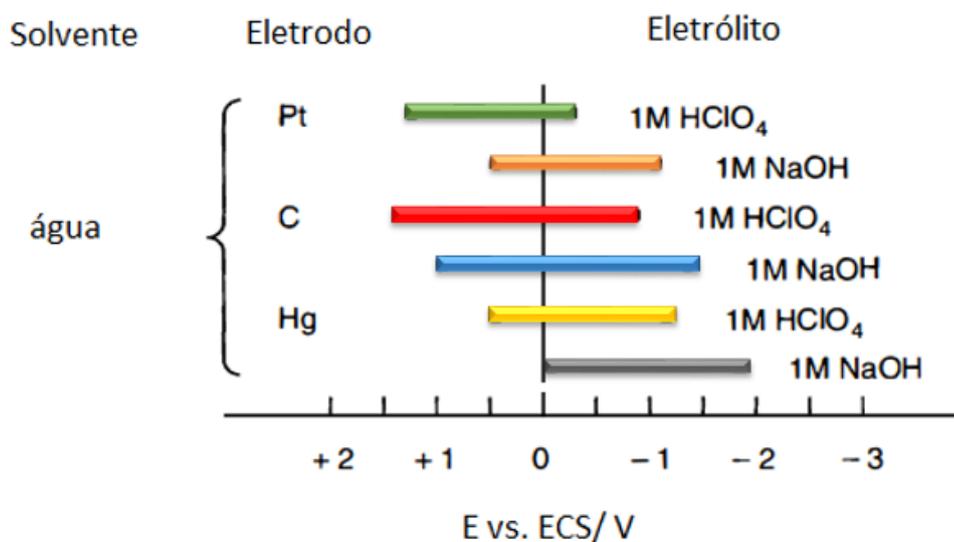
a termodinâmica e cinética do processo redox, mecanismos de oxirredução, determinação de potenciais formais e transferência eletrônica. O programa de potenciais na CV é aplicado de maneira linear, no qual, o potencial é modificado continuamente em função linear do tempo (Elgrishi et al., 2018).

De todas as técnicas eletroanalíticas, as estratégias de pulso destacam-se pela sensibilidade. Procedimentos como a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada mostram-se como técnicas mais eficientes e sensíveis na quantificação de analitos. O princípio central por trás das técnicas de pulso reside na diferença nas taxas de decaimento da corrente de carga e da corrente faradaica durante a amostragem de corrente. A corrente de carga decai mais rapidamente devido ao decaimento como função exponencial, enquanto a decomposição da corrente faradaica é inversamente proporcional à raiz quadrada do tempo. Portanto, no final de cada pulso a corrente capacitiva é significativamente menor quando comparada a corrente faradaica. Esse aumento na diferença entre corrente faradaica e capacitiva permite um menor limite de detecção bem como maior sensibilidade, e, portanto, é ideal para quantificações eletroanalíticas (Mirceski et al., 2013 e Uslu; Ozkan, 2011).

2.4.1 Espécies eletroativas

As espécies eletroativas são aquelas que sofrem redução ou oxidação na janela de potencial útil num específico sistema eletroquímico. Diferentes classes de espécies orgânicas ou inorgânicas podem ser consideradas eletroativas (Scholz, 2010). Nesses sistemas, a corrente produzida pelas reações de transferência de elétrons, que ocorrem na superfície do eletrodo, é proporcional a concentração da espécie reduzida e/ou oxidada (Elgrishi et al., 2018). Dentre os compostos inorgânicos mais comumente detectados por métodos eletroquímicos, podemos destacar os cátions metálicos e ânions, como o sulfito (Kokkinos et al., 2018 e Luo et al., 2021). O foco da eletroanálise concentra-se principalmente na determinação de espécies eletroativas orgânicas, devido à presença de grupos funcionais que podem ser reduzidos ou oxidados com certa facilidade como: grupos nitro, aminas aromáticas, compostos fenólicos, amidas, entre outros. Na maioria dos casos a eletro oxidação ou redução dos componentes orgânicos envolve a remoção ou adição de hidrogênios e por isso é dependente do pH (Scholz, 2010). Conforme apresentado na Figura 13, a janela eletroquímica útil nos métodos voltamétricos depende de três fatores: 1) solvente utilizado como meio de análise; 2) composição do eletrodo de trabalho e 3) composição do eletrólito.

Figura 14. Janela eletroquímica útil em meio aquoso na presença de diferentes eletrólitos e eletrodos



Fonte: produzido pela autora com adaptação da referência Thomas; G. Henze (2001)

Nesse sentido, é possível planejar os experimentos avaliando o potencial redox dos grupos funcionais presentes na molécula de interesse, combinados a janela eletroquímica útil encontrada na literatura. Dentre as classes de moléculas orgânicas eletroativas com alta relevância em monitoramento ambiental e diagnóstico, podem-se destacar pesticidas, disruptores endócrinos, neurotransmissores, lipídios e hormônios (Barbosa et al., 2019 e Dhanjai et al., 2018).

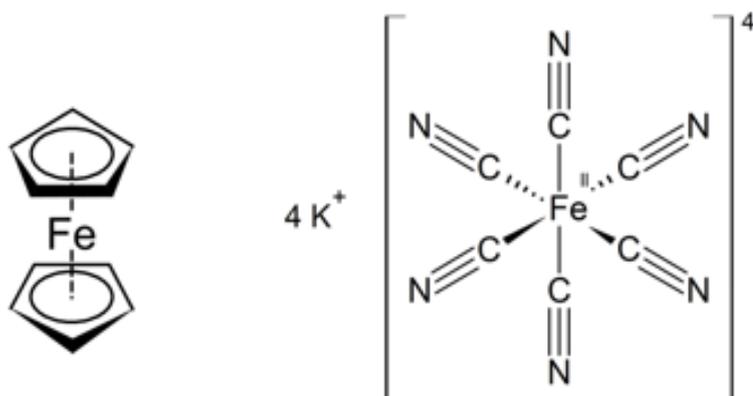
2.4.2 Determinação indireta de moléculas não eletroativas

Apesar de muitas moléculas orgânicas apresentarem grupos eletroativos que podem ser facilmente oxidados e/ou reduzidos, outras espécies são consideradas eletroquimicamente inertes. Dentre elas, destacam-se principalmente proteínas de interesse biomédico como biomarcadores tumorais e cardíacos (Rizwan et al., 2019). Nesse sentido, a principal estratégia para identificação e quantificação eletroanalítica desses compostos é a determinação indireta

através do uso de mediadores redox. Essa metodologia é amplamente explorada na construção de imunossensores eletroquímicos (Cho et al., 2018 e Dai; Liu, 2019).

No sistema de determinação indireta, os bioreceptores (anticorpos, ácidos nucleicos, células) são covalentemente ligados a superfície do eletrodo de trabalho. O mediador redox é uma espécie eletroativa imobilizada na superfície do eletrodo ou uma sonda redox presente na própria solução em que está sendo realizada a análise. O mediador apresenta sinal eletroanalítico intenso e reversível (Jalalvand, 2019 e Ruecha et al., 2019). A Figura 14 apresenta a estrutura química de dois dos mediadores de elétrons amplamente empregados na literatura: ferroceno e do ferrocianeto de potássio.

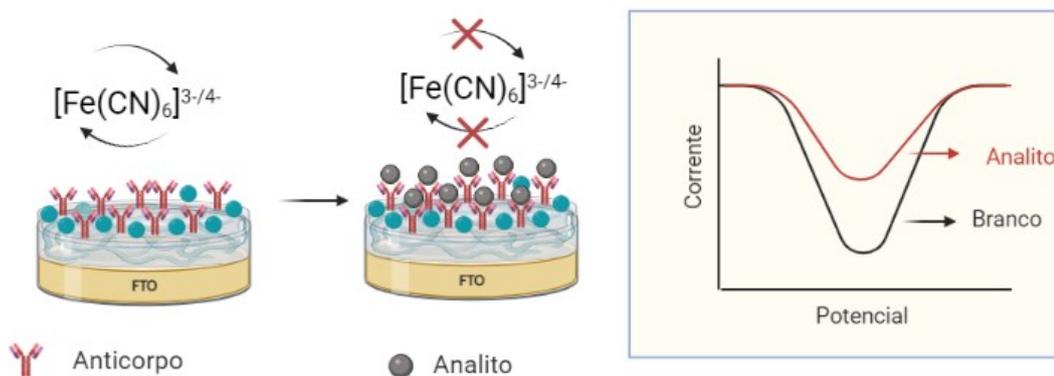
Figura 15. Estrutura química do ferroceno e ferrocianeto de potássio



Fonte: produzido pela autora

A detecção eletroanalítica de proteínas pode ser realizada de maneira direta ou indireta. Na forma direta, existe uma redução nas reações de transferência de carga e na intensidade do sinal eletroquímico devido ao bloqueio da superfície, conforme apresentado na Figura 15. Esse decréscimo no sinal é proporcional a concentração do analito e, acontece quando as espécies se conectam ao biorreceptor, imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho. (Shen; Shen, 2019). Essas estratégias fornecem aplicações mais rápidas e reprodutíveis quando comparados a ensaios biológicos complexos como ELISA, no entanto nem sempre é possível alcançar altas sensibilidades (Layqah; Eissa, 2019).

Figura 16. Representação esquemática do método de detecção eletroquímica direta de proteínas



Fonte: produzido pela autora

Considerando a estrutura da quitosana, pode-se alcançar a imobilização covalente de mediadores de elétrons através de reações com os grupamentos amino, resultando em filmes com atividade redox e potencial aplicação no desenvolvimento de imunossensores. Por exemplo, filmes eletroativos podem ser produzidos através da modificação da estrutura da quitosana com ferroceno aldeído. Na literatura, esse material apresentou promissora resposta na detecção eletroquímica de glicose (Yang et al., 2007). Além disso, recentemente também foi demonstrada a elevada atividade dos filmes de quitosana na presença do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e a sua dependência com o pH. Nesse trabalho, filmes de quitosana positivamente carregados foram adsorvidos na superfície de um eletrodo de carbono vítreo e avaliados na presença do par redox apresentando alta atividade electrocatalítica. Esse desempenho foi justificado através do mecanismo de interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ e as cargas negativas do par redox (Suginta et al., 2013).

2.5 ELETROANÁLISE: VANTAGENS COMPETITIVAS E TAMANHO DE MERCADO

Em termos de facilidade de análise e portabilidade, os equipamentos eletroanalíticos apresentam indiscutível vantagens quando comparados aos métodos cromatográficos. Alguns dispositivos eletroanalíticos como o pHmetro e o glicosímetro já apresentam enorme relevância e, indiscutível utilidade nos laboratórios de análise e, nas medições clínicas. O alto número de aplicações alcançadas sugere que provavelmente um maior número de aplicações baseadas em sensores eletroanalíticos irão fazer parte da nossa vida e rotina nos próximos anos. Nesse contexto, na última década é possível observar os esforços da comunidade científica em desenvolver novos sensores eletroquímicos miniaturizados com alta seletividade, sensibilidade e precisão, visando o desenvolvimento de *kits* comerciais para o monitoramentos ambiental e diagnóstico clínico (Karimi-Maleh et al., 2020). No entanto, comparativamente aos métodos cromatográficos acoplados ao detector de massas, a sensibilidade eletroanalítica ainda é considerada um problema em muitas aplicações reais. Em termos de sensibilidade analítica, os esforços concentram-se principalmente na modificação de eletrodos com novos nanomateriais electrocatalíticos, visando o aumento do desempenho (Mirsky, 2020). Em relação a seletividade dos métodos, o *design* aprimorado das superfícies é o principal aliado através da imobilização de biorreceptores, formação de complexos e, estratégias baseadas em química supramolecular.

Além do crescente avanço na miniaturização dos dispositivos, a eletroanalítica evoluiu também em aspectos de consciência ambiental e sustentabilidade (Lacasa et al., 2019). Os antigos eletrodos a base de mercúrio têm sido substituídos por suportes ecologicamente amigáveis como superfícies a base de carbono modificadas com nanomateriais. Adicionalmente, o avanço dos eletrodos impressos miniaturizados possibilitou a diminuição no volume de reagentes utilizados nas células eletroquímicas (Namuduri et al., 2020). Na atualidade, determinações eletroanalíticas altamente sensíveis podem ser realizadas utilizando apenas alguns microlitros de solução. Essas considerações práticas são de extrema importância na busca por metodologias analíticas verdes e sustentáveis, com foco na baixa geração de resíduos.

Para aplicações em área de saúde, inúmeras Health Techs têm apostado nos sensores eletroquímicos usáveis visando o monitoramento contínuo e não invasivo, voltados ao prognóstico, diagnóstico e gerenciamento de doenças. O foco principal concentra-se na análise de biomarcadores como a glicose, dopamina e cortisol em fluidos corporais, principalmente

suor e saliva (Pereira da Silva Neves et al., 2018). Atualmente, devido ao alto investimento e incentivo, os Estados Unidos lideram as tecnologias de ponta e o mercado de sensores usáveis para o monitoramento de glicose. Inúmeras Startups localizadas no Vale do Silício buscam também aumentar a eficiência, custo e expansão de mercado através do monitoramento de outros biomarcadores. Dentre elas, pode-se citar a Nix biosensor, Harvard Launch Lab-based e Kenzen (Min et al., 2021). Além disso, grandes companhias como a Google e a Apple têm demonstrado crescente interesse nessas tecnologias. Nesse contexto, projeta-se um tamanho de mercado de aproximadamente \$ 57 milhões até o fim de 2022, com uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 16.2%.

De maneira geral, atualmente o mercado de sensores eletroquímicos é avaliado em aproximadamente \$ 6.2 bilhões com projeção esperada para alcançar a margem de 11.9 bilhões até 2026. De acordo com relatórios produzido em 2020, espera-se um crescimento anual de quase 11% ao ano, entre 2021 a 2026. Os setores em destaque são voltados para dispositivos de segurança industrial, setor automotivo e, setor de petróleo e gás. Adicionalmente, espera-se continuidade para as novas demandas decorrentes da pandemia de COVID-19, que aumentaram significativamente a necessidade de métodos analíticos para a detecção rápida e barata de doenças. Nesse sentido, sensores eletroquímicos são adequados para análise no ponto de atendimento (*point-of-care*) e monitoramento contínuo de doenças (Snapshot; Overview, 2021).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico de acordo com as seguintes especificações: Quitosana (Aldrich, desacetilação $\geq 75\%$), hidreto de boro e sódio (Vetec 95%), precursores sais metálicos, chloroplatinic acid hexahydrate (Sigma Aldrich), Cloreto de ferro (III) anidro (98%); metilamina (solução aquosa 40%), Cloreto de Potássio (Aldrich, $\geq 99,5\%$), tripolifosfato de sódio (Aldrich, $\geq 85\%$), ácido cítrico (Sigma-Aldrich $\geq 99,5\%$), Nitrato de ferro (III) nona-hidratado (Sigma-Aldrich, 99,5%), acetona (Neon, 99,6%), etanol (Merck, 99,8%), Cloreto de Manganês tetrahidratado (Labsynth, 99,5%), ácido nítrico (Lafan, 65%). Os padrões dos analitos testados foram adquiridos da Sigma-Aldrich PESTANAL®, $>99\%$: Isoproturon, Diuron, Bifenox, 4-nitrofenol, pedimentalina e pirimicarb. O tampão Britton-Robinson (B-R) foi preparado a partir de ácido bórico (Vetec, 95%), ácido acético glacial (Vetec, 95%) e ácido fosfórico (Vetec, 95%) em diferentes concentrações: 0.05, 0.1, 0.2 and 0.3 mol L⁻¹ para testes de eletrólito suporte. O par redox K₃[Fe(CN)₆]/ K₃[Fe(CN)₆] (Sigma Aldrich, $>99\%$) foi usado como solução sonda para a caracterização eletroquímica por voltametria cíclica. As soluções foram todas preparadas com água ultra pura a partir de sistema Milli-Q (resistividade ca. 18 MΩ cm). As amostras de água de rio foram coletadas de acordo com os padrões analíticos em frascos de vidro e estocadas a 5°C.

Para o desenvolvimento do imunossensor eletroquímico, os seguintes reagentes foram utilizados: Lâmina de vidro de óxido de estanho flúor (FTO), com resistividade de superfície de 7Ω (Sigma-Aldrich), quitosana (Aldrich, grau de desacetilação $\geq 75\%$), hidróxido de amônio (Sigma-Aldrich, $\geq 28\%$), peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, $\geq 30\%$), álcool isopropílico (Sigma-Aldrich, $\geq 99,7\%$), etanol (Merck, $\geq 99\%$), genipina em pó (Challenge Bioproducts (Taiwan), $\geq 98\%$), Albumina sérica bovina (BSA) (INLAB, padrão), cloreto de potássio (Neon, $\geq 99\%$). A solução tampão de fosfato PBS 1x pH 7,4 foi preparada usando NaH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) e Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, $\geq 99,9\%$). A Anti-IL-6 foi adquirida do kit ELISA da eBioscience (Cat # 14-7061-68). A interleucina-6 murina foi preparada dissolvendo uma solução estoque de 1000 pg mL⁻¹ em PBS 1x pH 7,4 armazenado a -78 ° C. As amostras de soro de camundongos sépticos foram fornecidas pelo departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia da UFSC. As amostras de soro humano foram fornecidas pelo Hospital Universitário da UFSC.

3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.2.1 Difração de raios X

Análises de difração de raios X foi utilizada para caracterizar a estrutura da quitosana, nanopartículas de platina e nanopartículas de ferrita de manganês. Para isso, utilizou-se um equipamento com fonte de raios X de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0,154056$ nm). As amostras foram previamente secas em superfície de vidro em temperatura de 50°C . A equação de Scherrer foi utilizada para calcular o tamanho dos cristalitos. As amostras foram analisadas utilizando valores de ângulo de espalhamento na faixa de 10 a 90° (2θ). Os resultados obtidos foram comparados com o banco de dados fornecido pelo software acoplado ao equipamento.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram aplicadas para o estudo da morfologia dos filmes obtidos com nanopartículas de platina, ferrita de manganês e contendo Anti-IL-6. Para isso, as amostras foram gotejadas em superfície de carbono vítreo com o objetivo de simular a superfície do eletrodo de trabalho. No capítulo 3, as amostras foram preparadas na superfície do eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6390LV operando a uma voltagem de aceleração de 20 kV. Para as amostras contendo Anti-IL-6, realizou-se a aquisição das imagens na voltagem de aceleração de 10 kV.

3.2.3 Análises térmicas

A caracterização da estabilidade térmica dos filmes foi avaliada a partir de análise termogravimétrica (TGA). As medidas foram realizadas antes e após a síntese de nanopartículas metálicas, utilizando um equipamento modelo TGA-50 marca Shimadzu, sob uma taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$, na faixa de 25 a 400 $^\circ\text{C}$, sob atmosfera de nitrogênio 50 mL min^{-1} . As medidas de TGA foram realizadas em célula de platina, utilizando quantidade de amostra entre 8 - 10 mg.

3.2.3 Espectroscopia na região do UV-vis

A caracterização das dispersões de CS-1% contendo nanopartículas platina foi caracterizada por espectrofotometria no UV-Vis. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro ultravioleta-visível UV-1800 (Shimadzu, Japão) conectado a um software UV Probe (versão 2.50). As medidas foram realizadas em célula de quartzo com caminho óptico de 1 cm, utilizando janela espectral de 300 a 800 nm.

3.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

As micrografias de Microscopia Eletrônica de transmissão (TEM) dos filmes nanoestruturados contendo nanopartículas de platina e ferrita de manganês foram obtidas utilizando um microscópio JEOL JEM 1220 operando em 100 kv. A amostra foi preparada a partir da dispersão de 20 μL de nanopartículas em 200 μL de álcool isopropílico em ultrassom por 30 minutos. Após, 10 μL da dispersão foram adicionadas a uma grid de Cu revestida com carbono e esperou-se a secagem a condições ambientes.

3.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho

A análise da Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi realizada no espectrofotômetro de infravermelho IRPrestige-21 (Shimadzu) 64 varreduras e 2 cm^{-1} de resolução e faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} . Para avaliar a composição química dos filmes através da presença de diferentes grupos funcionais e de estiramentos de característicos, utilizou-se o modo de Reflexão Total Atenuada (ATR). As análises foram feitas com filmes dos materiais a base de quitosana previamente secos a temperatura de 50°C sob superfície de vidro.

3.3 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS

As análises eletroquímicas foram realizadas dois potenciostatos/galvanostatos modelos EmStat e PalmSens versão 4. O software PSTrace 5.4 foi utilizado para aquisição e tratamento de dados. Para todas as medidas eletroquímicas, utilizou-se uma cela eletroquímica convencional de três eletrodos, contendo como referência o eletrodo de Ag/AgCl, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho. As medidas de caracterização por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram conduzidas a temperatura ambiente, na presença de solução $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na concentração de 5mmol L^{-1} na presença de KCl 0.5 mol L^{-1} como eletrólito suporte. Para a caracterização por

espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizou-se amplitude de 5 mV e faixa de frequência de 0,1 a 50.000 Hz.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 1

3.4.1 Síntese das nanopartículas de platina

Primeiramente, preparou-se uma solução de quitosana na proporção de 1% (m/v). Esta solução foi dissolvida em ácido acético 0,02 mol L⁻¹. As nanopartículas de platina foram sintetizadas utilizando-se 3,00 mL de solução de quitosana 1% como estabilizante com a posterior adição de 100 µL de solução de sal precursor de platina 1 mmol L⁻¹ H₂PtCl₆, previamente preparada em água ultrapura. A solução resultante foi agitada durante 30 minutos até à homogeneização completa. Em seguida, 200 µL de NaBH₄ 0,02 mol L⁻¹ foram adicionados instantaneamente. O processo de redução de Pt⁴⁺ para Pt⁰ foi verificado pela mudança de coloração da solução de amarelo claro para cinza escuro. A dispersão foi armazenada em frasco âmbar a 4 °C; não foram observadas diferenças de coloração e, sinal eletroquímico após três meses de análises.

3.4.2 Preparo do eletrodo modificado Pt/CS/GCE

Para todas as análises eletroquímicas, utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com um diâmetro de 2 mm. A superfície do GCE foi cuidadosamente polida com alumina (0,05 µm), lavada e submetida a limpeza com ultrassom em água destilada por 3 min. Para a modificação dos eletrodos, utilizou-se o volume otimizado de 4 µL com posterior secagem na estufa por 15 minutos a 40 °C. Para fins comparativos, realizou-se a modificação do GCE com solução de quitosana 1% previamente dissolvido em ácido acético 0,02 mol L⁻¹. O eletrodo foi denominado como CS/GCE. O eletrodo modificado com a dispersão de nanopartículas de platina foi denominado PtNPs/CS/GCE.

3.4.3 Análises voltamétricas

Os procedimentos eletroquímicos de caracterização dos eletrodos por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizados de acordo com o descrito na seção 3.3. Para a determinação eletroquímica de isotreturon e diuron, utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial com redissolução adsorptiva (DPAdSV) em uma faixa de

potencial de +0,6 V a +1,3 V vs Ag/AgCl. As curvas de calibração foram obtidas pela adição de diferentes concentrações de uma solução estoque previamente preparada na concentração de 100 mg L⁻¹ em solução água e etanol 1:1 (v/v).

3.4.4 Análise da amostra

As amostras de água de rio foram coletadas seguindo padrão analítico em regiões agrícolas do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, em abril de 2020. Os recipientes foram previamente autoclavados e enchidos sem pré-enxágue. A água do rio foi coletada abaixo da superfície em diferentes pontos de amostragem em áreas de baixa turbulência e armazenada a 5 °C. Para a análise voltamétrica, 2 mL da amostra de água do rio sem prévio tratamento foram utilizados. Adicionou-se nessa fração concentração conhecida de isoproturon e diuron e, posteriormente submeteu-se a amostra cotendo os analitos em ultrassom por 5 minutos para a homogeneização completa. Aplicou-se o método de adição padrão para estimar as concentrações de diuron e isoproturon por voltametria, sob condições otimizadas. Assim, 1 mL da amostra enriquecida foi adicionado à célula eletroquímica e completado com a solução de eletrólito de suporte até 5 mL.

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 2

3.5.1 Síntese das nanopartículas MnFe₂O₄@CS

As nanopartículas de ferrita de manganês recobertas com quitosana, denominadas como MnFe₂O₄@CS foram preparadas e fornecidas pelo Laboratório de Polímeros, localizado no Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da UFSC, utilizando a seguinte rota: O núcleo magnético da ferrita de manganês foi sintetizado por coprecipitação. Primeiramente, os íons Fe³⁺ e Mn²⁺ foram dissolvidos em meio ácido (HCl) e vertidos em uma solução fervente de metilamina, sob agitação vigorosa. As nanopartículas foram tratadas em meio ácido (HNO₃) e passivadas com nitrato de ferro. O sólido foi ainda lavado com acetona e suspenso em água. A suspensão foi armazenada como ferrofluido em frasco de vidro. Para o preparo do recobrimento, uma alíquota do ferrofluido (1,00 g de MnFe₂O₄) foi ativada com ácido cítrico. Nesta etapa, dispersou-se o sólido em 40 mL de ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹, submetendo a dispersão em ultrassom por 20 min. O material resultante foi decantado magneticamente da solução. O mesmo procedimento foi repetido 3 vezes.

Em seguida, verteu-se o ferrofluido em um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de uma suspensão de quitosana previamente preparada ($0,40 \text{ g L}^{-1}$ em ácido acético 1% v / v, agitado durante a noite). A dispersão foi submetida a agitação vigorosa no T25 IKA Ultra - turrax a 3000 rpm por 5 min. Em seguida, 50 mL de solução de tripolifosfato de $0,50 \text{ g L}^{-1}$ foram vertidos na mistura de quitosana- MnFe_2O_4 , e a agitação foi aumentada para 8.000 rpm. O sistema foi mantido sob agitação por 40 min. Por fim, as nanopartículas foram decantada magneticamente do sobrenadante usando ímã NdFeB e, lavadas com água ultrapura e liofilizada. A síntese rendeu aproximadamente 1,2 g de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$.

3.5.2 Preparo do eletrodo modificado $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}/\text{GCE}$

O GCE foi polido várias vezes em alumina (0,05 mm), subseqüentemente lavado com água destilada e submetido a ultrassom em solução de água durante 5 minutos. Para a modificação do eletrodo, 5 mg de nanopartículas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$ foram dispersadas em ultrassom utilizando 1 mL de solução CS 1% (p/v) por 20 minutos em temperatura ambiente. Com o auxílio de uma micropipeta, 5 μL da dispersão $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$ foram gotejados na superfície de GCE. Os eletrodos produzidos foram secos na estufa a temperatura de 40°C por 15 minutos. O mesmo procedimento foi repetido para cada modificação.

3.5.3 Análises eletroquímicas

Os procedimentos eletroquímicos de caracterização dos eletrodos por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizados de acordo com o descrito na seção 3.3. Para a determinação eletroquímica de bifeno, utilizou-se a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV) em uma faixa de potencial de +0,0 V a +0,6 V vs Ag/AgCl. As condições experimentais otimizadas aplicadas para a determinação do analito por SWV foram: frequência de 90 Hz, potencial de pulso de 4 mV e amplitude de pulso de 40 mV. As curvas de calibração foram obtidas pela adição de diferentes concentrações de uma solução estoque previamente preparada na concentração de 100 mg L^{-1} do analito em etanol.

3.5.4 Análise da amostra

Os detalhes das amostras de coleta e armazenamento da água de rio utilizada estão descritos na seção 3.4.4. As amostras de água encanada analisadas foram coletadas em Florianópolis, estado de Santa Catarina, Brasil. O pH das amostras de água do rio e da torneira

foi de 6,1 e 6,4, respectivamente. Para a análise voltamétrica, as amostras foram enriquecidas com uma concentração conhecida de uma solução padrão previamente preparada de bifenox. Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi adicionada à célula eletroquímica e analisada diretamente sem prévio tratamento.

3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 3

3.6.1 Preparo dos eletrodos

Primeiramente, os eletrodos de FTO foram previamente tratados com uma mistura de hidróxido de amônio, peróxido de hidrogênio e água na proporção 1: 1: 5. Os eletrodos foram mantidos na mistura a 60 ° C até a evaporação completa do solvente. Assim, eles foram enxaguados com álcool isopropílico e purgados com N₂. Em seguida, a área geométrica dos eletrodos do FTO foi delimitada em 25 mm² com o auxílio de um papel resistivo. A modificação da superfície foi realizada pelo método de *drop-casting*. Filmes camada por camada foram montados em duas etapas: 1) 5 µL de solução de quitosana CS a 1% (m/v) foram adicionados na superfície do FTO e secos a 60 ° C por 15 minutos. Os eletrodos foram denominados CS/FTO e 2) 5 µL de genipina 5 mg mL⁻¹ foram gotejados na superfície do eletrodo CS/FTO e, o mesmo procedimento de secagem foi aplicado, resultando em um eletrodo modificado com hidrogel de quitosana e genipina (CSG/FTO). Para a imobilização do anticorpo, o CSG/FTO foi mantido em contato com uma solução de anti-IL-6 que foi previamente diluída em PBS 1x pH 7,4. A incubação foi realizada usando um bloco de aquecimento sob temperatura controlada de 37 ° C por 12 horas. Em seguida, os eletrodos foram imersos por 10 minutos em uma solução de tween 0,02% (v/v) em PBS 1x pH 7,4 para remover as interações inespecíficas entre o anticorpo e a superfície do eletrodo (anti-IL-6/CSG/FTO). Por fim, a superfície do anti-IL-6/CSG/FTO foi recoberta com 5 µL de solução BSA 1% (p/v) por 45 minutos em temperatura ambiente. Os eletrodos foram lavados com tween 0,02% (v.v) em PBS 1x pH 7,4 e, o eletrodo modificado resultante foi denominado como BSA/anti-IL-6/CSG/ FTO. As curvas de calibração foram construídas utilizando 5 µL da solução padrão IL-6, através da incubação por 45 minutos a 37 °C. Antes da análise eletroquímica dos eletrodos com antígeno, os mesmos foram submetidos a lavagem com tween 0,02% (v.v) em PBS 1x pH 7,4 e água deionizada.

3.6.2 Preparo das amostras de sangue de murino induzidos a sepse

Os cuidados e tratamento dos animais foram baseados no Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. Camundongos C57BL/6 com oito e dez semanas de idade (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA) foram alojados no Animal Facility do Departamento de Farmacologia da UFSC sob o protocolo de aprovação CEUA # 8278290818. A sepse murina foi realizada conforme descrito anteriormente (Formiga et al., 2020). Resumidamente, camundongos submetidos a processo intraperitoneal com 100 μL de 1×10^7 CFU de suspensão de *E. coli* (ATCC 25922, Manassas, VA, EUA). Neste modelo murino, 50-60% dos camundongos injetados com bactérias morreram em 72h (Formiga et al., 2020). Após 48h da indução da sepse, um volume de 1 mL de sangue murino foi coletado por punção cardíaca em tubos contendo heparina e as amostras centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o plasma foi diluído em solução de PBS (1:40). Para as medições eletroquímicas, um volume de 5 μL de amostras de soro diluídas ou não diluídas foi colocado no imunossensor e incubado por 45 minutos a 37 ° C. O eletrodo foi então lavado com tween 0,02% (v.v) em PBS 10 mmol L⁻¹ por 2 minutos seguido por uma etapa de lavagem com água deionizada e, análise eletroquímica foi realizada conforme descrito na seção 3.6.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

CAPÍTULO I

4.1 NANOPARTÍCULAS DE PLATINA ESTABILIZADAS EM QUITOSANA APLICADAS NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ISOPROTURON E DIURON

4.1.1 INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO

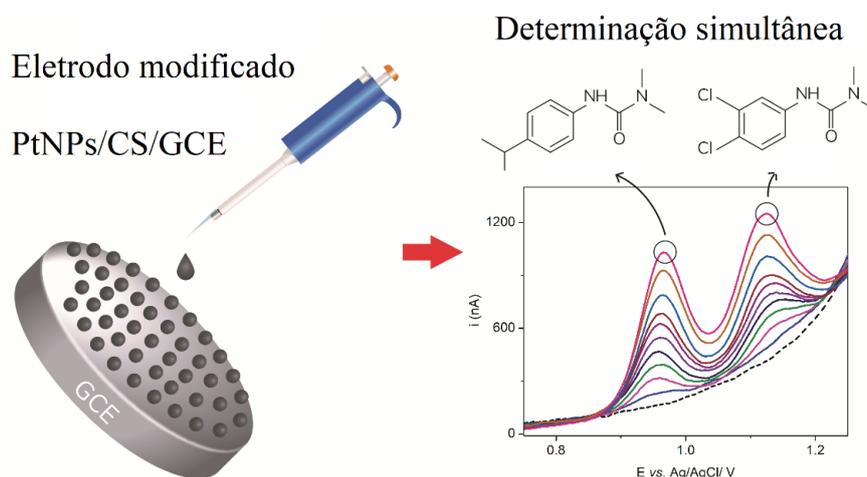
Neste estudo, nanopartículas de platina foram sintetizadas *in-situ* usando quitosana como agente estabilizante. O bionanocompósito produzido foi aplicado no desenvolvimento de um eletrodo de carbono vítreo modificado (PtNPs/CS/GCE) para a análise simultânea rápida, seletiva e de baixo custo de diuron e isoproturon em amostra de água de rio. Esses compostos são derivados da fenilureia, atualmente uma das classes de herbicidas mais difundidas no mundo, amplamente aplicados em solos agrícolas para controlar o crescimento de ervas daninhas. Inúmeros compostos do tipo fenilureia são considerados tóxicos para o meio ambiente, potenciais desreguladores endócrinos e cancerígenos (Huovinen et al., 2015 e Mohammed et al., 2018). A exposição a esses produtos químicos persistentes ocorre principalmente em áreas rurais devido ao processo de lixiviação e lavagem que os leva para as águas subterrâneas e superficiais (Federico et al., 2013). Nesse contexto, diferentes misturas de herbicidas podem ser encontradas em amostras de água de rio, incluindo os herbicidas diuron e isoproturon (Dupraz et al., 2019). O uso indiscriminado desses produtos químicos perigosos constitui um risco iminente ao meio ambiente e aos organismos aquáticos, trazendo grandes preocupações devido à sua lenta biodegradação, genotoxicidade e ecotoxicidade (Sousa et al., 2018 e Starling et al., 2019).

