



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

Renê Santos de Amorim

Estudo de biossensor eletroquímico para detecção de saxitoxina

Florianópolis

2023

Renê Santos de Amorim

Estudo de biossensor eletroquímico para detecção de saxitoxina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação no Programa de pós-graduação em química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em química.

Orientador(a): Prof.(a) Ivan Helmuth Bechtold, Dr.

Florianópolis

2023

Amorim, Renê Santos de Estudo de biossensor
eletroquímico para detecção de saxitoxina / Renê
Santos de Amorim ; orientador, Ivan Helmuth Bechtold,
2023. 82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. Biossensores. 3. Aptâmeros. 4.
Eletroquímica. 5. Química. I. Bechtold, Ivan Helmuth. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Química. III. Título.

Renê Santos de Amorim

Estudo de biossensor eletroquímico para detecção de saxitoxina

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 16 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Cristiani de Campos Pla Cid, Dr.(a)
Instituição FSC-UFSC

Prof.(a) Tatiane de Andrade Maranhão, Dr.(a)
Instituição DQ-UFSC

Prof.(a) Daniela Zambelli Mezalira, Dr.(a)
Instituição DQ-UFSC/Suplente

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química, com especialização em Físico-Química

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Ivan Helmuth Bechtold, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc) e do Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica (INEO) e, portanto, expresso aqui meus sinceros agradecimentos.

Agradeço também à Universidade Federal de Santa Catarina e o seu corpo docente, em especial àqueles dos departamentos de Pós-Graduação em Química e de Pós-Graduação em Física que demonstraram estar comprometido com a qualidade e excelência do ensino.

Ao Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA), onde fui muito bem recebido e pude desenvolver a minha pesquisa.

Ao professor Dr. Ivan Helmuth Becthtold, por aceitar a tarefa de me orientar durante o mestrado.

Aos membros do grupo de pesquisa, que hoje eu chamo de amigos.

RESUMO

A saxitoxina (STX) é uma neurotoxina extremamente nociva e produzida naturalmente. Pode ser encontrada durante a época de floração de alguns microorganismos aquáticos/algas e representa uma grande preocupação para a saúde humana. Para garantir as condições de potabilidade d'água, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um limite máximo de 3µg/L (microgramas por litro) de saxitoxina. Com o desenvolvimento de novas tecnologias envolvendo produção e manipulação de DNA, surgiu um novo mundo de possibilidades para plataformas de sensoriamento. Aliado a uma técnica não invasiva usada para análise de propriedades interfaciais, como espectroscopia de impedância eletroquímica, é possível construir um biossensor eletroquímico de fácil uso e de baixo custo para uso em monitoramento da qualidade d'água. Estudos foram realizados junto ao Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos – LOOSA, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC com estes métodos, demonstrando sua viabilidade e sugerindo que é possível obter sucesso na elaboração de um biossensor para detecção de saxitoxina. Pensando na necessidade de aprimoramento do sistema e de se monitorar a qualidade da água potável, este trabalho descreve a revisão e estudo eletroquímico dos procedimentos de desenvolvimento de um biossensor utilizando um aptâmero (oligonucleotídeo) como elemento de reconhecimento para detecção de saxitoxina em meio aquoso associado à técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. O trabalho de revisão sistemática aqui empregado demonstrou a necessidade de revisão dos conceitos empregados durante estudo ou desenvolvimento de um projeto. Fica claro que uma boa revisão teórica e entendimento das técnicas utilizadas são essenciais para o desenvolvimento/otimização de procedimentos de fabricação deste dispositivo. Aqui foi demonstrado que uma faixa segura de potencial que garante a estabilidade do sistema eletroquímico se encontra entre -0,1 e +0,7 volts em relação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Também foi demonstrado que é possível se obter um valor de base constante para eletrodos modificados desde que estes sejam acondicionados por tempo suficiente nas soluções de medida. Valores de x^2 mostram que as medidas de EIE após o tempo necessário para o equilíbrio estão dentro das condições ideais para tratamento de dados e os testes com diferentes concentrações de saxitoxina mostram uma diferenciação de sinais clara entre a linha base (sem toxina) e os sinais em diferentes concentrações.

Palavras-chave: Biossensor; Saxitoxina; Aptâmero, Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

ABSTRACT

Saxitoxin is an extremely harmful and naturally produced neurotoxin. It can be found during water microorganisms/algae bloom season and represents a major concern for human health. The Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) established a maximum limit of 3,0 µg/L (three micrograms per liter) for water consumption. With the development of new technologies involving DNA production and manipulation, a new world of possibilities for sensing platforms has emerged. Combined with a non-invasive technique used for analysis of interfacial properties, such as electrochemical impedance spectroscopy, it is possible to build an easy-to-use and low-cost electrochemical biosensor for use in water monitoring. Studies were carried out at the Laboratory of Organic Optoelectronics and Anisotropic Systems - LOOSA, of the Federal University of Santa Catarina - UFSC with these methods, demonstrating its feasibility and suggesting that it is possible to succeed in the elaboration of a biosensor for saxitoxin detection. Considering the need to improve the system and monitor the quality of drinking water, this work describes the review and electrochemical study of the procedure for developing a biosensor using an aptamer (oligonucleotide) as a recognition element for detection of saxitoxin in aqueous medium associated with electrochemical impedance spectroscopy technique.

The systematic review work demonstrated the need to know the concepts used during the study or development of a project. It is clear that a good theoretical review and understanding of the techniques used are essential for the procedures development/optimization. Here it was demonstrated that a safe range of potential that guarantees the stability of the electrochemical system is between -0.1 and +0.7 volts in relation to an Ag/AgCl reference electrode. It has also been demonstrated that it is possible to obtain a constant baseline value for modified electrodes as long as they are conditioned for a sufficient time in the measurement solutions. Values of χ^2 shows that the EIS measurements after the time required for equilibration are within ideal conditions for data processing and the tests with different saxitoxin concentrations show a clear differentiation of signals between the baseline (no toxin) and the signals containing different concentrations.

Keywords: Biosensor; Saxitoxin; Aptamer; Impedance Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica (backbone) de saxitoxinas.	22
Figura 2. Lagoa do Peri, localizada no município de Florianópolis.	24
Figura 3. Imagem retirada do documento PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017 referente às normas de monitoramento de cianobactérias. O valor para contagem de células é de 10.000 (dez mil), enquanto no texto da portaria é de 20.000 (vinte mil)	25
Figura 4. Representação esquemática de um biosensor.	28
Figura 5. Estrutura secundária do aptâmero M30-f proposto por Zheng e colaboradores.	29
Figura 6. Voltagem através de uma fonte ca senoidal.	31
Figura 7. Representação de sinais sinusoidais aplicados a sistemas simples. Acima, um circuito formado por uma fonte ac e um resistor. Abaixo, um circuito formado por uma fonte ac e um indutor. Em ambos os casos (a) representa o comportamento de corrente e potencial em relação ao tempo e (b) diagramas de fasores para os respectivos casos.	32
Figura 8. A impedância é resultado do quociente entre a função ddp e função corrente. Pode ser expressa em termos de módulo de impedância $ Z $, e ângulo de fase φ , ou com um gráfico de Z_{rel} vs Z_{im} (Nyquist).	33
Figura 9. Plot Nyquist e circuito de Randles para um eletrodo em contato com eletrólito. C_{dl} representa a capacitância de dupla camada elétrica resultante de carga sendo acumulada na interface eletrodo-solução. R_{ct} representa o fluxo de corrente devido a processos redox na interface. W é a impedância de Warburg resultante da impedância quando a corrente sofre influência de processos difusionais do seio da solução para a interface. R_s é a resistência da solução.	34
Figura 10. Gráfico de a) potencial aplicado em relação ao tempo e b) voltamograma cíclico resultante para atividade redox envolvendo transferência de 1 elétron. Fonte	35
Figura 11. Fluxograma resumindo as etapas de fabricação de um biossensor eletroquímico, propostas e utilizadas por Serrano.	37
Figura 12. Resultados de CV e EIE para as diversas etapas de fabricação do biossensor proposto por Serrano, 2021. (a) diagramas de nyquist normalizados para STX em diferentes concentrações. (b) curva de calibração obtida a partir dos dados	

anteriores. (c) dados de CV e (d) EIE obtidos para as diferentes etapas de fabricação do biosensor. As medidas foram realizadas em tampão PBS contendo 5,0 mM do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$38

Figura 13. Fluxograma representativo das etapas deste projeto de pesquisa.40

Figura 14. Representação de uma célula eletroquímica acoplada a um potenciostato. Se a condutividade da solução aumenta, R_{sol} diminui e, portanto, R_u também diminui. Encurtar a distância entre os eletrodos de Trabalho, WE e referência RE, também diminui os valores de R_u . R_c geralmente é compensada pelo potenciostato quando usamos contra eletrodo, CE.....44

Figura 15. Espectros de EIE para eletrodo de ouro com diferentes concentrações do par redox.45

Figura 16. Superior: curvas de voltametria cíclica para um eletrodo de ouro em PBS apenas (curva azul) e na presença do par redox(vermelha). O potencial foi varrido na faixa de -1,0 ~ +1,0 V em versus Ag|AgCl. Inferior: comparação da curva para PBS apenas(azul) com a janela de potencial com fluxo de corrente desprezível(verde). A velocidade de varredura foi de 0,1 V/s.46

Figura 17. Voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro em PBS apenas (Azul) e na presença do par redox. As linhas tracejadas marcam janela de potencial utilizada, entre -0,1~0,5 V vs Ag|AgCl. A velocidade de varredura foi de 0,1 V/s.48

Figura 18. A esquerda, alguns exemplos de compostos contendo tióis, capazes de formar SAMs em superfícies metálicas. a) 1-Nonanotiol, b) Tiofenol, c) 1,8-octanoditiol, d) dissulfeto de dinonanoila, e) 1,1-dinonanotiol. A direita esquema de uma molécula de decanotiol adsovida em superfície de ouro com ângulos típicos de $a=30^\circ$, $b=55^\circ$, e $c=14^\circ$ para uma configuração estendida. Esferas vermelhas representam enxofre, azuis representam carbono, brancas representam hidrogênio e amarelo para ouro.49

Figura 19. Esquema dos diferentes passos durante a formação de SAMs a partir de tióis sobre superfície de ouro. i) fisissorção, ii) fase “deitada” (quimissorção), iii) nucleação e fase “de pé”, iv) levante completo.....50

Figura 20. Diagrama de Nyquist para um eletrodo de ouro após processo de limpeza. A inserção mostra o circuito de Randles (modificado) que foi utilizado para o ajuste teórico da Impedância. O gráfico na parte de baixo mostra os valores de R_{ct} em relação ao tempo.....52

<p>Figura 21. Valores de R_{ct} obtidos para diferentes tempos de imersão dos eletrodos de ouro em soluções contendo APT $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$(azul) e solução contendo MCH $5,0 \text{mmol.L}^{-1}$ (Laranja). Os valores foram obtidos a partir do ajuste teórico de curvas de EIE tratadas com software NOVA enquanto cada média e desvio padrão apresentado foram calculados a partir de 3 medidas distintas utilizando Microsoft Excel.</p>	54
<p>Figura 22 Valores de taxa de cobertura Θ calculados a partir da equação 10. Em azul, curvas para a primeira modificação com APT, em laranja, valores para a etapa com MCH.</p>	56
<p>Figura 23. Valores de taxa de cobertura Θ calculados a partir da equação 9, descrita na seção 7.1.3. Em azul, curvas para a primeira modificação com APT e, em laranja, valores para a etapa com MCH.</p>	57
<p>Figura 24. Curva de pseudo-chi quadrado (χ^2_{ps}) versus tempo de imersão em APT durante o processo de avaliação de modificação com APT. Os valores foram calculados através do software NOVA e projetados em Microsoft Excel.</p>	59
<p>Figura 25. Curva de pseudo-chi quadrado (χ^2_{ps}) versus tempo de imersão em MCH (Após APT) durante o processo de avaliação de adsorção por EIE. Os valores foram calculados através do software NOVA.</p>	60
<p>Figura 26. Voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura para as etapas de modificação de eletrodos de ouro. A) Ouro apenas, B) Modificação com APT e C) Modificação com APT/MCH. As medidas foram realizadas após a estabilização na solução de medida. A direita os respectivos plots de picos de corrente versus raiz da velocidade de varredura.....</p>	62
<p>Figura 27. Valores de R_{ct} para diferentes concentrações de STX após fabricação de eletrodo modificado do tipo Au/APT/MCH. Com o aumento da concentração, é possível visualizar uma mudança na cinética de decaimento. Em azul também é mostrada a medida “branco”, sem presença de SXT.</p>	66
<p>Figura 28. Valores de R_{ct} obtidos em função do tempo para estabilização após imersão em soluções por 24h. Os valores diminuem de forma parecida com as medidas anteriores, porém a partir de valores muito mais elevados.....</p>	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo das diferentes estruturas dos congêneres de Saxitoxina. O destaque em vermelho indica os substituintes para Saxitoxina.....	23
Quadro 2: Lista de comparação das soluções tampão utilizadas por Serrano, 2021 e as utilizadas neste trabalho.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de cobertura do eletrodo de ouro calculados a partir dos valores de R_{ct} pelos diferentes métodos propostos por (CAMPUZANO et al., 2006) 58