Os métodos eletroquímicos podem ser considerados atrativos para a detecção desses compostos devido a rápida resposta, baixo custo, alta seletividade, reprodutibilidade e portabilidade, ideais para aplicação em análises ambientais. Apesar das vantagens, os trabalhos encontrados na literatura apresentam baixas sensibilidades devido ao alto sobrepotencial necessário para que ocorra a oxidação de compostos fenilureias, dificultando aplicações práticas (Mani et al., 2015 e Noyrod; Chailapakul; Wonsawat; Chuanuwatanakul, 2014). Nesse contexto, o uso de diferentes eletrodos modificados nanoestruturados tem como principal objetivo aumentar o desempenho analítico de sensores eletroquímicos. Nas últimas décadas, eletrodos modificados com novos nanomateriais têm permitido um aumento significativo na resposta da corrente faradaica, diminuindo o limite de detecção de métodos eletroanalíticos. Nanopartículas de platina (PtNPs) têm sido um tema de pesquisa na área de eletrodos modificados eletroquimicamente devido à sua alta estabilidade, taxa de transferência de elétrons, excelente atividade eletrocatalítica, alta relação superfície-volume e biocompatibilidade (Gerent; Spinelli, 2017). Apesar disso, a alta energia superficial das

nanopartículas requer um agente estabilizador eficiente para evitar sua agregação e garantir seu pequeno tamanho na superfície do eletrodo (Deon et al., 2019).

A quitosana é uma excelente escolha para estabilizar nanopartículas metálicas por efeitos estérico-eletrônicos, proporcionando bionanocompósitos com alta funcionalidade. Esse fenômeno acontece devido à grande afinidade da quitosana por metais de transição aliada a excelente aderência para a formação de filmes (Phan et al., 2019). Os grupos amino dos bionanocompósitos resultantes aumentam as interações do suporte com outros polímeros e materiais inorgânicos, produzindo filmes com boa adesão em superfícies negativamente carregadas e porosas a base de carbono (Ramos et al., 2015). Além disso, a alta permeabilidade permite o processo de difusão do analito na superfície modificada do eletrodo (Devi et al., 2019). A Figura 17 apresenta o resumo das análises propostas no presente capítulo. Nesse sentido, visou-se sintetizar, caracterizar e estudar a viabilidade de aplicação analítica de nanopartículas de platina (PtNPs) estabilizadas em quitosana. Esse material foi usado para construir um no eletrodo de carbono vítreo modificado (PtNPs/CS/GCE), aplicado na determinação voltamétrica simultânea de diuron e isotroturon.

Figura 17. Esquema representativo da modificação do eletrodo de carbono vítreo e, das análises voltamétricas aplicadas no presente capítulo.

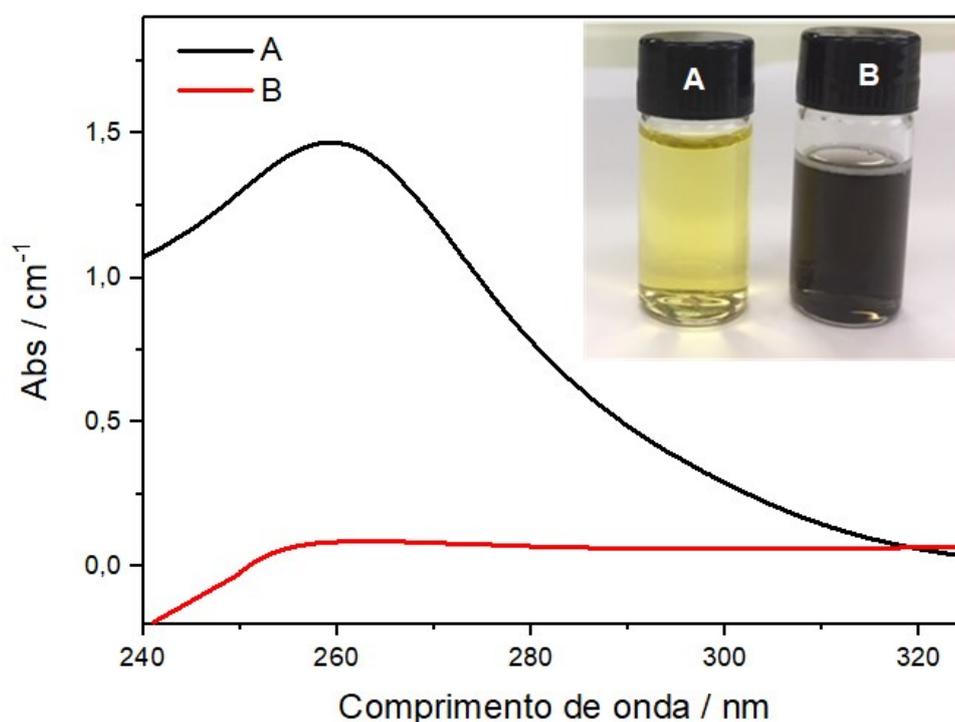


4.1.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MORFOLÓGICA NANOPARTÍCULAS DE PLATINA ESTABILIZADAS EM QUITOSANA

A análise de espectrofotometria na região do UV-vis pode ser útil para caracterizar nanopartículas metálicas, através do aparecimento de bandas de ressonância de *plasmon* e/ou

por meio do desaparecimento de bandas de transferência de carga comuns a complexos metálicos. Nesse sentido, a Figura 18 apresenta os espectros de UV-vis da dispersão de quitosana contendo o precursor metálico antes e após a adição do agente redutor. Imediatamente após a adição de NaBH_4 , observou-se mudança na coloração da dispersão de amarelo claro para cinza (Inset: Figura 18) sugerindo a alteração do estado de oxidação da platina. Antes da redução, é possível observar uma banda característica de transferência de carga dos íons metálicos $[\text{PtCl}_6]^{2-}$ em aproximadamente 260 nm, correspondente a transição π dos orbitais ligantes (Glebov et al. 2012). A mudança de cor da dispersão de amarelo para cinza, acompanhada do desaparecimento da banda em 260 nm é um indicativo da eficiente redução platina, com a mudança do estado de oxidação de Pt^{4+} para Pt^0 .

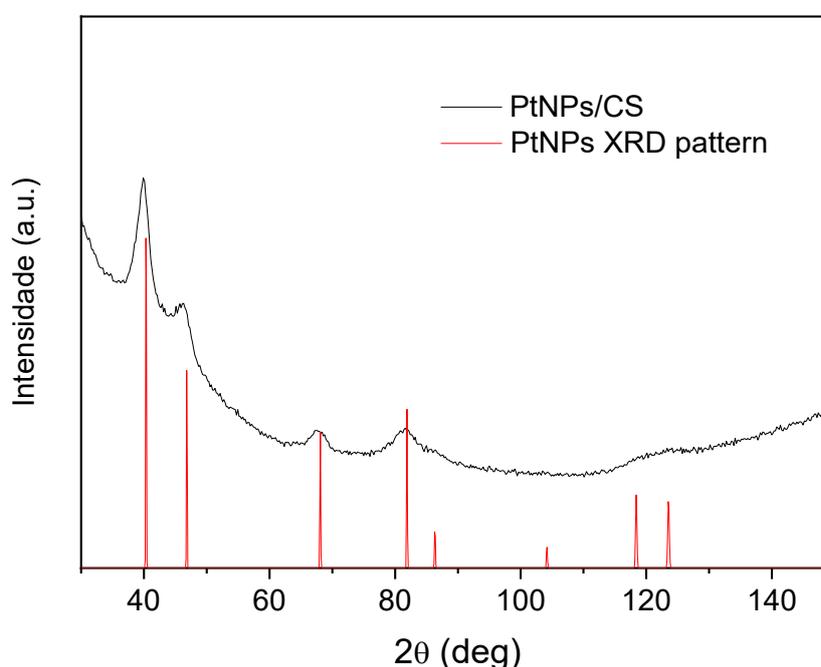
Figura 18. UV-vis das amostras A) $[\text{PtCl}_6]^{2-}/\text{CS}$ antes da adição do agente redutor e B) PtNPs/CS após a redução.



Adicionalmente, aplicou-se a análise de difração de raios X da amostra PtNPs/CS, visando a caracterização microestrutural e cristalina da amostra, conforme é apresentado na Figura 19 juntamente com os padrões obtidos no banco de dados. Através da análise, observa-se um pico de difração em 20° e, um pico alargado em 23° , que podem ser atribuídos aos carbonos amorfos presentes na estrutura da quitosana. Os picos e planos encontrados em $39,9^\circ$

(111), 46.3° (200), 67.5° (220), 82.0° (311) podem ser atribuídos a estrutura cúbica de face centrada (fcc) da platina, indicando a existência do metal na forma cristalina, de acordo com o padrão comparado [JCPDS:#04-0802]. O tamanho do cristalito foi determinado pela equação de Scherrer, utilizando o pico de difração mais intenso em $39,8^\circ$. O tamanho encontrado foi 4 nm. Esses resultados indicam a eficiente estabilização das nanopartículas de platina na matriz de quitosana.

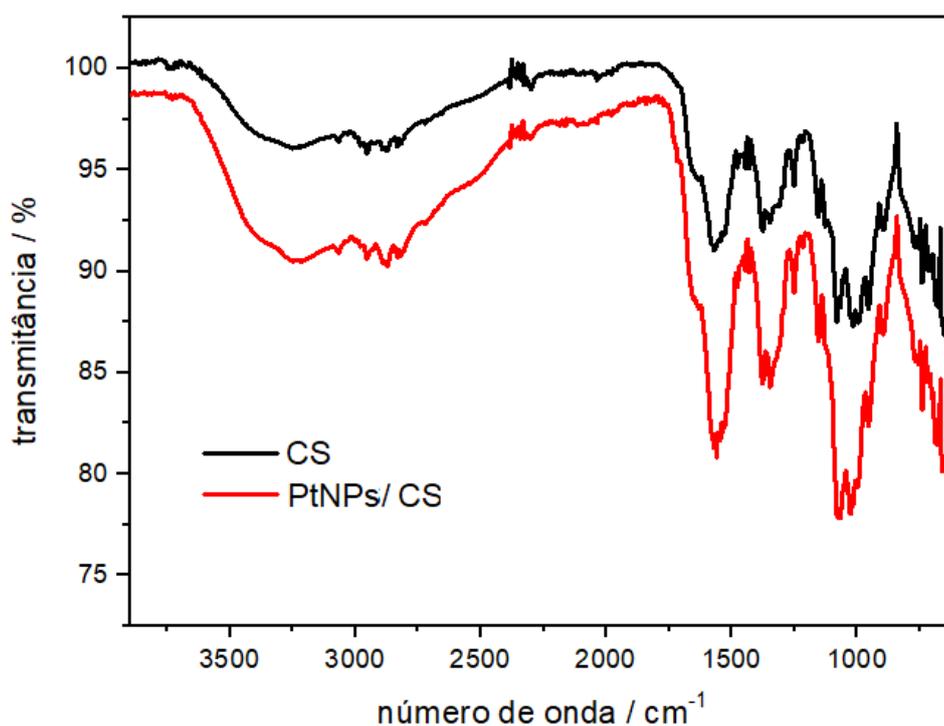
Figura 19. Difratomogramas de raios X das amostras CS e PtNPs/CS



Para a caracterização das PtNPs/CS, também utilizou-se a espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier no modo de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), conforme apresentado na Figura 20. Através da análise de infravermelho, foi possível identificar as bandas características da quitosana, que podem ser descritas como: 3350 cm^{-1} , atribuída ao estiramento axial das ligações O-H e N-H; bandas em 2931 e 2883 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento axial simétrico e assimétrico das ligações C-H; bandas centradas em 1649 cm^{-1} e em 1583 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C=O (conhecida como banda de amida I) e a deformação N-H de aminas, bandas em 1421 e 1379 cm^{-1} , resultantes da combinação do estiramento axial de C-N e da deformação angular de N-H; bandas em 1151 e

1036 cm^{-1} devido à estrutura polissacarídica incluindo as ligações glicosídicas, estiramentos dos grupos C-O e C-O-C. Nenhum deslocamento de bandas foi identificado após a incorporação das nanopartículas de platina. No entanto, a interação química entre os grupos NH^{3+} da quitosana e as nanopartículas de platina (PtNPs) pode ser evidenciada pela diminuição na intensidade das bandas localizadas na região de aproximadamente 3254 cm^{-1} e, nas bandas entre $1380\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ que correspondem aos estiramentos N-H e C-N dos grupos amino. Esse resultado indica a forte interação da platina com os grupamentos amino na estrutura da quitosana, indicando que os mesmos exercem papel fundamental na estabilização das nanopartículas.

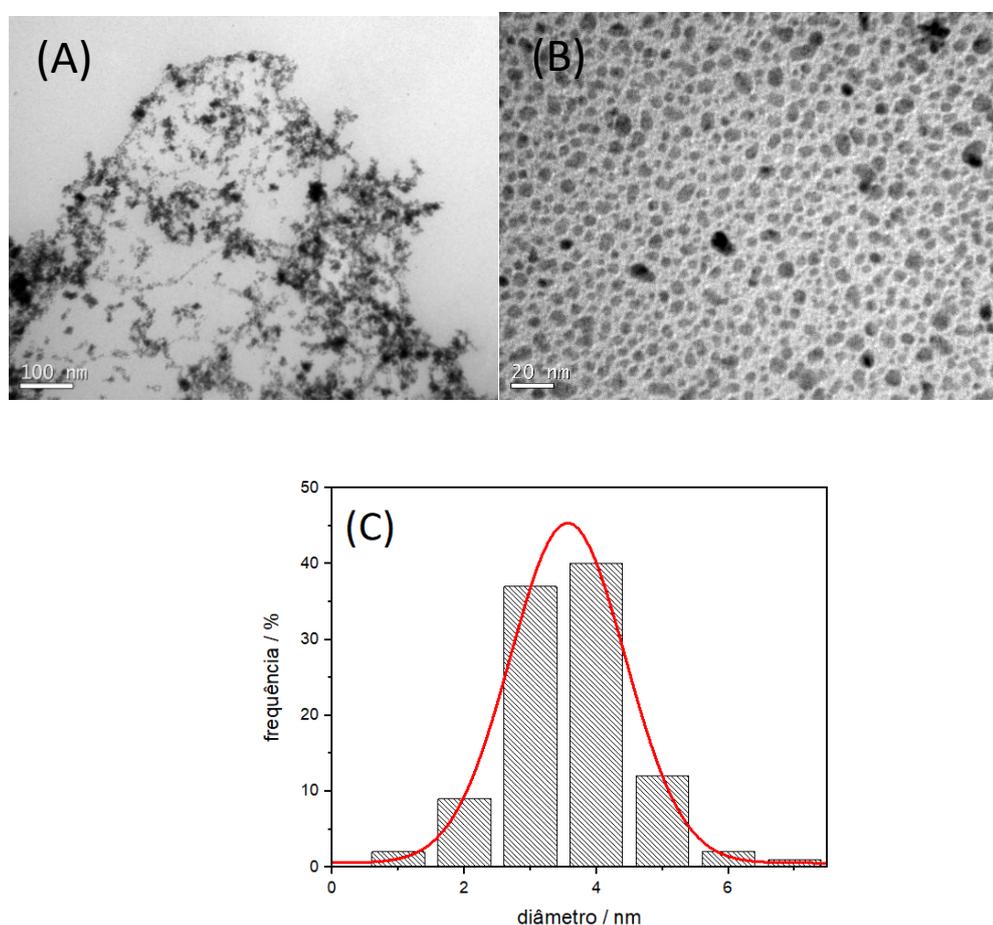
Figura 20. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier no modo reflectância total atenuada das dispersões CS e CS/PtNPs.



A dispersão PtNPs/CS também foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão. A partir das micrografias mostradas na Figura 21A, observa-se a formação de nanopartículas de platina esféricas homogeneamente dispersas, com algumas regiões densas correspondentes ao biopolímero. O histograma da distribuição do tamanho de partículas está apresentado na Figura 21B e, mostra a distribuição homogênea do tamanho de partículas com um máximo localizado em aproximadamente 4 nm, considerando um desvio padrão de 0,9 e,

população total de 103 partículas. O tamanho de partículas obtido por MET concorda com o tamanho do cristalito calculado por difração de raios X através da equação de Scherrer. O pequeno tamanho das PtNPs sugere que a quitosana atua na estabilização das nanopartículas, evitando aglomerações devido ao impedimento estérico da rede polimérica. Além disso, a distribuição homogênea pode ser explicada através das interações eletrostáticas entre os grupos amino protonados da quitosana e as cargas negativas dos íons PtCl_6^- .

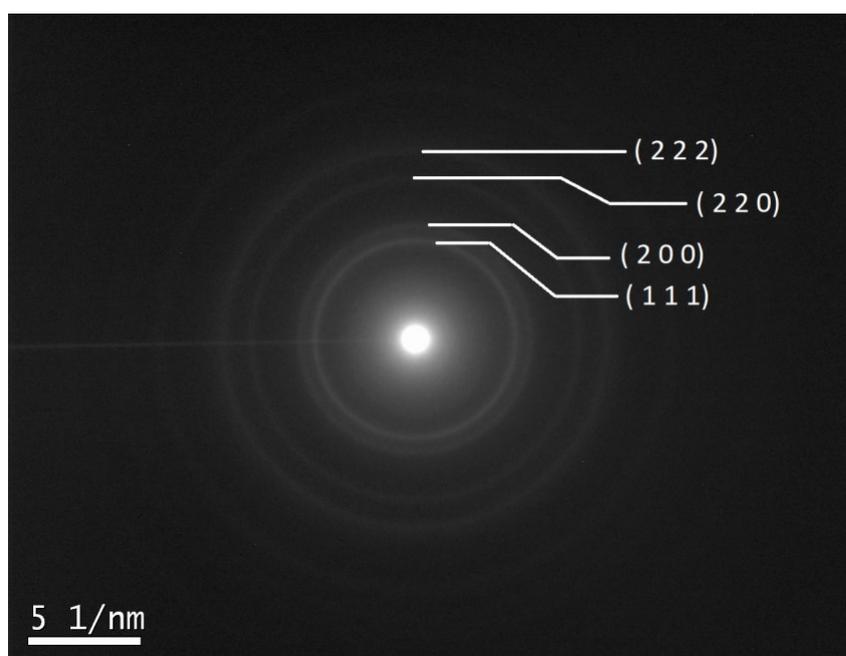
Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão da amostra PtNPs/CS A) menor aproximação B) maior aproximação e C) histograma de distribuição do tamanho de partícula



Com o auxílio do microscópio eletrônico de transmissão também foi realizada a análise complementar de difração de elétrons por área selecionada (do inglês SAED), conforme apresentado na Figura 22. Nessa técnica, os átomos atuam como uma rede de difração aos elétrons provenientes do feixe de alta energia aplicado. Os círculos formados na imagem correspondem ao padrão de difração da estrutura cristalina da platina. A partir da análise,

identificou-se os planos cristalinos (111), (222), (220) e (311) da platina, mostrando os mesmos planos obtidos por difração de raios X identificados na análise dos filmes.

Figura 22. Difração de elétrons por área selecionada da amostra PtNPs/CS com a atribuição dos planos cristalinos da platina através de comparação com o banco de dados.



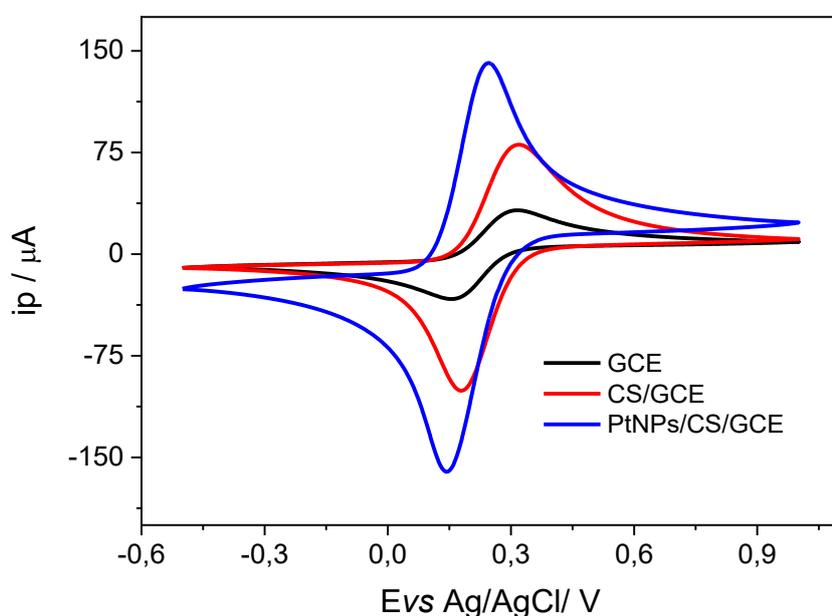
4.1.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Os estudos de CV foram aplicados com o objetivo de avaliar comparativamente o comportamento eletroquímico do GCE antes e após cada modificação, como é mostrado na Figura 23. As medidas de CV foram realizadas aplicando a faixa de potencial de -0,5 a 1,0 V vs. Ag/AgCl e, velocidade de varredura igual a 50 mV s⁻¹ na presença de uma solução redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} com concentração 5 mmol L⁻¹ e KCl 0.1 mol L⁻¹. Os picos definidos identificados nos voltamogramas estão relacionados ao processo redox do par [Fe(CN)₆]^{3-/4-}. Como é possível observar, os voltamogramas apresentam aumento da intensidade de corrente dos picos catódicos e anódicos para cada passo da modificação quando comparados ao eletrodo não modificado GCE. Os valores correspondentes de intensidade de pico anódico (*i*_{pa}) foram 33, 80 e 140 μA e de intensidade de pico catódico (*i*_{pc}) foram equivalentes a 33, 101, 160 μA para os eletrodos GCE, GCE/CS e GCE/CS/PtNPs, respectivamente.

Esses resultados mostram que a modificação com a quitosana pode ter fornecido aumento na taxa de transferência de elétrons devido aos seus grupos amino protonados que

podem interagir eletrostaticamente com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ negativamente carregada. Os valores obtidos para a razão i_{pa}/i_{pc} foram iguais a 0,99, 0,80 e 0,91 para o GCE, GCE/CS e GCE/CS/PtNPs, respectivamente. Esses valores mostram que ocorreu diminuição na reversibilidade do processo redox, provocada pela incorporação de quitosana, com posterior aumento da reversibilidade fornecido pela incorporação das PtNPs. O valor razão i_{pa}/i_{pc} igual a 0,91 para o eletrodo modificado com o material resultante é característico de um processo quase reversível.

Figura 23. CV comparativa dos eletrodos GCE, GCE/CS e GCE/CS/PtNPs $v= 50 \text{ mV s}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ e $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

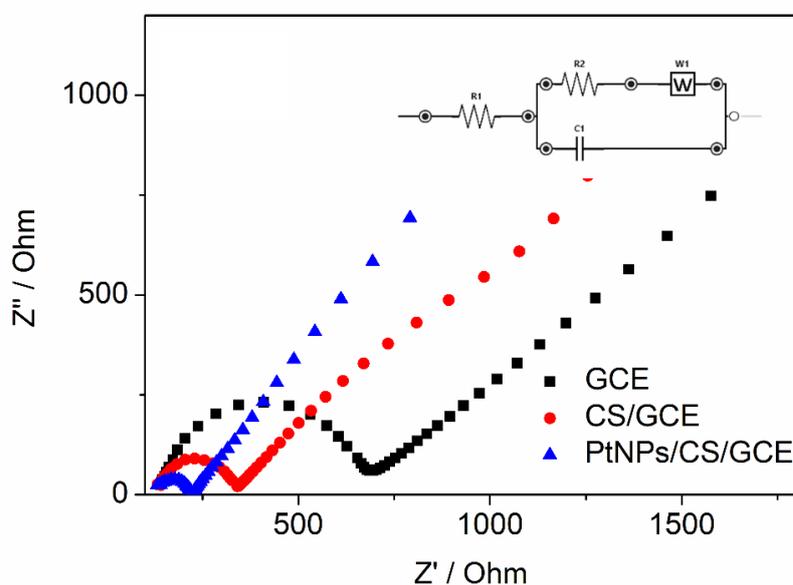


Além disso, também foram avaliados os valores de ΔE_p que corresponde à diferença entre os picos catódicos e anódicos ($E_{pa}-E_{pc}$). Observou-se uma diminuição do valor de ΔE_p de 155 mV (GCE) para 138 mV (GCE/CS) após a modificação com quitosana. O eletrodo final modificado com as PtNPs (GCE/CS/PtNPs) apresentou valor de separação de picos de 102 mV. Essa diminuição na resistência a transferência de cargas provavelmente é fornecida pelo desempenho eletrocatalítico das PtNPs, que apresentam elevada relação área-volume e propriedades elétricas.

Para a caracterização dos eletrodos modificados, realizou-se também a análise de espectroscopia de impedância eletroquímica, visando investigar as propriedades elétricas e o processo de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução. As curvas de Nyquist estão

apresentadas na Figura 24. O circuito equivalente que se adapta aos resultados experimentais é apresentado no Inset da Figura 24. No circuito, o componente R1 representa a resistência da solução, R2 a resistência de transferência de carga, C1 é definido como a capacitância de camada dupla, W1 é a constante de Warburg, relacionada à contribuição da difusão semi-infinita. Os valores de resistência a transferência de carga (R_{ct}) foram estimados com base no diâmetro do semicírculo. Observou-se maior (R_{ct}) para o GCE não modificado ($R_{ct} = 552 \text{ k}\Omega$) devido lenta cinética de transferência de elétrons. Após a modificação com quitosana, foi possível observar um decréscimo neste valor para $200 \text{ k}\Omega$. Este fenômeno pode ocorrer devido à presença de grupos amino carregados positivamente que melhoram a densidade de carga na superfície do eletrodo. Por outro lado, o GCE/PtNPs/CS modificado mostrou R_{ct} de $100 \text{ k}\Omega$, diminuição de aproximadamente 5 vezes quando comparado ao eletrodo não modificado. A diminuição da resistência de transferência de carga pode ser atribuída a efetividade electrocatalítica das PtNPs, que apresentam alta relação superfície-volume aliadas excelentes propriedades elétricas.

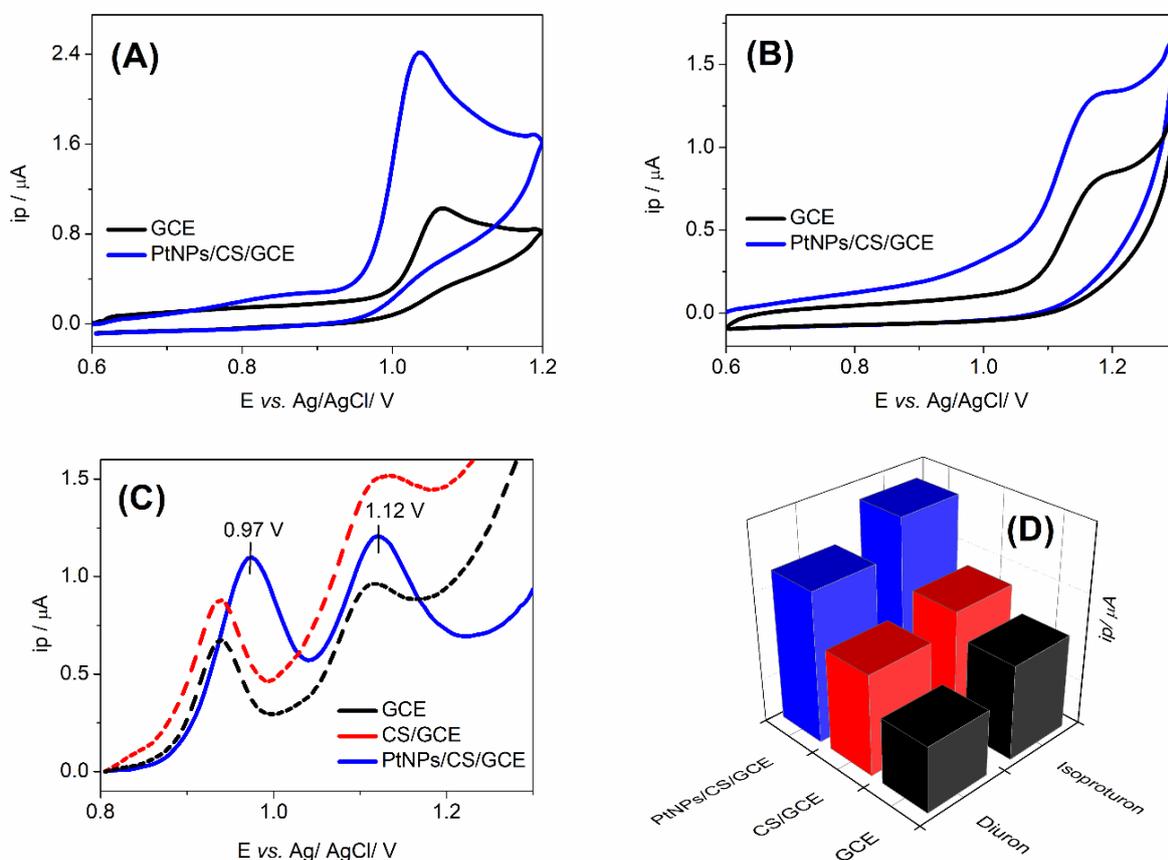
Figura 24. EIS dos eletrodo GCE, CS/GCE e PtNPs/CS/GCE na presença de sonda redox $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; eletrólito suporte: $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$. Inset: circuito equivalente.



4.1.4 COMPORTAMENTO DO ELETRODO PtNPs/CS/GCE NA PRESENÇA DE ISOPROTURON E DIURON

Avaliou-se também a resposta eletroquímica dos eletrodos GCE e PtNPs/CS/GCE por CV na presença de 2 mg L⁻¹ de diuron (Figura 25A) e isoproturon (Figura 25B). Através dos resultados, observou-se um comportamento típico de processos irreversíveis para ambos analitos, que apresentaram processo de oxidação em aproximadamente +1,0 V para isoproturon e +1,2 V para diuron *vs.* Ag/AgCl. A Figura 25A mostra o aumento de corrente de pico de oxidação na presença de isoproturon em aproximadamente 3 vezes quando o eletrodo modificado PtNPs/CS/GCE é empregado na análise. Observa-se esse comportamento também na presença de diuron, com aumento de corrente de aproximadamente 1,75 vezes, conforme mostrado na Figura 25B. Esses resultados sugerem que o eletrodo PtNPs/CS/GCE proposto apresenta excelente desempenho na presença dos analitos da classe fenilureia.

Figura 25. A) CV na presença de 2 mg L⁻¹ de isoproturon na velocidade de 50 mV s⁻¹ do GCE e PtNPs/CS/GCE. B) CV na presença de 2 mg L⁻¹ de diuron velocidade de 50 mV s⁻¹ do GCE e PtNPs/CS/GCE. C) DPV na presença de 1000 µg L⁻¹ de diuron e isoproturon (0.1 mol L⁻¹ BR-buffer, pH 2.0, 20 mV s⁻¹). D) Intensidade de corrente do pico anódico obtida por DPV usando GCE, CS/GCE and PtNPs/CS/GCE.



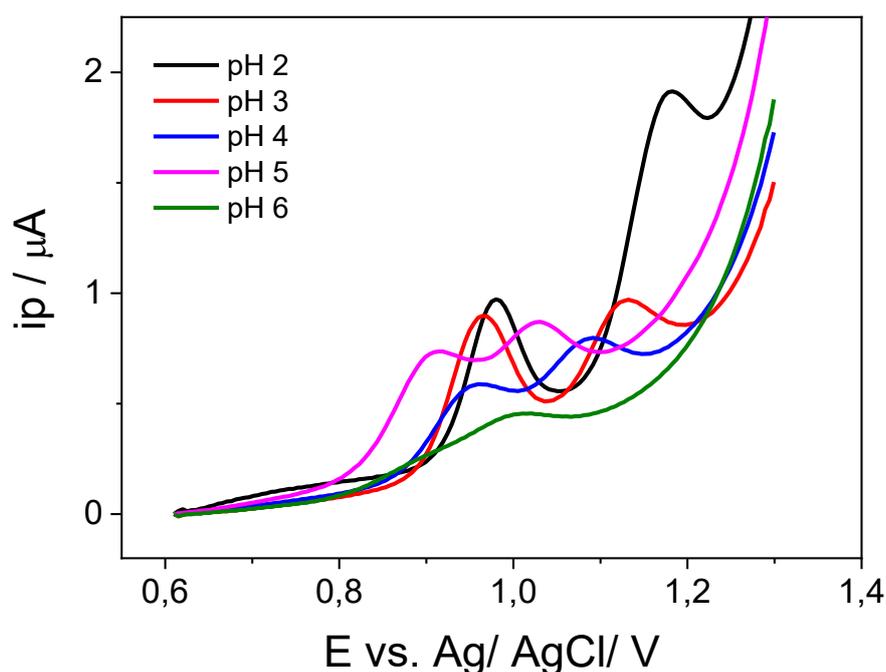
Estudos posteriores foram realizados por voltametria de pulso diferencial (DPV) na presença simultânea dos analitos (1 mg L^{-1}); os resultados são mostrados na Figura 25C. Observou-se melhor compromisso entre a qualidade do sinal analítico e a intensidade da corrente de pico para o eletrodo PtNPs/CS/GCE também para a análise simultânea. Ao comparar os potenciais de pico anódico (E_{pa}), evidenciou-se uma separação de picos entre diuron e isoproturon igual a 150 mV, com adequada resolução de sinais. Esses resultados indicam a possibilidade de determinação simultânea dos herbicidas. Também relatou-se um aumento no i_{pa} utilizando apenas o CS/GCE em comparação com o eletrodo não modificado (Figura 25C). Este fenômeno pode ocorrer devido a interação entre os grupos amino da quitosana, que podem auxiliar a pré-concentração do analito por meio de interações intermoleculares na interface eletrodo/solução. A maior resposta de corrente de pico para ambos os analitos foi observada para os PtNPs/CS/GCE, conforme mostrado na Figura 25D. Essa resposta pode estar relacionada à incorporação de PtNPs na superfície do eletrodo, que apresentam boas propriedades elétricas, possibilitando a rápida transferência de elétrons. Este resultado sugere que o bionanocompósito PtNPs/CS sintetizado de uma maneira simples apresenta resultado promissor para aplicações eletroanalíticas.

4.1.5 EFEITO DO pH E DA VELOCIDADE DE VARREDURA

Para estudar o comportamento eletroquímico do isoproturon e do diuron, as medidas de DPV foram realizadas em diferentes valores de pH, variando na faixa de 2,0 a 6,0, conforme apresentado na Figura 26.