Tabela 2. Parâmetros obtidos da relação entre picos de corrente versus raiz da velocidade de varredura para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em PBS utilizando eletrodos de ouro não modificados e eletrodos de ouro modificados por SAMs..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD: Água deionizada	40, 41
APHA: American Public Health Associatio	25
APT: Aptâmero	35, 40, 42;
AWWA: American Water Works Association	25
Cr: Cromo	40
CV: Cyclic Voltametry (Voltametria cíclica)	34, 36
DNA: Ácido desoxirribonucleico	17
EIE: Espectroscopia de Impedância eletroquímica	29, 33, 35, 36, 38, 41, 44, 50, 52, 57, 64
HCl: Ácido clorídrico	40, 50
HPLC: High Performance Liquid Chromatography	16
ISO: International Standartization Organization,	25
KOH: Hidróxido de Potássio	41
LabSiN: Laboratórios de Sistemas Nanoestruturados	40
LFFS: Laboratório de Filmes Finos e Superfícies	40
LOOSA: Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos	17
OMS: Organização Mundial da Saúde	18, 25
ONU: Organização das nações unidas	24
PB: Phosphate buffer (Tampão fosfato)	50
PBS: Phosphate buffered saline	28, 36, 39, 40, 42, 45, 46, 49, 50
PSP: Paralytic shellfish poisonig	22

PST: Paralytic Shellfish Toxins	16
R _c : Resistência compensada	43
RNA: Ácido ribonucleico	17
R _{sol} : Resistência da Solução	43
R _u : Resistência não compensada	43
SAM: Self Assembled Monolayer	52, 57
Sinan: Sistema de informação de agravos de notificação	19
STX/L: Euivalentes de saxitoxina	24
TE: Tampão Trizma-EDTA	40, 50
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina	17, 40
USEPA United States Environmental Protection Agency	25
VMP: Valor máximo permitido	24
WEF: Water Environment Federation	25
WHO: Wold health organization	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	CONTEXTUALIZAÇÃO	19
2.1	DA PROBLEMÁTICA E MOTIVAÇÃO DO TRABALHO.....	19
2.2	DAS TOXINAS PRODUZIDAS NA NATUREZA	21
2.2.1	Saxitoxinas (STXs)	22
2.3	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	24
2.3.1	Normas de controle para STX	24
2.3.2	Métodos de detecção e análise padrão para STX	26
2.4	BIOSSENSORES.....	27
2.4.1	Elemento de reconhecimento	28
2.4.2	Transdutores de sinal	29
2.5	TÉCNICAS UTILIZADAS	30
2.5.1	Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE)	30
2.5.2	Voltametria cíclica	35
2.6	O TRABALHO DE SERRANO, 2021	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVOS GERAIS:	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAIS UTILIZADOS.....	40
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES	41
4.3	FABRICAÇÃO DOS ELETRODOS DE OURO	41
4.3.1	Limpeza eletrodos de ouro	42
4.3.2	Funcionalização da superfície	43
4.3.3	Complexação APT-STX	43
4.4	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	REVISÃO DO TRABALHO PROPOSTO POR SERRANO, 2021	44
5.1.1	Ajuste da concentração do par redox para medidas eletroquímicas ...44	44
5.1.2	Ajuste da janela de potencial utilizada	46
5.1.3	Uso de diferentes solventes (tampões) durante a modificação dos eletrodos	48

5.2	AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS NÃO MODIFICADOS	51
5.3	AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE SAM	53
5.3.1	Estimativa da taxa de cobertura	55
5.3.2	O teste de Kronig-Kramer	58
5.3.3	Análise da reversibilidade da sonda redox	61
5.4	TESTES NA PRESENÇA DE SAXITOXINA	65
6	CONCLUSÃO	68
6.1	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A –DIAGRAMA DE ARGAND (NYQUIST) E CURVAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA AS ETAPAS DE FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVO. MEDIDAS TOMADAS APÓS EQUILÍBRIO.....	79
	APÊNDICE B –DIAGRAMA DE ARGAND (NYQUIST) OBTIDOS PELA TÉCNICA DE EIE AO LONGO DE 19 HORAS PARA A MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE OURO COM APTÂMERO E CURVA DE VALORES DE R_{CT} OBTIDA PELO TRATAMENTO DESSES DADOS.....	80
	APÊNDICE C –DIAGRAMA DE ARGAND (NYQUIST) OBTIDOS PELA TÉCNICA DE EIE AO LONGO DE 19 HORAS PARA A MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE OURO COM MCH APÓS A ETAPA DE MODIFICAÇÃO COM APTÂMERO E CURVA DE VALORES DE R_{CT} OBTIDA PELO TRATAMENTO DESSES DADOS.	81
	APÊNDICE D – GRÁFICO FORMADO PELA PARTE REAL DA IMPEDÂNCIA VERSUS O INVERSO DA RAIZ QUADRADA DA FREQUÊNCIA ANGULAR ($Z' \times \omega^{-1/2}$) UTILIZADOS PARA CALCULAR θ_{ISP}.....	82
	ANEXO A – PRINT MANUAL DO USUÁRIO METROHM NOVA.	83

1 INTRODUÇÃO

A grande velocidade de crescimento populacional aliada ao efeito de globalização faz com que a preocupação relacionada à segurança alimentar e consumo de água potável se torne uma tendência mundial. (SAATH; FACHINELLO, 2018)

São inegáveis os impactos sociais e econômicos (em pequenos casos, local e em larga escala, mundial) advindos de surtos de intoxicação alimentar e/ou água contaminada. (CHEESEMAN, 2016; CHEN et al., 2016)

Dentre os contaminantes mais comuns estão as bactérias, vírus, parasitas e substâncias químicas. Esta última podendo ser de origem antrópica (provenientes de indústrias, rejeitos urbanos, acúmulo de metais pesados etc.) ou naturais (micotoxinas, glicosídeos cianogênicos, biotoxinas marinhas etc.). (TESTAI et al., 2016)

Um bom exemplo de biotoxinas marinhas são as saxitoxinas, conhecidas como “toxinas paralisantes de mariscos” (PST, do inglês Paralytic Shellfish Toxins), que podem ser encontradas em quantidades perigosas para alguns animais e humanos durante episódios de grande proliferação de certas espécies aquáticas. (TESTAI et al., 2016) Durante esses episódios, corpos de água utilizados para atividades de recreação ou abastecimento público apresentam risco de contaminação para seus usuários. (MACEDO, 2010; MILLER et al., 2017)

Por se tratar de uma questão de saúde pública, se faz necessário um constante monitoramento tanto dos locais onde existe risco de contaminação (rios, lagos, locais de produção, preparo e comércio de alimento) como dos produtos que dali derivam (peixes, camarões, ostras etc.). (BERNARDES et al., 2018)

Atualmente, o método de detecção e análise de substâncias de controle é feito por meio de técnicas laboratoriais que demandam pessoal qualificado, recursos onerosos (como a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou imunoenaios) e muito tempo. (BORTOLI; PINTO, 2015) Tempo esse que impacta na tomada de decisão, que é crucial para diminuição da probabilidade de possíveis surtos de intoxicação.

A busca por avanços nos métodos de análise é, portanto, constante.

Uma alternativa promissora é a utilização de biossensores, que utilizam um componente biológico acoplado a um transdutor de sinal para detecção do analito de

interesse. Apresentam alta especificidade e sensibilidade e um baixo tempo de resposta, quando comparado com técnicas laboratoriais. (MCPARTLIN et al., 2016)

O uso de aptâmeros (sequências de oligonucleotídeos, DNA/RNA) como unidade de reconhecimento biológico tem sido empregado em diversos trabalhos, pois não necessitam do uso de seres vivos para sua produção/obtenção. Ademais, apresentam capacidade de ligar-se com alta afinidade ao analito de interesse, alta especificidade, possibilitam a produção em larga escala e podem ser facilmente funcionalizados. (BRENTANO; CARDOSO, 2014; LAGOS et al., 1999; MONDARDO, 2009)

Estudos iniciais vêm sendo realizados junto ao Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos – LOOSA, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC com este tipo de material junto ao uso de técnicas eletroquímicas de análise, demonstrando sua viabilidade e sugerindo que é possível obter sucesso na elaboração de um biossensor aptâmérico para detecção de saxitoxina. (SERRANO et al., 2021)

No entanto, a fim de melhorar o desempenho e reprodutibilidade do biossensor torna-se necessário otimizar parâmetros de fabricação. (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; EIRAS; COSCIONE; ANDRADE, 2018)

Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo a revisão do processo de fabricação do biossensor eletroquímico, anteriormente apresentado por Serrano, 2021, com o intuito de avaliar a necessidade de possíveis modificações na metodologia adotada que permitam a obtenção de condições ótimas de operação e reprodutibilidade

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 Da problemática e motivação do trabalho

As chamadas Doenças de transmissão hídrica e alimentar, DTHA¹, são definidas como sendo doenças causadas pela ingestão de alimento e/ou água contaminados. A estimativa é que existam mais de 250 doenças desse tipo no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b) e segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), cerca de 600 milhões (1 em cada 10 pessoas no mundo, aproximadamente) adquirem alguma doença relacionada a alimentos contaminados todos os anos e cerca de 420.000 morrem, no mesmo período, pelo mesmo motivo. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a)

Ocorrências clínicas consequentes desse tipo de contaminação podem estar relacionada com microorganismos patogênicos (infecciosos, toxinogênicos ou infestantes), toxinas de microrganismos, substâncias químicas ou objetos lesivos ou que contenham em sua constituição estruturas naturalmente tóxicas. Ocorrem então, pela ingestão de componentes que apresentam riscos biológicos, químicos ou físicos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, [s.d.]

Não há um quadro clínico específico para os surtos de DTHA, logo, é possível observar uma grande variação de sintomas de acordo com o agente etiológico envolvido. Os sinais e sintomas mais comuns são náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, falta de apetite ou febre. Além desses, podem ocorrer também afecções extra intestinais em diferentes órgãos e sistemas como nos rins (Síndrome Hemolítico-Urêmica), sistema nervoso central (botulismo e toxoplasmose) e má formação congênita (toxoplasmose). Em casos mais extremos é possível que o indivíduo apresente paralisia temporária, danos cerebrais permanentes e morte. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b; SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, [s.d.]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a)

Dados do Ministério da Saúde mostram que, no Brasil, foram notificados 6.347 surtos de DTHA, entre os anos 2012 e 2021. Isso constitui uma média de 634,7 surtos

¹ Em documentos mais antigos são citadas como Doenças transmitidas por alimento/água (DTA)

por ano. Destes, 5031 foram confirmados laboratorialmente, mas somente 2.258 tiveram seus agentes etiológicos identificados. Surtos provenientes do consumo de água representam 25,2% do total e cerca de 52,8% de todos os casos eram provenientes de residências e/ou restaurantes. 48,56% de todos os surtos registrados durante esse período ocorreram na região sul do Brasil. Em 9,4% das vezes não foi possível indicar a origem dos surtos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022a, 2022b)

O ônus gerado devido a esses surtos abrange todo um espectro social e econômico, sendo necessário constante monitoramento da qualidade de produtos consumidos e/ou fontes de água usados para recreação/consumo. (MELO et al., 2018)

O Ministério da Saúde recomenda que, antes do início do tratamento específico, as amostras biológicas sejam coletadas para a pesquisa de toxina ou do agente etiológico. Dessa forma, surtos de DTHA considerados “ameaça à saúde pública” devem ser comunicados imediatamente à vigilância epidemiológica dos três níveis de gestão da saúde, pelo meio mais rápido, e, além disso, deve ser notificada e registrada no Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) em até sete dias. A investigação deverá ser realizada pelas vigilâncias epidemiológica, sanitária, ambiental, laboratorial, atenção à saúde, com a participação, sempre que possível e necessário, de profissionais de outros setores da agricultura e pecuária e abastecimento. O diagnóstico laboratorial é realizado mediante análises de amostras clínicas (fezes, vômitos, urina, sangue etc.), bromatológicas (água, alimentos que apresentaram associação positiva com o surto) e ambientais (solo, água de retrolavagem de filtros etc.); e os tipos de amostras a serem coletadas vão variar de acordo com as hipóteses diagnósticas levantadas durante a investigação de surtos DTHA. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2021a, 2021b)

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido. Somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes.

2.2 Das toxinas produzidas na natureza

Substâncias potencialmente tóxicas podem ser produzidas por diversos micro-organismos, plantas ou animais, geralmente como parte do mecanismo de defesa contra predadores. Essas substâncias não são danosas ao organismo que as produz, mas podem acarretar sérios riscos a outras criaturas como, por exemplo, humanos, se ingeridas. Toxinas provenientes de algas, bactérias e plantas são as mais comumente associadas a contaminações de corpos de água, tornando-os impróprios para o consumo humano. (PICARDO et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022)

O relatório de 2022 sobre toxinas naturalmente produzidas da organização mundial da saúde lista algumas das classes mais comuns de toxinas que são naturalmente produzidas, dentre elas estão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b):

- a) Alcalóides pirrolizidínicos, produzidos por mais de 600 espécies de plantas diferentes,
- b) Toxinas produzidas por cogumelos venenosos,
- c) Solanina e chaconina, presentes em espécies da família Solanaceae (batata, tomate, berinjela, pimenta e o pepino),
- d) Micotoxinas, produzidas por bolores (fungos filamentosos muito comum no ambiente doméstico),
- e) Lecitinas, que podem ser encontradas em feijões, por exemplo,
- f) Fumocumarinas, que podem ser encontradas em plantas de fruto cítrico,
- g) Glicosídeos cianogênicos, encontrados em plantas que contêm ácido cianídrico (como a mandioca brava)
- h) Biotoxinas aquáticas, produzidas por algas e bactérias em ambientes aquáticos.

Esta última categoria, abrange também vários subgrupos de toxinas que podem ser classificados de acordo com seus efeitos em organismos de mamíferos (amnésicas, diarréicas, neutóxicas, paralisantes etc.) ou estrutura química (azaspirácidos, brevetoxinas, iminas cíclicas, ácidos domóicos, ácidos ocadáicos, saxitoxinas e outros). (VISCIANO et al., 2016)

Neste trabalho, dedicaremos especial atenção ao grupo das saxitoxinas.

Quadro 1. Resumo das diferentes estruturas dos congêneres de Saxitoxina. O destaque em vermelho indica os substituintes para Saxitoxina.