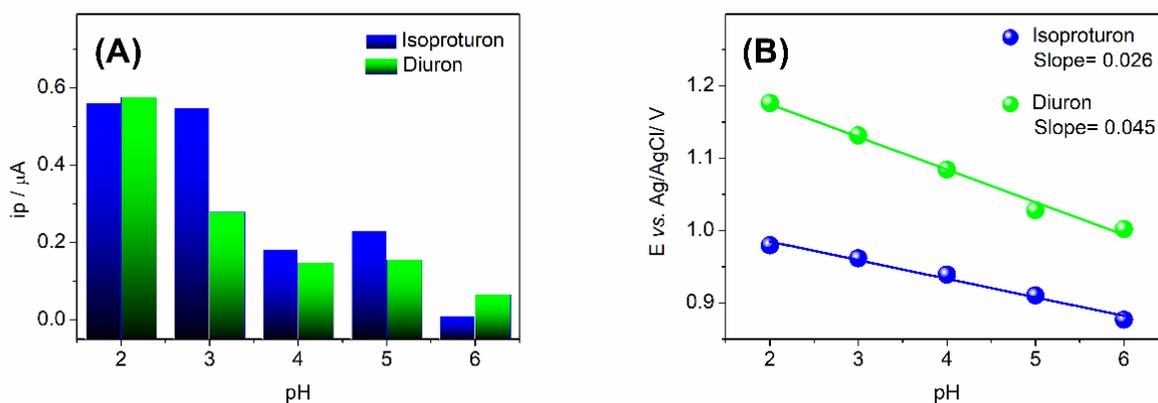
Conforme observado no gráfico, o processo de oxidação para os dois analitos é dependente do pH, indicando o envolvimento de prótons no mecanismo redox. Com a diminuição do pH, os potenciais de pico do diuron e isoproturon deslocam para valores mais altos, dificultando a oxidação dos analitos. Por outro lado, a i_{pa} aumenta em baixos valores de pH, indicando um favorecimento na cinética de transferência de elétrons nessas condições para os dois analitos (Figura 26). Nesse contexto, visando a maior relação sinal ruído, escolheu-se o pH 2 para estudos posteriores. Além disso, não houve resposta eletroquímica em valores de pH superiores a 6,0. Este é um comportamento esperado para o isoproturon de acordo com trabalhos anteriores, sugerindo que a protonação de grupos amino em meio ácido pode facilitar o processo de oxidação devido à clivagem oxidativa (Manisankar et al., 2006).

Figura 26. DPV na presença de isotproturon e diuron em diferentes valores de pH na faixa de 2.0-6.0 usando tampão BR 0.1 mol L⁻¹.



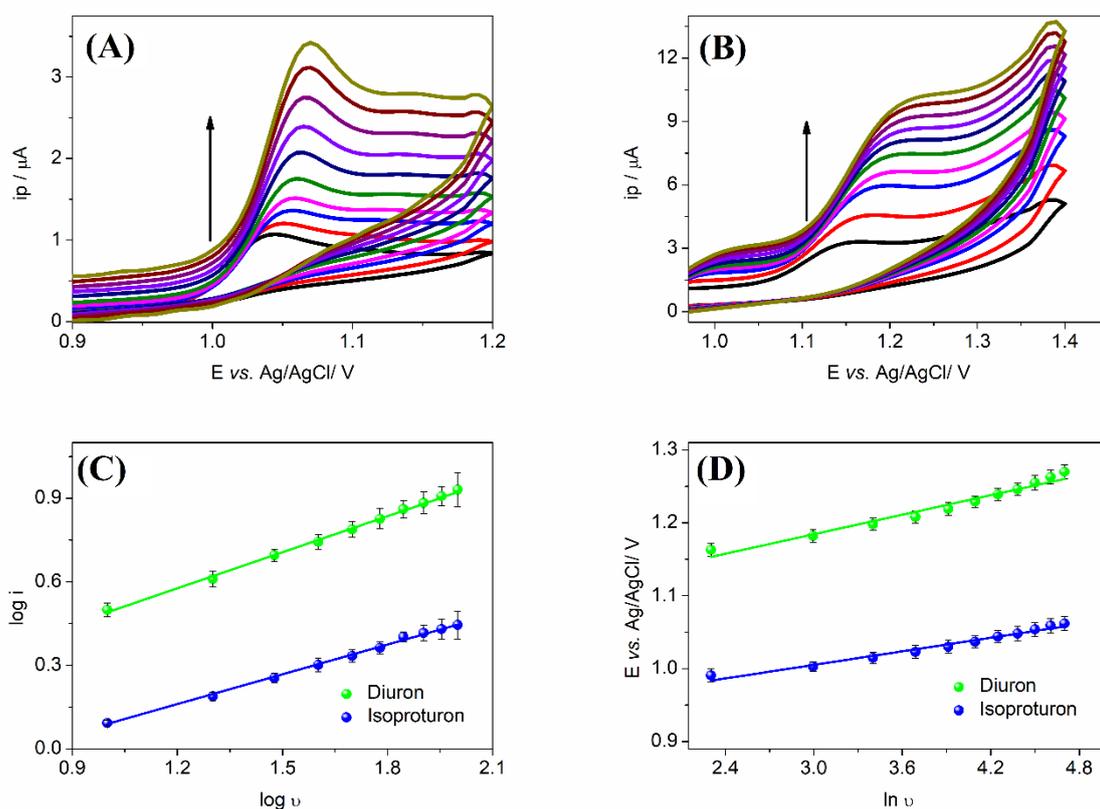
A Figura 27A mostra a magnitude dos sinais eletroanalíticos obtidos por DPV em diferentes valores de pH, justificando a escolha. Adicionalmente, a relação linear entre os valores de E_p e pH pode ser expressa por: $E_p/V = 1,26 (\pm 0,01) - 0,045 (\pm 0,002) \text{ pH}$, para diuron, e $E_p/V = 1,036 (\pm 0,008) - 0,026 (\pm 0,002) \text{ pH}$, para isotproturon, conforme apresentado na Figura 27B. O valor do slope para o isotproturon igual a 26 mV pH^{-1} , indica razão $m/n = 1/2$ para o mecanismo de oxidação do analito, considerando $m =$ número de prótons e $n =$ número de elétrons. (Scholz, 2010). Por outro lado, a inclinação de 45 mV pH^{-1} , obtida para o diuron, está próxima do valor teórico de Nernst, indicando um número igual de prótons e elétrons no mecanismo de oxidação (Scholz, 2010). Esses resultados sugerem que a dependência do pH pode ser útil para separar os picos de oxidação dos analitos, facilitando a determinação simultânea em condições ácidas, conforme observado na Figura 26.

Figura 27. A) Intensidade de corrente de pico obtida por DPV na presença de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e isotroturon em diferentes valores de pH e B) Relação linear entre pH potencial de pico obtidos por DPV.



Com o objetivo de investigar o comportamento eletroquímico do isotroturon e diuron em diferentes velocidades de varredura (v), as medições de CV foram realizadas na faixa de 30 a 300 mV s^{-1} , conforme mostrado nas Figuras 28A e 28B. As relações lineares obtidas entre i_p versus $v^{1/2}$ estão apresentadas na Figura 28C. Os coeficientes de determinação encontrados iguais a $R^2 = 0,9919$ para diuron e $R^2 = 0,9997$ para isotroturon, indicam que a cinética de transferência de elétrons na interface do eletrodo é controlada por difusão (Thomas; G. Henze, 2001). Para confirmar esses resultados, a relação linear entre $\log i_p$ versus $\log v$ também foi avaliada, conforme mostrado na Figura 28D. As relações lineares podem ser expressas por $i_p / \mu\text{A} = -0,45 + 0,44x$, para diuron ($R^2 = 0,9998$), e $i_p / \mu\text{A} = -0,27 + 0,37x$, para isotroturon ($R^2 = 0,9987$). As inclinações encontradas, iguais a 0,44 e 0,37 para o diuron e isotroturon, respectivamente, estão próximas do valor teórico de 0,5, típico de processos controlados por difusão (Bard; Faulkner, 2000).

Figura 28. A) CV na presença de 1 mg L⁻¹ de isotproturon (0.1 mol L⁻¹ em tampão BR, pH 2.0) a diferentes velocidades de varredura de 30 a 300 mV s⁻¹. B) CV na presença de 2 mg L⁻¹ de diuron (0.1 mol L⁻¹ tampão BR, pH 2.0) a diferentes velocidades de varredura de 30 a 300 mV s⁻¹. C) Relação linear entre I_p and v^{1/2} obtida para isotproturon e diuron D) relação linear entre log i and log v obtida por CVs em diferentes velocidades de varredura.

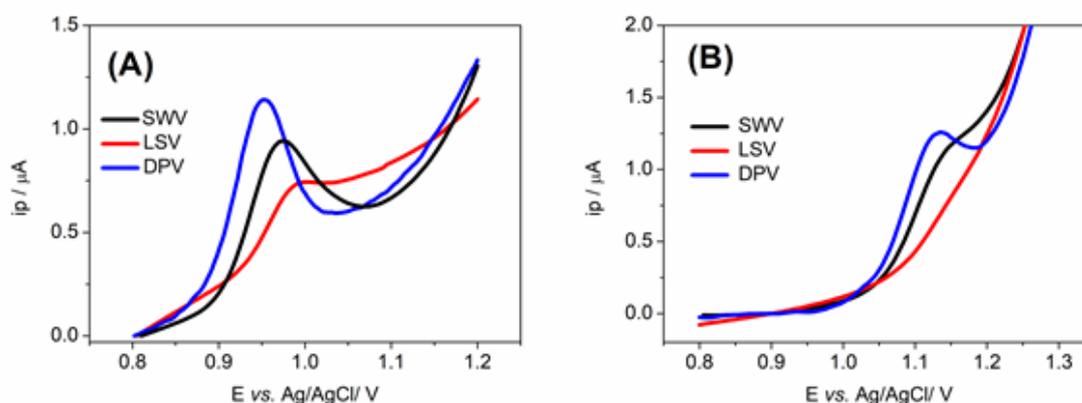


4.1.6 ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO

Primeiramente, o comportamento voltamétrico foi observado em termos de intensidade i_{pa} e resolução do sinal, na presença de 1 mg L⁻¹ de cada analito, variando a técnica voltamétrica, conforme mostrado na Figura 29. Os voltamogramas foram registrados utilizando velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, comparando as técnicas de varredura linear (LSV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV). Para essa otimização, determinou-se a velocidade de varredura dos experimentos de SWV com base na seguinte relação: $v = f \times \Delta E_s$, onde f corresponde a frequência e ΔE_s o incremento de potencial. A baixa resposta obtida para LSV pode ser justificada devido a maior contribuição da corrente capacitiva quando comparada às técnicas de pulso, dificultando a resolução dos sinais. A maior intensidade de corrente e melhor resolução do sinal analítico para ambos os analitos foi obtida

por medidas de DPV. Esse fenômeno pode ser explicado devido a maior adequação da DPV para experimentos conduzidos em menores velocidades de varredura, considerando a lenta cinética de transferência de elétrons para o analito estudado, típica das reações redox irreversíveis (Bard; Faulkner, 2000). Nesse contexto, a DPV foi selecionado como técnica voltamétrica para proceder à análise de quantificação.

Figura 29. Otimização da técnica eletroanalítica na velocidade de 20 mV s^{-1} na presença de A) isoproturon e B) diuron.

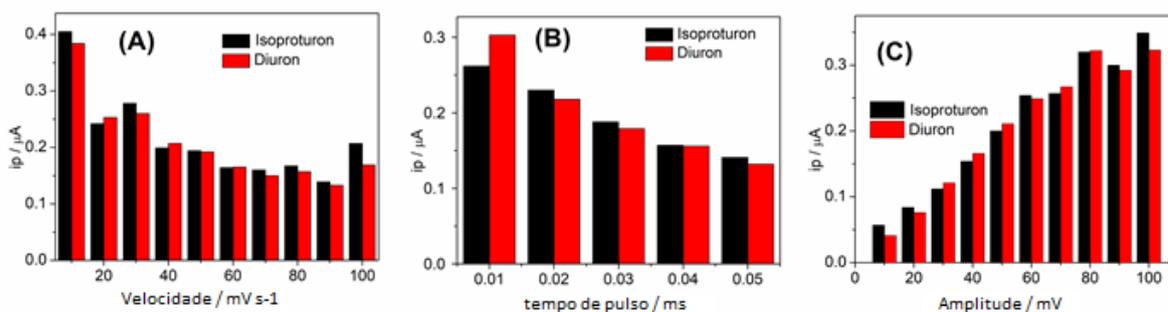


Com o objetivo de alcançar o melhor compromisso entre a qualidade do sinal analítico e a intensidade da corrente de pico, otimizou-se também os parâmetros analíticos da técnica de DPV, avaliando as condições de análise nas seguintes faixas: tempo de pulso de 1 a 5 ms, amplitude do pulso de 10 a 100 mV e, velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} . O gráfico de barras que apresenta a integral dos sinais obtida para os dois analitos testados é apresentado na Figura 30. A partir do gráfico de barras, levou-se em consideração a maior intensidade de corrente aliada a resolução dos sinais analíticos. As condições otimizadas escolhidas foram: tempo de pulso 2 ms, amplitude de pulso 60 mV e velocidade de varredura 10 mV s^{-1} .

Visando melhorar o desempenho eletroanalítico em relação à sensibilidade do método, observou-se também a influência do uso da voltametria de pré-concentração anódica (ASV), na qual através da aplicação de um potencial conhecido pode-se concentrar o analito na interface do eletrodo por processos de adsorção e/ou deposição. Para isso, os estudos foram conduzidos variando os seguintes parâmetros: potencial de pré concentração e tempo de pré-concentração, conforme apresentado na Figura 31A e 31B. Em termos de magnitude de corrente, observou-se aumento do sinal analítico com a aplicação da ASV, que pode ser justificada devido a

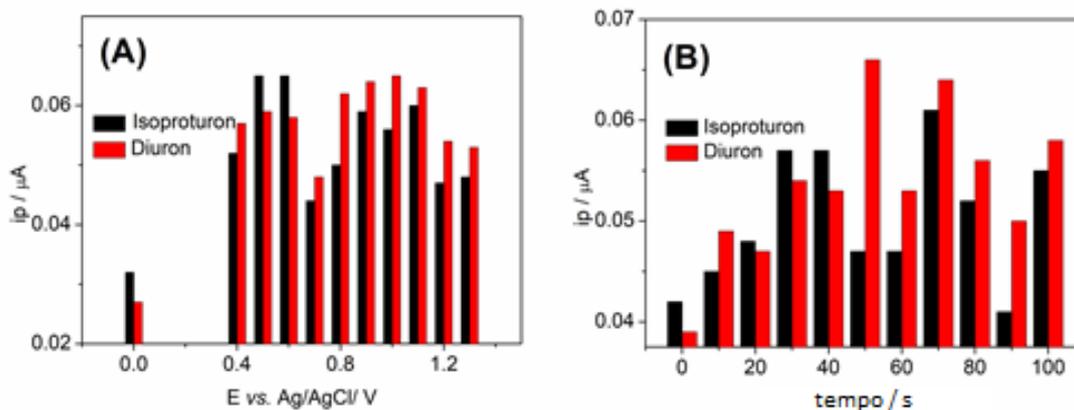
polarização do eletrodo por aplicação de potencial constante, seguido da adsorção dos analitos mediada por interações eletrostáticas e intermoleculares na interface eletrodo/solução.

Figura 30. Otimização de parâmetros da técnica de DPV A) velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} ; B) tempo de pulso de 1 a 5 ms e C) amplitude de pulso de 10 a 100 mV.



Os valores otimizados foram iguais a: potencial de pré concentração = + 0,8 V vs. Ag/AgCl e tempo de pré-concentração = 100 s. Esse pré-condicionamento foi realizado durante todas as medidas para a quantificação dos analitos.

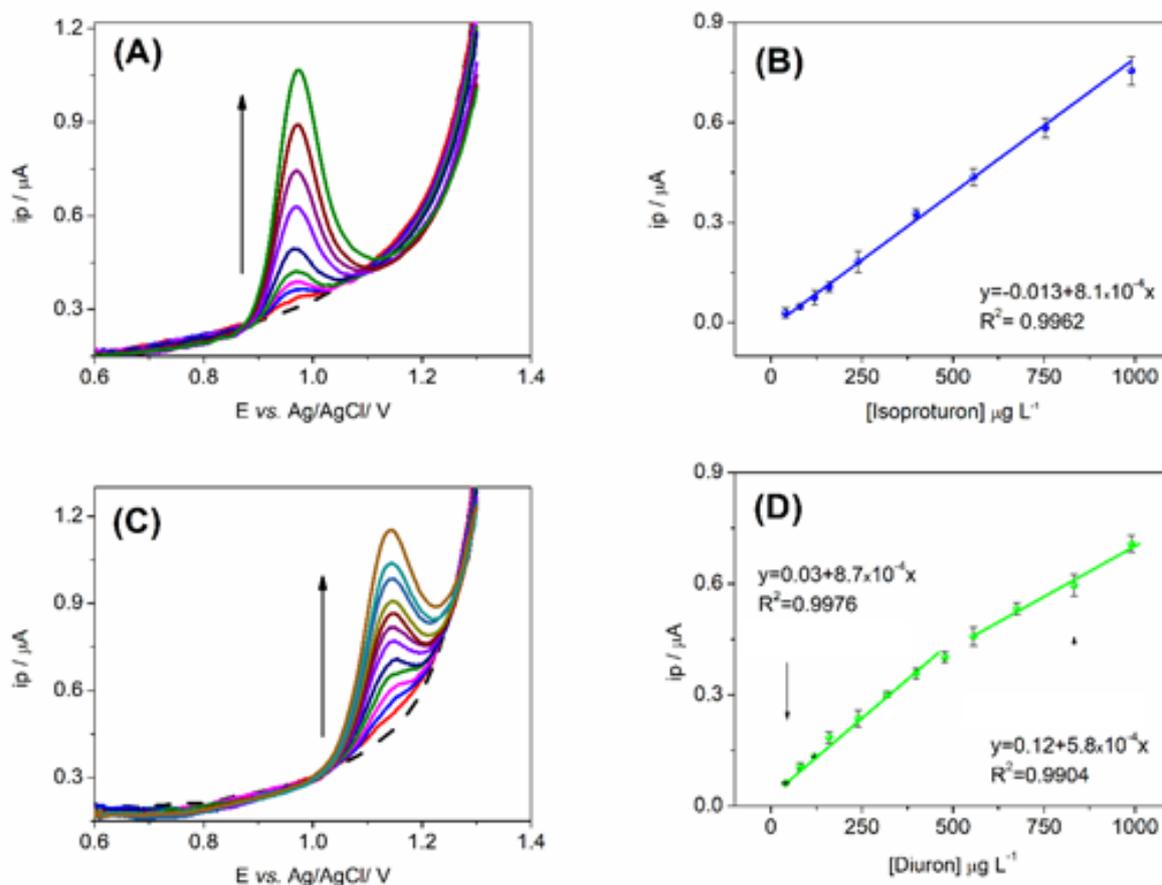
Figura 31. Otimização dos parâmetros da voltametria adsorptiva por pré-concentração A) potencial aplicado e B) tempo de deposição.



4.1.7 DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE ISOPROTURON E DIURON

Primeiramente, avaliou-se o perfil voltamétrico de cada analito de maneira individual na faixa de concentração de 40 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme mostrado nas Figuras 32A e 32C. Para os dois analitos, a intensidade de corrente anódica aumentou linearmente com o aumento da concentração de analito. Todas as curvas de calibração apresentadas foram obtidas em triplicata ($n=3$).

Figura 32. Determinação eletroquímica A) DP ASV para isotproturon. B) curva de calibração do isotproturon. C) DP ASV para o diuron. D) curva de calibração para diuron. Condições experimentais: tampão BR 0.1 mol L⁻¹ pH 2.0.



Para o diuron, identificou-se duas faixas lineares distintas: a primeira faixa no intervalo de concentrações entre 40 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e, a segunda no intervalo de 500 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por outro lado, o isotproturon apresentou apenas uma faixa linear no intervalo estudado. No caso do diuron, a primeira faixa linear foi usada para estimar os parâmetros analíticos. As equações que expressam a relação linear entre corrente e concentração podem ser expressas através das seguintes relações:

$$i_p/\mu\text{A} = 0,013 (\pm 0,002) + 8,1 \times 10^{-4} (\pm 0,2 \times 10^{-4}) [\text{Isotproturon}] (\mu\text{g L}^{-1});$$

$$i_p/\mu\text{A} = 0,028 (\pm 0,005) + 8,7 \times 10^{-4} (\pm 0,1 \times 10^{-4}) [\text{Diuron}] (\mu\text{g L}^{-1});$$

Para o cálculo dos parâmetros analíticos, considerou-se o limite de detecção (LOD) como três vezes o desvio padrão do intercepto da curva/inclinação e o limite de quantificação (LOQ) como dez vezes o desvio padrão do intercepto/inclinação, os valores foram calculados para ambos os analitos. As figuras de mérito para a determinação individual do eletrodo GCE antes e após a modificação estão resumidas na Tabela 1. Através da análise, observa-se o excelente desempenho do eletrodo modificado PtNPs/CS/GCE aplicado na determinação eletroanalítica de isoproturon e diuron, justificando a modificação proposta.

Tabela 1. Figuras de mérito para os herbicidas fenilureia diuron e isoproturon no GCE e PtNPs/CS/GCE obtidos a partir de diferentes medidas eletroquímicas (n=3).

| Parâmetros | GCE | | PtNPs/CS/GCE | |
|---|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| | ISO | DIU | ISO | DIU |
| Faixa linear/ $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 200-1000 | 200-500 | 40-1000 | 60-500 |
| Sensibilidade/ $\mu\text{AL } \mu\text{mol}^{-1}$ | 4.5×10^{-4} | 4.25×10^{-4} | 8.1×10^{-4} | 8.7×10^{-4} |
| Coefficiente de correlação / r | 0.986 | 0.992 | 0.998 | 0.999 |
| LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 60 | 57 | 7 | 17 |
| LOQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 200 | 190 | 25 | 58 |

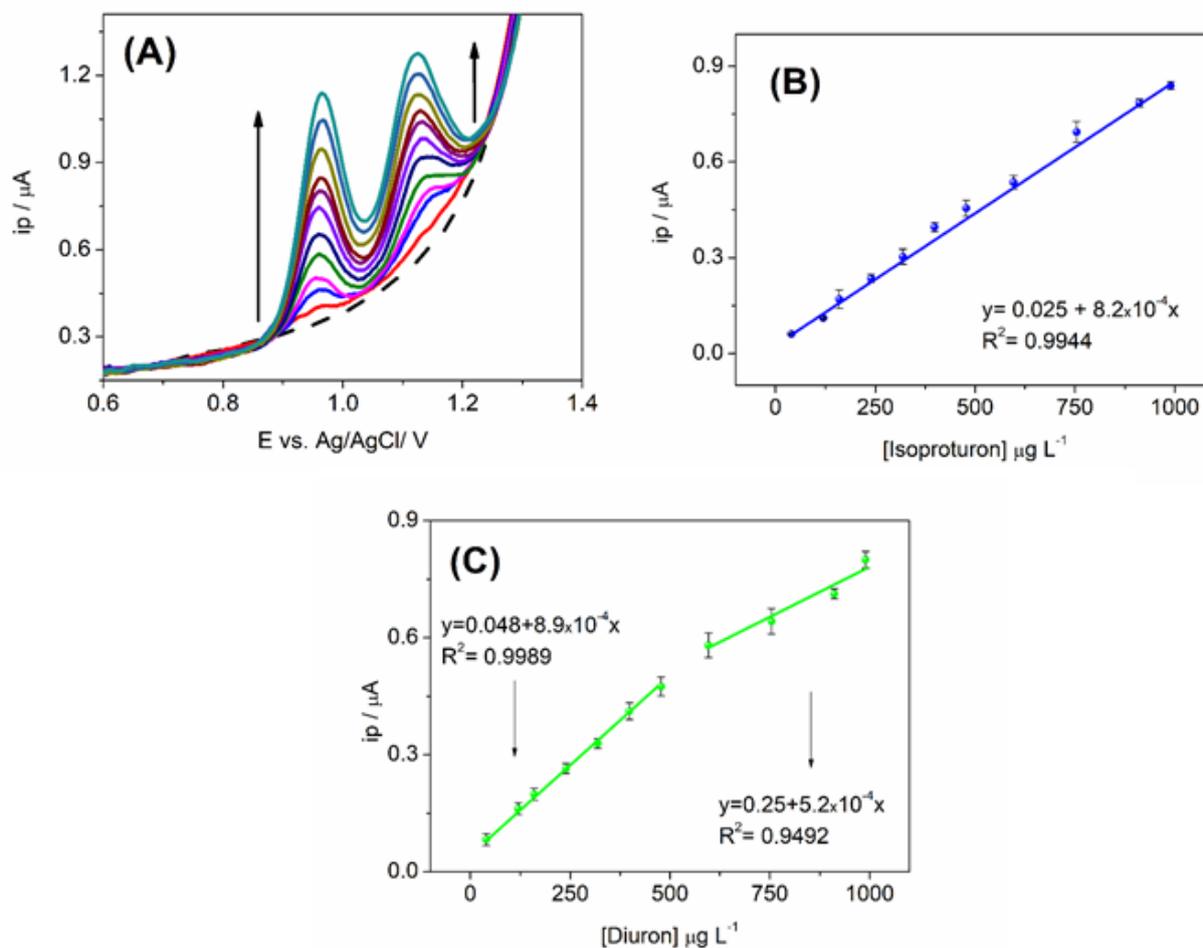
Adicionalmente, realizou-se a análise simultânea de diuron e isoproturon, na mesma faixa de concentração, de 60 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme mostrado na Figura 33. Para os dois analitos, observou-se um aumento de i_{pa} proporcional ao aumento da concentração. Os dados são ilustrados nas Figuras 33A, 33B e 33C (n=3). Para a análise simultânea, as equações lineares podem ser expressas como:

$$i_p/\mu\text{A} = 0,025 (\pm 0,002) + 8,2 \times 10^{-4} (\pm 0,2 \times 10^{-4}) [\text{Isoproturon}] (\mu\text{g L}^{-1});$$

$$i_p/\mu\text{A} = 0,048 (\pm 0,006) + 8,9 \times 10^{-4} (\pm 0,1 \times 10^{-4}) [\text{Diuron}] (\mu\text{g L}^{-1}).$$

A partir da análise simultânea, os valores de LOD calculados através da equação da reta foram iguais a 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para isoproturon e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diuron e, os valores de LOQ iguais a 24 $\mu\text{g L}^{-1}$ para isoproturon e 67 $\mu\text{g L}^{-1}$ para diuron. Os valores de sensibilidade foram semelhantes aos obtidos na análise individual, sugerindo baixa interferência do diuron na quantificação de isoproturon e *vice-versa*.

Figura 33. Determinação simultânea. A) DP ASV na presença de diferentes concentrações de diuron e isotroturon. B) curva de calibração para o isotroturon por análise simultânea. C) curva de calibração para o diuron por análise simultânea.



O desempenho do eletrodo modificado PtNPs/CS/GCE possibilitou a obtenção de menores valores de LOD em comparação com outros eletrodos modificados encontrados na literatura, conforme mostrado na Tabela 2. O novo sensor apresentou sensibilidade necessária para a análise dos compostos feniluréia testado em amostras ambientais de água de rio, especialmente para a determinação de diuron, visando o monitoramento ambiental, de acordo com recomendações de análises de água (Sousa et al., 2018). Esses resultados sugerem a promissora aplicação do método sugerido para a quantificação simultânea de diuron e isotroturon em amostras de água de rio, mesmo considerando a legislação rigorosa de países como Austrália,

Nova Zelândia e Canadá. Esse resultado não é possível com a utilização do eletrodo GCE não modificado. Além disso, a estratégia experimental utilizada neste trabalho permitiu a separação inédita dos sinais eletroquímicos para as duas espécies com considerável semelhança estrutural. Ambos os herbicidas foram quantificados através do mesmo procedimento experimental, com a mesma alíquota de amostra.

Tabela 2. Comparação do desempenho analítico dos PtNPs/CS/GCE com outros eletrodos modificados encontrados na literatura.

| Eletrodo modificado | Analito | E_{pa} / V | Técnica | LOD/$\mu\text{g L}^{-1}$ | Ref. |
|-------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------|--|--|
| MIP/GCE ^a | ISO | 1.05 | SWV | 0.5 | Sadriu et al. (2020) |
| Graphene/SPE ^b | ISO | 0.78 | SWAdSV | 20 | Noyrod; Chailapakul; Wonsawat; Chuanuawatanakul (2014) |
| PtNPs/CS/GCE | ISO | 0.98 | DP ASV | 7 | Esse trabalho |
| MIP-p-Phe/PGE ^c | DIU | 0.82 | DPV | 10 | Öndeş; Soysal (2019) |
| MWCNT-COOH/GCE ^d | DIU | 1.10 | DPV | 16 | Morita et al. (2019) |
| FeTAPc/SWCNT/GCE ^e | DIU | 0.9 | Amperometria | 61 | Mugadza; Nyokong (2010) |
| PtNPs/CS/GCE | DIU | 1.12 | DP ASV | 20 | Esse trabalho |

^a Eletrodo de carbono vítreo molecularmente impresso com polímero condutor

^b Eletrodo de carbono impresso modificado com grafeno

^c Eletrodo de grafite molecularmente impresso com p-fenildiamina

^d Eletrodo de carbono vítreo funcionalizado com nanotubos de carbono

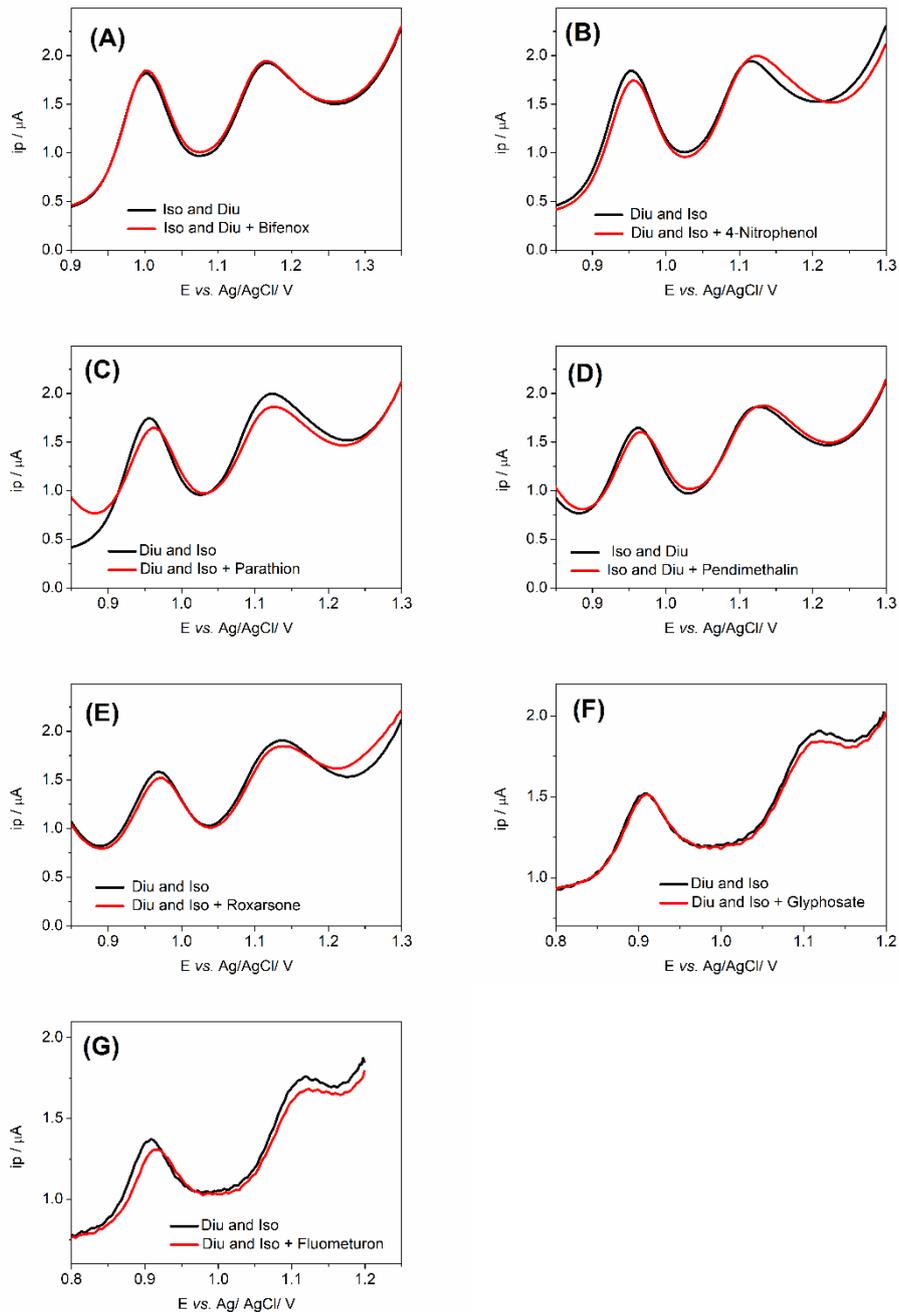
^e Eletrodo de carbono vítreo modificado com tetra-amino ftalocianina e nanotubos de carbono com parede única

4.1.8 SELETIVIDADE E REPETIBILIDADE

Com o objetivo de utilizar o eletrodo modificado PtNPs/CS/GCE para a determinação simultânea de isotroturon e diuron em amostras de água de rio, avaliou-se primeiramente a seletividade do sensor na presença de compostos que possivelmente coexistem na amostra de interesse, podendo apresentar dessa maneira potencial interferência na quantificação dos analitos de interesse. Para avaliar a interferência de resposta de cada composto, utilizou-se como padrão a intensidade de corrente ipa de isotroturon e diuron na presença de concentração fixa dos analitos e, estimou-se a interferência de resposta através da variação de sinal observada antes e após a adição de cada interferente. Para isso, as medidas foram realizadas em uma concentração fixa de $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e isotroturon, utilizando excesso de 5 vezes de cada possível interferente. Os compostos investigados como interferentes foram: (a) Bifenox; (b) 4-

nitrofenol; (c) Paration; (d) Pendimetalina; (e) Roxarsone; (f) Glifosato e (g) Fluometuron. Os resultados estão apresentados na Figura 34.

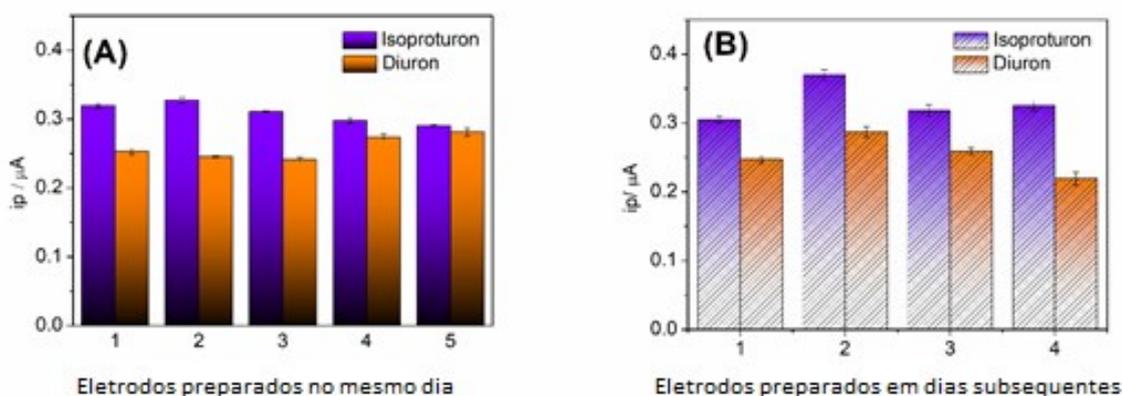
Figura 34. Estudos de seletividade por DPASV em $800 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito diuron e isoproturon antes e após a adição de interferentes A) Bifenox; B) 4-nitrofenol; C) Paration; D) Pendimetalina e E) Roxarsone. Tampão BR (pH 2,0) nas condições otimizadas.