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
			-OCONH₂	⁻ OCONHOSO ₃	⁻ OH	H
H	H	H	STX	GTX₅ (B1)	DcSTX	DoSTX
OH	H	H	NEO	GTX₆ (B2)	DcNEO	-
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX₁	C3	dcGTX₁	-
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX₂	C1	dcGTX₂	doGTX₁
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX₃	C2	dcGTX₃	doGTX₂
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX₄	C4	dcGTX₄	-

Fonte: Adaptado de Etheridge, 2010.

Por causa de sua estrutura química, as STXs, quando ingeridas, provocam nos mamíferos as chamadas intoxicações paralisantes dos mariscos (do inglês paralytic shellfish poisonig – PSP), pois possuem a habilidade de que atuar bloqueando os canais de sódio em células nervosas, causando paralisia e podendo levar a morte. Altos níveis dessas toxinas podem ser encontrados durante episódios de floração de bactérias ou algas ou devido à fenômenos de eutrofização em corpos hídricos, que leva a uma maior produção de toxinas, seja pelo ambiente favorável, ou como mecanismo de defesa dessas espécies. (O'NEILL; MUSGRAVE; HUMPAGE, 2016)

Dentre os diversos vetores que propagam essas toxinas para humanos estão:

- a) O consumo de frutos do mar, em especial moluscos bivalves, pois apresentam a capacidade de acumular em seu organismo diversas substâncias tóxicas
- b) O consumo da própria água com altas concentrações destas substâncias. (DE SOUZA; DA SILVA; NOVAES, 2022; ETHERIDGE, 2010; O'NEILL; MUSGRAVE; HUMPAGE, 2016; VISCIANO et al., 2016)

Ambos os casos recebem especial atenção na região sul do país. Em especial, Santa Catarina, que é responsável por mais de 95% da produção de todos os moluscos consumidos no Brasil. Sua capital, Florianópolis, é considerada a maior produtora de ostras, bem como de vieiras. Essa região apresenta histórico de proliferação de algas e cianobactérias produtoras deste tipo de toxina em corpos de água utilizados tanto para o abastecimento público, quanto para a maricultura. (DE SOUZA; DA SILVA; NOVAES, 2022)

Dentro do mesmo estado, um caso de interesse público é a Lagoa do Peri, um reservatório que faz parte de uma área de proteção ambiental utilizada pela secretaria de abastecimento de SC para fornecimento de água para região sul do município de Florianópolis (figura 2), atendendo mais de 100 mil pessoas. (PICARDO et al., 2019; PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS, [s.d.]

Figura 2. Lagoa do Peri, localizada no município de Florianópolis.



Fonte: Google Maps.

Trabalhos relatam a presença de cianobactérias da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, conhecida pela produção de, entre outras substâncias, saxitoxina desde 1994 (KOMÁRKOVÁ; LAUDARES-SILVA; SENNA, 1999; LAGOS et al., 1999; RAMOS et al., 2021)

É comum, aos moradores da região, depararem-se com notícias (jornais, blogs ou redes sociais) ou notas publicas legais com avisos sobre os riscos envolvidos em corpos de água utilizados para abastecimento público/recreação bem como o consumo de produtos de maricultura na região em período de floração de algas ou bactérias. (CALDAS, 2016; G1 SC, 2021; G1 SC; NSC TV, 2021; REDAÇÃO ND, CRICIÚMA, 2022)

2.3 Legislação brasileira

2.3.1 Normas de controle para STX

É inegável que o acesso a água potável é algo intrínseco para a manutenção do direito à vida. Direito este que consta como um dos fundamentos da Constituição da República Federativa do Brasil, de 1988, (caput do art. 5º, que trata os direitos e garantias fundamentais, no capítulo dos direitos e deveres individuais e coletivos)

além de também ser assegurado pela Declaração Universal de Direitos Humanos de 1948 (ONU), artigo XXV. Logo, é dever do estado providenciar meios para que isso se torne possível. (“CONSTITUIÇÃO DE 1988”, 1988; ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 1948; PEDROSO MELEGARI, 2010)

No Brasil, fica a cargo do Ministério de estado da saúde elaborar normas e procedimentos para o controle para com a qualidade da água. Segundo a PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017, fica aos cuidados dos estados e municípios a coleta de amostras e análise mensal em mananciais de interesse público enquanto a contagem de espécies potencialmente produtoras não exceder o valor de 20.000 células.mL⁻¹(vinte mil células por mililitro) e análise semanal para contagens acima desse valor. É interessante notar uma certa contradição nessa parte texto, pois ao verificar os anexos referentes à essa legislação, notamos que o valor mostrado é metade daquele citado anteriormente.

Figura 3. Imagem retirada do documento PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017 referente às normas de monitoramento de cianobactérias. O valor para contagem de células é de 10.000 (dez mil), enquanto no texto da portaria é de 20.000 (vinte mil)

ANEXO 11 DO ANEXO XX	
TABELA DE FREQUÊNCIA DE MONITORAMENTO DE CIANOBACTÉRIAS NO MANANCIAL DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA (Origem: PRT MS/GM 2914/2011, Anexo 11)	
Quando a densidade de cianobactérias (células/mL) for:	Frequência
≤ 10.000	Mensal
> 10.000	Semanal

Fonte: PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017

Segundo a mesma portaria, sempre que for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores de cianotoxinas, deve também realizar análise para detecção e quantificação dessas toxinas. O valor máximo permitido, VMP para equivalentes de saxitoxina, STX/L (valor que corresponde à somatória das quantidades intra e extracelular de análogos à saxitoxina) é estabelecido como 3,0 µg.L⁻¹ (três microgramas por litro) e a análise deve ser realizada com mesma frequência. (“CONSTITUIÇÃO DE 1988”, 1988; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; PEDROSO MELEGARI, 2010)

2.3.2 Métodos de detecção e análise padrão para STX

Os procedimentos estabelecidos na legislação brasileira para o controle da qualidade de água não versam especificamente sobre o método de identificação/quantificação de substâncias potencialmente perigosas. No entanto, o artigo 22 da sessão V (dos laboratórios de controle e vigilância) do capítulo III (das competências e responsabilidades) contidos na portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 (inclusa na portaria de consolidação) do ministério da Saúde, deixa claro que:

“As metodologias analíticas para determinação dos parâmetros previstos nesta portaria devem atender às normas nacionais ou internacionais mais recentes, tais como:

- I. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de autoria das instituições American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) e Water Environment Federation (WEF);
- II. United States Environmental Protection Agency (USEPA);
- III. normas publicadas pela International Standardization Organization (ISO);
- IV. metodologias propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS).”

De forma geral, essas normas versam sobre padrões de procedimento para coleta e armazenamento de amostras a serem analisadas, mas são suficientes quanto à uma normatização de técnicas a serem utilizadas.

Orientações analíticas para monitoramento da população de algas/cianobactérias e suas toxinas associadas não se fazem presentes na coleção Standard Methods que apenas define, em linhas gerais, recomendações de amostragem e armazenamento de amostras para análise. (BRIDGEWATER et al., 2017)

O mesmo ocorre para os padrões de potabilidade da ISO, que apenas determinam padrões para amostragem, armazenamento e confiabilidade de análises. (“ISO - International Organization for Standardization”, [s.d.]

USEPA e WHO sugerem o uso de Imunoensaios² para detecção de toxinas mas advertem para o fato de que esse tipo de teste não apresenta boa distinção entre espécies congêneres, ou seja, detectam classes de toxinas mas não distinguem entre elas. Ambos também recomendam o uso de técnicas cromatográficas (onde há separação de substâncias em uma mistura) acopladas a outras técnicas de detecção (como espectrometria de massas ou espectroscopia UV-vis, por exemplo) para se

² Ensaios bioquímicos onde a presença ou concentração de uma macromolécula ou uma pequena molécula em uma solução é avaliada através do uso de um anticorpo ou um antígeno.

obter uma melhor resolução, pois conseguem diferenciar espécies de toxinas parecidas e possibilitam obter informações sobre a razão entre espécies congêneres caso uma amostra da toxina de interesse esteja disponível na forma pura. (CHORUS; WELKER, 2021; US EPA, 2018)

Talvez por isso, ainda na mesma seção, da mesma portaria citada anteriormente, o artigo 17, inciso III diz que compete ao ministério da saúde:

“definir os critérios e os procedimentos para adotar metodologias analíticas modificadas e não contempladas nas referências citadas no art. 22 desta Portaria.”

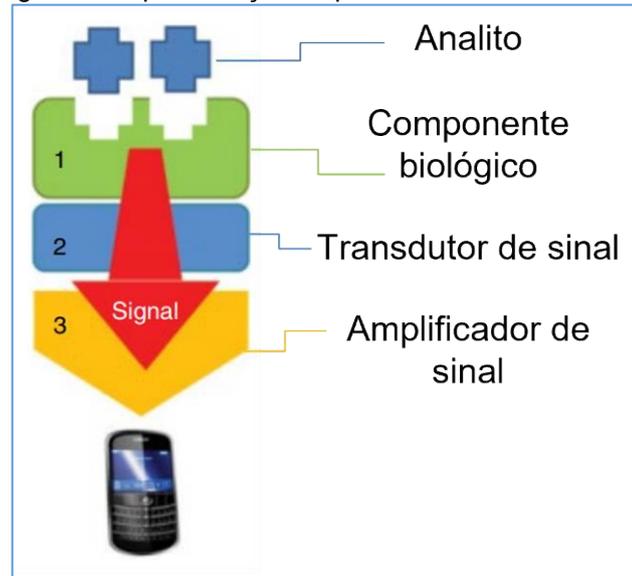
Nesse sentido, muitos trabalhos vêm sendo apresentados nos últimos anos com o intuito de aprimorar técnicas já utilizadas ou propor novos modelos de detecção para as mais diversas aplicações na área de monitoramento ambiental. (KREWSKI et al., 2020; REGUEIRAS, 2009; SANTOS, 2018; TIAN et al., 2021)

2.4 Biossensores

Biossensores são dispositivos que utilizam reações bioquímicas num sistema para detecção/quantificação de alguma substância de interesse, chamada de analito. (CHEMISTRY (IUPAC), [s.d.]

Esse tipo de dispositivo apresenta muitas possibilidades de construção, a partir de uma infinidade de componentes bio e tecnológicos. No entanto, podemos dizer que são basicamente compostos por um elemento de reconhecimento bioquímico (proteínas, enzimas, anticorpos etc.) responsável por realizar uma interação específica com o analito de interesse, um transdutor de sinal, que traduz a extensão das reações bioquímicas em um sinal que seja detectável (uma mudança em alguma propriedade física que pode ser medida) e um método de detecção/quantificação, através do qual seja possível interpretação desses dados. A figura 4 ilustra um esquema típico para esse tipo de sistema.

Figura 4. Representação esquemática de um biosensor.



Fonte: Adaptado de ALTINTAS, 2018

Portanto a construção de um biosensor é complexa, envolvendo uma ampla gama de áreas de estudo e depende de diversos fatores relacionados ao tipo de aplicação a qual este se destina. (ALTINTAS, 2018)

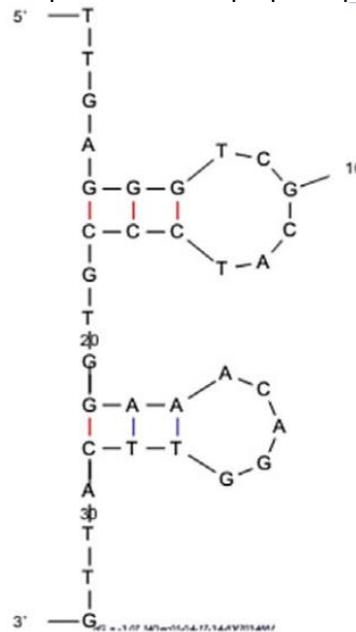
2.4.1 Elemento de reconhecimento

É o tipo de componente utilizado para interação com o analito-alvo. Este deve garantir uma interação única, a fim de se obter uma especificidade de análise. Pode ser uma proteína, enzima, anticorpo, cadeias de DNA ou RNA (simples ou dupla hélice), entre outros. (ALTINTAS, 2018; JEONG-YEOL YOON, 2016)

Nesse trabalho, foi utilizada uma cadeia de aptâmero como elemento de reconhecimento. Aptâmeros são sequências de oligonucleotídeos (DNA, RNA) selecionadas com base em sua capacidade de ligar-se a um analito-alvo. Eles vêm atraindo o interesse nas últimas décadas, em inúmeros trabalhos, devido suas vantagens, que incluem, a facilidade de síntese em laboratório (dispensando o uso de seres vivos como produtores de material biológico), facilidade de derivação em sua estrutura e a possibilidade de fabricação em larga escala. (JEONG-YEOL YOON, 2016; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

Diversos grupos de pesquisa vêm atuando na busca de sequências de aptâmeros cada vez mais específicos para os mais diversos fins. A figura 4 ilustra uma sequência, denominada M30-f, proposta por Zheng e colaboradores em 2015. Esta sequência apresenta capacidade de ligação com STX de pelo menos 30 vezes maior do que outras sequências previamente conhecidas, apresentando afinidade de $K_D = 0.133$ mM em PBS-T a temperatura ambiente quando comparada por técnicas de toxicidade em ratos, células (neublastomas de ratos) e biointerferometria. (ZHENG et al., 2015)

Figura 5. Estrutura secundária do aptâmero M30-f proposto por Zheng e colaboradores.



Fonte: ZHENG et al., 2015

2.4.2 Transdutores de sinal

Transdutores são dispositivos que convertem as mudanças físicas que ocorrem quando um elemento de reconhecimento interage com o analito-alvo em um sinal detectável/mensurável. Ou seja, são conversores de sinal. Podem trabalhar na conversão de mudanças de temperatura, massa, stress, umidade, pressão, luz ou sinais elétricos (voltagem). (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

Um transdutor eletroquímico, por exemplo, transforma uma reação de ligação em movimento de íons ou difusão de espécies eletroativas, que podem ser quantificados. Apresentam as vantagens de rápida análise, boa estabilidade e alta

sensibilidade. O tipo de sinal a ser observado e tratamento de dados depende da técnica a ser utilizada, podendo variar entre impedância, resistência etc. (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

Um biossensor eletroquímico combina a sensibilidade de técnicas eletroanalíticas com a bioseletividade dos elementos de reconhecimento utilizados. Além da facilidade de digitalização de dados e integração de sistemas. Talvez por isso, seja o tipo mais comumente escolhido. (JEONG-YEOL YOON, 2016; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

2.5 Técnicas utilizadas

A técnica utilizada para leitura de dados obtidos depende, logicamente do tipo de transdutor escolhido para o processo. Nesse trabalho, foi utilizado um transdutor eletroquímico, logo as técnicas aqui abordadas são respectivas ao uso desse tipo de biossensor ou sua caracterização.

2.5.1 Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE)

A técnica de espectroscopia de Impedância eletroquímica consiste na aplicação de uma perturbação com forma sinusoidal (com caráter ondulatório) e com baixa amplitude a um sistema eletroquímico. Essa perturbação pode ser tanto uma diferença de potencial, V , como um fluxo de corrente i . A frequência dessa perturbação é variada ao longo de uma grande faixa para se obter um espectro de impedância. (RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010)

Para entender melhor essa técnica, podemos imaginar um circuito elétrico qualquer ao qual aplicamos uma perturbação ca (corrente alternada, aqui será usado para definir tanto corrente alternada como tensão alternada). Cada elemento nesse circuito (resistências, capacitores ou indutores) pode ser representados algebricamente segundo as leis de Ohm e Kirchoff e a resposta obtida para esse sistema será proporcional ao estímulo aplicado (em ambos os casos, deve gerar equações com o mesmo formato). Então, é possível resolver as diferentes equações de sistemas elétricos quando se tem conhecimento de uma das componentes do par perturbação/sinal. (D. YOUNG; A. FREEDMAN, 2015; LASIA, 2014)

Se essa perturbação se dá de modo senoidal, como mostra a figura 6, podemos controlar também a frequência do estímulo aplicado. Uma tensão ac pode ser representada por uma função do seguinte tipo:

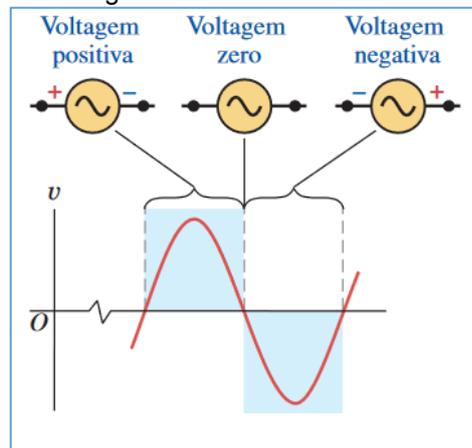
$$V(t) = V \cdot \cos(\omega t) \quad (1)$$

De modo análogo, uma corrente, com um valor máximo de I (amplitude de corrente) pode ser escrita na forma:

$$i(t) = I \cdot \cos(\omega t) \quad (2)$$

Ambas as equações descrevem equações de onda, onde V é o potencial aplicado, medido em Volts (V), I , é a amplitude de corrente, medida em Ampers (A), ω é a frequência angular definida como $\omega = 2\pi f$, e t é o tempo em segundos (s).

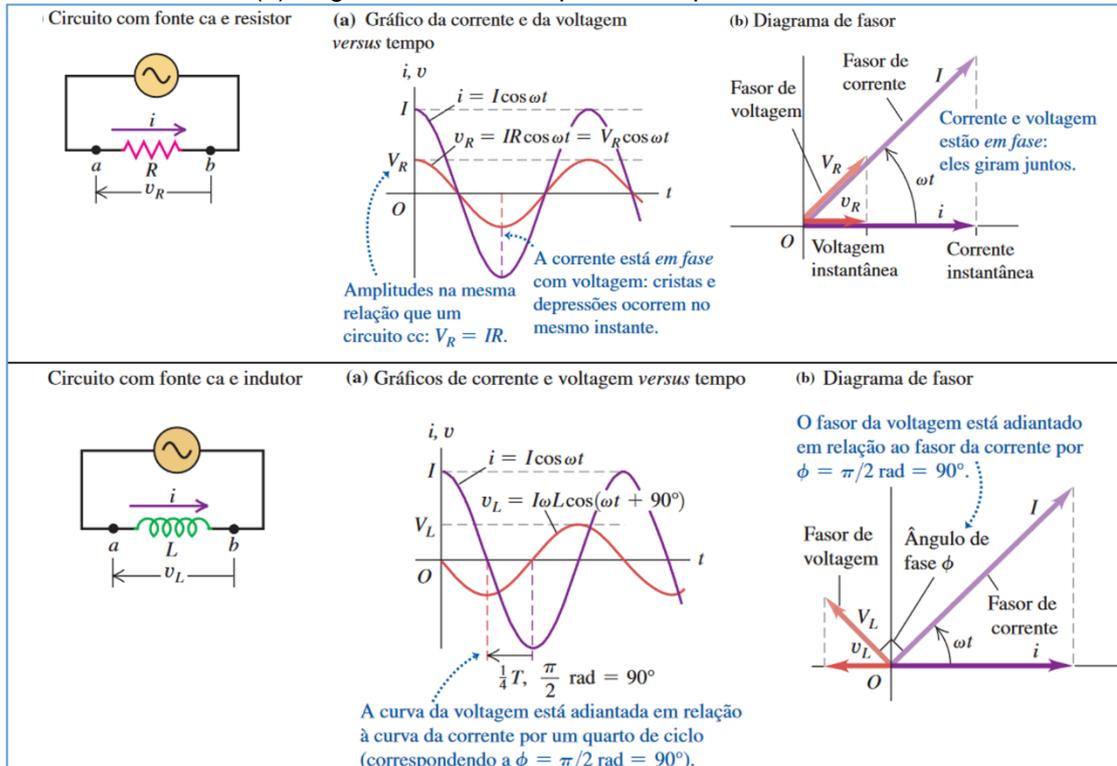
Figura 6. Voltagem através de uma fonte ca senoidal.



Fonte: D. YOUNG; A. FREEDMAN, 2015

Ao compararmos os perfis para o par sinal/resposta podemos notar que a corrente oscila com a mesma frequência que o potencial aplicado (ou vice-versa), mas com um deslocamento de fase dependente de um ângulo ϕ , chamado de ângulo de fase. (LASIA, 2014) O ângulo de fase é obtido através da representação dos valores de correntes e tensões utilizando diagramas vetoriais, semelhantes aos usados nos estudos dos movimentos harmônicos simples (Ver figura 7).

Figura 7. Representação de sinais sinusoidais aplicados a sistemas simples. Acima, um circuito formado por uma fonte ac e um resistor. Abaixo, um circuito formado por uma fonte ac e um indutor. Em ambos os casos (a) representa o comportamento de corrente e potencial em relação ao tempo e (b) diagramas de fasores para os respectivos casos.



Fonte: D. YOUNG; A. FREEDMAN, 2015

Nesses diagramas, o valor instantâneo de uma grandeza que varia senoidalmente com o tempo é representado pela projeção sobre o eixo horizontal de um vetor cujo comprimento fornece a amplitude da grandeza considerada. O vetor gira em sentido anti-horário com velocidade angular constante ω . Esses vetores rotativos são chamados de fasores, e um desenho com essas grandezas é chamado de diagrama de fasor. O ângulo entre um fasor da função potencial e fasor da função corrente é chamado de ângulo de fase, ϕ . Geralmente, representa-se as fases da voltagem em relação à corrente. (D. YOUNG; A. FREEDMAN, 2015)

A definição de impedância é dada por:

$$Z = \frac{V(t)}{i(t)} = \frac{V \cdot \cos(\omega t)}{I \cdot \cos(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\cos(\omega t)}{\cos(\omega t + \phi)} \tag{3}$$

Soluções para sistemas formados por vários elementos em diferentes arranjos, geralmente, estão no campo dos números complexos. Para esses sistemas,

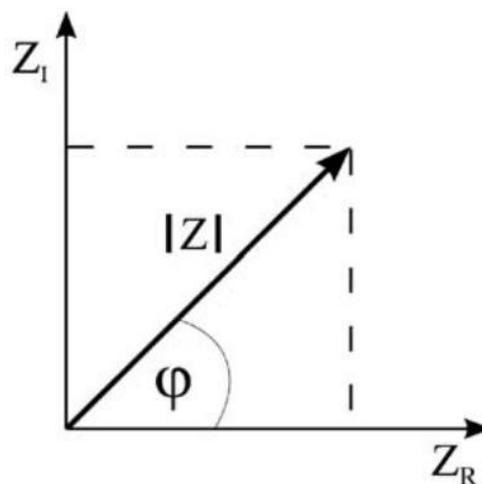
a obtenção dos perfis de resposta se torna difícil resolução pois envolve o uso de diferentes equações diferenciais integrais. No entanto, as transformações de Laplace/Fourier permitem transformar essas equações diferenciais/integrais em equações algébricas, facilitando sua resolução. Utilizando-se dessas transformações, pacotes de software para análise de dados de EIE possibilitam determinar a impedância de um sistema e resolver a equação 3 para um sistema qualquer. (LASIA, 2014)

O resultado é um valor complexo, expresso em função de ω :

$$Z(\omega) = Z' + jZ'' \quad (4)$$

Esses valores podem ser representados utilizando coordenadas retangulares³ em um plano $Re \times Im$, o que dá origem ao diagrama de Argand⁴. A figura 8 ilustra a impedância em termos desse diagrama.

Figura 8. A impedância é resultado do quociente entre a função ddp e função corrente. Pode ser expressa em termos de módulo de impedância $|Z|$, e ângulo de fase φ , ou com um gráfico de Z_{rel} vs Z_{im} (Nyquist).



Fonte: LASIA, 2014

Se usarmos coordenadas retangulares temos:

$$Z' = Re(Z) = |Z| \cos(\varphi) \quad (5)$$

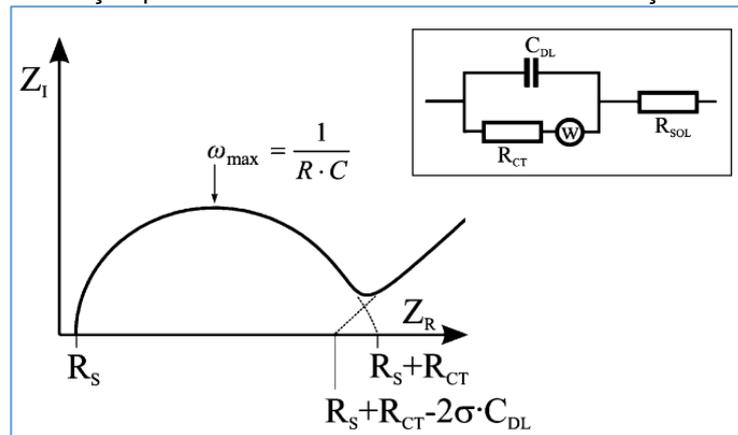
$$Z'' = Im(Z) = |Z| \sin(\varphi) \quad (6)$$

³ Também chamadas de coordenadas polares.

⁴ Também conhecido como plano complexo ou, mais popularmente, gráfico de Nyquist.

Ao se realizar uma varredura em uma faixa de frequências, o diagrama de Argand assume formas características de acordo com os diferentes processos que ocorrem no sistema sob investigação. A figura 9 mostra um diagrama com formato característico para um eletrodo imerso em solução na presença de uma reação redox.

Figura 9. Plot Nyquist e circuito de Randles para um eletrodo em contato com eletrólito. C_{dl} representa a capacitância de dupla camada elétrica resultante de carga sendo acumulada na interface eletrodo-solução. R_{ct} representa o fluxo de corrente devido a processos redox na interface. W é a impedância de Warburg resultante da impedância quando a corrente sofre influência de processos difusionais do seio da solução para a interface. R_s é a resistência da solução.



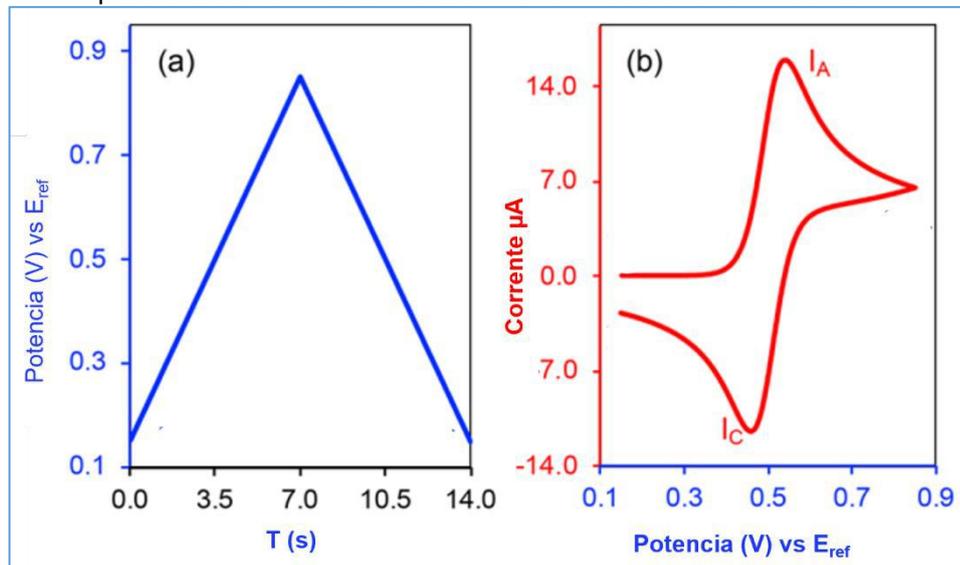
Fonte: LASIA, 2014.