Para todos os interferentes, observou-se desvio padrão relativo (DPR) menor que 10% para ambos os analitos. O perfil voltamétrico obtido antes e após a adição de cada interferente também não apresentou significativa variação, mostrando a alta seletividade do eletrodo na presença de outros contaminantes ambientais.

Para avaliar a repetibilidade de resposta do PtNPs/CS/GCE, preparou-se cinco diferentes eletrodos modificados, que foram posteriormente empregados na quantificação de uma concentração fixa dos analitos ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ de isotroturon e diuron). O desvio padrão relativo (DPR) foi de 1,3% para o isotroturon e 1,6% para o diuron para 5 diferentes eletrodos preparados no mesmo dia, indicando baixo desvio e consistência dos dados para aplicações reais. Além disso, também foi avaliada a reprodutibilidade de eletrodos preparados em diferentes dias durante quatro dias subsequentes, utilizando uma nova modificação para cada análise. Os valores de DPR foram calculados como 4,8% e 2,8% para isotroturon e diuron, respectivamente, indicando que o sensor proposto apresenta baixa variabilidade para ambos os analitos. Os gráficos de barra referentes aos sinais de i_{pa} obtidos para as análises de repetibilidade no mesmo dia e, em dias subsequentes, estão apresentados nas Figuras 36A e 36B, respectivamente.

Figura 35. i_{pa} obtidos por diferentes eletrodos modificados na presença de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e isotroturon preparados A) no mesmo dia e B) durante 4 dias consecutivos

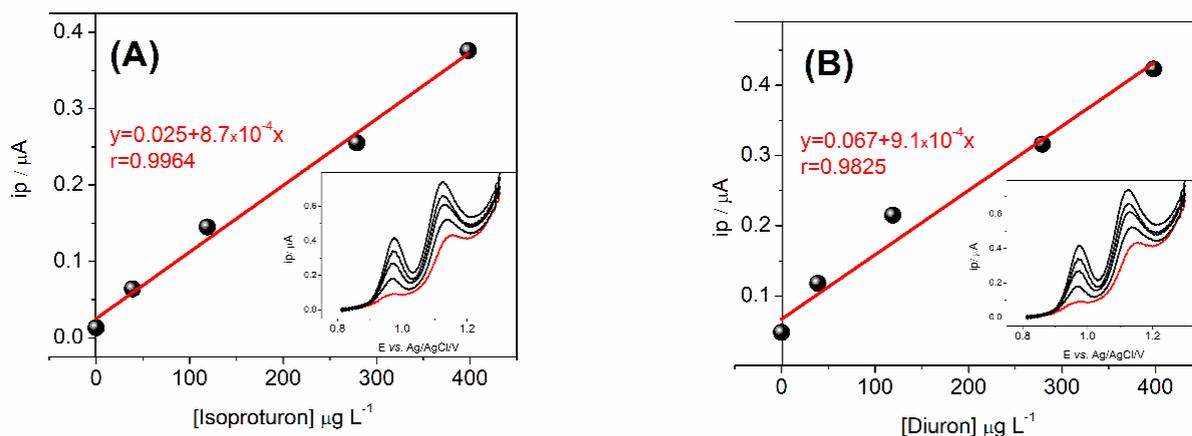


4.1.9 QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANALITOS EM AMOSTRA

Para avaliar a viabilidade de aplicação do sensor eletroquímico PtNPs/CS/GCE, aplicou-se o mesmo na determinação simultânea de diuron e isotroturon em amostras de água

de rio. Para isso, a amostra de água do rio foi enriquecida com uma concentração conhecida de diuron e isoproturon. A quantificação dos analitos foi realizada pelo método de adição padrão. Os voltamogramas obtidos para a determinação de diuron e isoproturon em uma das concentrações testadas estão mostrados nas Figuras 37A e 37B. Os valores de sensibilidade obtidos para a análise simultânea usando a solução padrão dos analitos ($8,2 \times 10^{-4} \mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ L}$ e $8,9 \times 10^{-4} \mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ L}$) foram próximos aos obtidos para a análise em uma amostra de água de rio ($8,7 \times 10^{-4} \mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ L}$ para isoproturon e $9,1 \times 10^{-4} \mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ L}$ para diuron). O resultado sugere que não há interferência significativa da matriz da amostra para a determinação eletroquímica simultânea dos analitos de interesse.

Figura 36. A) Curva de adição padrão para o isoproturon. B) Curva de adição padrão para o diuron. *Inset:* medidas de DPASV na amostra enriquecida aumentando concentração de diuron e isoproturon.



Além disso, conforme demonstrado na Tabela 3, a recuperação foi realizada em três níveis diferentes de concentração para cada analito, considerando a faixa de estudo do método. Recuperações na faixa de 90-110% são satisfatórias de acordo com a equação de Horwitz (Kellner, Mermet, Otto, Valcárcel; Widmer, 2004). Portanto, o método proposto é adequado para a determinação simultânea dos analitos testados em amostras de água de rios.

Tabela 3. Determinação de diuron e isoproturon em água de rio usando o eletrodo PtNPs/CS/GCE (n=3).

| Isoproturon | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------|---------|
| Adicionado/ $\mu\text{g L}^{-1}$ | Encontrado/ $\mu\text{g L}^{-1}$ | Recuperação/ % | DPR / % |
| 30 | 28,7 | 95,7 | 5,6 |
| 50 | 51,2 | 102,4 | 4,4 |
| 80 | 77,1 | 96,4 | 2,1 |
| Diuron | | | |
| Adicionado/ $\mu\text{g L}^{-1}$ | Encontrado/ $\mu\text{g L}^{-1}$ | Recuperação/ % | DPR / % |
| 80 | 73,6 | 92,0 | 3,8 |
| 120 | 125,6 | 104,7 | 1,3 |
| 160 | 177 | 110,6 | 2,4 |

4.1.10 CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO

Nanopartículas de platina estabilizadas em quitosana PtNPs/CS foram sintetizadas e caracterizadas. O material resultando foi aplicada na construção de um novo eletrodo GCE modificado para a determinação simultânea de herbicidas de feniluréia diuron e isoproturon, compostos que apresentam uma estrutura química muito semelhante. A utilização da quitosana como agente estabilizante permitiu a obtenção de nanopartículas com diâmetro de aproximadamente 4 nm, resultando em um material com elevada área, ideal para aplicação como sensor eletroquímico. Através do método desenvolvido, por DPASV, baixos limites de detecção foram alcançados na determinação simultânea dos analitos, apresentando valores de 7 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para isoproturon e diuron, respectivamente. O eletrodo modificado PtNPs/CS/GCE apresentou também excelente resposta em relação à repetibilidade, seletividade e sensibilidade. De acordo com esses resultados, o novo sensor desenvolvido neste trabalho é uma promissora plataforma bioinspirada a base de quitosana e nanopartículas de platina com potencial aplicação na determinação de diuron e isoproturon, de forma individual e/ou simultânea, apresentando características adequadas para análises ambientais, como em amostras de água de rio.

CAPÍTULO II

4.2 NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE MANGANÊS RECOBERTAS COM QUITOSANA APLICADAS NA DETERMINAÇÃO DE BIFENOX

4.2.1 INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO

Neste capítulo, utilizou-se a quitosana no recobrimento de nanopartículas ferrita de manganês (MnFe_2O_4), previamente sintetizadas pelo método de coprecipitação. Diferentes técnicas foram empregadas para a caracterização química e estrutural das nanopartículas *core-shell* resultantes, denominadas como $\text{MnFe}_2\text{O}_4@CS$. Pela primeira vez, aplicou-se o novo nanomaterial no desenvolvimento de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado. Aplicou-se o eletrodo resultante $\text{MnFe}_2\text{O}_4@CTS/GCE$ na determinação de um herbicida da classe nitro difenil éter (NDPE), com foco na análise ambiental. Para a quantificação escolheu-se o composto 5- (2,4-diclorfenoxi) 2nitrobenzoato de metila, também conhecido como bifenox, que é classificado como um herbicida seletivo e sistêmico com aplicação em atividades agrícolas para controlar ervas daninhas em cereais, arroz, trigo e cevada (Zaouak et al., 2013). O bifenox pertence à mesma classe dos herbicidas acifluorfen e nitrofen (Cheng et al., 2021). Este composto tem demonstrado induzir o estresse oxidativo das células, aumentando o potencial tumorigênico (Cheng et al., 2021). Além disso, os produtos da hidrólise do bifenox e outros NDPEs podem causar riscos ao meio ambiente. Como consequência de seu uso extensivo, esses compostos são frequentemente detectados em águas de rios e lagos, causando danos ao ecossistema aquático (Cheng et al., 2021). Nesse sentido, existe atualmente a necessidade de desenvolvimento de ferramentas analíticas eficientes aplicadas ao monitoramento ambiental de NDPEs.

Nesse contexto, visou-se avaliar o desenvolvimento de um novo sensor nanoestruturado para a determinação do bifenox. Além das excelentes propriedades catalíticas de nanomateriais discutidas no capítulo anterior, destaca-se também o uso de óxidos metálicos condutores, e sistemas híbridos combinados com quitosana. Na literatura, observa-se que inúmeros óxidos metálicos magnéticos nanuestruturados podem oferecer um efeito electrocatalítico em experimentos de voltametria cíclica (CV), amplificando as correntes redox e o coeficiente de difusão de analitos específicos (Cheng et al., 2021). Além disso, o uso desses materiais pode aumentar a vida útil da plataforma de detecção (Cheng et al., 2021). Recentemente, óxidos magnéticos, como MnFe_2O_4 , têm demonstrado características desejáveis para a eletroanálise de metais pesados como Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} (Zhou et al., 2017). Além disso, esses materiais também apresentam promissora resposta para a produção de dispositivos de armazenamento de energia (Zhou et al., 2017). Do ponto de vista de síntese e preparo, nanopartículas de MnFe_2O_4 podem ser produzidas com diferentes tamanhos e morfologias,

dependendo dos parâmetros empregados na síntese (Murugesan et al., 2021). Para aplicações eletroanalíticas, a propriedade mais desejada consiste no pequeno tamanho das partículas. Nesse contexto, o uso de agentes estabilizantes com efeitos estéricos e eletrostáticos podem ser adotados para evitar a presença de aglomerados. Adicionalmente, o recobrimento de nanopartículas MnFe_2O_4 com polímeros, como alginato e quitosana, pode melhorar a funcionalidade e aumentar a dispersão desses materiais no meio de interesse (Zhang et al., 2021).

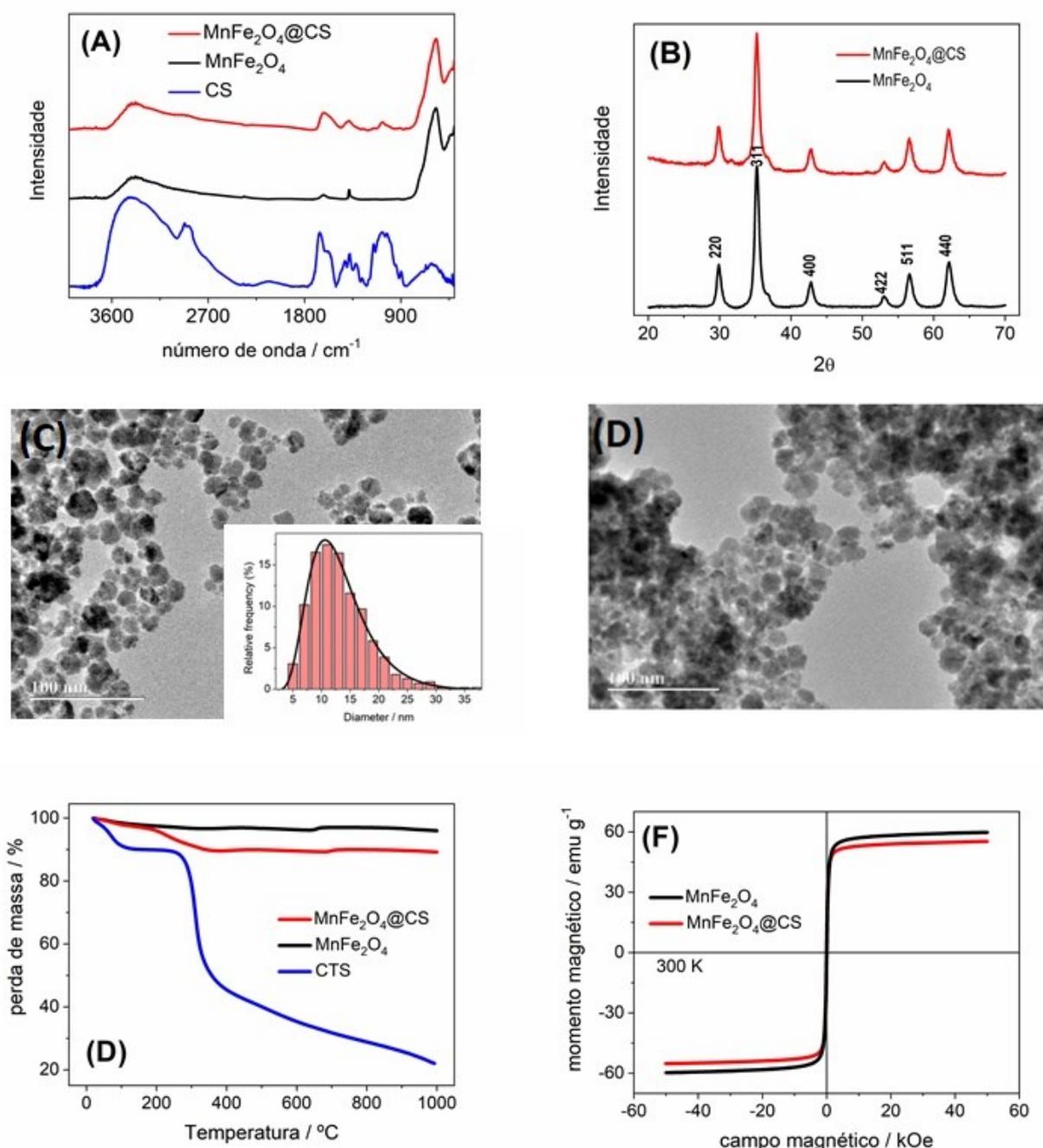
A quitosana pode atuar como um agente estabilizante desses materiais, apresentando-se também como um quelante e, agente com propriedades adequadas na formação de filmes. Recentemente, as características combinadas de materiais híbridos magnéticos têm sido exploradas em diferentes campos de pesquisa, incluindo a eletrocatalise (Zhang et al., 2021). Especificamente, para a eletroanálise ambiental, o uso de materiais combinados pode fornecer interações planejadas entre analito/eletrodo, melhorando a sensibilidade das plataformas eletroquímicas (Zhang et al., 2021). Adicionalmente, o recobrimento de materiais magnéticos com a quitosana pode melhorar a estabilidade dos eletrodos. A partir desta perspectiva, as propriedades do novo material híbrido $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ foram exploradas para a preparação de eletrodos modificados visando a detecção eletroanalítica do bifenox em amostras de água.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$

A Figura 38A apresenta os espectros de Infravermelho comparativos dos materiais MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ e CS em pó pura. Para o material MnFe_2O_4 , observa-se o estiramento característico da vibração metal-oxigênio em aproximadamente 418 cm^{-1} (sítio octaédrico) e, em 577 cm^{-1} (sítio tetraédrico), característicos de ferritas (Majeed, 2017). As bandas próximas a 3400 e 1626 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento da vibração de O-H e flexão angular de H-O-H da água, respectivamente. O sinal próximo a 1378 cm^{-1} está relacionado ao alongamento assimétrico do $-\text{NO}$, a partir do nitrato residual da etapa de passivação durante a síntese. O espectro CS apresenta bandas características em 1656 cm^{-1} (alongamento de carbonila da amida I), 1379 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$), 898 cm^{-1} (estrutura de sacarídeo) e 3300 cm^{-1} (vibração de alongamento de hidroxila e amina). Comparativamente, para o material $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$, as vibrações características do CS são deslocadas (1617 , 1384 e 907 cm^{-1}), e os sinais relacionados à vibração metal-oxigênio aparecem, o que indica o revestimento efetivo da ferrita pelo polímero (Zhang et al., 2021). Além disso, o alongamento $\text{P}=\text{O}$ em 1252 cm^{-1} está presente no espectro de

$\text{MnFe}_2\text{O}_4@CS$ e ausente no espectro de CS puro. Conforme apresentado na Figura 38B, também realizou-se a caracterização química e estrutural dos materiais através de difratometria de raios X.

Figura 37. Caracterização dos materiais CS, MnFe_2O_4 , e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@CS$ por diferentes técnicas. A) FTIR B) Difração de Raios X C) Microscopia eletrônica de transmissão. Inset: histograma do tamanho de partículas. D) Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução do material $\text{MnFe}_2\text{O}_4@CS$. E) Curvas termogravimétricas. F) Curvas de magnetização.



O padrão de difração característico da fase de ferritas do tipo espinélio pode ser identificados nos materiais MnFe_2O_4 e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$. Conforme a literatura, o parâmetro de rede do MnFe_2O_4 puro é 8,7642 (2) Å. A relação do parâmetro de rede (experimental/padrão - cartão ICSD n° 155275) é 1,0295, o que sugere defeitos estruturais e/ ou falhas de empilhamento durante o crescimento do grão (Bruzamarello et al., 2020).

Além disso, a razão molar Mn/Fe para o material do núcleo é de 0,396. Como esperado para o sistema avaliado, o padrão de difração das nanopartículas híbridas *core-shell* $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$ não apresentou o sinal amorfo característico da quitosana, devido à baixa proporção do polímero na composição final do material sintetizado.

Através das imagens de MET mostradas na Figura 38C e 38D, observou-se a presença de nanopartículas com morfologia esférica. Com base no histograma inserido na Figura 38C, estimou-se o diâmetro médio das nanopartículas de MnFe_2O_4 , em aproximadamente 15,1 nm $\pm 0,4$. O pequeno tamanho alcançado sugere uma característica importante e diferenciada para a aplicação do material na preparação de eletrodos modificados. Além disso, após o revestimento com CS não foram observadas alterações significativas na morfologia das nanopartículas, indicando a formação de uma fina camada de recobrimento, que permite o aumento da funcionalidade do material mantendo as suas propriedades.

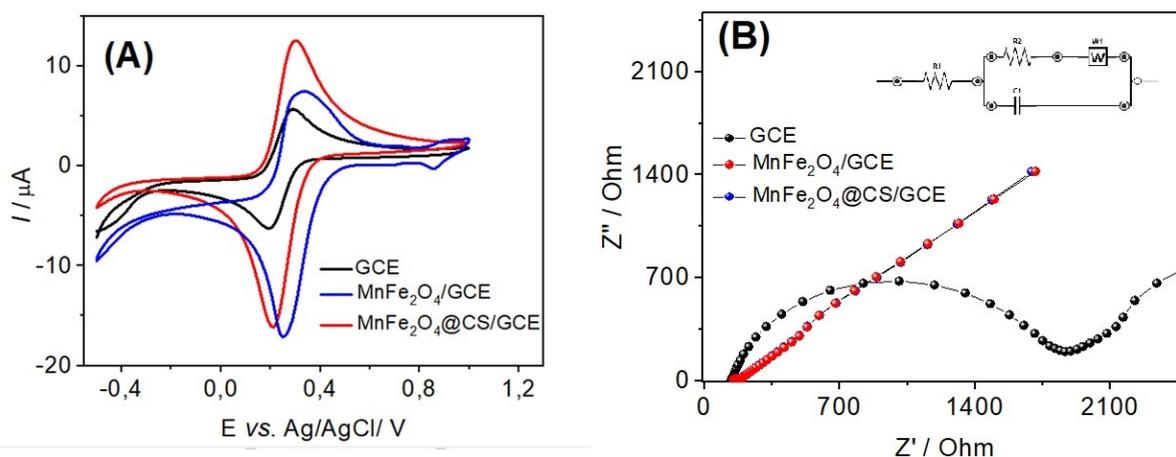
As curvas termogravimétricas dos materiais MnFe_2O_4 , $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$ e CS são apresentadas na Figura 38E. Observa-se através da análise a alta estabilidade térmica das nanopartículas magnéticas MnFe_2O_4 ao longo da faixa de temperatura avaliada. Para o material $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$, observa-se a degradação da porção polimérica em faixa de temperatura próxima a degradação da CS pura, caracterizada por uma perda de massa de aproximadamente 7,4% (Tonset = 184 ° C). Nesse contexto, observa-se que a incorporação desta pequena quantidade de biopolímero como recobrimento, responsável por produzir nanopartículas do tipo *core-shell* com um pequeno diâmetro de partícula e, um alto caráter magnético, conforme confirmado por curvas de magnetização (Figura 38F).

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

As análises de voltametria cíclica (CV) foram realizadas na presença de uma sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em uma faixa de potencial de -0,4 a +0,9 V vs Ag/AgCl visando estudar o comportamento eletroquímico do material híbrido $\text{MnFe}_2\text{O}_4@ \text{CS}$. A Figura 39A mostra os

voltamogramas comparativos do GCE antes e depois o recobrimento com a quitosana denominados $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{GCE}$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$, respectivamente. Comparado ao eletrodo GCE, após modificação, o eletrodo $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ apresentou um aumento de aproximadamente 2,2 vezes e 2,5 vezes nas correntes de pico anódico e catódico, respectivamente. Para fins comparativos, o comportamento eletroquímico de $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{GCE}$ também foi avaliado, apresentando intensidade de corrente menor, quando comparado ao eletrodo modificado com o material híbrido. Além disso, a diferença entre a corrente de pico anódica e catódica para $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{GCE}$ indica menor reversibilidade das reações redox. Os valores estimados de ΔE_p ($E_{pa}-E_{pc}$) foram iguais a 95 mV para o GCE e 90 mV para o $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$, indicando discreto aumento na reversibilidade da reação redox fornecida pela incorporação dos materiais funcionalizados híbridos magnéticos.

Figura 38. Caracterização eletroquímica na presença de $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ dos eletrodos GCE, $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{GCE}$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ A) voltametria cíclica de -0.3V a $+0.9\text{V}$ velocidade = 20 mV s^{-1} e B) espectroscopia de impedância eletroquímica.



O resultado obtido difere de trabalhos anteriores, que sugerem a inibição da resposta de corrente e uma maior separação pico a pico na presença de MnFe_2O_4 , devido à baixa condutividade elétrica de óxidos metálicos magnéticos (Zhou et al., 2017). No entanto, o comportamento diferente do esperado para o material $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ na presença da sonda redox pode ser explicado devido à interação eletrostática entre a amina protonada de quitosana e as espécies de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução negativamente carregadas (Feng et al., 2006). Além disso, a rápida cinética de transferência de elétrons justifica-se devido ao pequeno diâmetro das

nanopartículas, proporcionada e alta razão superfície-volume, que permite o consequente aumento dos sítios eletrocatalíticos disponíveis na superfície do eletrodo.

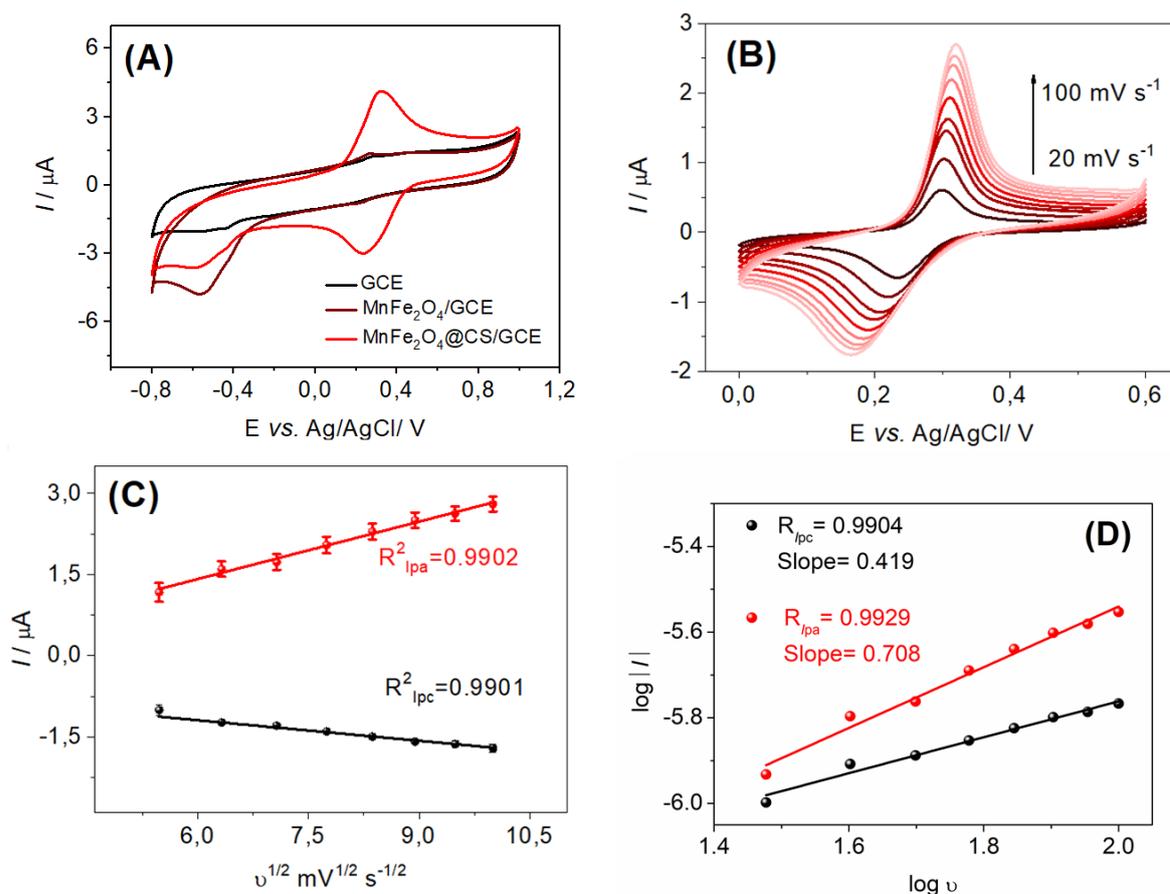
A espectroscopia de impedância eletroquímica também foi aplicada para investigar a resistência de transferência de carga interfacial (R_{ct}) dos eletrodos. Os gráficos de Nyquist e o circuito Randles equivalente são apresentados na Figura 39B. No circuito, o componente R1 representa a resistência da solução, R2 a resistência de transferência de carga, C1 é definido como a capacitância de camada dupla, W1 é a constante de Warburg, relacionada à contribuição da difusão semi-infinita. Os valores de R_{ct} foram estimados como o diâmetro do semicírculo como 1,74, 0,02 e 0,03 $k\Omega$ para o GCE, $MnFe_2O_4/GCE$ e $MnFe_2O_4@CS/GCE$, respectivamente. A diminuição pronunciada na resistência de transferência de carga pode ser atribuída rápida cinética de transferência de elétrons no eletrodo modificado. Além disso, os resultados na resistência à transferência de carga foram semelhantes para $MnFe_2O_4/GCE$ e $MnFe_2O_4@CS/GCE$, indicando a formação de uma fina camada de camada de quitosana. Este resultado está de acordo com as medidas de CV e, sugere que as nanopartículas híbridas $MnFe_2O_4@CS$ apresentam características promissoras para aplicação no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

4.2.4 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO NA PRESENÇA DE BIFENOX

O comportamento eletroquímico do analito foi investigado por medições de CV na presença de 8 $mmol L^{-1}$ de bifenoX usando uma faixa de potencial de -0,8 a +1,0 V vs Ag/AgCl. A Figura 40A apresenta os voltamogramas comparativos de GCE, $MnFe_2O_4/GCE$ e $MnFe_2O_4@CS/GCE$. De acordo com trabalhos anteriores, o bifenoX apresenta conhecido sinal catódico em uma faixa de potencial próxima a -0,6 V na superfície de eletrodos de GCE, relacionado à redução irreversível dos grupos nitro presentes na estrutura da molécula. No entanto, a redução de grupos nitro comumente precisa ser realizada em atmosfera inerte, pois ocorre na mesma faixa de potencial das reações de redução de oxigênio. Por outro lado, usando o $MnFe_2O_4@CS/GCE$, reduz-se os grupos nitro do bifenoX a hidroxilamina. Essas espécies podem ser posteriormente oxidadas a grupos nitroso, com característico sinal em +0,2 V vs. Ag/AgCl (Salehzadeh, Hamid et al., 2016). Como observado nas análises comparativas, esse perfil voltamétrico foi evidenciado apenas na presença do eletrodo $MnFe_2O_4@CS/GCE$, mostrando o comportamento eletrocatalítico do material híbrido proposto.

Como é mostrado na Figura 40A, os potenciais de pico de oxidação e redução das espécies hidroxilamina/nitroso estão próximos de +0,31 e +0,23 V vs Ag/AgCl, respectivamente. Os valores de separação entre os picos redox (ΔE_p) para esses picos foram iguais a 40, 52 e 80 mV para o GCE, $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{GCE}$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$, respectivamente. Os valores obtidos para ambos foram inferiores a $57/n$ mV (n = número de elétrons), o que é típico de uma reação redox reversível. Além disso, após a modificação, foi observado um aumento nas correntes de pico catódico e anódico de aproximadamente 3 e 5 vezes, respectivamente. Este sinal reversível foi usado para a quantificação do bifenox.

Figura 39. A) VC na presença de 8 mmol L^{-1} de bifenox velocidade= 50 mV s^{-1} . B) CV do eletrodo $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CTS}/\text{GCE}$ na presença de 4 mmol L^{-1} de bifenox em diferentes velocidades de varredura de 20 a 100 mV s^{-1} . C) Dependência linear entre I and $v^{1/2}$ para o $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CTS}/\text{GCE}$. D) Relação entre $\log I$ versus $\log v$ para $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CTS}/\text{GCE}$.



O intenso sinal obtido para a reação redox dos grupos hidroxilamina/nitroso na presença do eletrodo $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ sugerem que o recobrimento das nanopartículas com quitosana pode aumentar a homogeneidade e dispersão das MnFe_2O_4 na superfície do eletrodo.

Além disso, o recobrimento polimérico aumenta as interações eletrostáticas do bifenoxy no eletrodo modificado, levando a uma maior sensibilidade. Isso pode ser explicado pela atração entre $R-NH^{3+}$ da quitosana e as regiões negativas do bifenoxy, que estão localizadas no átomo de oxigênio do grupo carbonila (Karpagakalyaani et al., 2020). Os processos reversíveis são adequados para fins eletroanalíticos, evitando a adsorção de produtos não eletroativos na superfície do eletrodo. Além disso, esses processos apresentam maior sensibilidade através da técnica de SWV, onde a corrente resultante considera as intensidades de pico de redução e oxidação.

As características eletroquímicas do eletrodo proposto foram investigadas em diferentes velocidades de varredura de 10 a 100 $mV s^{-1}$ na presença de bifenoxy 8 $mmol L^{-1}$. Esses voltamogramas são apresentados na Figura 40B. Através das medidas, observou-se uma relação linear entre a corrente de pico catódico e anódico versus a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$), que pode ser expressa por:

$$i_{pa} (\mu A) = -0,7 + 0,35 v^{1/2} (mV^{1/2} s^{-1/2});$$

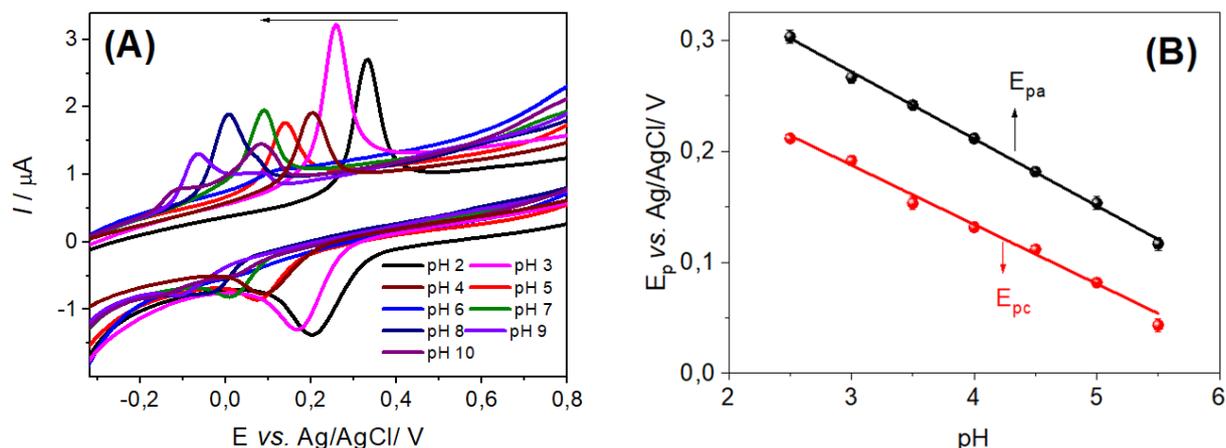
$$i_{pc} (\mu A) = -0,4 - 0,13 v^{1/2} (mV^{1/2} s^{-1/2});$$

Os coeficientes de correlação foram 0,9901 e 0,9902 para i_{pa} e i_{pc} , respectivamente (Figura 40C). De acordo com a equação de Randles-Sevcik, esse comportamento é típico dos processos redox controlados por difusão. Além disso, a Figura 40D mostra a dependência linear entre $\log i$ versus $\log v$, que apresentou uma inclinação de 0,419, que é próximo ao valor teórico de 0,5 para processos de difusão (Bard; Faulkner, 1980).

4.2.5 EFEITO DO pH

Análises de voltametria cíclica foram realizadas na presença do analito em diferentes valores de pH na faixa de 2,5 a 5,5, conforme mostrado na Figura 41A. De acordo com os voltamogramas, observa-se que os potenciais de pico são dependentes da concentração de H^+ no meio, apresentando um deslocamento para potenciais negativos com o aumento do pH na faixa estudada. Esse resultado pode ser atribuído à influência do próton na oxidação do grupo hidroxilamina, conforme mecanismos relatados na literatura (Salehzadeh, Hamid et al., 2016).

Figura 40. A) CV em diferentes valores de pH na presença de 2 mmol L⁻¹ de bifenoX e B) relação linear entre E_{pa} e E_{pc} versus pH.



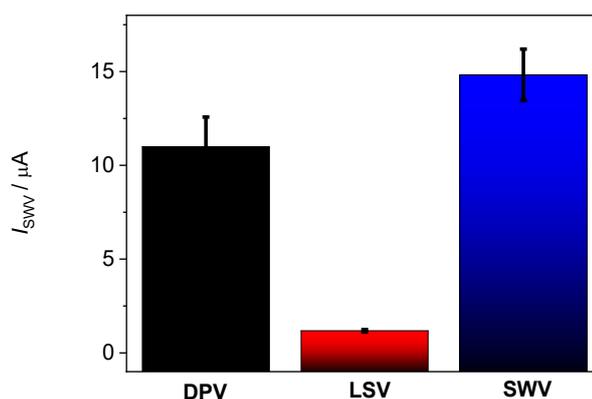
A partir dos voltamogramas apresentados na Figura 41A, identificou-se uma relação linear entre os potenciais de pico anódico e catódico versus pH do meio, com inclinações de 0,060 e 0,054 pH mV⁻¹, respectivamente (Figura 41B). Os resultados obtidos foram próximos aos valores teóricos de Nernst, indicando um número semelhante de mol de prótons e elétrons envolvidos na reação redox. Esse resultado está de acordo com publicações anteriores, que descrevem o envolvimento de dois prótons e dois elétrons no mecanismo de oxidação do bifenoX para a faixa de pH (Salehzadeh, Hamid et al., 2016). Além disso, o pico de corrente mais intenso foi obtido em meio ácido (pH 3,0). Esse valor foi utilizado para os estudos de otimização e quantificação do analito.

4.2.6 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

Diferentes técnicas eletroanalíticas, como voltametria de varredura linear (LSV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV), foram estudadas na presença de bifenoX de 20 μmol L⁻¹, utilizando velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. A Figura 42 apresenta os resultados comparativos, indicando que as técnicas de pulso proporcionaram um grande aumento da corrente de pico quando comparadas a LSV. Esse comportamento pode ser atribuído à contribuição da corrente capacitiva na técnica LSV. Ao comparar as técnicas de pulso, a SWV apresentou maior intensidade de corrente, justificada por sua adequação a processos reversíveis, onde o sinal obtido é proveniente da resultante dos sinais

de oxidação e redução do analito (Thomas; G. Henze, 2001). Nesse sentido, escolheu-se a SWV para experimentos posteriores.

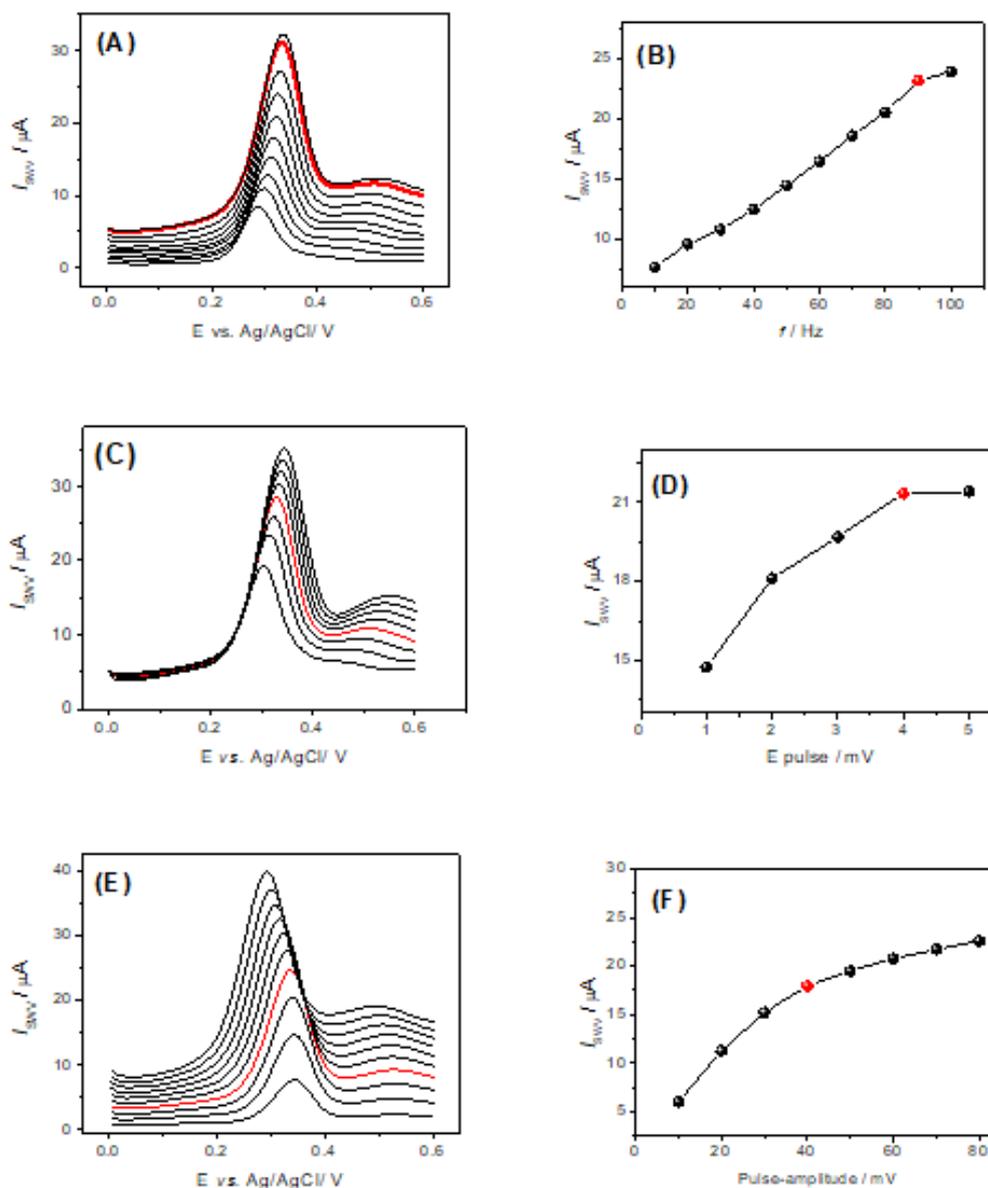
Figura 41. Influência da técnica voltamétrica aplicada para a quantificação de bifenox. Condições: $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ bifenox; 0.1 mol L^{-1} de eletrólito suporte, pH 3.0 ($v = 20 \text{ mV s}^{-1}$).



Para fins analíticos, foram avaliados os seguintes parâmetros de SWV, tais como: amplitude de pulso, tempo de pulso e frequência.

O comportamento do pico anódico foi estudado na presença de bifenox $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os resultados são apresentados na Figura 43. Em relação ao melhor compromisso entre a intensidade da corrente de pico e a qualidade do sinal analítico, as condições experimentais otimizadas foram: frequência de 90 Hz, potencial de pulso de 4 mV e amplitude de pulso de 40 mV.

Figura 42. Otimização dos parâmetros da SWV na presença de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de bifenoX in 0.1 mol L^{-1} tampão B-R (pH 3.0). A) otimização da frequência na faixa de 10 a 100 Hz. B) Relação entre I_{sw} e frequência. C) Potencial de pulso variando os valores na faixa de 1 a 5 mV. D) Relação entre I_{sw} e potencial de pulso. E) Amplitude de pulso variando valores de 10 a 80 mV. F) Relação entre I_{sw} e amplitude de pulso.

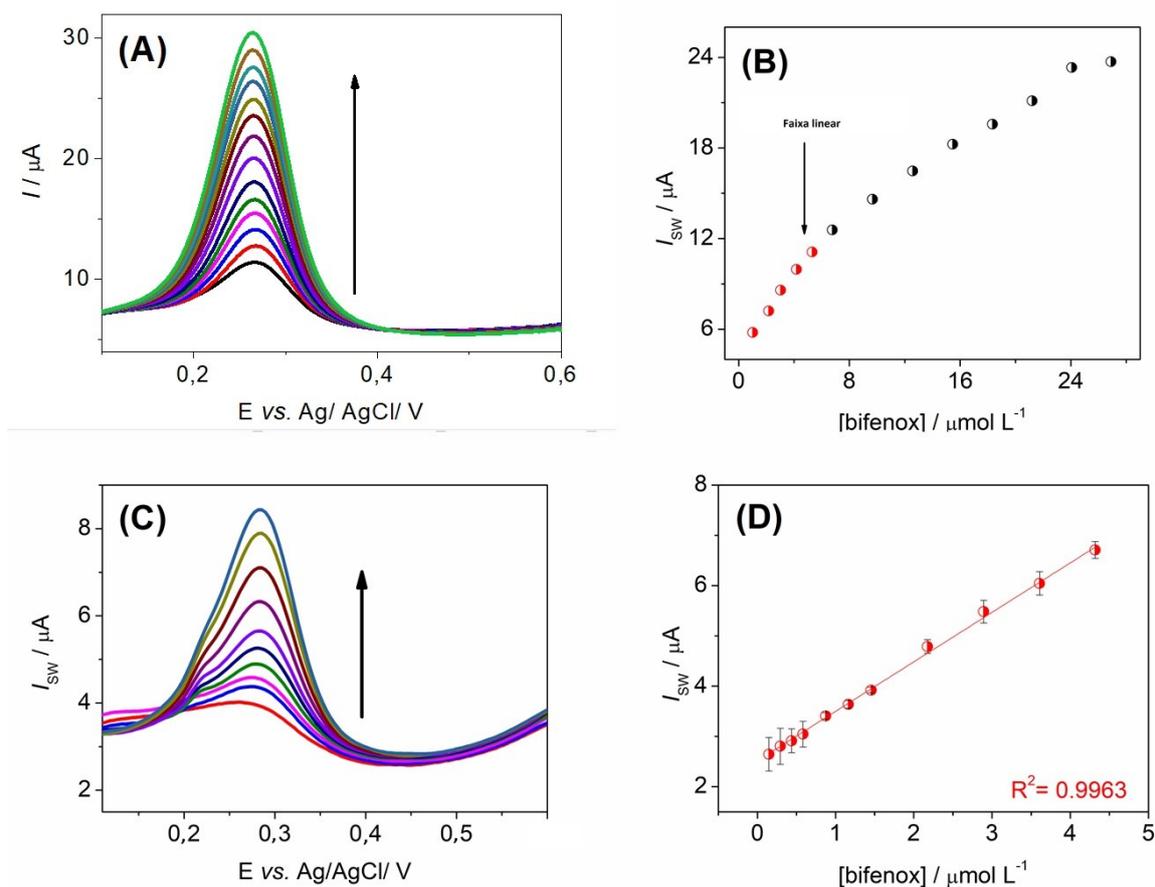


4.2.7 DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE BIFENOX

Através da análise de SWV nas condições otimizadas, realizou-se a determinação voltamétrica de bifenoX na faixa de potencial de $-0,4$ a $+0,6 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Como pode ser visto na Figura 43A, o pico anódico relacionado à oxidação do bifenoX em $+0,3 \text{ V}$ aumenta com o aumento da concentração do analito. Os voltamogramas foram registrados utilizando o

eletrodo modificado variando o analito em uma ampla faixa de concentração de 0,3 a 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$, visando investigar a faixa linear do método analítico.

Figura 43. A) SWV usando o $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CTS}/\text{GCE}$ na presença de diferentes concentrações de bifenoX na faixa de 0,3 to 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$. B) Relação entre corrente de pico anódico e concentração de bifenoX. C) voltamogramas de SWV obtidos na faixa de concentração de 0,3 a 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. D) Curva de calibração do bifenoX. faixa de 0,3 to 28 $\mu\text{mol L}^{-1}$. B) Relação entre corrente de pico anódico e concentração de bifenoX. C) voltamogramas de SWV obtidos na faixa de concentração de 0,3 a 4.



A Figura 43B mostra a dependência linear da corrente de pico anódico com a concentração de bifenoX. Esse resultado revela a existência de duas faixas lineares distintas, sugerindo uma saturação inicial da superfície do eletrodo para valores de concentração acima de 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Essa saturação pode ser atribuída à possível adsorção de produtos não eletroativos na superfície do eletrodo, provocando conseqüentemente a diminuição do número de sítios redox disponíveis. A Figura 43C apresenta a curva de calibração realizada para concentrações mais baixas de bifenoX, antes do ponto de saturação, na faixa de concentração de 0,3 a 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir dos voltamogramas em diferentes concentrações, construiu-se a

curva de calibração em triplicata, conforme apresentado na Figura 43D. A relação linear obtida pode ser expressa por:

$$I_{sw}/\mu A = 2,52 (\pm 0,03) + 0,98 (\pm 0,02) [\text{bifenox}] (\mu\text{mol L}^{-1});$$

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados estatisticamente pela razão de $3 \times \text{SDB}/\text{sensibilidade}$ e $10 \times \text{SDB}/\text{sensibilidade}$, respectivamente, onde SDB é o desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração. Os valores LOD e LOQ encontrados foram iguais a $0,09 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta os valores comparativos de métodos cromatográficos e eletroquímicos para a determinação de bifenox. A partir do método proposto, alcançou-se valor de LOD em níveis de nmol L^{-1} , que corresponde a faixa de concentração próxima as determinações de bifenox por métodos cromatográficos. Além disso, as medições eletroquímicas podem ser consideradas mais adequadas em termos de portabilidade e economia, facilitando as análises voltadas ao monitoramento ambiental.

Tabela 4. Desempenho analítico de diferentes métodos aplicados na determinação de bifenox

| Método | Técnica | Recuperação / % | LOD / nmol L^{-1} | Ref |
|---------------|------------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| Cromatografia | LC ¹ | 81-104 | 4,2 | Sheu et al. (2006) |
| | DPV ² | 79-84 | 590 | Barek et al. (2011) |
| Eletroquímica | SWV ² | 97-104 | 80 | Salehzadeh, H et al. (2016) |
| | SWV ⁴ | 81-98 | 90 | Esse trabalho |

¹LC: cromatografia líquida

² DPV: Voltametria de pulso diferencial

³ SWV: voltametria de onda quadrada

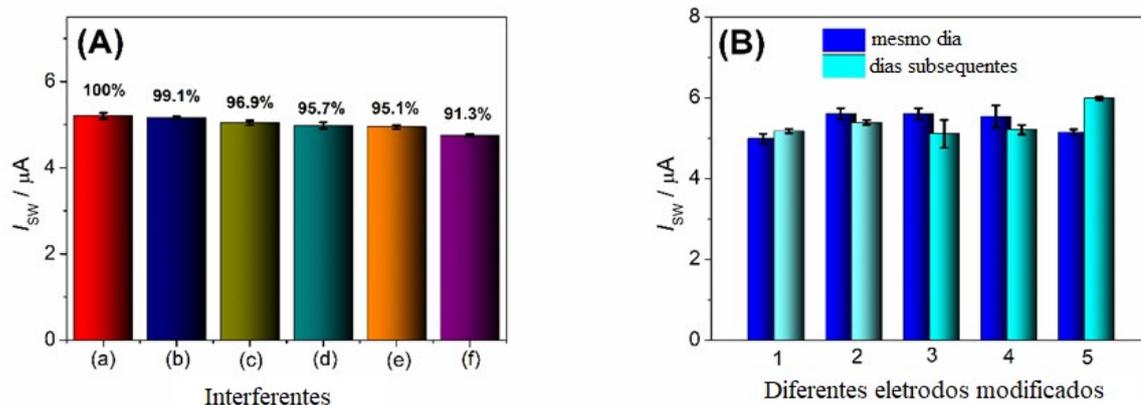
Além disso, o presente sensor apresentou uma diminuição de 6,5 vezes no limite de detecção quando comparado a estudo anterior usando um eletrodo de amálgama de prata (LOD

= 590 nmol L⁻¹) (Barek et al., 2011). Se comparado a outros eletrodos, o desempenho eletroquímico do novo sensor foi equivalente ao obtido para um eletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas, que apresenta excelente atividade eletrocatalítica, amplamente estudada na literatura (LOD = 80 nmol L⁻¹) (Salehzadeh et al., 2016). Este excelente resultado é atribuído à melhora na intensidade de corrente após a modificação do eletrodo de trabalho com as nanopartículas magnéticas híbridas biofuncionalizadas, o que destaca as promissoras características analíticas do material sintetizado para sensoriamento eletroquímico de herbicidas nitrodifenil éter.

4.2.8 SELETIVIDADE E REPETIBILIDADE

A seletividade do presente sensor foi avaliada na presença de 2 µmol L⁻¹ de bifenoX e 20 µmol L⁻¹ de diferentes potenciais contaminantes ambientais. O estudo de interferência foi realizado em condições otimizadas sem etapas de pré-condicionamento. As análises eletroquímicas foram conduzidas por SWV e, realizadas separadamente para cada interferente para garantir a resposta de interferência intrínseca a cada composto avaliado. Os resultados da interferência relativa são mostrados na Figura 45A, de acordo com a seguinte descrição: a) bifenoX sem interferente; b) isoproturon; c) diuron; d) pirimicarbe; e) 4-nitrofenol e f) pendimetalina. O desvio padrão relativo foi estimado considerando os sinais de corrente anódica dos voltamogramas do bifenoX na presença de cada interferente. Conforme mostrado na Figura 45A, para todos os compostos testados, a interferência foi inferior a 10%, indicando a alta seletividade do sensor na presença de outros pesticidas. A alta seletividade pode ser explicada devido ao efeito eletrocatalítico do MnFe₂O₄@CS/GCE, que forneceu um baixo potencial para a oxidação do bifenoX (+0,2 V vs. Ag / AgCl). Nesse caso, é importante ressaltar que muitos interferentes, especialmente herbicidas, requerem energias mais altas para passar por processos redox, ou seja, as reações de redução e/ ou oxidação ocorrem em potenciais mais positivos ou negativos, dependendo do processo. Assim, a ausência de reações redox no mesmo potencial de oxidação da hidroxilamina/nitroso pode contribuir para a menor interferência de resposta, justificando a alta seletividade do método. A repetibilidade e reprodutibilidade (precisão intra-dia e inter-dia) foram investigadas na presença de 2 µmol L⁻¹. Antes de cada medição, uma modificação completamente nova foi construída no eletrodo GCE. As intensidades de pico relacionadas a cada voltamograma são mostradas na Figura 45B.

Figura 44. Testes de seletividade. A) Intensidade de corrente de pico por SWV para a) somente bifenoX, e na presença de possíveis interferentes b) isoproturon; c) diuron; d) pirimicarb; e) 4-nitrofenol and f) pendimetalin. B) Resposta de corrente de pico para cinco diferentes eletrodos MnFe₂O₄@CTS/GCE preparados no mesmo dia e em dias subsequentes.



Para avaliar a repetibilidade da modificação, cinco eletrodos diferentes foram preparados no mesmo dia e, aplicados para a quantificação de um mesmo nível de concentração do analito. Adicionalmente, avaliou-se a repetibilidade em dias subsequentes, usando o procedimento descrito com cinco eletrodos modificados preparados em dias diferentes. Os valores de desvio padrão relativo foram estimados com base na corrente de pico anódica do analito como 3,99 e 5,79% para repetibilidade no mesmo dia e em dias subsequentes, respectivamente. Esses valores são semelhantes a outros eletrodos magnéticos modificados que podem ser encontrados na literatura (Zhou et al., 2017).

4.2.9 DETERMINAÇÃO DE BIFENOX EM AMOSTRAS DE ÁGUA

O desempenho analítico do método proposto foi investigado na presença de amostras de água de rio e de torneira para verificar a aplicabilidade do sensor no monitoramento ambiental. Para fins comparativos, as amostras controle de rio e torneira foram avaliadas diretamente na ausência de concentrações conhecida de bifenoX. Ao aplicar o método proposto, não foi possível detectar o bifenoX nas amostras de controle, como pode ser visto na Tabela 5. Posteriormente, adicionou-se concentração conhecida de solução padrão de bifenoX às amostras e, os valores de concentração foram estimados pelo usando o eletrodo modificado, através do

método de adição padrão. Os dados foram coletados em triplicata e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Quantificação de bifenoX em amostras de água potável e água de rio usando o eletrodo modificado $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ (n=3).

| Amostra | Adicionado | Encontrado | Recuperação |
|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------|
| | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | $\mu\text{mol L}^{-1}$ | % |
| | Amostra | < LOQ | --- |
| Água torneira | 0.58 | 0.56 | 96.5 (± 1.5) |
| | 0.72 | 0.70 | 97.2 (± 2.2) |
| | 0.87 | 0.71 | 81.6 (± 3.3) |
| | Amostra | < LOQ | --- |
| Água de rio | 0.58 | 0.55 | 94.8 (± 2.9) |
| | 0.72 | 0.70 | 97.2 (± 4.5) |
| | 0.87 | 0.75 | 86.2 (± 2.8) |

A quantificação das amostras enriquecidas foi realizada em três níveis de concentração. Os dados de recuperação apresentaram na faixa de 80 a 100%, sugerindo baixa interferência da amostra da matriz e precisão, características adequadas para eletroanálise ambiental (Kellner, Mermet, Otto, Valcárcel; Widmer, 2004).

4.2.10 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nanopartículas superparamagnéticas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ foram sintetizadas e caracterizadas por diferentes técnicas. Pela primeira vez, o material híbrido $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ foi aplicado na construção de dispositivos eletroanalíticos. O sensor proposto foi preparado através de *drop-casting*, usando uma metodologia simples para a modificação da superfície de um eletrodo GCE. Por SWV, alcançou-se excelente seletividade e um baixo limite de detecção para quantificação de bifenoX. Os baixos valores de desvio padrão relativo obtidos para as análises de repetibilidade indicam aplicação promissora e viabilidade de aplicação para o

monitoramento ambiental. O método analítico foi aplicado com sucesso para a análise de bifenoX em amostras de água da torneira e de rio. Como perspectivas futuras, o híbrido $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ pode ser combinado com diferentes materiais eletrocatalíticos, como grafeno e nanotubos de carbono, com o objetivo de aumentar o desempenho de sensores. Além disso, o baixo valor R_{ct} obtido para $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}/\text{GCE}$ sugere que este material também pode ser explorado futuramente para dispositivos de armazenamento de carga. Além disso, o comportamento eletroquímico das nanopartículas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4@\text{CS}$ pode ser posteriormente estudado para a determinação eletroquímica de outros poluentes ambientais.

CAPÍTULO III

4.3 FILMES DE QUITOSANA E GENIPINA APLICADOS NA CONSTRUÇÃO DE
IMUNOSSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A DETERMINAÇÃO DE
INTERLEUCINA-6

4.3.1 INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos, que apresenta um papel importante na defesa do organismo e pode estar associada a câncer, doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (Kumari et al., 2016; Narazaki and Kishimoto, 2018; Delgobo et al., 2019). Em indivíduos saudáveis, a concentração de IL-6 no sangue é comumente encontrada na faixa de pg mL^{-1} , no entanto, durante um processo inflamatório, esses níveis podem ser elevados, alcançando concentrações próximas a ng mL^{-1} (Balayan et al. 2020). A IL-6 tem sido descrita como um importante indicador de sobrevida em doenças inflamatórias, bem como, pode ser aplicada para avaliar a eficiência de diferentes tratamentos de câncer. Nos últimos meses, a análise de amostras de soro de pacientes graves com COVID-19 também sugeriu a presença de uma síndrome hiperinflamatória denominada como tempestade de citocinas, que pode aumentar drasticamente o nível de IL-6 no soro (Balayan et al., 2020; McGonagle et al., 2020). Da mesma forma, concentrações aumentadas de IL-6 são frequentemente encontradas em amostras de soro de indivíduos com sepse após uma resposta pró-inflamatória excessiva que pode ser desencadeada por diferentes condições clínicas, como cirurgias ou quimioterapia (Maruszynski; Pojda 1995). Nesse contexto, a IL-6 pode ser um biomarcador de prognóstico útil para avaliar a pneumonia em pacientes infectados com SARS-CoV-2 (Liu et al. 2020), bem como sepse (Balayan et al. 2020). Assim, existe uma necessidade atual na busca de novos biossensores de resposta rápida e, baixo custo para avaliar os perfis de IL-6 em amostras biológicas.

Os métodos analíticos convencionais disponíveis para a detecção de IL-6 baseiam-se principalmente no ensaio imunoenzimático (ELISA), que apresenta alta sensibilidade e limites de detecção na faixa de pg mL^{-1} (Romanova et al. 2020; Tan et al., 2020). No entanto, o alto consumo de tempo e os reagentes caros dos kits de ELISA são questões atuais que exigem melhorias. Conseqüentemente, o desenvolvimento de novas tecnologias de imunossensor com base na detecção piezoelétrica, colorimétrica e eletroquímica pode ser útil para melhorar as características analíticas dos imunoenaios padrão disponíveis (Ren et al., 2018; Wen et al., 2017; Zhang et al., 2017). Por exemplo, procedimentos eletroquímicos comumente requerem um baixo volume de amostra e podem ser realizados em equipamentos portáteis, ambas são características desejadas para que a análise possa ser realizada diretamente no ponto de atendimento (Da Silva et al. 2017). É importante ressaltar que as técnicas eletroanalíticas, como a análise voltamétrica, podem ser aplicadas na construção de imunoenaios de maneira simples,

rápida e, como uma estratégia de detecção direta de proteínas em baixos níveis de concentração (Herzog e Arrigan, 2007). No entanto, a imobilização de anticorpos requer um design aprimorado da plataforma eletroquímica utilizada para a detecção (Svalova et al., 2017)

O anticorpo pode ser covalentemente ligado ou adsorvido na superfície de diferentes suportes sólidos contendo grupos reativos funcionais ativados por meio de reações de reticulação Li; Chen (2018). Nesse contexto, a quitosana é um polissacarídeo abundante e atóxico que proporciona um ótimo ambiente para imobilização de moléculas biológicas para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (Laranjo et al., 2019; Morawski et al., 2018). Este biopolímero é solúvel em meio ácido moderado, apresentando grupos amina protonados que podem ser subsequentemente aprisionados em superfícies porosas ou carregadas negativamente. Assim, os grupos de amina primária de quitosana disponíveis também podem ser usados como um suporte para a ligação covalente de enzimas e outras proteínas por meio de reações de reticulação com diferentes produtos químicos, como glutaraldeído, ligações entre o par ECS/NHS e genipina (Chen et al., 2020; Flores et al., 2019; Laranjo et al., 2019).

Recentemente, a genipina tem sido estudada na ativação de suportes para a imobilização de enzimas, como um reticulador verde, promovendo a ancoragem covalente de proteínas em superfícies biocompatíveis Tacias-Pascacio et al. (2019). Nesse caso, a genipina pode reagir com grupos amino da quitosana. Embora o mecanismo de reticulação não tenha sido completamente elucidado, trabalhos anteriores sugerem um possível ataque nucleofílico da amina primária de quitosana ao carbono olefínico da genipina, gerando um intermediário de anel aberto Tacias-Pascacio et al. (2019). Posteriormente, outro grupo amina presente na estrutura de muitos biorreceptores de interesse pode atacar o grupo metoxicarbonila, produzindo uma amida secundária Mi et al. (2005). Essa reação de ancoragem usando a genipina como *cross-linker* apresenta coloração característica azulada, proporcionando maior estabilidade e alta funcionalidade. De fato, os suportes de quitosana/genipina foram aplicados com sucesso para a imobilização de enzimas para uso no desenvolvimento de biocatalisadores e tecnologias voltadas ao biodiagnóstico (Klein et al., 2016; Naseer et al., 2020; Phadungcharoen et al., 2019). Portanto, estudou-se também no presente trabalho a funcionalidade de sistemas de quitosana/genipina para a imobilização de anticorpos, que apresentam amina primária ou secundária residuais em sua estrutura. Esses suportes formados através de montagem camada a camada, foram aplicados no desenvolvimento de uma nova

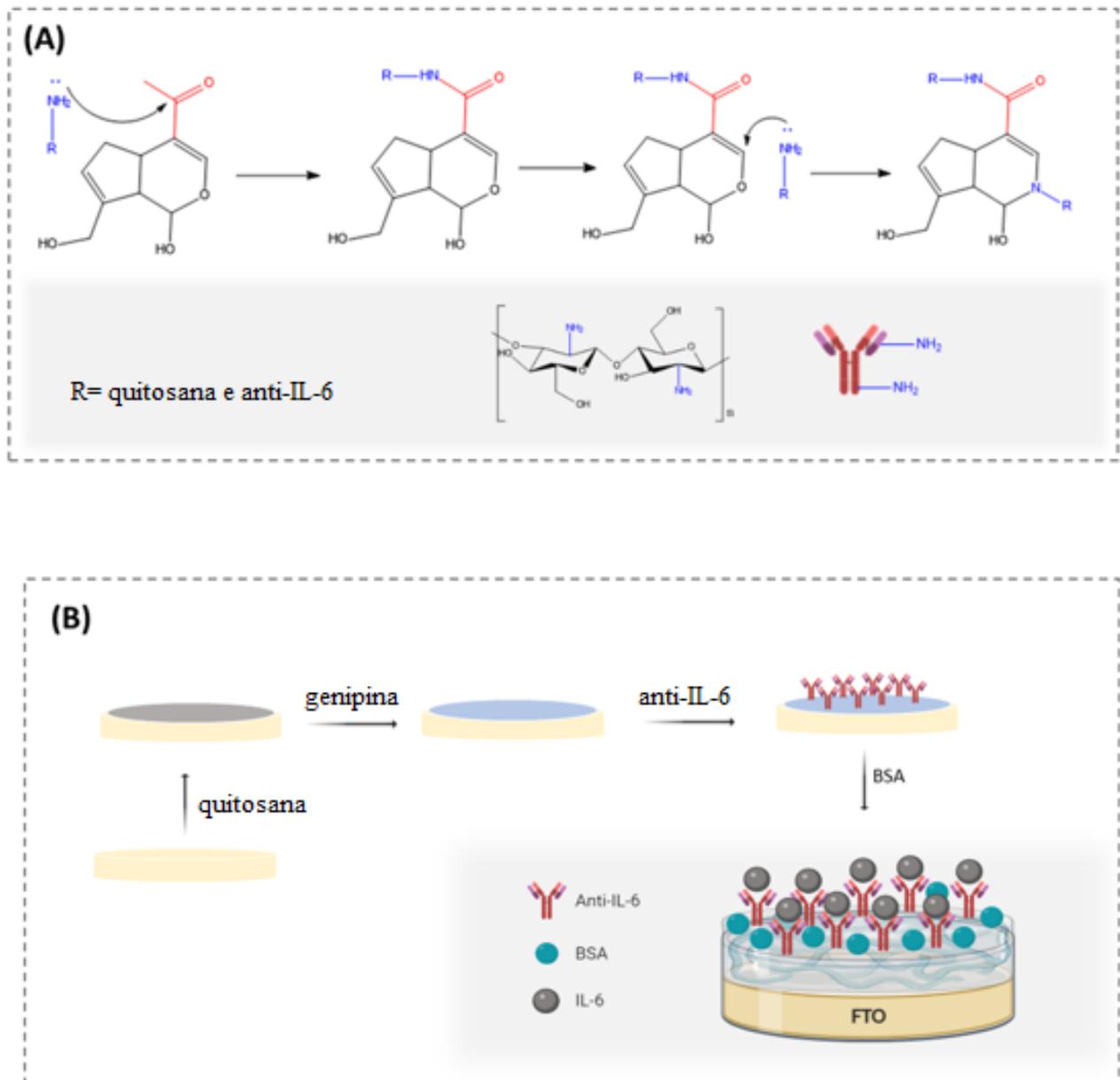
imunoplateforma eletroquímica ultrasensível para quantificação direta de marcadores de IL-6 usando voltametria de onda quadrada na presença de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, usado como mediador redox. Nesse capítulo, a modificação foi construída na superfície de um eletrodo de FTO de baixo custo contendo matriz de quitosana/genipina e anti-IL-6, aplicado na detecção de IL-6 em amostras de soro de camundongos induzidos a sepse e, de pacientes com a COVID-19.

4.3.2 CARACTERIZAÇÃO DO FILME QUITOSANA/GENIPINA/ANTI-IL6

Primeiramente, a superfície do FTO foi modificada considerando a possível interação eletrostática entre os grupos amino de quitosana e a superfície FTO carregada negativamente, que é fornecida pela presença de íons de flúor inseridos na estrutura de cristal de óxido de estanho (Li et al. 2017). Em seguida, o eletrodo foi revestido com uma solução de genipina, que permite a interação covalente com a quitosana em condições neutras e ácidas, a partir da formação do intermediário do anel diidropirano (Muzzarelli. 2009). A cor azul obtida para o filme de hidrogel resultante indica a presença de reações de autopolimerização de genipina, bem como reações de reticulação com grupos amino (Muzzarelli. 2009). O mecanismo proposto para a imobilização do anticorpo foi detalhado na Figura 45A. Em seguida, o eletrodo foi tratado com uma solução de BSA para bloquear as interações não específicas entre os grupos funcionais restantes disponíveis do hidrogel com os antígenos solúveis que poderiam estar presente na amostra biológica. As diferentes etapas para a preparação do FTO/CSG /anti-IL-6 estão ilustradas na Figura 45B.

Após cada etapa de modificação os eletrodos foram caracterizados por espectroscopia FTIR, MEV, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. As plataformas de eletroquímica produzidas foram denominadas da seguinte maneira: eletrodo de FTO modificado com quitosana (FTO/CS); eletrodo modificado com filme camada a camada de quitosana e genipina (FTO/CSG); eletrodo modificado com quitosana e genipina após a imobilização do anti-IL-6 (FTO/CSG/anti-IL-6); eletrodo modificado com quitosana e genipina e anti-IL-6 após o bloqueio das interações não específicas com BSA (FTO/CSG/anti-IL-6-BSA).

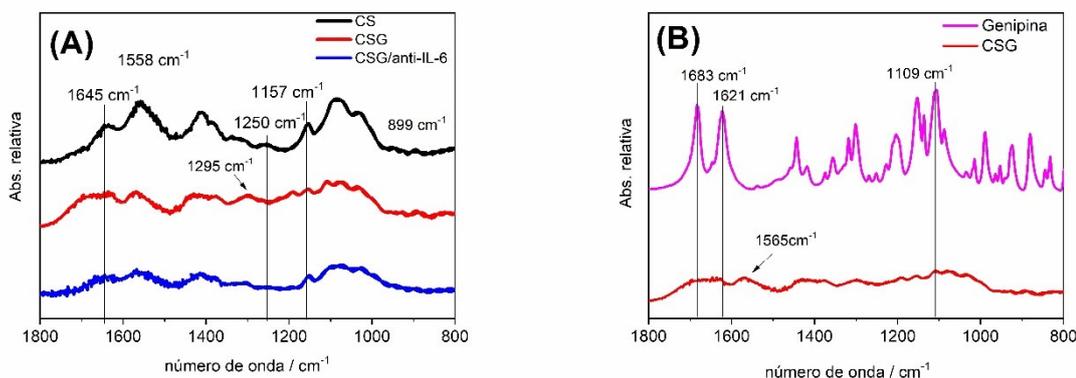
Figura 45. Esquema mostrando os diferentes passos para a imobilização do anti-IL-6 A) mecanismo de imobilização proposto; B) sequência de procedimentos aplicados na preparação do FTO/CSG/Anti-IL6.