Existem dois modos de tratamento de dados obtidos por EIE: Um deles é o tratamento matemático que, usando expressões padrão de Nernst-Planck-Einstein, Poisson, etc., prevê resoluções analíticas para as características do sistema. O outro se trata de um circuito elétrico atribuído aos processos eletroquímicos que ocorrem, simulando respostas semelhantes de correntes as que são produzidas pelo sistema analisado. A resposta de uma varredura de EIE pode então ser associada a um circuito elétrico que descreve as reações ocorrendo no sistema e, a partir do tratamento adequado de dados, essa técnica permite a obtenção completa e detalhada das características elétricas da interface eletrodo/solução, tornando-se assim amplamente empregada como método de monitoramento de reações em biossensores eletroquímicos. (LASIA, 2014; LISDAT; SCHÄFER, 2008)

2.5.2 Voltametria cíclica

Voltametria cíclica é uma técnica padrão de análise do comportamento de oxirredução de espécies eletroativas. Consiste na aplicação de um potencial que é variado de forma triangular com o tempo em relação a um eletrodo de referência (figura 10). Se uma espécie sofre reação de transferência de elétrons, o gráfico, chamado de voltamograma, é plotado em relação ao potencial aplicado, gerando uma curva característica. (PACHECO et al., 2013; SKOOG, 2014)

Figura 10. Gráfico de a) potencial aplicado em relação ao tempo e b) voltamograma cíclico resultante para atividade redox envolvendo transferência de 1 elétron. Fonte



Fonte: KHALAFI et al., 2021

Quando o potencial é variado durante uma medida de CV, as concentrações das espécies eletroativas próximas ao eletrodo mudam com o tempo. A equação de Nernst relaciona essa concentração com o potencial aplicado. (ELGRISHI et al., 2018)

$$V = V^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} = V^0 + 2,3026 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (7)$$

Onde V é o potencial medido no sistema e V^0 é o chamado potencial formal, obtido quando as concentrações de ambas as espécies oxidada, $[Ox]$ e reduzida, $[Red]$ são iguais (logo, a corrente é igual a zero). R é a constante dos gases, T é a temperatura, n é o número de elétrons envolvidos na reação e F é a constante de Faraday.

A combinação de velocidades de migração de espécies da/para a superfície do eletrodo de acordo com o potencial aplicado, dá origem à separação de picos levando ao formato característico em forma de “pato”. (ELGRISHI et al., 2018)

O que define a escala de tempo desse tipo de medida é a velocidade de varredura, ou seja, a velocidade com a qual o potencial é variado durante o experimento, o que faz dessa técnica uma ótima escolha para estudos cinéticos envolvendo transferência de elétrons. (BARD; FAULKNER, 2001; KHALAFI et al., 2021)

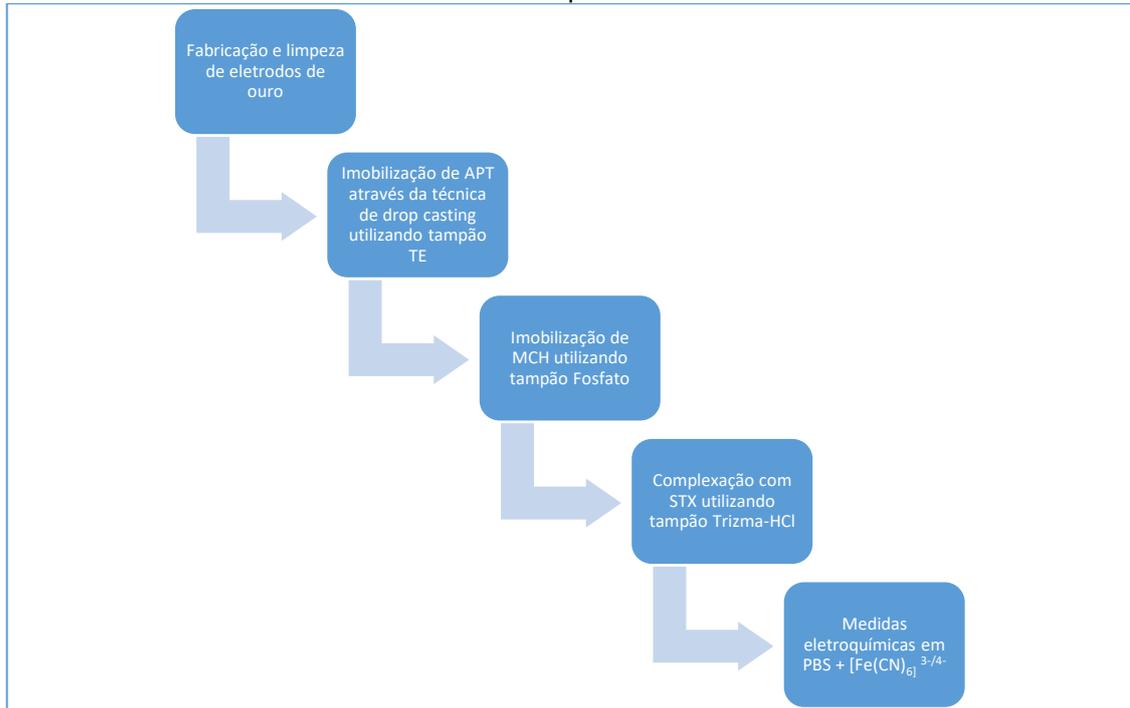
A técnica é uma ferramenta favorável para estudos exploratórios e suas aplicações incluem caracterizar o comportamento redox de compostos, determinar processos químicos que precedem ou sucedem reações eletroquímicas, avaliar a cinética de transferência eletrônica e muitas vezes, análise quantitativa. Quando associada a outras técnicas, a voltametria cíclica pode ser utilizada para elucidar processos complexos e corroborar com resultados já obtidos.

2.6 O trabalho de Serrano, 2021

Em 2021, um artigo publicado por Serrano na *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, demonstrou o trabalho do grupo de pesquisa LOOSA no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico capaz de quantificar STX em água.

A metodologia de fabricação do dispositivo proposta pelo grupo consiste na imobilização da sequência de oligonucleotídeo (APT) em uma superfície de ouro (eletrodo) através do processo de adsorção de tióis, passivação da superfície não totalmente coberta utilizando MCH (através do mesmo processo) e detecção de STX em água através de parâmetros eletroquímicos utilizando a técnica de EIE. Os procedimentos do trabalho são descritos de forma simplificada no fluxograma apresentado na figura 11:

Figura 11. Fluxograma resumindo as etapas de fabricação de um biossensor eletroquímico, propostas e utilizadas por Serrano.

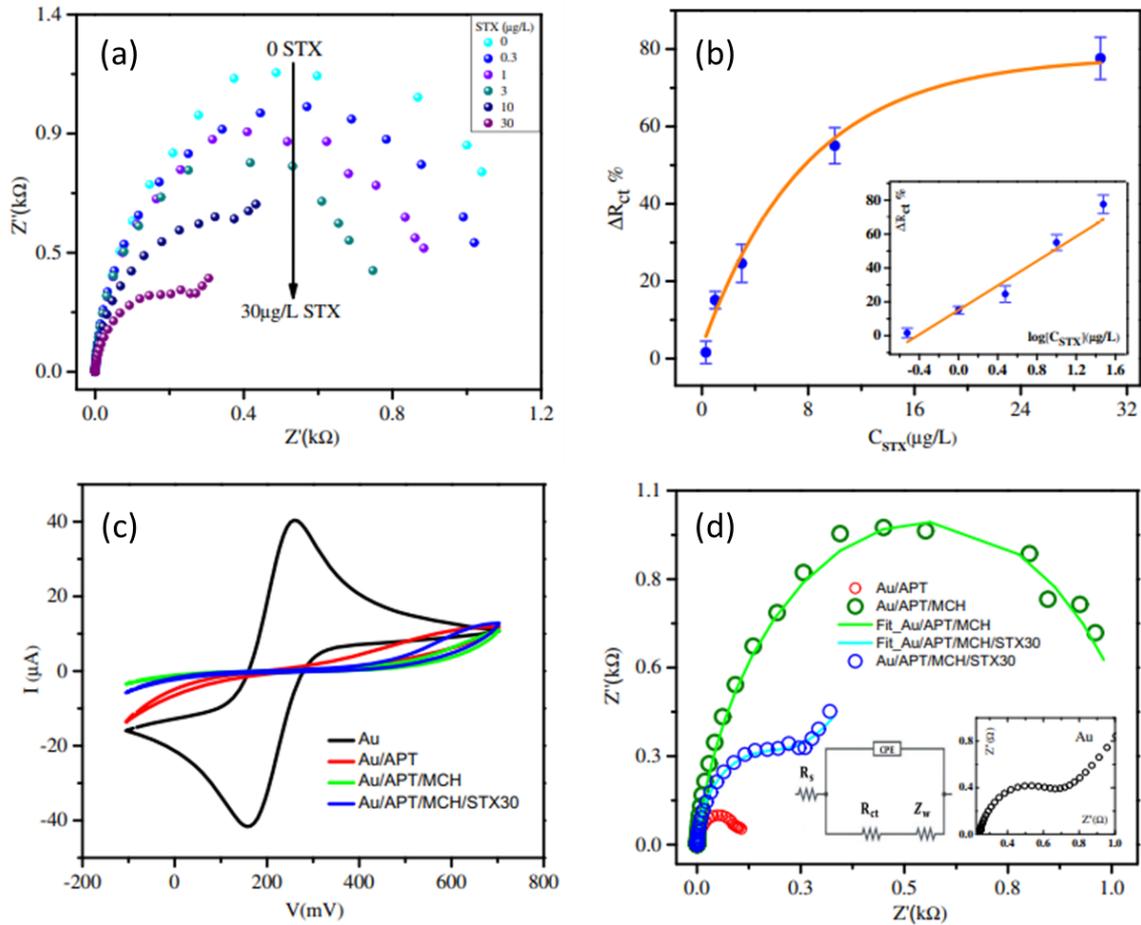


Fonte: Elaborado pelos autores.

Medidas de CV e EIE foram utilizadas para acompanhar cada etapa do processo utilizando cerca de 50,0 mL de solução tampão PBS + $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+/3+}$ a 5,0 mmol. L⁻¹ em água.

Em seu trabalho, o autor avaliou a dependência dos valores de R_{ct} com a concentração de saxitoxina bem como durante todo o processo. A figura 12 resume o trabalho de Serrano e colaboradores.

Figura 12. Resultados de CV e EIE para as diversas etapas de fabricação do biossensor proposto por Serrano, 2021. (a) diagramas de nyquist normalizados para STX em diferentes concentrações. (b) curva de calibração obtida a partir dos dados anteriores. (c) dados de CV e (d) EIE obtidos para as diferentes etapas de fabricação do biossensor. As medidas foram realizadas em tampão PBS contendo 5,0 mM do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.



Fonte: Retirado de Serrano, 2021

Essa publicação foi utilizada como ponto de partida para o estudo apresentado nesta dissertação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos GERAIS:

- a) Revisão do processo de fabricação de um biosensor eletroquímico proposto por Serrano,2021, atualmente em estudo no grupo de pesquisa LOOSA;
- b) Análises dos processos de fabricação utilizados e racionalização de possíveis otimizações nas condições de fabricação utilizadas;

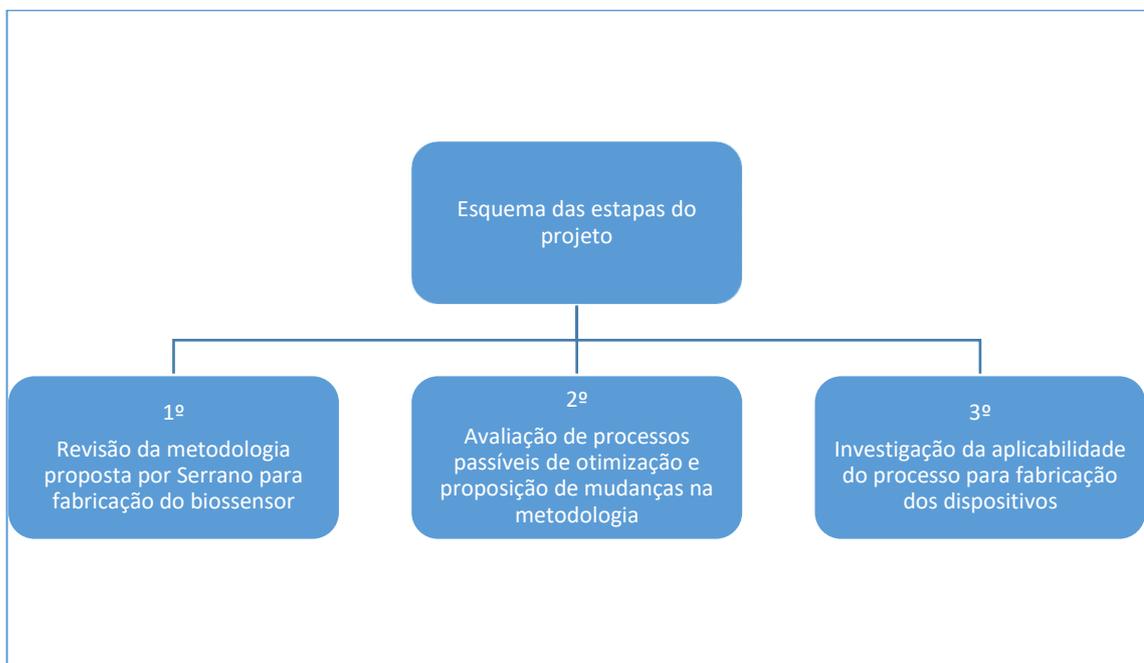
3.2 Objetivos Específicos

- a) Fabricação de eletrodos de ouro a serem utilizados nesse trabalho;
- b) Funcionalização de eletrodos utilizando compostos com terminação tiól;
- c) Avaliação do processo de adsorção e formação de monocamada auto-organizada utilizando uma sequência de Aptâmero com grupo tiol e 6-mercaptotaxanol em eletrodos de ouro através da técnica de EIE;
- d) Teste de aplicação dos eletrodos funcionalizados em diferentes concentrações de saxitoxina em meio aquoso;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido em 3 etapas principais, que englobam os objetivos do projeto de pesquisa (ver figura 13). Durante a primeira parte, foi realizada uma avaliação do trabalho publicado por Serrano e levantamento bibliográfico acerca dos processos utilizados. Na segunda etapa, foram propostas mudanças no processo a fim de simplificar a fabricação do dispositivo. E por fim, na terceira etapa a parte prática do projeto foi aplicada, com a avaliação do ajuste no modo de fabricação e testes com STX.