Através das análises de espectroscopia de infravermelho foi possível identificar os grupos funcionais presentes na quitosana e genipina. A Figura 46A mostraram picos em 899 cm^{-1} e 1157 cm^{-1} são atribuídos ao alongamento das unidades de sacarídeo, enquanto o sinal de 1080 cm^{-1} está relacionado ao modo vibracional C-O ou C-N. As bandas em 1645 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} correspondem respectivamente à Amida I, Amida II e Amida III da quitosana Vlasceanu et al. (2020). De acordo com trabalhos anteriores, a banda apresentada em 1558 cm^{-1}

¹ está associado a grupos NH_3^+ Lawrie et al. (2007). Após a reação de reticulação, observou-se a diminuição da banda em 1558 cm^{-1} , sugerindo a diminuição do número de grupos de amins primárias disponíveis. Por outro lado, a intensidade da banda em 1645 cm^{-1} aumenta, devido à presença de amidas secundárias Dimida et al. (2017). Além disso, uma nova banda apareceu em 1295 cm^{-1} , que pode ser atribuído ao alongamento assimétrico C-O-C. A Figura 46B apresenta a comparação dos espectros de hidrogel genipina e CSG. A formação do hidrogel reticulado torna-se mais evidente visto que houve uma redução significativa do pico localizado em 1683 cm^{-1} , que indica uma hidrólise do grupo éster na genipina. Além disso, a diminuição das bandas localizadas em 1109 cm^{-1} e 1621 cm^{-1} e, o aparecimento de um novo sinal de 1565 cm^{-1} , sugerem a reação de abertura do anel do diidropirano na genipina Mi et al. (2005).

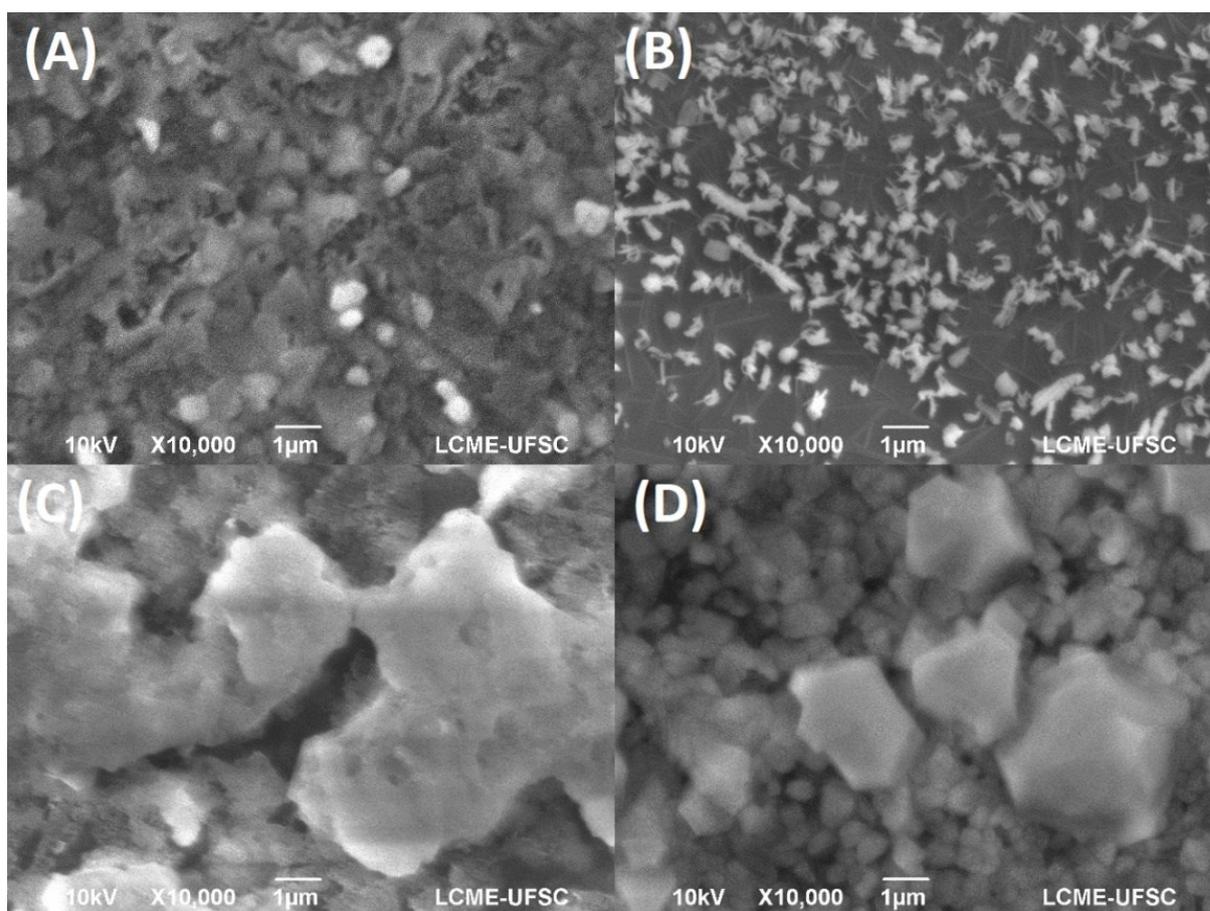
Figura 46. Espectroscopia de infravermelho (FTIR) das diferentes amostras. A) comparação entre os filmes CS, CSG e anti-IL-6/CSG preparados em suporte de sílica. B) comparação do filme de genipina com a amostra de quitosana e genipina (CSG).



A caracterização morfológica de cada etapa do preparo do imunossensor foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos filmes formados na superfície do eletrodo de FTO. As imagens de FTO/CS (Figura 47A) características morfológicas diferenciadas com superfície porosa que pode ser atribuída às interações intermoleculares de cadeias poliméricas de quitosana. Também foi observada uma morfologia diferente após a adição da camada de genipina, indicando a presença de micropartículas com a formação de uma superfície rugosa (Figura 47B). A diferente superfície e morfologia dos filmes formados FTO/CS e FTO/CSG sugerem a efetiva reação de reticulação entre a quitosana e genipina na superfície do eletrodo. Além disso, a formação de uma superfície densa e rugosa com a presença de aglomerados pode ser observada para o eletrodo FTO/CSG/anti-IL-6, indicando a eficiente imobilização de

anticorpos anti-IL-6 na superfície do eletrodo modificado (Figura 47C). Além disso, os eletrodos tratados com BSA FTO/CSG/anti-IL-6 mostraram a formação de agregados esféricos e não uniformes, indicando o bloqueio dos sítios de interação não específicos (Figura 47D).

Figura 47. Imagens de MEV obtidas na voltagem de 10 kV com magnificação de 10.000x dos eletrodos modificados A) FTO/CS; B) FTO/CSG; C) FTO/CSG/anti-IL-6 and D) FTO/CSG/anti-IL-6/BSA.



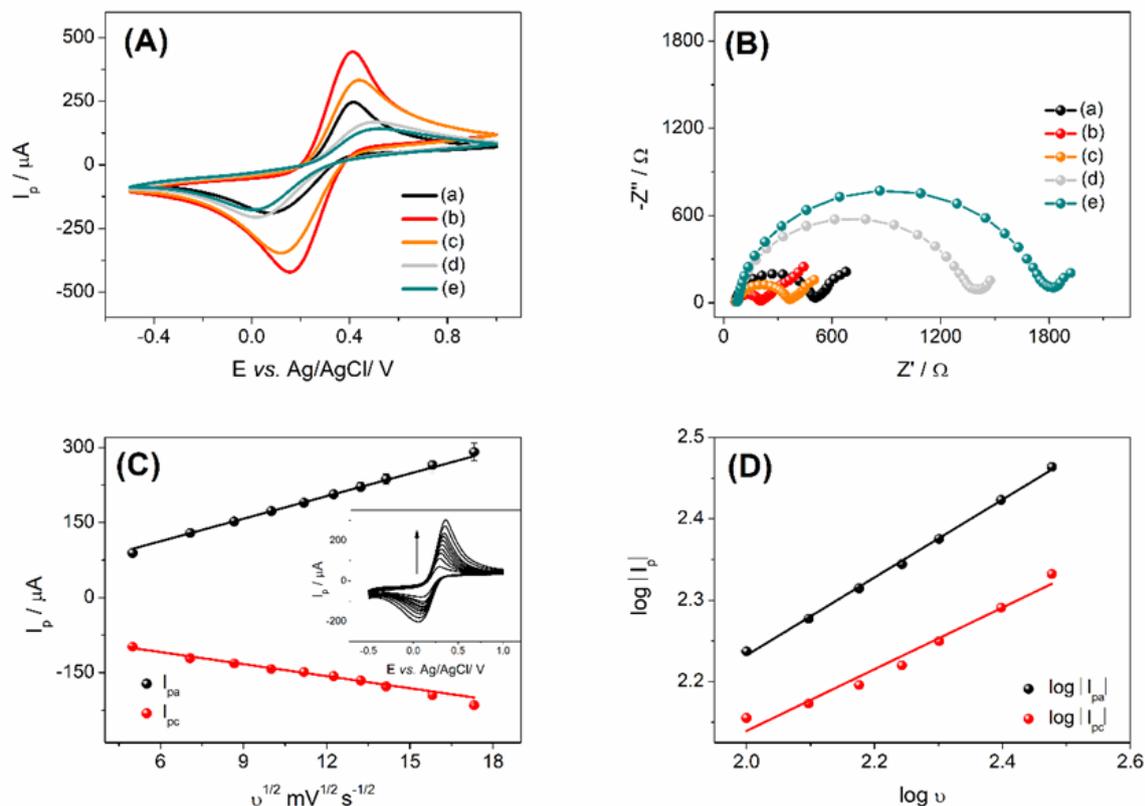
4.3.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

A montagem bem-sucedida da camada por camada de quitosana-genipina (CSG) e as seguintes etapas para a imobilização do anticorpo anti-IL-6 foram monitoradas por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e voltametria cíclica (CV) usando uma solução de sonda redox contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em concentração 5 mmol L^{-1} preparado em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Primeiramente, as modificações na superfície do FTO foram evidenciadas por medições de CV (Figura 48A). O eletrodo FTO/CS apresentou um aumento de aproximadamente

2 vezes na corrente de pico quando comparado ao FTO não modificado. Os altos valores de corrente catódica e anódica obtidos para FTO/CS podem estar associados à interação eletrostática da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ carregada negativamente e os grupos amino protonados da quitosana. Em contraste, o pico de corrente diminuiu com a adição da camada de genipina, o que se deve à interação da quitosana amina com os grupos funcionais de genipina. Consequentemente, a ligação covalente pode ocorrer via ataque nucleofílico dos grupos amino no carbono olefínico C-3, seguido pela abertura do anel do anel dihidropirano para produzir uma amina heterocíclica, conforme ilustrado na Figura 45A Tacias-Pascacio et al. (2019). Além disso, quando comparado ao FTO/CSG, foi evidenciado um decréscimo de 2 vezes na corrente de pico e um aumento da separação dos picos anódico e catódico, que apresentou valor próximo a 230 mV para o eletrodo modificado com anticorpos anti-IL-6 (FTO/CSG/anti-IL6), como é mostrado na Figura 48A. Este fenômeno sugere a imobilização de anticorpos anti-IL-6 no FTO, uma vez que as proteínas são conhecidas por bloquear as reações de transferência de carga na interface eletrodo / solução (Herzog e Arrigan, 2007).

A espectroscopia de impedância eletroquímica também foi aplicada para estudar as características interfaciais das modificações graduais para a construção do imunossensor. Os gráficos de Nyquist e o circuito equivalente de Randles são apresentados na Figura 48B. Os espectros apresentaram um comportamento semelhante para todos os eletrodos testados com um perfil semicírculo atribuído à resistência de transferência de carga (R_{ct}) seguido por um comportamento linear em frequências mais baixas, que está relacionado ao processo de difusão da sonda redox Nakamura et al. (2011). Os valores de R_{ct} obtidos foram 458, 157 e 326 para FTO, FTO/CS e FTO/CSG, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os experimentos de CV, que mostraram uma diminuição significativa na resistência à transferência de carga com a incorporação de quitosana seguida de seu aumento com a adição de genipina. Além disso, o R_{ct} aumentou de 326 para 1360 k Ω após a imobilização de anticorpos anti-IL-6. Este resultado está de acordo com os voltamogramas CV, indicando a menor cinética das reações de transferência de carga devido à incorporação de proteínas na superfície do FTO. Por fim, o aumento no valor de R_{ct} após a adição de BSA (1776 k Ω) sugere o bloqueio dos sítios ativos do eletrodo modificado, evitando interações não específicas com outras proteínas.

Figura 48. A) CV realizada na velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} ; B) Diagrama de Nyquist na faixa de frequência de $0.01\text{--}50.000 \text{ Hz}$; realizados em solução $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ contendo $5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a) FTO, b) FTO/CS, c) FTO/CSG, d) FTO/CSG/Anti-IL6 and e) FTO/CSG/Anti-IL6/BSA; C) Realção linear entre I_p versus $\nu^{1/2}$ obtidas para o eletrodo FTO/CSG/Anti-IL-6; Inset: voltamogramas a diferentes velocidades de varredura de 25 a 300 mV s^{-1} e D) Relação linear entre $\log I_p$ versus $\log \nu$ obtidos para FTO/CSG/Anti-IL-6 obtidos por voltamogramas realizados a diferentes velocidades de varredura.

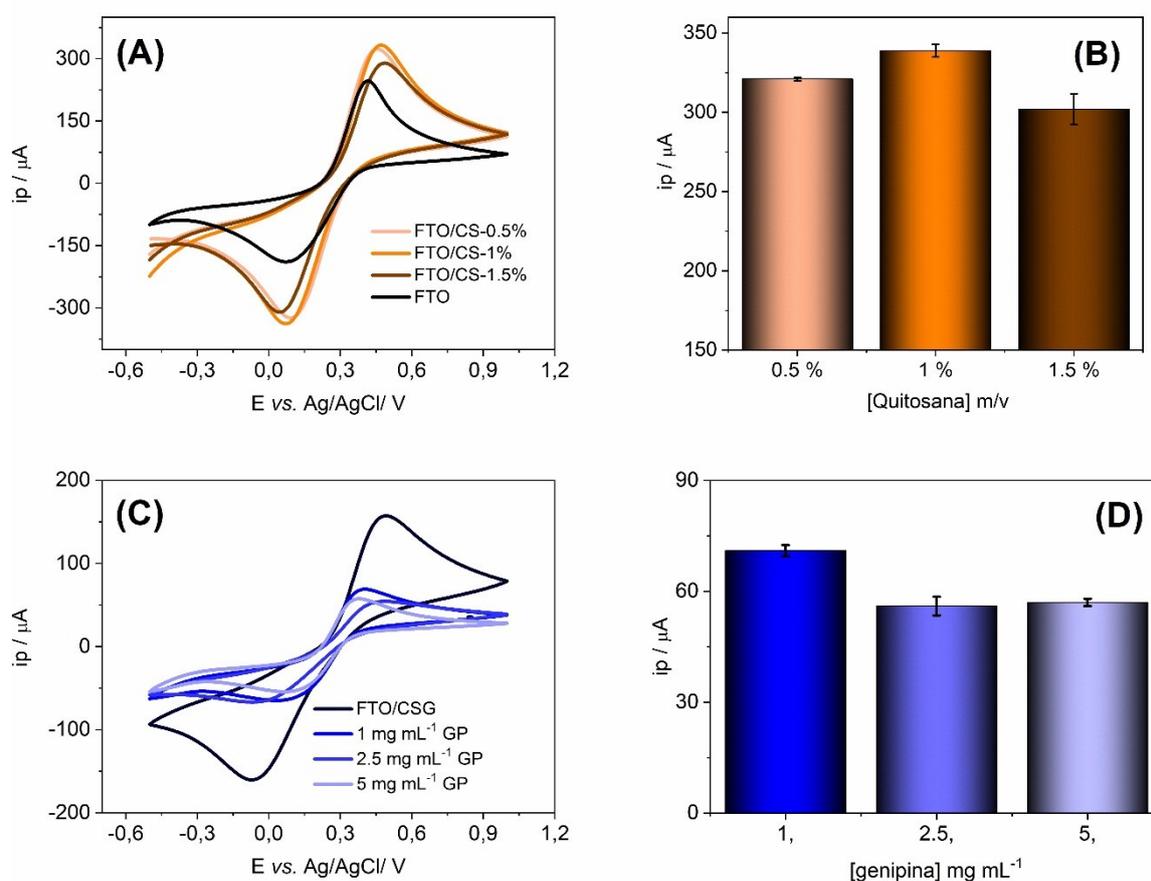


As medidas de CV também foram registradas para o FTO/CSG/anti-IL6 em diferentes velocidades de varredura de 25 a 300 mV s^{-1} usando uma janela de potencial de $-0,5$ a $+1,0 \text{ V}$ vs Ag/AgCl . Na Figura 48C, foi possível observar a dependência linear entre o anódico e o catódico correntes de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura que pode ser expressa por: $I_{pa} / \mu\text{A} = 22,5 (\pm 2,1) + 15,1 (\pm 0,3) \nu^{1/2}$ e, $I_{pc} / \mu\text{A} = -60,7 (\pm 4,3) - 8,1 (\pm 0,4) \nu^{1/2}$ com coeficientes de correlação de $R^2 \text{ ipa} = 0,999$ e $R^2 \text{ ipc} = 0,997$. A dependência entre $\log I_p$ vs $\log \nu$ também foi avaliada (Figura 48D). As relações lineares podem ser expressas por $\log |I_{pa}| / \mu\text{A} = 1,28 (\pm 0,02) + 0,48 (\pm 0,01) \log \nu$ e $\log |I_{pc}| / \mu\text{A} = 1,38 (\pm 0,06) + 0,38 (0,03) \log \nu$ com coeficientes de correlação $R^2 \text{ ipa} = 0,999$ e $R^2 \text{ ipc} = 0,998$. As inclinações obtidas foram próximas a $0,5$, indicando um processo típico de difusão controlada (Bard e Faulkner, 2001).

4.3.4 ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO

Em seguida, CV e SWV foram empregados na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl visando otimizar e estudar o comportamento do eletrodo para obter o melhor desempenho eletroquímico do imunossensor FTO/CSG/anti-IL6. Todas as medições foram realizadas em triplicata ($n = 3$). Primeiramente, a concentração de quitosana foi otimizada, pois pode afetar a resposta de corrente de pico, considerando a presença de grupos amino carregados positivos que podem interagir com cargas negativas de ferrocianeto (Talarico et al., 2016). Desta forma, a resposta eletroquímica de filmes poliméricos preparados com diferentes quantidades de quitosana contendo 0,5%, 1% e 1,5% (massa/volume) foi avaliada por CV em termos de correntes de pico anódico e catódico, como mostrado nas Figuras 49A e 49B.

Figura 49. Otimização das condições de montagem do filme camada a camada na superfície do FTO. A) CV dos filmes preparados com diferentes proporções de quitosana. B) intensidade do pico de corrente anódicas para as diferentes concentrações de quitosana. C) CV de filmes preparados com diferentes concentrações de genipina usando o eletrodo FTO/CS-1%. D) intensidade do pico de corrente anódica para as diferentes concentrações de genipina.



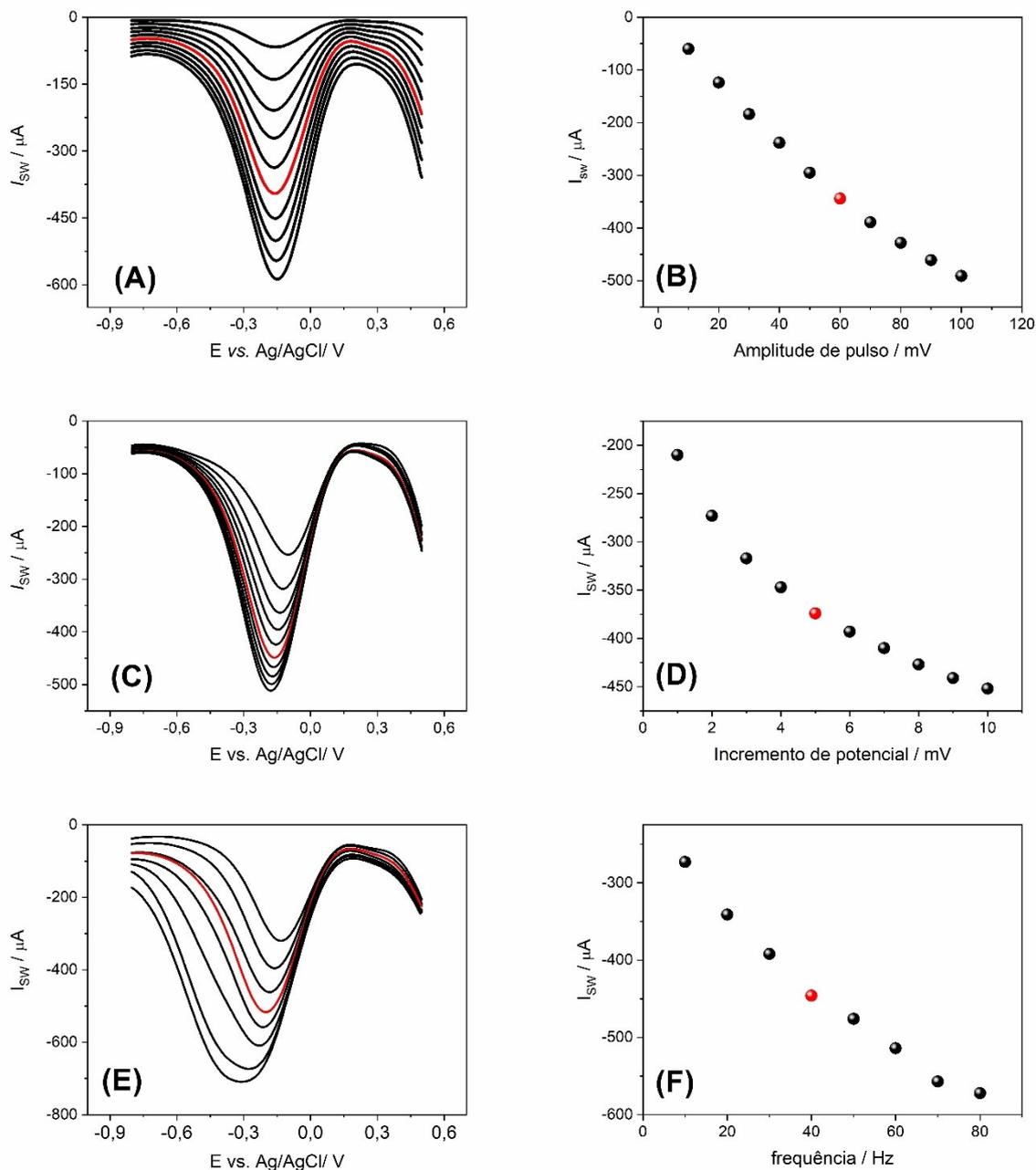
O aumento das correntes de pico com o aumento da concentração de quitosana foi observado para os eletrodos modificados contendo 0,5% e 1% de CS. Este efeito pode ser explicado pelo alto número de cargas positivas na superfície de 1% CS. No entanto, a resposta oposta foi observada para o eletrodo contendo 1,5% de quitosana, sugerindo o aparecimento de um fenômeno diferente. Nesse caso, a elevada quantidade de quitosana pode contribuir para as interações de reticulação entre as cadeias poliméricas, formando uma rede com mobilidade restrita Berger et al. (2004). Considerando que a maior resposta foi obtida para a concentração contendo 1% de quitosana, esta condição foi usada para os seguintes experimentos.

Posteriormente, diferentes quantidades de genipina contendo 1, 2,5 e 5 mg mL⁻¹ foram empregadas para a imobilização de anticorpos anti-IL6. Para essa avaliação, os diferentes eletrodos produzidos foram imersos em uma solução contendo a mesma concentração de anticorpo por um período de 18h a 37 ° C. As Figuras 49C e 49D mostram as medidas de CV que apresentam a diminuição das correntes de pico catódico e anódico com o aumento da concentração de genipina de 1 para 2,5 mg mL⁻¹. Este resultado sugere que a genipina tem um papel crucial na imobilização de anticorpos anti-IL6 e pode atuar como um agente de ligação cruzada nos grupos amina residuais que constituem a estrutura da proteína Tacias-Pascacio et al. (2019). Além disso, não foram observadas diferenças significativas na resposta da corrente de pico com o aumento da concentração de genipina de 2,5 para 5 mg mL⁻¹; no entanto, o desvio padrão foi significativamente menor com o aumento da concentração de genipina. Uma vez que valores mais altos de DPR podem implicar em reprodutibilidade mais baixa Otto et al. (2004), a concentração otimizada de genipina foi estabelecida como 5 mg mL⁻¹.

Para fins analíticos, a SWV foi usada para a quantificação de IL-6 com base em sua maior resposta para reações redox reversíveis (Scholz, 2010). A fim de otimizar as condições eletroquímicas da SWV para fins analíticos, diferentes parâmetros da técnica foram testados, como amplitude de pulso, incremento de potencial e frequência. Conforme mostrado na Figura 50A e 50B, a amplitude do pulso foi testada de 10 a 100 mV usando uma frequência de 50 Hz e um incremento de pulso de 5 mV. Em seguida, o incremento de pulso foi avaliado na faixa de 1 a 10 mV (50C e 50D) e a frequência de 10 a 100 Hz (Figura 50E e 50F). Como pode ser visto, o aumento da corrente de pico foi proporcional ao aumento da frequência aplicada. No entanto, houve uma diminuição significativa na resolução de pico. Os valores otimizados adotados para os experimentos foram selecionados em termos de resolução e intensidade de corrente de pico.

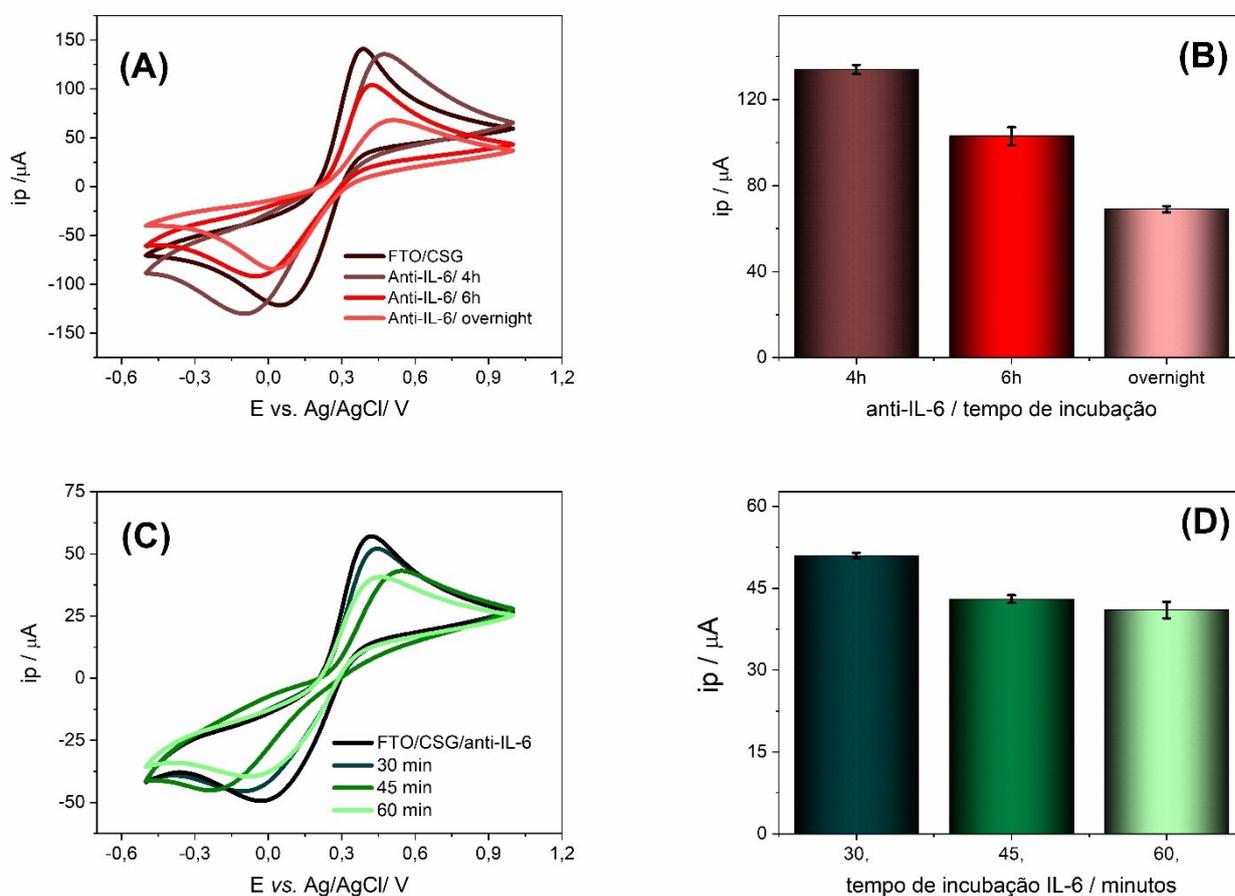
Nesse sentido, os seguintes parâmetros foram escolhidos: potencial de pulso = 60 mV, incremento de pulso = 5 mV e frequência = 40 Hz.

Figura 50. Otimização dos parâmetros da SWV usando o eletrodo modificado CSG/FTO na presença de 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{-3/4} em 0.1 mol L⁻¹ KCl. A) amplitude de pulso de 10 a 100 mV. B) Relação entre I_{SW} e amplitude de pulso. C) Incremento de potencial na faixa de 1 a 10 mV. D) Relação entre I_{SW} e incremento de potencial. E) frequência na faixa de 10 a 100 Hz. F) Relação entre I_{SW} e frequência.



Além disso, o tempo de imobilização do anticorpo pode influenciar o desempenho analítico do imunossensor. Além disso, por representar a etapa mais demorada, a imobilização dos anticorpos anti-IL-6 pode reduzir o tempo gasto para o preparo do eletrodo. Para este propósito, a mesma quantidade de anticorpo foi usada para o FTO/CSG que foram incubados a 37 °C por um período de 4 horas, 6 horas e, por aproximadamente 12 horas (*overnight*). Esses resultados estão apresentados nas Figuras 51A e 51B. As correntes de pico foram reduzidas com o aumento do tempo de exposição. Esse fenômeno sugere a imobilização de maior quantidade de anticorpos, com o aumento do tempo de exposição, uma vez que a formação de agregados de proteínas pode bloquear a superfície do eletrodo, afetando as reações de transferência de carga entre a interface eletrodo/solução.

Figura 51. Otimização das condições experimentais para a preparação do eletrodo FTO/CSG/anti-IL-6. A) CV dos eletrodos utilizando diferentes tempos de incubação para o anti-IL-6. B) relação entre i_{pc} e tempo de incubação do anti-IL-6. C) CV dos eletrodos incubados com a proteína antígeno IL-6 utilizando diferentes tempos de incubação. D) Relação entre i_{pc} e tempo de incubação da IL-6.

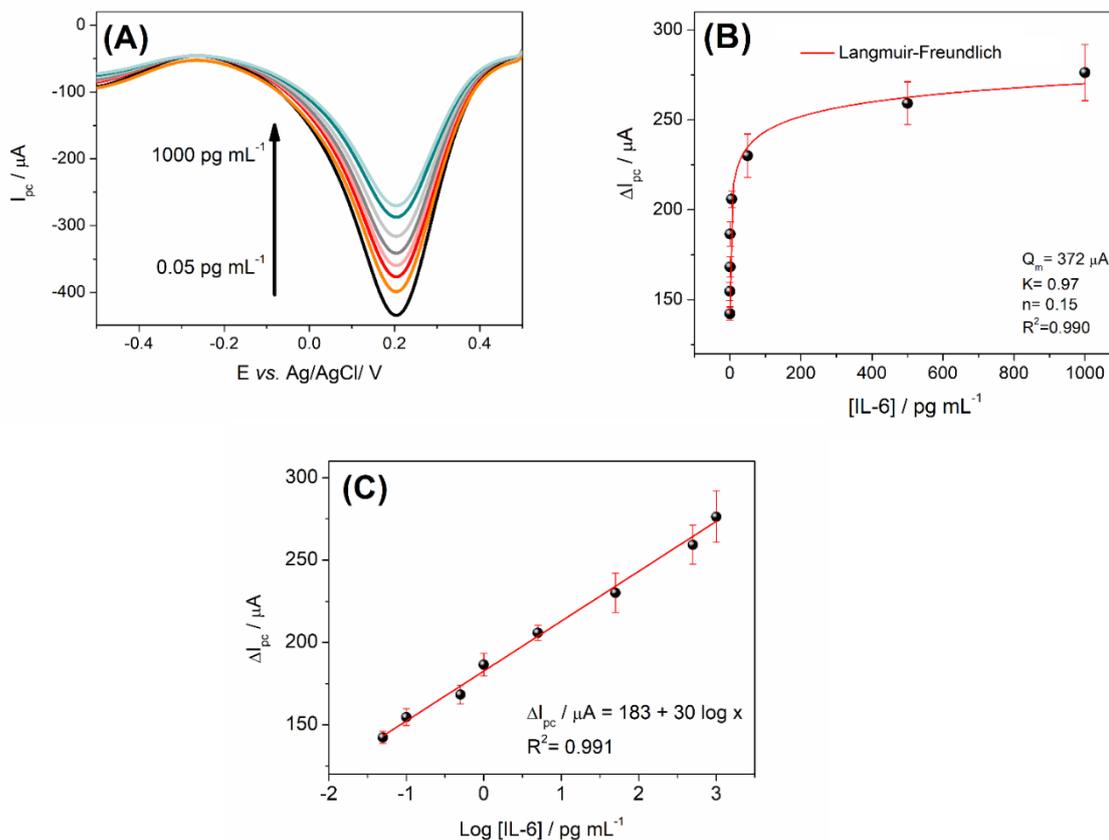


O tempo de imobilização considerado está de acordo com relatos anteriores que utilizam genipina como reticulador para imobilização enzimática. Nesses experimentos, o tempo adequado foi de 8h e 18h para a imobilização de β -galactosidase e glicose oxidase, respectivamente (Conghaile et al., 2020; Klein et al., 2016). Nesse sentido, verificou-se que a condição *overnight* concedeu a melhor opção experimental. Além disso, o tempo ideal para o reconhecimento do antígeno-anticorpo pode ser considerado uma etapa crucial da preparação do imunossensor porque a detecção depende do sucesso da ligação entre o par anti-IL-6/ IL-6. Desta forma, três diferentes tempos de incubação foram avaliados. Nenhuma mudança significativa foi observada após 45 minutos de incubação, que foi escolhida para ser a condição ideal para a análise (Figura 51C e 51D).