Figura 13. Fluxograma representativo das etapas deste projeto de pesquisa.



Fonte: Elaborado pelos autores.

4.1 Materiais utilizados

Neste trabalho foi utilizada uma sequência de oligonucleotídeo adquirida comercialmente junto à empresa [GenOne](#). A estrutura foi funcionalizada com um grupo tiol na extremidade 3' e apresenta a seguinte sequência: 5'- T TGA GGG TCG CAT CCC GTG GAA ACA GGT TCA TTG AAA AAA AAA AA-3'-C₆-SH (K_d = 133 nM em PBS-T), que foi descrita por Zheng e colaboradores como sendo otimizada para ligação com STX.

Tampão Trizma-HCl (pH=5), Ácido Etilenodiaminotetracético, 6-Mercapto-1-hexanol, Solução de Saxitoxina em HCl, hidróxido de potássio, Suspensões de alumina (1,0 e 0,3 μm), tampão fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS, pH=7,4), Hexacianoferrato de Potássio (II e III), Cromo e Ouro para evaporação foram todos adquiridos comercialmente junto à Sigma-Aldrich.

Lâminas de silício tipo P (dopado com Boro, plano 100) foram obtidas junto ao [Laboratórios de Sistemas Nanoestruturados – LabSiN](#) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Durante toda a realização desse trabalho foi utilizada água deionizada (AD, Millipore®, 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$) adquirida junto ao [Laboratório de Filmes Finos e Superfícies – LFFS](#) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.2 Preparo das soluções

Para a reconstituição do aptâmero⁵ a ser utilizado, foram seguidas as orientações básicas descritas em notas técnicas de [AMRESCO® Buffers](#) (“AMRESCO Buffers”, 2001) e [AMSBIO protocol](#) (“General Handling Protocol for Aptamer”, [s.d.]) Primeiramente o tubo com o material liofilizado foi levado a uma centrífuga por 10 minutos para garantir que todo o conteúdo estivesse disponível no fundo do tubo. Após esse processo, a faixa de DNA foi reconstituída em 630 μL de solução tampão TE, seguida de agitação leve por cerca de 5 minutos. O material, foi dividido em 42 alíquotas de 15 μL , cada uma em um tubo eppendorf de 2 mL. Esse material foi guardado no congelador até o uso.

Soluções contendo APT, MCH e STX foram preparadas a partir da dissolução de quantidades cuidadosamente avolumadas em tampão PBS em água deionizada contendo 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

4.3 Fabricação dos eletrodos de ouro

Neste trabalho, foram utilizados eletrodos compostos por uma fina camada de ouro depositada sobre a superfície de silício (substrato) utilizando Cromo (Cr) como agente de ligação.

⁵**Reconstituição** corresponde a adição de um excipiente próprio a um medicamento em pó ou pó liofilizado para obtenção do fármaco em solução.

As lâminas de silício foram submetidas à limpeza através de imersão em acetona durante 20 minutos seguida de imersão em etanol por 5 minutos e extensa lavagem com AD. As lâminas foram secas com jatos de gás nitrogênio (2.2) logo após a lavagem com AD e imediatamente antes do processo de deposição. Para o processo de deposição foi utilizada uma evaporadora Thermionics, 3kW. A taxa de evaporação foi mantida constante em cerca de 0,5 (unidade/segundo) por aproximadamente 1:30 minutos. Obtendo-se assim uma espessura de 5 nm de Cromo cobertos por uma camada de 50 nm de ouro. O material foi reservado até o uso.

4.3.1 Limpeza eletrodos de ouro

Cada eletrodo foi submetido a um processo de limpeza anterior ao uso de acordo com a metodologia descrita por (SERRANO et al., 2021). A influência desta etapa para o processo de fabricação de biosensor não foi avaliada nesse trabalho e, portanto, segue sem modificações:

- a) Limpeza física: os eletrodos foram gentilmente polidos com auxílio de um tecido (flanela 100% algodão) utilizando-se duas suspensões aquosas de alumina (Al_2O_3) com partículas de aproximadamente 1,0 μm e 0,3 μm de diâmetro, de forma consecutiva. Após o polimento os eletrodos foram lavados com água deionizada e submetidos a um banho assistido por ultrassom. Após o banho, os eletrodos foram novamente lavados com AD e armazenados em também em AD até a próxima etapa.
- b) Limpeza química: Os eletrodos que passaram pela etapa de limpeza física foram imersos em uma solução contendo KOH 50,0mM/ H_2O_2 30% em uma proporção 3:1, respectivamente, durante 10 minutos. Após esse período, foram lavados com AD armazenados em AD até a próxima etapa.
- c) Limpeza eletroquímica: Após a etapa de limpeza química os eletrodos foram submetidos a polimento eletroquímico composto por voltametria cíclica (200 ~ 1200 mV (vs. Ag/AgCl), 50mV/s) em KOH 50,0mM. Após 20 ciclos, os eletrodos foram lavados com água e imediatamente e um espectro de EIE foi recordado para cada um.

4.3.2 Funcionalização da superfície

Cada eletrodo, foi submetido à incubação (imersão) em solução de APT $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ por longos períodos de tempo para avaliar o processo de adsorção na superfície de ouro, seguidos de incubação (imersão) em uma solução contendo $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de MCH durante o tempo necessário para alcançar o equilíbrio.

4.3.3 Complexação APT-STX

Para avaliar o processo de formação do complexo APT-STX, os eletrodos funcionalizados foram imersos em solução aquosa de PBS + $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ contendo diferentes concentrações de STX.

4.4 Caracterização eletroquímica

Durante a caracterização eletroquímica, foi adotado um sistema de três eletrodos, sendo um eletrodo de Ag/AgCl como referência, enquanto um eletrodo de platina foi utilizado como contra eletrodo. O eletrodo de trabalho feito de Au com área superficial de aproximadamente $60,0 \text{ mm}^2$. As medidas foram todas realizadas em temperatura ambiente utilizando uma solução de $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+/3+}$ em PBS (pH=7,4). O volume de trabalho utilizado foi de aproximadamente $10,0 \text{ mL}$.

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas utilizando-se um Potenciostato/Galvanostato Methron Autolab com módulo analisador de frequência FRA2. A varredura de frequência ocorreu na faixa de 10^{-1} até 10^5 Hz com amplitude de $10,0 \text{ mV}$. O valor para potencial de circuito aberto (OCP) foi tomado antes de cada medida e utilizado como potencial aplicado à célula.

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em uma faixa correspondente à $\pm 300 \text{ mV}$ em relação ao OCP Vs Ag/AgCl. A velocidade de varredura utilizada para as medidas variou na faixa entre $300 \sim 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Revisão do trabalho proposto por Serrano, 2021

Durante a revisão do trabalho, 3 pontos foram observados, fundamentais para garantir a estabilidade reprodutibilidade do sistema biosensor durante as medidas eletroquímicas. Esses pontos foram usados para guiar o andamento desse trabalho e serão abordados nos próximos tópicos (7.1.1 até 7.1.3)

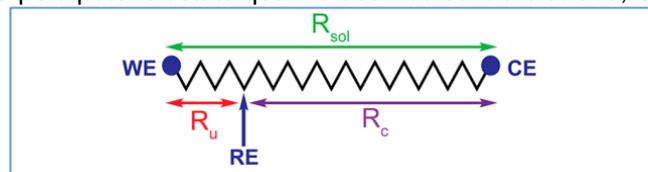
5.1.1 Ajuste da concentração do par redox para medidas eletroquímicas

Todas as soluções eletrolíticas possuem uma resistência intrínseca, chamada R_{sol} , composta por duas componentes (figura 14):

- R_c , compensada pelo próprio equipamento junto ao contra eletrodo
- R_u , chamada resistência não compensada (uncompensated resistance).

E por isso o potencial medido pode não ser o mesmo que o potencial sentido na superfície do eletrodo. (ELGRISHI et al., 2018)

Figura 14. Representação de uma célula eletroquímica acoplada a um potenciostato. Se a condutividade da solução aumenta, R_{sol} diminui e, portanto, R_u também diminui. Encurtar a distância entre os eletrodos de Trabalho, WE e referência RE, também diminui os valores de R_u . R_c geralmente é compensada pelo potenciostato quando usamos contra eletrodo, CE



Fonte: ELGRISHI et al., 2018

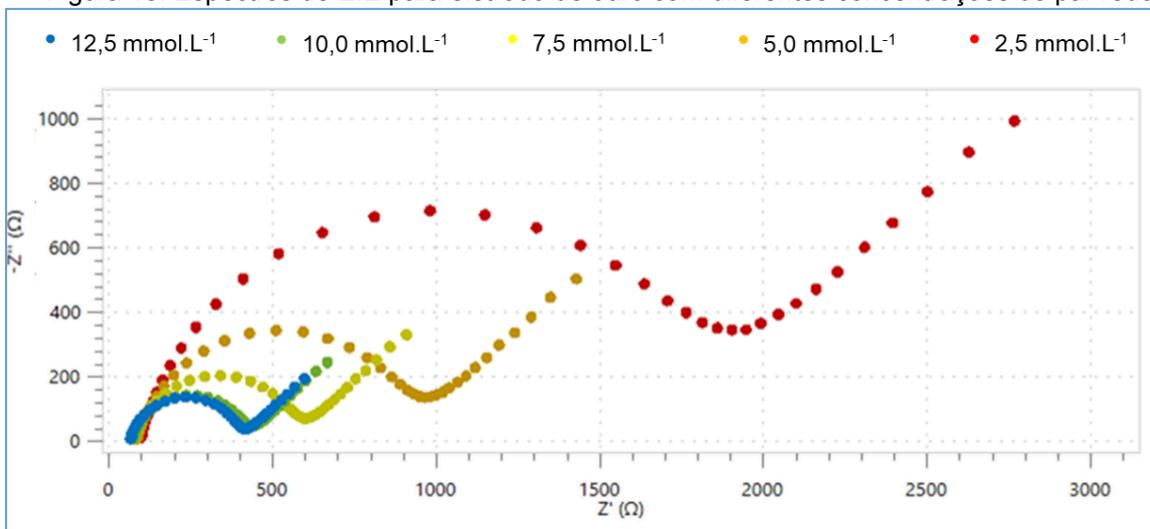
Para contornar esse problema, é aconselhável a adoção de três práticas comuns:

- Utilizar um eletrodo de trabalho de área menor ou menores velocidades de varredura (para voltamogramas);
- Aumentar a concentração de eletrólito;
- Diminuir a distância de separação entre eletrodos de referência e trabalho.

Durante medidas eletroquímicas, o que se deseja obter são curvas que reflitam os processos que ocorrem na superfície e a corrente que passa por um sistema depende da condutividade da solução. Uma maior concentração de eletrólito, diminui tal resistência, deixando o processo mais fiel e confiável. (BARD; FAULKNER, 2001) Além disso, alguns trabalhos descrevem como é possível melhorar o ajuste teórico de um espectro de impedância eletroquímica ao se trabalhar com soluções mais condutoras. (EATON; GEORGE; HANANIA, 1967; LASIA, 2014; SLUYTERS, 1960)

Isso posto, o primeiro ponto a ser avaliado foi a necessidade de correção das concentrações do par redox utilizadas para medidas eletroquímicas. Esses valores foram avaliados a partir de medidas de EIE utilizando eletrodos de ouro não modificados (apenas ouro, após o processo de limpeza). Os testes foram realizados variando-se as concentrações do par redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$) de 2,5 até 12,5 mmol.L⁻¹. A figura 15 mostra as curvas de EIE obtidas.

Figura 15. Espectros de EIE para eletrodo de ouro com diferentes concentrações do par redox.



Fonte: Elaborado pelos autores.