4.3.5 DESEMPENHO ANALÍTICO

A quantificação direta de IL-6 foi baseada em uma estratégia livre de marcadores usando o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como mediador redox. Essa estratégia tem se mostrado uma excelente alternativa para uma análise rápida de biomarcadores, com particular vantagem atribuída à facilidade de fabricação se comparado aos imunoenaios convencionais (Herzog e Arrigan, 2007). Sob as condições otimizadas, o comportamento eletroquímico do FTO/CSG/anti-IL-6/BSA foi avaliado na presença de diferentes concentrações de IL-6 por SWV, conforme apresentado na Figura 52. Através dos voltamogramas na presença de diferentes concentrações de IL-6 na faixa de 0.05 a 1000 pg mL^{-1} , observou-se uma diminuição da corrente de pico com o aumento da concentração de IL-6, que pode ser explicada pela alta afinidade entre o par antígeno-anticorpo, responsável por bloquear a superfície do eletrodo reduzindo a área eletroativa disponível para as reações redox (Figura 52A). A Figura 52B mostra a diferença entre as correntes de pico estimadas com base na relação $|\Delta I_p| = |I_{po} - I_p|$ (na equação I_{po} = corrente do branco e I_p = corrente na presença de analito). Os voltamogramas de SWV a diferentes concentrações apresentaram perfil não linear com rápida diminuição da corrente de pico na presença de baixas concentrações de IL-6, atingindo um platô em concentrações acima de 200 pg mL^{-1} , comportamento característico de interações antígeno-anticorpo. Esse fenômeno pode ser demonstrado através do modelo de isoterma de Langmuir-Freundlich, utilizada para ajustar o mecanismo de interação do antígeno com a superfície do eletrodo.

Figura 52. A) SWV obtida usando o FTO/CSG/anti-IL-6 realizada na presença de 0.1 mol L^{-1} KCl containing $5 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na presença de diferentes concentrações de IL-6 de 0.05 to 1000 pg mL^{-1} B) Relação entre concentração de IL-6 e ΔI_{pc} obtida por SWV ajustada pelo modelo de Langmuir-Freundlich C) curva de calibração ΔI_{pc} versus $\text{Log } [\text{IL-6}]$ obtida por SWV.



Esse ajuste experimental é tipicamente aplicado para descrever a adsorção de proteínas em suportes sólidos Camilo et al. (2019) e, pode ser expresso pela seguinte equação:

$$q = \frac{Q_m(KCeq)^n}{1 + (KCeq)^n}$$

Onde q é igual a quantidade de IL-6 adsorvida no eletrodo; Q_m é a capacidade de absorção em termos de locais de ligação de anticorpos; K é a constante de afinidade de adsorção; Ceq é a concentração da fase aquosa em equilíbrio; n é o índice de heterogeneidade. Nesse sentido, o valor estimado de Q_m foi de $372 \mu\text{A}$, o que indica a saturação dos locais de ligação de anti-IL-6 para valores de ΔI_p superiores a Q_m . Além disso, o n encontrado foi $0,15$,

indicando que a adsorção de IL-6 pode resultar na formação de uma camada não homogênea, o que está de acordo com a literatura para outros imunossensores eletroquímicos Thapa et al. (2017). A curva de calibração mostrou uma relação logarítmica entre a concentração de ΔI e IL-6 que pode ser expressa por $\Delta I/\mu A = 182,6 (\pm 1,2) + 30,3 (\pm 1,1) \log [IL-6], \text{pg mL}^{-1}$ ($R^2=0,991$), como é mostrado na Figura 52B. A curva de calibração foi realizado em triplicata pela metodologia de calibração externa. O limite de detecção (LOD) foi estimado de acordo com $3sb/S$, onde sb é o desvio padrão de 10 medições em branco diferentes e S é o sensibilidade da curva de calibração. O valor do LOD foi estimado em $0,03 \text{pg mL}^{-1}$, o que pode ser considerado satisfatório quanto às aplicações clínicas. O eletrodo modificado proposto apresenta bom desempenho em comparação com outras modificações propostas na literatura para a detecção de IL-6, usando um procedimento experimental simples (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação de parâmetros analíticos de diferentes eletrodos encontrados na literatura para a determinação eletroquímica de IL-6

| Eletrodo | Técnica | Estratégia | Faixa linear pg mL^{-1} | LOD pg mL^{-1} | Ref |
|-------------------------------|---------------|------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------|
| AuNPs/PEDOT/ITO ¹ | Amperometria | Enzimática | 4-800 | 1 | Wang et al. (2011) |
| MB/SPE ² | Impedimétrica | Magnética | 0,5-10000 | 0,3 | Tertiş et al. (2019) |
| Fc-D/AuNPs/GCE ³ | Amperometria | Enzimática | 5-120 | 1 | Liao; Tang (2009) |
| HOOC-MB/SPE ⁴ | Amperometria | Enzimática | 75-500 | 0,39 | Ojeda et al. (2014) |
| AB/EpxS-PPyr/ITO ⁵ | Impedimétrica | Direta | 0,01-50 | 0,003 | Aydın et al. (2021) |
| anti-IL-6/CSG/FTO | Voltamétrica | Direta | 0,05-1000 | 0,03 | Esse trabalho |

¹ Eletrodo de óxido de estanho dopado com índio modificado com nanopartículas de ouro

² Eletrodo de carbono impresso modificado com nanopartículas magnéticas

³ Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e ferrocianeto

⁴ Eletrodo de carbono impresso modificado com nanopartículas magnéticas

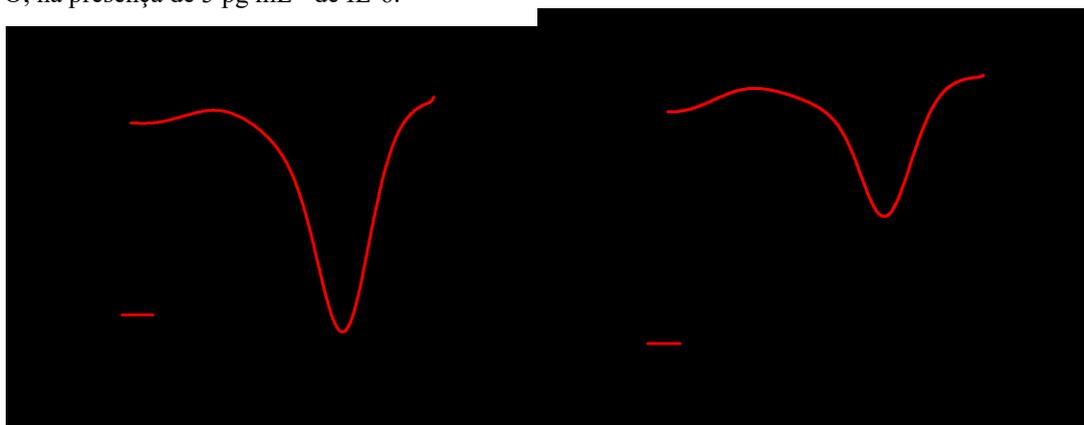
⁵ Eletrodo de óxido de estanho dopado com índio modificado com polipirrol

A maioria dos métodos relatados empregou o par EDC/NHS para a imobilização do anticorpo de detecção; no presente trabalho, criou-se uma nova estratégia usando genipina como um reticulador verde (Munge et al., 2009; Yang et al., 2013). O imunossensor proposto permitiu a quantificação de IL-6 com baixo nível de detecção na faixa de pg mL^{-1} . A alta sensibilidade alcançada sugere que a genipina pode ser capaz de se ligar a anticorpos anti-IL-6, mantendo os sítios do biorreceptor ativos para a eficiente interação com o antígeno de interesse.

4.3.6 SELETIVIDADE, PRECISÃO E ESTABILIDADE

Para avaliar a seletividade de interação da superfície do eletrodo com a IL-6 presente em solução, foram realizados diferentes testes controle. Primeiramente, foi verificada a afinidade de interação do eletrodo sem o anticorpo imobilizado na presença de uma concentração de 5 pg mL^{-1} de analito, conforme apresentado na Figura 53 A. Observa-se que nessas condições, não foi possível identificar variação significativa de corrente após a interação com o antígeno. Por outro lado, o eletrodo contendo o anticorpo imobilizado apresentou evidente diminuição na resposta de corrente após o contato com a IL-6, como evidenciado na Figura 53B. Esses resultados indicam a efetividade das interações específicas que ocorrem na interface/eletrodo soluções decorrentes das ligações antígeno/anticorpo.

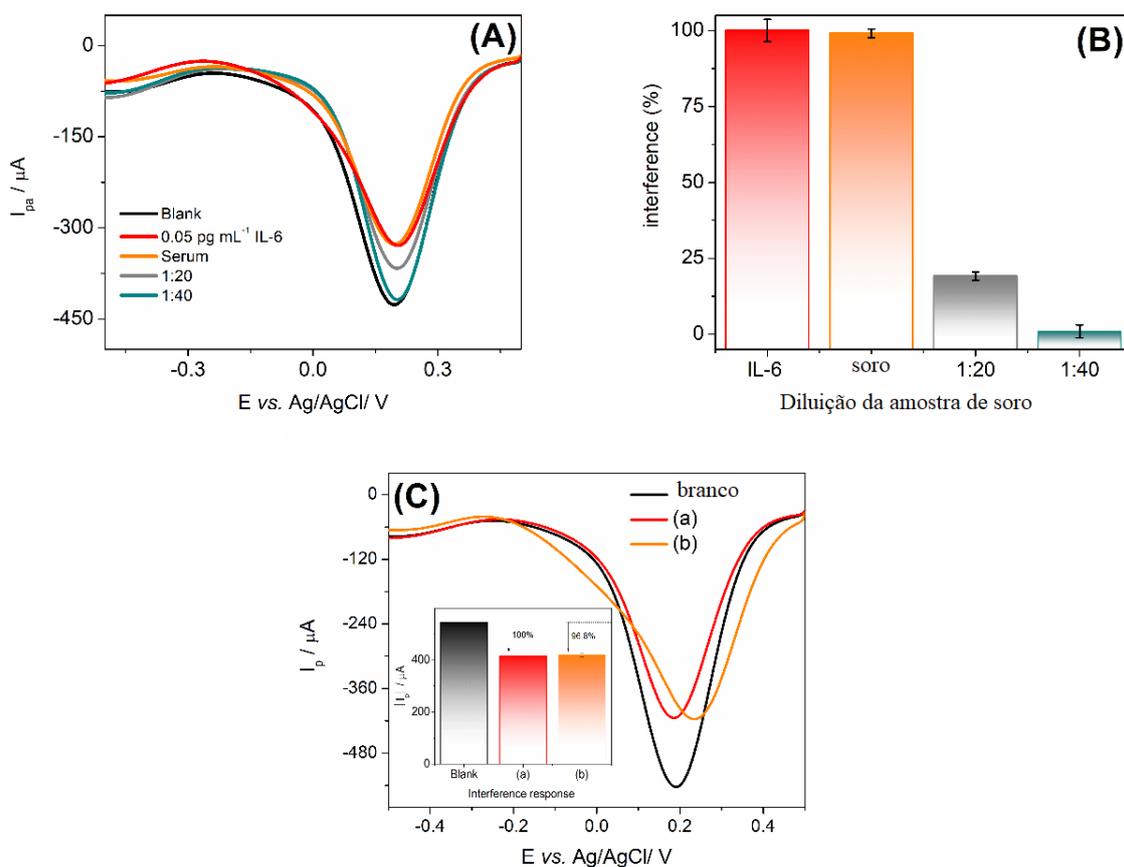
Figura 53. A) Eletrodo CSG/BSA/FTO na ausência do anticorpo de detecção e B) eletrodo BSA/anti/IL-6/CSG/FTO; na presença de 5 pg mL^{-1} de IL-6.



Além disso, a influência da matriz na detecção de IL-6 também foi investigada na presença de soro de camundongo saudáveis não diluído, que não deveriam conter níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Em contraste, as amostras de soro contêm uma enorme

diversidade de biomoléculas, incluindo anticorpos, antígenos, eletrólitos, etc., que podem interferir significativamente com a resposta eletroquímica do eletrodo FTO/CSG/anti-IL-6/BSA. Como esperado, a análise de SWV indicou uma diminuição significativa da corrente de pico em amostras de soro não diluídas. Essa resposta de interferência pode ser explicada pelas interações não específicas de outros componentes do soro na superfície do eletrodo (Vashist; Luong 2018). Assim, diluições de amostras de soro na proporção 1:20 e 1:40 em PBS 10 mmol L⁻¹ foram testadas com o objetivo de verificar as melhores condições eletroquímicas para quantificação de IL-6. Conforme pode ser observado na Figura 54A e 54B, observou-se que para uma diluição de 1:40 a variação da corrente de pico foi inferior a 1%. Nesse sentido, visando a alta seletividade do método, essa foi a condição escolhida para a análise das amostras de soro.

Figura 54. A) voltamogramas de SWV realizados na presença de 0.1 mol L⁻¹ KCl e 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{-3/4} para o eletrodo FTO/CSG/anti-IL-6 na presença de soro de camundong using different usando diferentes diluições B)Resposta relativa de corrente de pico catódico para as diferentes diluições testadas por SWV; C) SWV do eletrodo na (a) ausência e (b) presença de interferentes; Inset: Resposta relativa de corrente de obtidas por SWV.



Juntamente com os resultados da curva de calibração, observa-se que esses resultados demonstraram promissora aplicação do FTO/CSG/anti-IL-6/BSA em amostras clínicas devido ao baixo limite de detecção ($0,03 \text{ pg mL}^{-1}$). Nesse sentido, os dados da literatura mostram que os níveis circulantes de IL-6 estão na faixa de ng mL^{-1} em várias condições patológicas como a sepse (Chiesa et al. 2015).

Considerando que diferentes citocinas (por exemplo: IL-1 β , TNF- α e IL-12) também devem ser liberadas durante processos inflamatórios (Delgobo et al., 2019; dos Santos et al., 2018; Formiga et al., 2020), avaliamos sequencialmente a seletividade do imunossensor proposto na presença de uma amostra de soro contendo 50 pg mL^{-1} de cada possível interferente IL-1 β , IL-12 e TNF- α e $0,5 \text{ pg mL}^{-1}$ de IL-6. Para fins comparativos, a análise foi realizada na ausência (sinal a) e na presença (sinal b) dos interferentes testados. A Figura 54C mostra que não foram observadas alterações significativas na resposta de corrente após a adição dessas citocinas interferentes quando comparada ao sinal relacionado a IL-6 (ausência de IL-1 β , IL-12 e TNF- α). A interferência relativa foi estimada com base nos valores de ΔI_p apresentando um desvio padrão relativo de 3,2%, o que está de acordo com as diretrizes regulatórias para a validação de métodos bioanalíticos (Vashist; Luong 2018). Adicionalmente, realizou-se o teste de recuperação de quantidade conhecida de analito adicionado na amostra em três níveis de concentração, a partir de amostra fortificada e, posteriormente diluída na proporção de 1:40, conforme. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Tabela de recuperação de IL-6 em amostra de soro de camundongo utilizando amostras fortificadas com concentração conhecida de analito.

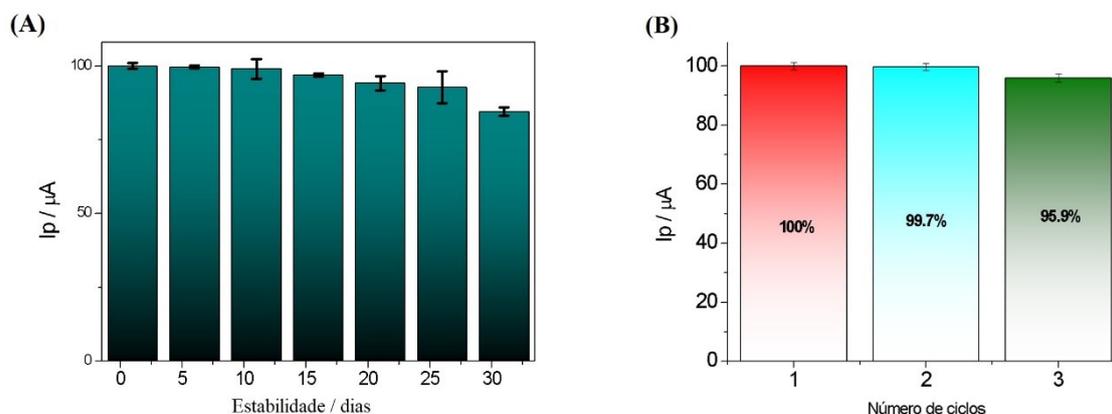
| Amostra | Adicionado / pg mL^{-1} | Encontrado / pg mL^{-1} | Recuperação / % | DPR / % |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------|
| | 0,05 | 0,053 | 106 | 1,1 |
| Soro | 0,5 | 0,45 | 89 | 0,9 |
| | 5 | 5,3 | 106 | 1,6 |

Nenhum efeito de matriz significativo foi observado uma vez que as recuperações encontradas apresentaram valores na faixa de 89-106% (Vashist e Luong, 2018). Segundo o

trompete de Horwitz, esse resultado é considerado satisfatório para aplicação em protocolos de rotina clínica (Otto et al., 2004).

Além disso, avaliou-se também a estabilidade do eletrodo produzido através do monitoramento do sinal de IL-6 na superfície do sensor eletroquímico por 30 dias consecutivos. Após 30 dias de monitoramento, foi observada a manutenção de 89% do sinal analítico inicial, indicando a boa estabilidade do sensor e, possibilidade de armazenamento (Figura 55A). Adicionalmente, avaliou-se a possibilidade de reuso do eletrodo para diferentes análises eletroquímicas. Para isso, após o contato com o eletrodo de trabalho, o mesmo foi mergulhado em solução HCl 1 mmol L⁻¹ com o objetivo de desconectar os antígenos previamente aderidos a superfície do eletrodo. Os resultados apresentaram a permanência de aproximadamente 96% do sinal analítico inicial após 3 ciclos de limpeza, indicando a possibilidade de reaproveitamento e reuso do eletrodo (Figura 55B).

Figura 55. A) Análise de estabilidade do sinal eletroquímico e B) Sinal eletroquímico após reuso do eletrodo BSA/anti-IL-6/CSG/FTO

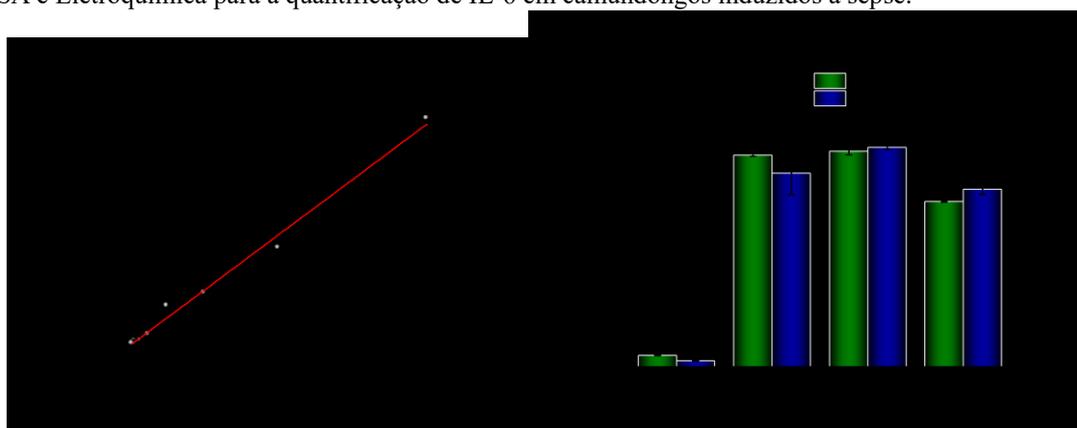


4.3.7 QUANTIFICAÇÃO DE IL-6 EM SORO DE CAMUNDONGOS SÉPTICOS

A aplicação prática do imunossensor BSA/anti-IL-6/CSG/FTO foi verificada pela quantificação de IL-6 em amostras de soro de camundongos com sepse induzida através de modelo de infecção por *Escherichia coli*. A concentração do analito foi estimada pelo método de calibração externa usando um gráfico de referência preparado imediatamente antes da análise

da amostra. Para cada amostra, o desvio padrão relativo (DPR) foi estimado com base nos resultados obtidos para diferentes eletrodos preparados no mesmo dia ($n = 3$). As amostras de três indivíduos sépticos foram avaliadas e comparadas com os animais controle (saudáveis). As diluições aplicadas foram 1: 100 para os experimentos eletroquímicos e 1:10 para o imunoenensaio enzimático ELISA. A curva de calibração utilizada nos ensaios ELISA está apresentada na Figura 56A. Conforme esperado, os experimentos de quantificação conduzidos por ELISA e através do sensor eletroquímico demonstraram que camundongos sépticos apresentaram níveis significativamente mais elevados de IL-6 quando comparados a animais saudáveis (Figura 56B). De maneira eficiente, o imunossensor proposto foi capaz de detectar níveis comparáveis de IL-6 em amostras de soro diluídas 1: 100.

Figura 56. A) curva de calibração obtida por ELISA e B) gráfico comparativo das amostras dos resultados obtidos por ELISA e Eletroquímica para a quantificação de IL-6 em camundongos induzidos a seps.



A concentração de IL-6 encontrada para cada amostra e os dados comparativos entre os ensaios de quantificação aplicados estão apresentados na Tabela 8. O teste comparativo de ELISA foi realizado com os mesmos imunorreagentes; entretanto, para este caso a diluição da amostra foi na proporção 1:10 considerando que o ELISA apresenta um LOD cerca de 10 vezes maior (LOD de 5 pg mL^{-1}) do que o imunoenensaio eletroquímico desenvolvido. O teste t foi aplicado para verificar a precisão do método, conforme pode ser visto na Tabela 8. Não foram observadas diferenças estatísticas entre o ELISA padrão e o método eletroquímico proposto usando um nível de confiança de 95%. Portanto, a precisão é outra característica do método proposto e a nova imunoplateforma pode ser aplicada com sucesso para a quantificação de IL-6 em amostras de soro de camundongos sépticos.

Tabela 8. Dados analíticos comparativos entre as técnicas de ELISA e SWV

| Amostra | I | | II | | III | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | SWV | ELISA | SWV | ELISA | SWV | ELISA |
| Encontrada ^a | 5295 | 5130 | 5316 | 5219 | 4267 | 3974 |
| DPR (%) ^b | 10,3 | 0,5 | 1,2 | 1,4 | 2,7 | 0,5 |
| Erro (%) ^c | 8,9 | | 1,9 | | 7,4 | |
| valor t ^d | 1,619 | | 0,492 | | 0,702 | |

a mmol L⁻¹

b n = 3

c Erro relative entre SWV e ELISA

d teórico = 2.1788

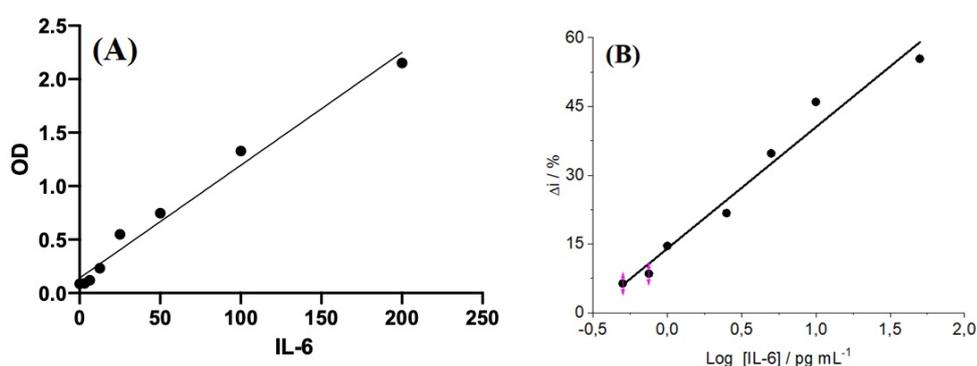
4.3.8 QUANTIFICAÇÃO DE IL-6 EM PACIENTES DE COVID-19

Recentemente, com o avanço da pandemia de SARS-CoV-2, que teve início no fim do ano de 2019, inúmeros estudos têm descrito a relação direta entre o alto nível de IL-6 no sangue de pacientes positivados com a severidade e o agravamento da doença. Em um dos primeiros estudos divulgados na China, realizado com 69 pacientes infectados, observou-se que altos níveis de IL-6 estão diretamente relacionados com a baixa oxigenação dos pacientes. Após inúmeros estudos, a IL-6 têm sido usada mundialmente como um biomarcador de prognóstico para avaliar a progressão de pacientes com a COVID-19. Nesse contexto, pacientes com quadros leves a moderados devem apresentar níveis de IL-6 na faixa de 5 a 20 pg mL⁻¹, enquanto em quadros mais graves da doença a concentração da proteína no sangue pode variar de 30-200 pg mL⁻¹. Nesse contexto, o desenvolvimento de novos sensores para a detecção rápida e barata de biomarcadores inflamatórios, em especial a IL-6, consiste numa urgente demanda, reconhecida internacionalmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Nesse sentido, a mesma metodologia de detecção aplicada para a análise de um modelo de sepsis induzida foi utilizada para a quantificação de IL-6 em amostras de pacientes infectados

com a COVID-19. Para isso, o anti-IL-6 humano foi imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho previamente desenvolvido e otimizado BSA/anti-IL-6/CSG/FTO. Sob as condições ótimas de análise, construiu-se uma nova curva de calibração na presença de solução padrão contendo o antígeno humano na faixa de concentração de 0,5 a 50 pg mL⁻¹ usando o método eletroquímico. As curvas de calibração obtidas ELISA e por eletroquímica estão apresentadas na Figura 57A e 57B, respectivamente. Os coeficientes de correlação linear obtidos foram estatisticamente próximos apresentando valor de 0,981 para o ELISA e 0,983 para o método eletroquímico proposto.

Figura 57. Curva de calibração de IL-6 humana obtida por A) ELISA e B) SWV usando o sensor eletroquímico proposto neste trabalho.



Através das curvas de calibração obtidas, utilizou-se os dois métodos para quantificar os níveis de IL-6 em amostras de soro de pacientes infectados com a COVID-19. As amostras foram fornecidas pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, sob aprovação do comitê de ética. Os pacientes foram divididos em três categorias: pacientes saudáveis que não haviam contraído a doença; pacientes coalescentes: os quais haviam contraído a doença mas não apresentavam infecção ativa no momento da coleta e; pacientes com infecção ativa: pacientes diagnosticados e internados com a doença. Os níveis de IL-6 detectados nas amostras estão apresentados na Tabela 9.

A partir dos dados obtidos, não foi possível detectar IL-6 nos 2 pacientes saudáveis testados através das duas metodologias utilizadas. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que indivíduos saudáveis comumente não apresentam níveis expressáveis de IL-6 circulante devido à ausência de processos inflamatórios. Para os 2 indivíduos

convalescentes avaliados, observou-se a ausência de IL-6 para as duas amostras através da análise de ELISA. Por outro lado, a partir das medidas eletroquímicas, evidenciou-se a presença de aproximadamente 4 pg mL^{-1} na amostra 4. Essa divergência de resultados pode ser justificada devido ao LOD dos dois métodos, que foi estimado como aproximadamente 0.03 pg mL^{-1} para o sensor eletroquímico e, 2 pg mL^{-1} para o ELISA. Nesse caso, considerando a diluição da amostra em níveis 1:5 nos ensaios de ELISA, o valor encontrado para a amostra 4 apresenta valor fora da faixa linear estipulada, justificando ausência de detecção da proteína através do imunoenensaio enzimático.

Por fim, os resultados obtidos para as 4 amostras de pacientes testados apresentaram excelente correlação entre as metodologias ELISA e SWV, com recuperação na faixa de 92-108%. Para os cálculos de recuperação considerou-se o valor estipulado pela metodologia padrão ELISA como o valor real de IL-6 nas amostras. Além disso, alcançou-se baixos DPRs para todas as amostras testadas. Esses resultados indicam a promissora aplicação do sensor para a detecção de IL-6 também em amostras de soro humano.

Tabela 9. Quantificação de IL-6 no soro de pacientes infectados com a COVID-19. Resultados comparativos entre as metodologias de ELISA e SWV.

| Situação | Amostra | [IL-6] encontrada pg mL^{-1} | | Recuperação | DPR |
|-------------------|---------|---------------------------------------|---------------|-------------|------|
| | | ELISA | Eletroquímica | % | % |
| Saúdavel | 1 | ND | ND | ---- | ---- |
| | 2 | ND | ND | ---- | ---- |
| Convalescente | 3 | ND | ND | ---- | ---- |
| | 4 | ND | 3,97 | ---- | ---- |
| Infecção ativa | 5 | 28,8 | 27,8 | 96,4 | 0,71 |
| | 6 | 134,2 | 134 | 99,9 | 0,14 |
| | 7 | 11,0 | 11,8 | 107,4 | 0,56 |
| | 8 | 5,33 | 4,85 | 92,8 | 0,36 |

4.3.9 CONCLUSÕES PARCIAIS

Um eletrodo descartável de quitosana/genipina modificado foi aplicado como um imunossensor eletroquímico para a determinação ultrasensível de IL-6 com base em uma estratégia sem rótulo usando uma solução de sonda redox. O eletrodo foi modificado com o biofilme contendo genipina como reticulador verde para a imobilização do anti-IL-6. Por voltametria cíclica e impedância eletroquímica foi possível observar um aumento das correntes de pico redox e uma diminuição da resistência de transferência de carga, sugerindo o sucesso da imobilização do anticorpo na superfície do eletrodo. O sensor proposto apresentou grande seletividade e sensibilidade apresentando um limite de detecção de $0,03 \text{ pg mL}^{-1}$. A quantificação do analito em diferentes amostras de soro séptico apresentou valores de IL-6 próximos ao método padrão ELISA, indicando a elevada precisão do novo método. Apesar das tecnologias avançadas apresentadas aqui, melhorias importantes podem ser aplicadas no futuro, com o objetivo de estudar o comportamento deste imunossensor eletroquímico em diferentes amostras. Além disso, outros protocolos podem ser explorados usando genipina para o desenvolvimento de tecnologias de imunossensor visando a detecção de citocinas. A partir desta perspectiva, esta metodologia inovadora de imobilização pode ser futuramente aplicada para anexar múltiplos elementos de reconhecimento para o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a análise simultânea de biomarcadores.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, novos materiais bioinspirados a base de quitosana foram propostos, estudando a sua funcionalidade e propriedades para aplicações eletroanalíticas voltadas ao monitoramento ambiental e diagnóstico clínico. Nesse sentido, foi possível explorar a versatilidade da biomolécula através de parâmetros como: 1) facilidade de formação de filmes e hidrogéis, 2) imobilização de biorreceptores, 3) estabilização e recobrimento de nanopartículas. Todas essas funcionalidades permitiram o design aprimorado de interfaces eletroquímicas a partir das interações planejadas na interface eletrodo/solução.

No primeiro capítulo, propôs-se o uso da quitosana como estabilizante de nanopartículas de platina para a detecção simultânea de herbicidas. A partir do método proposto, alcançou-se alta seletividade, repetibilidade e baixos limites de detecção, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados apresentam a potencial aplicação da quitosana no desenvolvimento de novos eletrodos modificados com materiais híbridos bioinorgânicos nanoestruturados. Nesse contexto, a quitosana apresenta um papel fundamental como agente duplo, aumentando a estabilidade das nanopartículas metálicas e aderência na formação de filmes.

No segundo capítulo, propôs-se um novo material híbrido a base de nanopartículas de ferrita de manganês recobertas com quitosana. Esse material foi aplicado na construção de eletrodos modificados para a determinação de bifenoxy em níveis nanomolares. A funcionalidade da quitosana foi explorada com o objetivo de aumentar a estabilidade das nanopartículas magnéticas e, aumentar a homogeneidade de dispersão das partículas em meio aquoso. Além disso, foi possível alcançar alta sensibilidade, atribuída a interação planejada dos grupos NH_3^+ com o analito de interesse. Através da abordagem proposta foi possível explorar uma nova funcionalidade da quitosana no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Por fim, no terceiro capítulo explorou-se o uso de sistemas combinados de quitosana e genipina para a imobilização de anticorpos na superfície de eletrodos modificados. Nesse sentido, buscou-se explorar a alta funcionalidade dos grupos NH_2 e biocompatibilidade de suportes a base quitosana/genipina. Esses pontos contribuíram para a imobilização efetiva do anticorpo e, conseqüentemente, para o eficiente desempenho analítico do imunossensor proposto.

6 REFERENCIAS

ABDULLAH, S.; UDDIN, M. Electrochemical immunosensors and their recent nanomaterial-based signal amplification strategies: a review. **2016**. Royal Society of Chemistry.

ABRICA-GONZÁLEZ, P.; ZAMORA-JUSTO, J. A.; SOTELO-LÓPEZ, A.; et al. Gold nanoparticles with chitosan, N-acetylated chitosan, and chitosan oligosaccharide as DNA carriers. **2019**. Nanoscale Research Letters.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **2010**. LWT - Food Science and Technology

ALI, A.; AHMED, S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **2018**. International Journal of Biological Macromolecules.

ALLEN J. BARD; LARRY R. FAULKNER. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. **1980**. 2nd Edition.

AN, Q.; HUANG, T.; SHI, F. Covalent layer-by-layer films: Chemistry, design, and multidisciplinary applications. **2018**. Chemical Society Reviews.

ANNU; RAJA, A. N. Recent development in chitosan-based electrochemical sensors and its sensing application. **2020**. International Journal of Biological Macromolecules.

ARDEAN, C.; DAVIDESCU, C. M.; NEMEȘ, N. S.; et al. Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. **2021**. International Journal of Molecular Sciences.

AYDIN, E. B.; AYDIN, M.; SEZGINTÜRK, M. K. A novel electrochemical immunosensor based on acetylene black/epoxy-substituted-polypyrrole polymer composite for the highly sensitive and selective detection of interleukin 6. **2021**. Talanta.

BAIG, N.; RANA, A.; KAWDE, A. N. Modified Electrodes for Selective Voltammetric Detection of Biomolecules. **2018**. Electroanalysis.

BAKKER, E.; QIN, Y. Electrochemical sensors. **2006**. Analytical Chemistry.

BALAYAN, S.; CHAUHAN, N.; CHANDRA, R.; KUCHHAL, N. K.; JAIN, U. Recent advances in developing biosensing based platforms for neonatal sepsis. **2020**. Biosensors and Bioelectronics.

BARBOSA, P. F. P.; VIEIRA, E. G.; CUMBA, L. R.; et al. Voltammetric Techniques for Pesticides and Herbicides Detection- an Overview. **2019**. International Journal of Electrochemical Science.