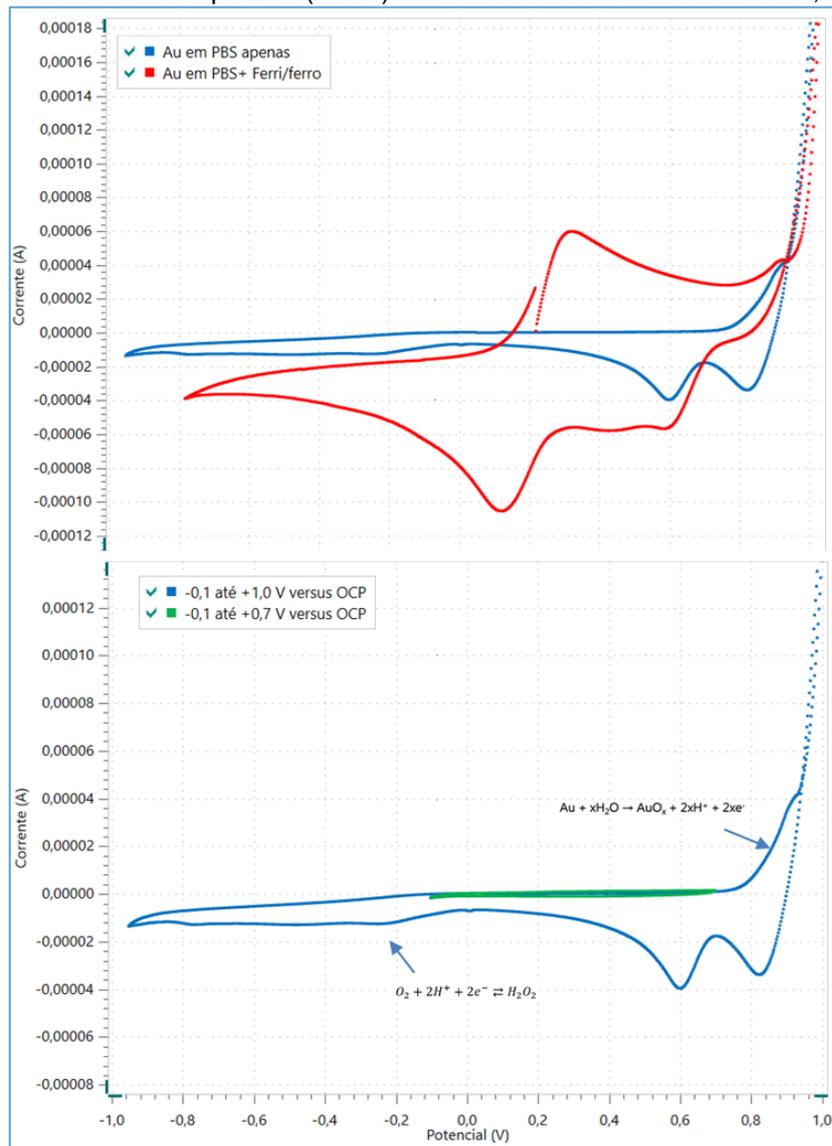
Quando a concentração do par redox excede o valor de 10,0 mmol.L⁻¹ a resistência da solução apresenta valor praticamente idêntico, não compensado o aumento de concentração a partir desse ponto. Logo, esse valor foi escolhido como a concentração de trabalho.

5.1.2 Ajuste da janela de potencial utilizada

Outro quesito a ser avaliado em medidas eletroquímica é a chamada janela de potencial, que determina os valores limites de potencial que podem ser aplicados ao sistema sem acarretar reações indesejadas.

Para avaliar a estabilidade dos eletrodos de ouro sob a faixa de potenciais utilizados, curvas de voltametria cíclica foram tomadas para o sistema com e sem presença do eletrólito suporte (apenas com tampão PBS) enquanto o potencial foi varrido entre -1,0 e +1,0 V.

Figura 16. Superior: curvas de voltametria cíclica para um eletrodo de ouro em PBS apenas (curva azul) e na presença do par redox(vermelha). O potencial foi varrido na faixa de -1,0 ~ +1,0 V em versus Ag|AgCl. Inferior: comparação da curva para PBS apenas(azul) com a janela de potencial com fluxo de corrente desprezível(verde). A velocidade de varredura foi de 0,1 V/s.



Fonte: Elaborado pelos autores.

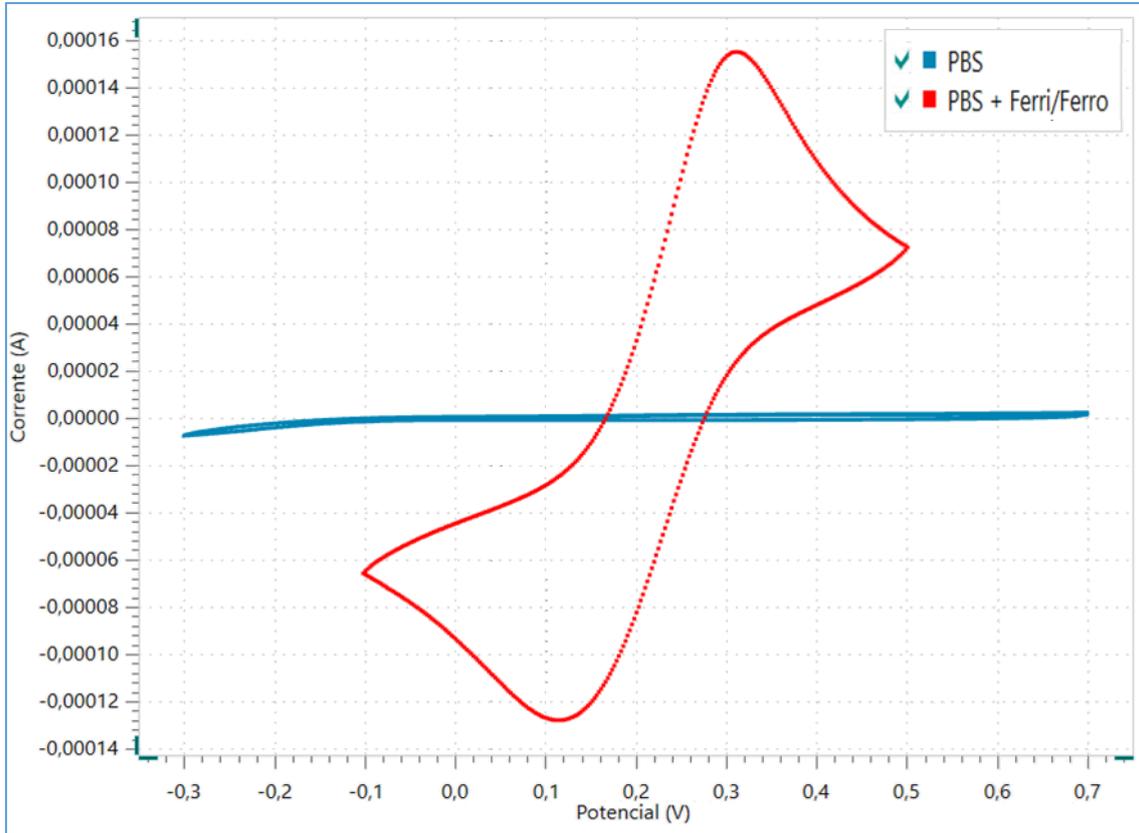
Na figura 16 podemos observar o comportamento de um eletrodo de ouro em solução PBS (curva azul) em comparação com o mesmo sistema com adição de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ (curva vermelha). Os potenciais foram aplicados em relação ao valor de OCP medido antes de cada varredura. Para o sistema sem a presença do par redox, o valor encontra-se bem próximo de zero, enquanto o sistema contendo o esse indicador o valor foi próximo de 220 mV. A varredura de potencial foi realizada primeiro em direção a valores mais positivos (oxidação) até aproximadamente 1,0 V onde ocorreu a inversão de varredura para valores mais negativos (redução) até o valor de aproximadamente -1,0 V, onde ocorreu uma nova inversão e o valor de potencial aplicado retornou ao valor de OCP.

A diferença entre os valores de corrente na presença e ausência do par redox é bem evidente. Enquanto temos uma região capacitiva (corrente zero) no início da varredura para o sistema sem o par redox, a adição de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$ gera picos de corrente significativos em torno de 0,323 correspondentes ao processo de oxidação da espécie $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$. O mesmo é observado quando avaliamos a corrente gerada próximo a 0,123 V que corresponde à redução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ enquanto para o sistema contendo apenas PBS o pico é inexistente.

Outros sinais são observados para ambos os sistemas, devendo estes serem resolvidos separadamente. Quando o potencial é direcionado para valores mais positivos, vemos um pico anódico com início em aproximadamente 0,7 V para a curva em azul. Isso indica o início do processo de oxidação do ouro, seguido de evolução de hidrogênio e, conseqüente, degradação do eletrodo. Para potenciais mais negativos, vemos um pico catódico de formação de peróxido, também com caráter degradativo. Essa mesma curva pode ser comparada com uma varredura utilizando uma menor janela de potencial (em verde) escolhida para excluir os processos citados.

A figura 17 mostra a repetição das medidas para os sistemas anteriores utilizando uma janela de potencial menor. Novamente, observamos uma curva característica para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, com picos de oxidação e redução próximos a +0,32 e +0,12 V, respectivamente. Fica evidente o caráter reversível das reações. A linha base, apenas com PBS não mostra nenhum pico apreciável nessa faixa e o valor de OCP para soluções contendo o par redox fica em torno de 220 mV.

Figura 17. Voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro em PBS apenas (Azul) e na presença do par redox. As linhas tracejadas marcam janela de potencial utilizada, entre -0,1~0,5 V vs Ag|AgCl. A velocidade de varredura foi de 0,1 V/s.



Fonte: Elaborado pelos autores.

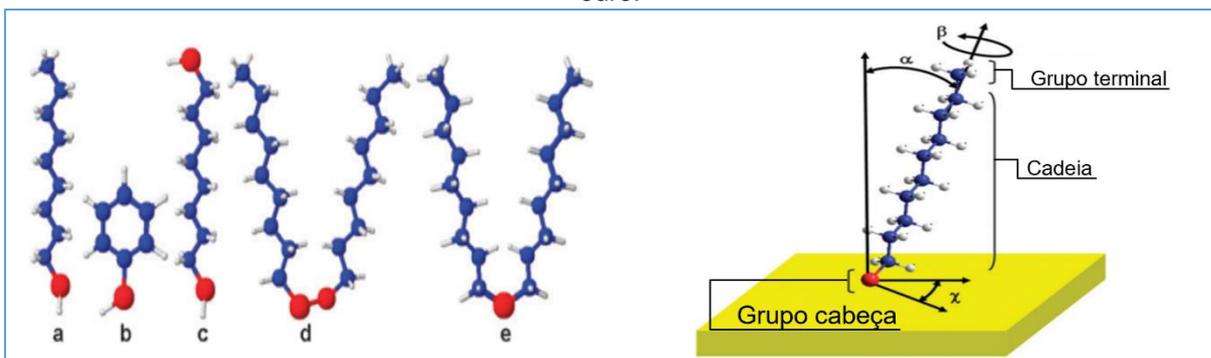
A partir desses dados, os valores para uma janela de potencial segura a ser utilizada durante os estudos eletroquímicos foram estabelecidos como ± 300 mV a partir do valor de OCP.

5.1.3 Uso de diferentes solventes (tampões) durante a modificação dos eletrodos

O trabalho proposto por Serrano, 2021 emprega o uso de moléculas contendo grupos tióis em suas terminações. Tais compostos possuem a habilidade de ligarem-se em superfícies metálicas. Esse processo leva à formação das chamadas camadas auto-organizadas, SAMs (Self-Assembled Monolayers). Esse tipo de sistema é formado a partir das diferentes interações que moléculas vizinhas possuem, levando à formação de um sistema empacotado, com alto grau de organização. (ALMEIDA, 2010; VERICAT et al., 2010)

Alguns exemplos de compostos contendo a terminação tiol são mostrados na figura 18.

Figura 18. A esquerda, alguns exemplos de compostos contendo tióis, capazes de formar SAMs em superfícies metálicas. a) 1-Nonanotiol, b) Tiofenol, c) 1,8-octanoditiol, d) dissulfeto de dinonanoila, e) 1,1-dinonanotiol. A direita esquema de uma molécula de decanotiol adsorvida em superfície de ouro com ângulos típicos de $\alpha=30^\circ$, $\beta=55^\circ$, e $\gamma=14^\circ$ para uma configuração estendida. Esferas vermelhas representam enxofre, azuis representam carbono, brancas representam hidrogênio e amarelo para ouro.



Fonte: VERICAT et al., 2010

Podemos considerar como um consenso na literatura que o processo de formação de SAMs por tióis sobre ouro ocorre em etapas (VERICAT et al., 2010):

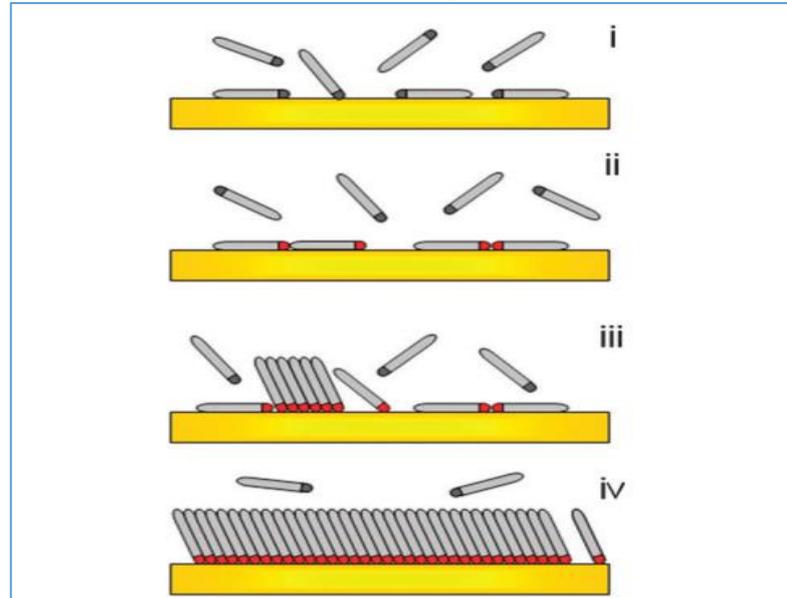
- adsorção sobre a superfície de ouro
- formação de ligação Au-S
- rearranjo estrutural e empacotamento.