BARD, A. J.; FAULKNER, R., L. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*. **2000**. Second Edition.

BAREK, J.; CABALKOVÁ, D.; FISCHER, J.; et al. Voltammetric determination of the herbicide Bifenox in drinking and river water using a silver solid amalgam electrode. **2011**. *Environmental Chemistry Letters*.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **2004**. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **2010**. *Advanced drug delivery reviews*.

BRATSKAYA, S.; PRIVAR, Y.; NESTEROV, D.; et al. Chitosan Gels and Cryogels Cross-Linked with Diglycidyl Ethers of Ethylene Glycol and Polyethylene Glycol in Acidic Media. **2019**. *Biomacromolecules*.

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. *Electrochemistry: Principles, methods, and applications*. **1999**. New York.

BRUZAMARELLO, N.; CARDOSO, S.; LUIZ, F.; VITALI, L.; LUIS, A. Magnetic solid-phase extraction of triclosan from water using n -octadecyl modified silica-coated magnetic nanoparticles. **2020**. *Journal of Environmental Chemical Engineering*.

CAMILO, D. E.; MIYAZAKI, C. M.; SHIMIZU, F. M.; FERREIRA, M. Improving direct immunoassay response by layer-by-layer films of gold nanoparticles – Antibody conjugate towards label-free detection. **2019**. *Materials Science and Engineering C*.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis : an updated review. **2010**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

CHATTERJEE, K.; SARKAR, S.; JAGAJJANANI RAO, K.; PARIJA, S. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. **2014**. *Advances in Colloid and Interface Science*.

CHEN, L. C.; WANG, E.; TAI, C. S.; et al. Improving the reproducibility, accuracy, and stability of an electrochemical biosensor platform for point-of-care use. **2019**. *Biosensors and Bioelectronics*.

CHENG, Y.; LAI, O.; TAN, C.; et al. Proline-Modified UIO-66 as Nanocarriers to Enhance Candida rugosa Lipase Catalytic Activity and Stability for Electrochemical Detection of Nitrofen. **2021**. *ACS Applied Materials and Interfaces*.

CHIESA, C.; PACIFICO, L.; NATALE, F.; et al. Fetal and early neonatal interleukin-

6 response. **2015**. Cytokine.

CHO, I. H.; LEE, J.; KIM, J.; et al. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. **2018**. Sensors (Switzerland).

CONGHAILE, P.; KUMAR, R.; FERRER, M. L.; LEECH, D. Glucose oxidation by enzyme electrodes using genipin to crosslink chitosan, glucose oxidase and amine-containing osmium redox complexes. **2020**. Electrochemistry Communications.

DAI, Y.; LIU, C. C. Recent Advances on Electrochemical Biosensing Strategies toward Universal Point-of-Care Systems. **2019**. Angewandte Chemie - International Edition.

DELGOBO, M.; MENDES, D. A. G. B.; KOZLOVA, E.; et al. An evolutionary recent IFN/IL-6/CEBP axis is linked to monocyte expansion and tuberculosis severity in humans. **2019**. eLife.

DEON, M.; MORAWSKI, F. M.; PASSAIA, C.; et al. Chitosan-stabilized gold nanoparticles supported on silica/titania magnetic xerogel applied as antibacterial system. **2019**. Journal of Sol-Gel Science and Technology.

DEVI, R.; GOGOI, S.; BARUA, S.; et al. Electrochemical detection of monosodium glutamate in foodstuffs based on Au@MoS₂/chitosan modified glassy carbon electrode. **2018**. Food Chemistry.

DHANJAI; SINHA, A.; KALAMBATE, P. K.; et al. Polymer hydrogel interfaces in electrochemical sensing strategies: A review. **2019**. TrAC - Trends in Analytical Chemistry.

DHANJAI; SINHA, A.; LU, X.; et al. Voltammetric sensing of biomolecules at carbon based electrode interfaces: A review. **2018**. TrAC - Trends in Analytical Chemistry.

DIMIDA, S.; BARCA, A.; CANCELLI, N.; et al. Effects of genipin concentration on cross-linked chitosan scaffolds for bone tissue engineering: Structural characterization and evidence of biocompatibility features. **2017**. International Journal of Polymer Science.

DIMIDA, S.; DEMITRI, C.; DE BENEDICTIS, V. M.; et al. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. **2015**. Journal of Applied Polymer Science.

DONG, S.; WANG, Y. The Application of Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry. **1989**.

DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **2003**. Nature Biotechnology.

DUMONT, M.; VILLET, R.; GUIRAND, M.; et al. Processing and antibacterial

properties of chitosan-coated alginate fibers. **2018**. Carbohydrate Polymers.

DUPRAZ, V.; MÉNARD, D.; AKCHA, F.; BUDZINSKI, H.; STACHOWSKI-HABERKORN, S. Toxicity of binary mixtures of pesticides to the marine microalgae *Tisochrysis lutea* and *Skeletonema marinoi*: Substance interactions and physiological impacts. **2019**. Aquatic Toxicology.

EL-SHERBINY, I. M.; HEFNAWY, A.; SALIH, E. New core-shell hyperbranched chitosan-based nanoparticles as optical sensor for ammonia detection. **2016**. International Journal of Biological Macromolecules.

ELGRISHI, N.; ROUNTREE, K. J.; MCCARTHY, B. D.; et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **2018**. Journal of Chemical Education.

FEDERICO, C.; PAPPALARDO, M.; LEOTTA, C. G.; et al. Phenylurea herbicides: Chemical properties and genotoxic effects. **2013**. Handbook on Herbicides: Biological Activity, Classification and Health and Environmental Implications.

FENG, K.; YANG, Y.; WANG, Z.; et al. A nano-porous CeO₂/Chitosan composite film as the immobilization matrix for colorectal cancer DNA sequence-selective electrochemical biosensor. **2006**. Talanta.

FLORES, E. E. E.; CARDOSO, F. D.; SIQUEIRA, L. B.; et al. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **2019**. Process Biochemistry.

FORMIGA, R. DE O.; ALVES JÚNIOR, E. B.; VASCONCELOS, R. C.; et al. P-cymene and rosmarinic acid ameliorate tnbs-induced intestinal inflammation upkeeping zo-1 and muc-2: Role of antioxidant system and immunomodulation. **2020**. International Journal of Molecular Sciences.

FRICK, J. M.; AMBROSI, A.; POLLO, L. D.; TESSARO, I. C. Influence of Glutaraldehyde Crosslinking and Alkaline Post-treatment on the Properties of Chitosan-Based Films. **2018**. Journal of Polymers and the Environment.

GAO, L.; GAN, H.; MENG, Z.; et al. Evaluation of genipin-crosslinked chitosan hydrogels as a potential carrier for silver sulfadiazine nanocrystals. **2016**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.

GARIFULLINA, A.; SHEN, A. Q. Optimized Immobilization of Biomolecules on Nonspherical Gold Nanostructures for Efficient Localized Surface Plasmon Resonance. **2019**. Biosensing.

GEORGE, S. M.; TANDON, S.; KANDASUBRAMANIAN, B. Advancements in Hydrogel-Functionalized Immunosensing Platforms. **2020**. ACS Omega.

GERENT, G. G.; SPINELLI, A. Magnetite-platinum nanoparticles-modified glassy carbon electrode as electrochemical detector for nitrophenol isomers. **2017**. Journal of Hazardous Materials.

GHOSH CHAUDHURI, R.; PARIA, S. Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. **2012**. Chemical Reviews.

GIRI, A.; BHOWMICK, R.; PRODHAN, C.; et al. Synthesis and characterization of biopolymer based hybrid hydrogel nanocomposite and study of their electrochemical efficacy. **2019**. International Journal of Biological Macromolecules.

GLEBOV, E. M.; KOLOMEETS, A. V.; POZDNYAKOV, I. P.; et al. Redox processes in photochemistry of Pt (IV) hexahaloid complexes. **2012**. RSC Advances.

GOVINDHAN, M.; ADHIKARI, B. R.; CHEN, A. Nanomaterials-based electrochemical detection of chemical contaminants. **2014**. RSC Advances.

H.R. REZAIIE, L. BAKHTIARI, A. O. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **2015**. Sensors.

HAHN, T.; TAFI, E.; PAUL, A.; et al. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. **2020**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology.

HERZOG, G.; ARRIGAN, D. W. M. Electrochemical strategies for the label-free detection of amino acids, peptides and proteins. **2007**. Analyst.

HUANG, H.; YANG, X. Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence / Presence of Tripolyphosphate. **2004**. Biomacromolecules.

HUBER, D.; TEGL, G.; BAUMANN, M.; et al. Chitosan hydrogel formation using laccase activated phenolics as cross-linkers. **2017**. Carbohydrate Polymers.

HUMMEL, M.; LU, S.; NELSON, Z.; et al. Kappa-Carrageenan/Graphene Oxide Carbon Composite Film for Electrochemical Sensing of Dopamine. **2020**. Journal of The Electrochemical Society.

HUOVINEN, M.; LOIKKANEN, J.; NAARALA, J.; VÄHÄKANGAS, K. Toxicity of diuron in human cancer cells. **2015**. Toxicology in Vitro.

JALALVAND, A. R. Fabrication of a novel and ultrasensitive label-free electrochemical aptasensor for detection of biomarker prostate specific antigen. **2019**. International Journal of Biological Macromolecules.

KALAMBATE, P. K.; DHANJAI; HUANG, Z.; et al. Core@shell nanomaterials based sensing devices: A review. **2019**. TrAC - Trends in Analytical Chemistry.

KALYANI, T.; SANGILI, A.; NANDA, A.; et al. Bio-nanocomposite based highly sensitive and label-free electrochemical immunosensor for endometriosis diagnostics application. **2021**. Bioelectrochemistry.

KARIMI-MALEH, H.; KARIMI, F.; ALIZADEH, M.; SANATI, A. L. Electrochemical Sensors, a Bright Future in the Fabrication of Portable Kits in Analytical Systems. **2020**. Chemical Record.

KARPAGAKALYAANI, G.; MAGDALINE, J. D.; CHITHAMBARATHANU, T.; ARULDHAS, D.; ANUF, A. R. Spectroscopic (FT-IR , FT-Raman , NBO) investigation and molecular docking study of a herbicide compound Bifenox. **2020**. Chemical Data Collections.

KAUR, R.; RANA, S.; LALIT, K.; SINGH, P.; KAUR, K. Electrochemical detection of methyl parathion via a novel biosensor tailored on highly biocompatible electrochemically reduced graphene oxide-chitosan-hemoglobin coatings. **2020**. Biosensors and Bioelectronics.

KIM, E.; XIONG, Y.; CHENG, Y.; et al. Chitosan to connect biology to electronics: Fabricating the bio-device interface and communicating across this interface. **2015**. Polymers.

KIM, J.; CAMPBELL, A. S.; DE ÁVILA, B. E. F.; WANG, J. Wearable biosensors for healthcare monitoring. **2019**. Nature Biotechnology.

KLEIJN, S. E. F.; LAI, S. C. S.; KOPER, M. T. M.; UNWIN, P. R. Electrochemistry of Nanoparticles. **2014**. Angewandte Reviews.

KLEIN, M. P.; HACKENHAAR, C. R.; LORENZONI, A. S. G.; et al. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. **2016**. Carbohydrate Polymers.

KOEV, S. T.; DYKSTRA, P. H.; LUO, X.; et al. Chitosan: An integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices. **2010**. Lab on a Chip.

KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; GIOKAS, D. Paper-based device with a sputtered tin-film electrode for the voltammetric determination of Cd(II) and Zn(II). **2018**. Sensors and Actuators, B: Chemical.

KUMARI, N.; DWARAKANATH, B. S.; DAS, A.; BHATT, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **2016**. Tumor Biology.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **2006**. Marine Biotechnology.

LABIB, M.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. **2016**. Chemical Reviews.

LACASA, E.; COTILLAS, S.; SAEZ, C.; et al. Environmental applications of electrochemical technology. What is needed to enable full-scale applications. **2019**. Current Opinion in Electrochemistry.

LAGHRIB, F.; FARAHI, A.; BAKASSE, M.; LAHRICH, S.; EL MHAMMEDI, M. A. Voltammetric determination of nitro compound 4-nitroaniline in aqueous medium at chitosan gelified modified carbon paste electrode (CS@CPE). **2019**. International Journal of Biological Macromolecules.

LAHOUTI, S.; NAEIMI, H. Chitosan-encapsulated manganese ferrite particles bearing sulfonic acid group catalyzed efficient synthesis of spiro indenoquinolines. **2020**. RSC Advances.

LAI, J. Y.; LI, Y. T.; WANG, T. P. In vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers. **2010**. International Journal of Molecular Sciences.

LARANJO, M.; MORAWSKI, F.; DIAS, S.; et al. Silica/Titania Graphite Composite Modified with Chitosan and Tyrosinase Employed as a Sensitive Biosensor for Phenolic Compounds. **2019**. Journal of the Brazilian Chemical Society.

LARANJO, M. T.; MORAWSKI, F. M.; DIAS, S. L. P.; et al. Silica/titania graphite composite modified with chitosan and tyrosinase employed as a sensitive biosensor for phenolic compounds. **2019**. Journal of the Brazilian Chemical Society.

LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **2007**. Biomacromolecules.

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. **2019**. Microchimica Acta.

LEPOITTEVIN, B.; ELZEIN, T.; DRAGOE, D.; et al. Hydrophobization of chitosan films by surface grafting with fluorinated polymer brushes. **2019**. Carbohydrate Polymers.

LI, M.; GAO, H.; WANG, X.; et al. A fluorine-doped tin oxide electrode modified with gold nanoparticles for electrochemiluminescent determination of hydrogen peroxide released by living cells. **2017**. Microchimica Acta.

LI, Z.; CHEN, G.-Y. Current Conjugation Methods for Immunosensors. **2018**.

Nanomaterials.

LIAO, J.; TANG, D. High-Throughput Miniaturized Immunoassay for Human Interleukin-6 Using Electrochemical Sandwich-Type Enzyme Immunosensors. **2009**. *Current Pharmaceutical Analysis*.

LIU, Z.; LI, J.; CHEN, D.; et al. Dynamic Interleukin-6 Level Changes as a Prognostic Indicator in Patients With COVID-19. **2020**. *Frontiers in Pharmacology*.

LUO, X.; CHEN, L.; YANG, J.; et al. Electrochemically simultaneous detection of ascorbic acid, sulfite and oxalic acid on Pt-Pd nanoparticles/chitosan/nitrogen doped graphene modified glassy carbon electrode: A method for drug quality control. **2021**. *Microchemical Journal*.

MA, B.; XU, Y.; MENG, X.; MA, Z.; HAN, H. Hydrogel with peroxidase-like activity to enhance sensitivity of electrochemical immnuosensor. **2021**. *Sensors and Actuators B: Chemical*.

MAJEED, A. Influence of preparation method on structural , optical and magnetic properties of nickel ferrite nanoparticles. **2011**. *Bulletin Materials Science*.

MANI, V.; DEVASENATHIPATHY, R.; CHEN, S. M.; WU, T. Y.; KOHILARANI, K. High-performance electrochemical amperometric sensors for the sensitive determination of phenyl urea herbicides diuron and fenuron. **2015**. *Ionics*.

MANI, V.; GOVINDASAMY, M.; CHEN, S. M.; et al. Core-shell heterostructured multiwalled carbon nanotubes@reduced graphene oxide nanoribbons/chitosan, a robust nanobiocomposite for enzymatic biosensing of hydrogen peroxide and nitrite. **2017**. *Scientific Reports*.

MANISANKAR, P.; SELVANATHAN, G.; VEDHI, C. Determination of pesticides using heteropolyacid montmorillonite clay-modified electrode with surfactant. **2006**. *Talanta*

MANZOOR, K.; AHMAD, M.; AHMAD, S.; IKRAM, S. Removal of Pb(II) and Cd(II) from wastewater using arginine cross-linked chitosan-carboxymethyl cellulose beads as green adsorbent. **2019**. *RSC Advances*.

MARUSZYNSKI, M.; POJDA, Z. Interleukin 6 (IL-6) levels in the monitoring of surgical trauma. **1995**. *Surg Endosc*.

MENSHYKAU, D.; COMPTON, R. G. The influence of electrode porosity on diffusional cyclic voltammetry. **2008**. *Electroanalysis*.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization

of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **2005**. Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry.

MIN, J.; SEMPIONATTO, J. R.; TEYMOURIAN, H.; WANG, J.; GAO, W. Wearable electrochemical biosensors in North America. **2021**. Biosensors and Bioelectronics.

MIRCESKI, V.; GULABOSKI, R.; LOVRIC, M.; et al. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. **2013**. Electroanalysis.

MIRSKY, V. M. Electrochemical sensors between the academic world and harsh reality: a few thoughts on the past, present, and future. **2020**. Journal of Solid State Electrochemistry.

MOHAMMED, A. M.; KARTTUNEN, V.; HUUSKONEN, P.; et al. Transplacental transfer and metabolism of diuron in human placenta. **2018**. Toxicology Letters.

MOHANDAS, A.; DEEPTHI, S.; BISWAS, R.; JAYAKUMAR, R. Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. **2018**. Bioactive Materials.

MORAWSKI, F. D. M.; DEON, M.; NICOLODI, S.; et al. Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for catechol and catecholamines. **2018**. Electrochimica Acta.

MORAWSKI, F. D. M.; XAVIER, B. B.; VIRGILI, A. H.; et al. A novel electrochemical platform based on mesoporous silica / titania and gold nanoparticles for simultaneous determination of norepinephrine and dopamine. **2021**. Materials Science & Engineering C.

MORAWSKI, F. DE M.; DEON, M.; NICOLODI, S.; et al. Magnetic silica/titania xerogel applied as electrochemical biosensor for catechol and catecholamines. **2018**. Electrochimica Acta.

MORITA, I. M.; ARAÚJO, G. M.; CODOGNOTO, L.; SIMÕES, F. R. Functionalised multi-walled carbon nanotubes-modified electrode for sensitive determination of Diuron in seawater samples. **2019**. International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

MORO, G.; DE WAEL, K.; MORETTO, L. M. Challenges in the electrochemical (bio)sensing of nonelectroactive food and environmental contaminants. **2019**. Current Opinion in Electrochemistry.

MUGADZA, T.; NYOKONG, T. Electrocatalytic oxidation of amitrole and diuron on iron(II) tetraaminophthalocyanine-single walled carbon nanotube dendrimer. **2010**. Electrochimica Acta.

MUNGE, B. S.; KRAUSE, C. E.; MALHOTRA, R.; et al. Electrochemical immunosensors for interleukin-6. Comparison of carbon nanotube forest and gold nanoparticle platforms. **2009**. *Electrochemistry Communications*.

MURRAY, R. W. Chemically Modified Electrodes. **1980**. *Acc. Chem. Res.*

MURUGESAN, C.; UGENDAR, K.; OKRASA, L.; SHEN, J.; CHANDRASEKARAN, G. Zinc substitution effect on the structural, spectroscopic and electrical properties of nanocrystalline MnFe_2O_4 spinel ferrite. **2021**. *Ceramics International*.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **2009**. *Carbohydrate Polymers*.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. **2005**. *Advances in Polymer Science*.

NAKAMURA, T.; HOMMA, K.; TACHIBANA, K. Impedance spectroscopy of manganite films prepared by metalorganic chemical vapor deposition. **2011**. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.

NAMUDURI, S.; NARAYANAN, B. N.; DAVULURU, V. S. P.; BURTON, L.; BHANSALI, S. Review—Deep Learning Methods for Sensor Based Predictive Maintenance and Future Perspectives for Electrochemical Sensors. **2020**. *Journal of The Electrochemical Society*.

NANGIA, S.; WARKAR, S.; KATYAL, D. A review on environmental applications of chitosan biopolymeric hydrogel based composites. **2018**. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*.

NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases. **2018**. *International Journal of Molecular Sciences*.

NASEER, S.; OUYANG, J.; CHEN, X.; et al. Immobilization of β -glucosidase by self-catalysis and compared to crosslinking with glutaraldehyde. **2020**. *International Journal of Biological Macromolecules*.

NATARAJ, D.; SAKKARA, S.; MEGHWAL, M.; REDDY, N. Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications. **2018**. *International Journal of Biological Macromolecules*.

NOYROD, P.; CHAILAPAKUL, O.; WONSAWAT, W.; CHUANAWATANAKUL, S. The simultaneous determination of isoproturon and carbedazim pesticides by single drop analysis using a graphene-based electrochemical sensor.

2014. Journal of Electroanalytical Chemistry.

NOYROD, P.; CHAILAPAKUL, O.; WONSAWAT, W.; CHUANUWATANAKUL, S. The simultaneous determination of isoproturon and carbendazim pesticides by single drop analysis using a graphene-based electrochemical sensor. **2014.** Journal of Electroanalytical Chemistry.

OJEDA, I.; MORENO-GUZMÁN, M.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification. **2014.** Analytical and Bioanalytical Chemistry.

ÖNDEŞ, B.; SOYSAL, M. Determination of diuron by using electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer film. **2019.** Journal of the Electrochemical Society.

OTTO, M.; VALCARCEL CASES, M.; MERMET, J.-M.; et al. Analytical Chemistry - A Modern Approach to Analytical Science. **2004.** 2nd Editio ed.

ÖZCAN, A.; TOPÇUOĞULLARI, D.; ATILIR ÖZCAN, A. Fenitrothion sensing with reduced graphene oxide decorated fumed silica nanocomposite modified glassy carbon electrode. **2019.** Sensors and Actuators, B: Chemical.

PAIXÃO, T. R. L. C. Measuring Electrochemical Surface Area of Nanomaterials versus Randles-Sevcik Equation. **2020.** ChemElectroChem.

PANNELL, M. J.; DOLL, E. E.; LABBAN, N.; et al. Versatile sarcosine and creatinine biosensing schemes utilizing layer-by-layer construction of carbon nanotube-chitosan composite films. **2018.** Journal of Electroanalytical Chemistry.

PAVINATTO, A.; MERCANTE, L. A.; LEANDRO, C. S.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. Layer-by-Layer assembled films of chitosan and multi-walled carbon nanotubes for the electrochemical detection of 17 α -ethinylestradiol. **2015.** Journal of Electroanalytical Chemistry.

PEERS, S.; MONTEBAULT, A.; LADAVIÈRE, C. Chitosan hydrogels incorporating colloids for sustained drug delivery. **2022.** Carbohydrate Polymers.

PEREIRA DA SILVA NEVES, M. M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; FANJUL-BOLADO, P. Future trends in the market for electrochemical biosensing. **2018.** Current Opinion in Electrochemistry.

PETRUCCI, R.; PASQUALI, M.; SCARAMUZZO, F. A.; CURULLI, A. Recent advances in electrochemical chitosan-based chemosensors and biosensors: Applications in food

safety. **2021**. Chemosensors.

PHADUNGCHAROEN, N.; WINOTAPUN, W.; KHOMNIYAWANIT, A.; KRATAICHAN, F.; ROJANARATA, T. Facile and green fabrication of biocatalytic chitosan beads by one-step genipin-mediated β -glucosidase immobilization for production of bioactive genistein. **2019**. Sustainable Chemistry and Pharmacy.

PHAN, T. T. V.; HOANG, G.; NGUYEN, V. T.; et al. Chitosan as a stabilizer and size-control agent for synthesis of porous flower-shaped palladium nanoparticles and their applications on photo-based therapies. **2019**. Carbohydrate Polymers.

R. KELLNER, J.-M. MERMET, M. OTTO, M. VALCÁRCEL, H. M.; WIDMER. Analytical Chemistry: A modern approach to analytical science. **2004**. 2nd editio ed. New.

RAJ, S.; KUMAR SHARMA, P.; MALVIYA, R. Pharmaceutical and Tissue Engineering Applications of Polyelectrolyte Complexes. **2018**. Current Smart Materials.

RAMIREZ CABALLERO, S. S.; SAIZ, E.; MONTEBAULT, A.; et al. 3-D printing of chitosan-calcium phosphate inks: rheology, interactions and characterization. **2019**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine.

RAMOS, J. V. H.; MORAWSKI, F. D. M.; COSTA, T. M. H.; et al. Mesoporous chitosan/silica hybrid material applied for development of electrochemical sensor for paracetamol in presence of dopamine. **2015**. Microporous and Mesoporous Materials.

RASSAS, I.; BRAIEK, M.; BONHOMME, A.; et al. Highly sensitive voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulated in a chitosan/kappa-carrageenan/gold nanoparticle bionanocomposite. **2019**. Sensors (Switzerland).

REN, X.; LU, P.; FENG, R.; et al. An ITO-based point-of-care colorimetric immunosensor for ochratoxin A detection. **2018**. Talanta.

RIZWAN, M.; HAZMI, M.; LIM, S. A.; AHMED, M. U. A highly sensitive electrochemical detection of human chorionic gonadotropin on a carbon nano-onions/gold nanoparticles/polyethylene glycol nanocomposite modified glassy carbon electrode. **2018**. Journal of Electroanalytical Chemistry.

ROCHA, M. A. M.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M.; NUNES, C. Impact of chitosan-genipin films on volatile profile of wine along storage. **2021**. Applied Sciences (Switzerland).

ROMANOVA, Y.; LAIKOV, A.; MARKELOVA, M.; et al. Proteomic analysis of human serum from patients with chronic kidney disease. **2020**. Biomolecules.

RUECHA, N.; SHIN, K.; CHAILAPAKUL, O.; RODTHONGKUM, N. Label-free paper-based electrochemical impedance immunosensor for human interferon gamma detection. **2018**. *Sensors and Actuators, B: Chemical*.

RYDZEK, G.; JI, Q.; LI, M.; et al. Electrochemical nanoarchitectonics and layer-by-layer assembly: From basics to future. **2015**. *Nano Today*.

SADRIU, I.; BOUDEN, S.; NICOLLE, J.; et al. Molecularly imprinted polymer modified glassy carbon electrodes for the electrochemical analysis of isoproturon in water. **2020**. *Talanta*.

SALEHZADEH, H.; EBRAHIMI, M.; NEMATOLLAHI, D.; AHMAD, A. Electrochemical study of fenitrothion and bifenoxy and their simultaneous determination using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **2016**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*.

SALEHZADEH, H.; EBRAHIMI, M.; NEMATOLLAHI, D.; AHMAD, A. Electrochemical study of fenitrothion and bifenoxy and their simultaneous determination using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. **2016**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*.

SANTANA, E. R.; MARTINS, E. C.; SPINELLI, A. Electrode modified with nitrogen-doped graphene quantum dots supported in chitosan for triclocarban monitoring. **2021**. *Microchemical Journal*.

DOS SANTOS, P. F.; VAN WEYENBERGH, J.; DELGOBO, M.; et al. ISG15-Induced IL-10 Is a Novel Anti-Inflammatory Myeloid Axis Disrupted during Active Tuberculosis. **2018**. *The Journal of Immunology*.

SARIKOKBA; TIWARI, D.; PRASAD, S. K.; et al. Bio-composite materials precursor to chitosan in the development of electrochemical sensors: A critical overview of its use with micro-pollutants and heavy metals detection. **2020**. *Applied Chemistry for Engineering*.

SCHOLZ, F. *Electroanalytical methods: Guide to Experiments and Applications*. **2010**.

SCIDA, K.; STEGE, P. W.; HABY, G.; MESSINA, G. A.; GARCÍA, C. D. Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review. **2011**. *Analytica Chimica Acta*.

SHARIFI, M.; AVADI, M. R.; ATTAR, F.; et al. Cancer diagnosis using

nanomaterials based electrochemical nanobiosensors. **2019**. *Biosensors and Bioelectronics*.

SHEN, Y.; SHEN, G. Electrochemical impedimetric immunosensor based on host-guest interaction between β -cyclodextrin and ferrocene anchored to ionic liquid. **2019**. *Ionics*.

DA SILVA, E. T. S. G.; SOUTO, D. E. P.; BARRAGAN, J. T. C.; et al. Electrochemical Biosensors in Point-of-Care Devices: Recent Advances and Future Trends. **2017**. *ChemElectroChem*.

SILVA, F.; THAÍS, T.; MONTANHEIRO, A.; et al. Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle : Eliminating the use of toxic crosslinkers. **2020**. *Journal of Applied Polymer Science*.

SILVA, R. DE O.; DA SILVA, É. A.; FIORUCCI, A. R.; FERREIRA, V. S. Electrochemically activated multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed electrode for voltammetric determination of sulfentrazone. **2019**. *Journal of Electroanalytical Chemistry*.

SNAPSHOT, M.; OVERVIEW, M. Electrochemical Sensor Market - Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2021 - 2026). **2021**. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/4897095/electrochemical-sensor-market-growth-trends>>. .

SOUSA, J. C. G.; RIBEIRO, A. R.; BARBOSA, M. O.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. **2018**. *Journal of Hazardous Materials*.

SPYCHALSKA, K.; ZAJAC, D.; BALUTA, S.; HALICKA, K.; CABAJ, J. Functional Polymers Structures for (Bio)Sensing Application- A review. **2020**. *Polymers*.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **2019**. *Journal of Hazardous Materials*.

SUGINTA, W.; KHUNKAEWLA, P.; SCHULTE, A. Electrochemical biosensor applications of polysaccharides chitin and chitosan. **2013**. *Chemical Reviews*.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; GARCÍA-PARRA, E.; VELA-GUTIÉRREZ, G.; et al. Genipin as an emergent tool in the design of biocatalysts: Mechanism of reaction and applications. **2019**. *Catalysts*.

TAN, X.; CHEN, Q.; ZHU, H.; et al. Fast and Reproducible ELISA Laser Platform for Ultrasensitive Protein Quantification. **2020**. *ACS Sensors*.

TERTIŞ, M.; MELINTE, G.; CIUI, B.; et al. A Novel Label Free Electrochemical

Magnetoimmunosensor for Human Interleukin-6 Quantification in Serum. **2019**. Electroanalysis.

THAPA, A.; SOARES, A. C.; SOARES, J. C.; et al. Carbon Nanotube Matrix for Highly Sensitive Biosensors to Detect Pancreatic Cancer Biomarker CA19-9. **2017**. ACS Applied Materials and Interfaces.

THOMAS, F. G.; G. HENZE. **Voltammetric Analysis**. Collingwood, **2001**.

TOKAREK, K.; HUESO, J. L.; KUS, P.; KYZIOŁ, A. Green Synthesis of Chitosan-Stabilized Copper. **2013**. European Journal of Inorganic Chemistry.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. **2011**. Analytical Letters.

VASHIST, S. K.; LUONG, J. H. T. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. **2018**. Elsevier.

VELAYUDHAM, J.; MAGUDEESWARAN, V.; PARAMASIVAM, S. S.; KARRUPPAYA, G.; MANICKAM, P. Hydrogel-aptamer nanocomposite based electrochemical sensor for the detection of progesterone. **2021**. Materials Letters.

VLASCEANU, G. M.; CRICA, L. E.; PANDELE, A. M.; IONITA, M. Graphene Oxide Reinforcing Genipin Crosslinked Chitosan-Gelatin Blend Films. **2020**. Coatings.

WANG, C.; XIA, K.; WANG, H.; et al. Advanced carbon for flexible and wearable electronics. **2019**. Advanced Materials.

WANG, G.; HUANG, H.; ZHANG, G.; et al. Dual amplification strategy for the fabrication of highly sensitive interleukin-6 amperometric immunosensor based on poly-dopamine. **2011**. Langmuir.

WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Application. **2008**.

WANG, J. Electrochemical biosensing based on noble metal nanoparticles. **2012**. Microchimica Acta.

WANG, Y.; ZHANG, B.; TANG, Y.; ZHAO, F.; ZENG, B. Fabrication and application of a rutin electrochemical sensor based on rose-like AuNPs-MoS₂-GN composite and molecularly imprinted chitosan. **2021**. Microchemical Journal.

WANI, T. U.; PANDITH, A. H.; SHEIKH, F. A. Polyelectrolytic nature of chitosan: Influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles. **2021**. Journal of Drug Delivery Science and Technology.

WEI, L.; HUANG, X.; ZHANG, X.; et al. High-performance electrochemical sensing platform based on sodium alginate-derived 3D hierarchically porous carbon for simultaneous determination of dihydroxybenzene isomers. **2021**. *Analytical Methods*.

WEI, P.; LI, Z.; ZHAO, X.; SONG, R.; ZHU, Z. Fe₃O₄/SiO₂/CS surface ion-imprinted polymer modified glassy carbon electrode for highly sensitivity and selectivity detection of toxic metal ions. **2020**. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.

WEN, W.; YAN, X.; ZHU, C.; DU, D.; LIN, Y. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors. **2017**. *Analytical Chemistry*.

WINDMILLER, J. R.; WANG, J. Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. **2013**. *Electroanalysis*.

WONGKAEW, N.; SIMSEK, M.; GRIESCHE, C.; BAEUMNER, A. J. Functional Nanomaterials and Nanostructures Enhancing Electrochemical Biosensors and Lab-on-a-Chip Performances: Recent Progress, Applications, and Future Perspective. **2019**. *Chemical Reviews*.

WU, Q.; THERRIAULT, D.; HEUZEY, M. C. Processing and Properties of Chitosan Inks for 3D Printing of Hydrogel Microstructures. **2018**. *ACS Biomaterials Science and Engineering*.

XU, Z.; SONG, J.; LIU, B.; et al. A conducting polymer PEDOT:PSS hydrogel based wearable sensor for accurate uric acid detection in human sweat. **2021**. *Sensors and Actuators B: Chemical*.

YANG, T.; WANG, S.; JIN, H.; et al. An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. **2013**. *Sensors and Actuators, B: Chemical*.

YANG, W.; ZHOU, H.; SUN, C. Synthesis of ferrocene-branched chitosan derivatives: redox polysaccharides and their application to reagentless enzyme-based biosensors. **2007**. *Macromolecular Rapid Communications*.

YOSHIDA, K.; SATO, K.; KASHIWAGI, Y. Preparation of Nafion / Polycation Layer-by-Layer Films for Adsorption and Release of Insulin. **2018**. *Polymers*.

ZAOUAK, A.; MATOUSSI, F.; DACHRAOUI, M. Electrochemical oxidation of herbicide bifenox acid in aqueous medium using diamond thin film electrode. **2013**. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*.

ZHANG, P.; GUO, X.; WANG, H.; et al. An electrode-separated piezoelectric immunosensor array with signal enhancement based on enzyme catalytic deposition of palladium nanoparticles and electroless deposition nickel-phosphorus. **2017**. Sensors and Actuators, B: Chemical.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; et al. Removing copper and cadmium from water and sediment by magnetic microspheres - MnFe_2O_4 /chitosan prepared by waste shrimp shells. **2021**. Journal of Environmental Chemical Engineering.

ZHOU, S.; WANG, J.; GAN, L.; et al. Individual and simultaneous electrochemical detection toward heavy metal ions based on L-cysteine modified mesoporous MnFe_2O_4 nanocrystal clusters. **2017**. Journal of Alloys and Compounds.