De modo geral, as primeiras duas etapas do processo podem ser resumidas de acordo com duas equações químicas que representam os processos de adsorção (8) e formação de ligação química de tióis sobre uma superfície de ouro (9):



Vericat e seus colegas sugerem um esquema para entender melhor o processo total, até a completa formação de uma monocamada. Na figura 19 podemos ver o que eles sugerem serem duas etapas distintas (nucleação e formação das SAMs) que envolvem os processos de rearranjo estrutural. Este rearranjo ocorre porque SAMs são muito sensíveis a mudanças no caráter dielétrico de solventes.

Figura 19. Esquema dos diferentes passos durante a formação de SAMs a partir de tióis sobre superfície de ouro. i) fisissorção, ii) fase “deitada” (quimissorção), iii) nucleação e fase “de pé”, iv) levante completo



Fonte: VERICAT et al., 2010

Uma questão de extrema importância ao se trabalhar com SAMs é a cinética do processo de organização desse tipo de sistema. Estudos mostram processos de formação de monocamadas variando de algumas horas até alguns dias, dependendo do tipo de cadeia que a molécula apresenta, modo de formação da monocamada, e do meio em que o material está inserido. (SUBRAMANIAN; LAKSHMINARAYANAN, 2000)

XU e sua equipe propõe que, para estudos utilizando SAMs, o mais adequado é que se utilize o mesmo solvente para diminuir efeitos de interação e rearranjo das monocamadas (XU et al., 2019) enquanto que o grupo de Zheng, que desenvolveu o aptâmero utilizado neste trabalho, deixa claro o uso do mesmo tampão, PBS-T, durante todo o processo de avaliação para evitar interferências indesejadas. (ZHENG et al., 2015)

Com base nesse tópico, o presente trabalho propõe uma mudança no procedimento de fabricação de biossensores de Serrano através da utilização de um único solvente (um único tampão) durante todo o processo, em lugar de vários. Para tanto, todo o trabalho foi desenvolvido em solução tampão PBS contendo $10,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ em AD, exceto quando for dito o contrário.

Quadro 2: Lista de comparação das soluções tampão utilizadas por Serrano, 2021 e as utilizadas neste trabalho.

Tampões utilizados por Serrano:	Tampões utilizados neste trabalho:
TE (armazenamento e diluição apt),	TE (armazenamento apt)
PB (armazenamento e diluição MCH)	Triz-HCl (Armazenamento STX)
Triz-HCl (Armazenamento e diluição STX)	PBS (diluição e medidas eletroquímicas)
PBS (medidas eletroquímicas)	

Fonte: Elaborados pelos autores.

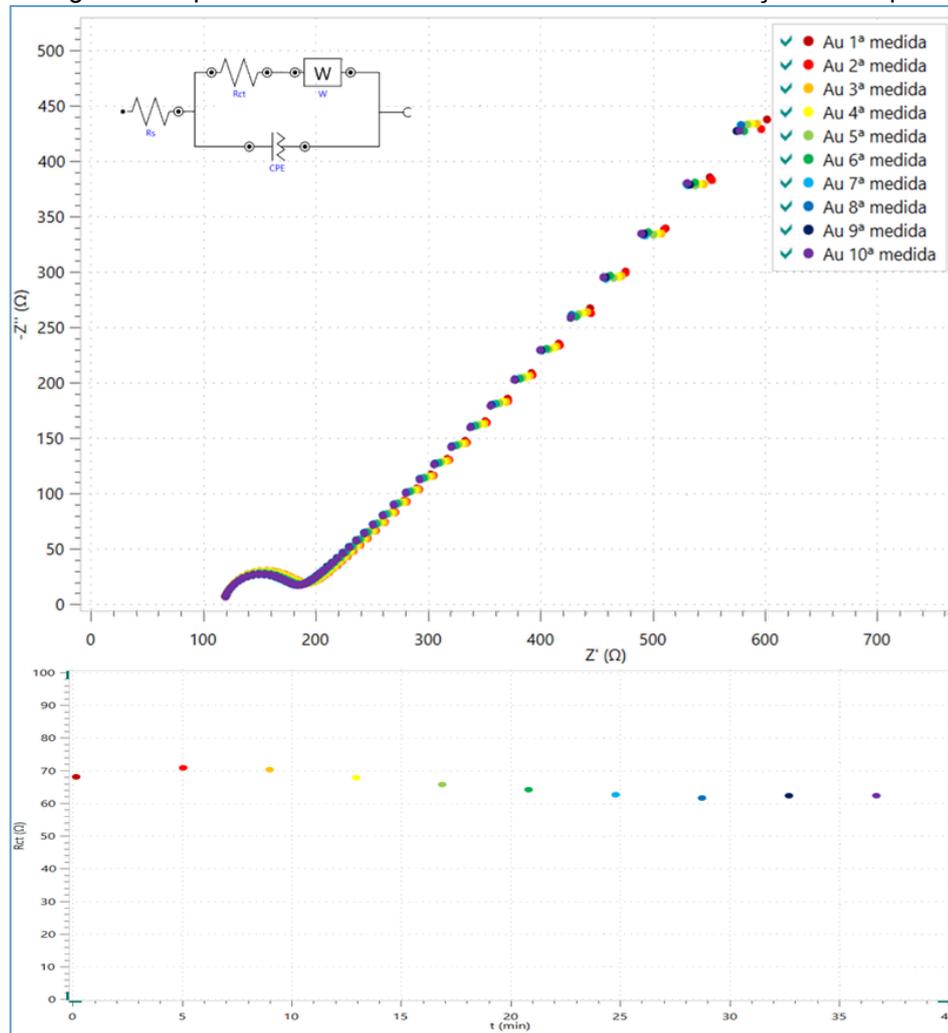
O quadro 2 traz as listas de tampões utilizados por Serrano, 2021 e os sugeridos neste trabalho para comparação. Os tampões TE e Triz-HCl, antes utilizados em grande quantidade para diluição de amostras e preparo de eletrodos, serão utilizados neste trabalho apenas para armazenamento de material (APT e SXT, respectivamente) em volumes reduzidos. Portanto seu uso, em termos de volume, foi praticamente insignificante neste trabalho.

5.2 Avaliação dos eletrodos não modificados

O procedimento para fabricação e limpeza dos eletrodos de ouro utilizados durante esse trabalho não sofreu alteração, portanto é o mesmo processo proposto por Serrano, o qual está descrito na sessão de procedimentos experimentais.

A figura 20 ilustra uma curva de EIE típica para os eletrodos produzidos, após processo de limpeza. Através do semicírculo no gráfico de Nysquist é possível calcular a resistência a transferência de carga para o eletrodo de ouro (R_{ct}) e tomá-la como base para avaliar o processo de limpeza.

Figura 20. Diagrama de Nyquist para um eletrodo de ouro após processo de limpeza. A inserção mostra o circuito de Randles (modificado) que foi utilizado para o ajuste teórico da Impedância. O gráfico na parte de baixo mostra os valores de R_{ct} em relação ao tempo.



Fonte: elaborado pelos autores.

Nota-se que a região dominada por baixas frequências (parte linear, a direita) se apresenta como muito superior àquela de altas frequências (semicírculo, a esquerda). Demonstrando que o processo de transferência de carga se dá de forma muito rápida para o sistema avaliado.

Os dados obtidos foram modelados de acordo com o circuito de Randles (inserção da figura 20) de onde os valores de resistência de transferência carga foram obtidos. É possível observar um decréscimo no valor de R_{ct} até uma faixa de aproximadamente 62,062 Ohm. A diferença no valor de R_{ct} entre o 1º e o 10º ciclo é de aproximadamente 5,04%. Tanto o valor de R_{ct} quanto a baixa variância entre os valores após várias medidas, evidenciam um bom processo de limpeza. (FISCHER et al., 2009)

5.3 Avaliação dos processos de formação de SAM

Para avaliar o processo de adsorção, foram realizadas medidas de EIE em diferentes tempos durante a imersão dos eletrodos para as soluções de APT, MCH e Sxt (ver apêndices B e C). A avaliação desse processo visa trazer luz sobre o equilíbrio e estabilização das monocamadas formadas, a fim de dirimir desvios e interpretações errôneas de sinais.

A figura 21 mostra os valores de R_{ct} obtidos para o processo de formação de monocamadas com Au/APT e Au/APT/MCH em relação ao tempo. É possível identificar duas regiões presentes em cada processo:

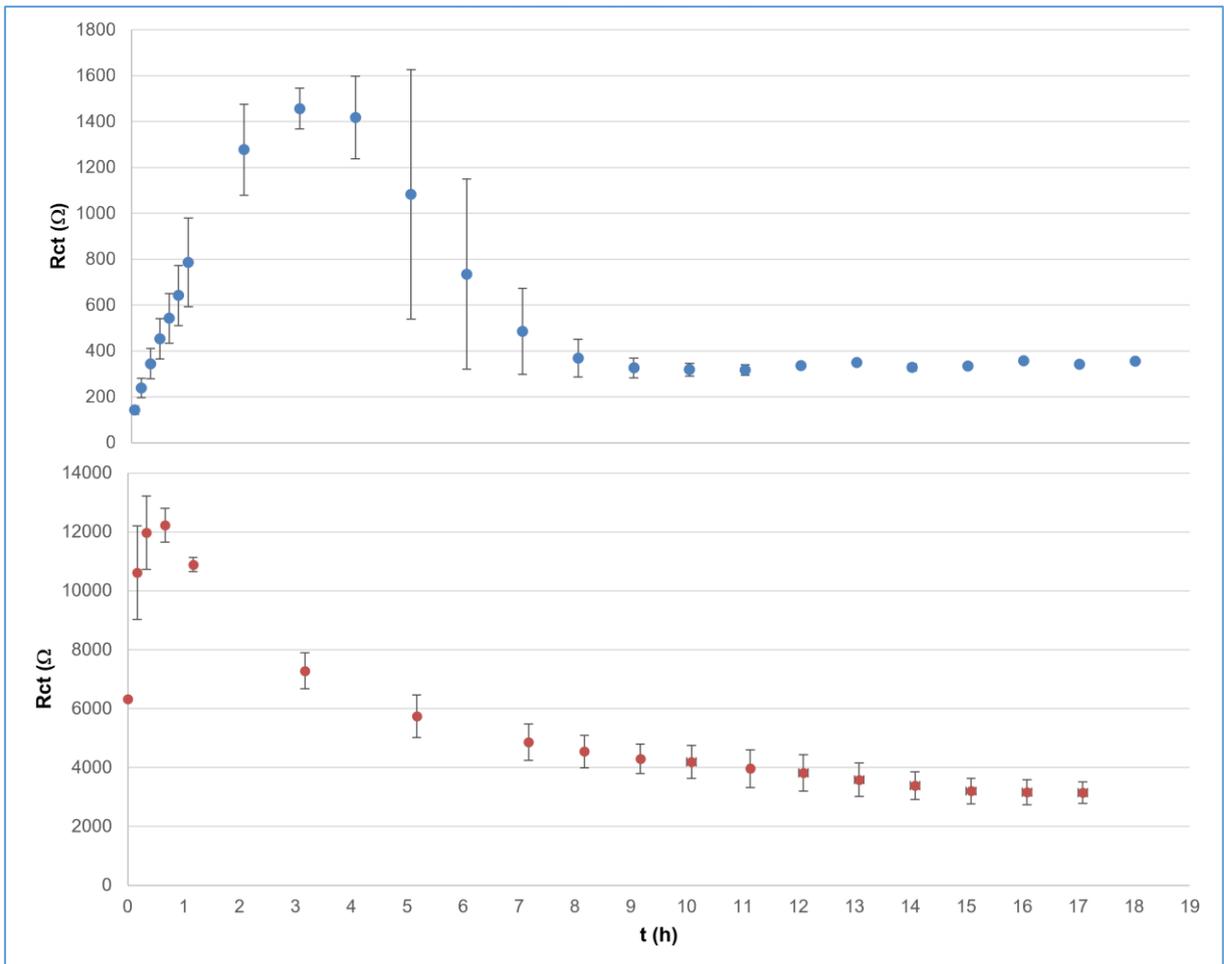
- a) Em um primeiro momento, o valor de R_{ct} apresenta um crescimento rápido, chegando a um pico.
- b) Após esse período observa-se um decréscimo lento desse valor que se estabiliza a partir de algum tempo. Desse momento em diante o valor de R_{ct} não apresenta mudança significativa

Para o caso da formação de monocamada de APT, o pico atinge um valor de R_{ct} equivalente a quase 25 vezes o valor para eletrodos de ouro em um período de 3 horas. Após esse período observa-se um decréscimo lento desse valor que se estabiliza a partir de algum tempo em torno de 10 horas. Desse momento em diante o valor de R_{ct} não apresenta mudança significativa. ΔR_{ct} é de aproximadamente 4,61 Ω por hora, o que representa uma diferença de cerca de 1,39% entre uma medida e outra. Além disso, o desvio entre os resultados representa menos de 5% em relação valor médio dos últimos 10 pontos.

A parte inferior da figura 21 mostra os valores de R_{ct} para adsorção de MCH após o processo de modificação com APT. O mesmo comportamento é observado, no entanto, o processo alcança um valor de pico em torno de 1 (uma) hora, muito mais rápido que o anterior. O processo de estabilização, porém, aparenta ser bem mais lento, levando um período superior a 17 horas para atingir um completo equilíbrio. O caráter resistivo da camada formada é bem mais pronunciado do que aquele para modificação com APT. Enquanto a monocamada de APT atinge um equilíbrio em algo

em torno de $338,32 \pm 14,02 \Omega$, a subsequente modificação com MCH leva a valores próximos a $3156,85 \pm 5,3 \Omega$. Quase 10 vezes maior.

Figura 21. Valores de R_{ct} obtidos para diferentes tempos de imersão dos eletrodos de ouro em soluções contendo APT $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (azul) e solução contendo MCH $5,0 \text{mmol.L}^{-1}$ (Laranja). Os valores foram obtidos a partir do ajuste teórico de curvas de EIE tratadas com software NOVA enquanto cada média e desvio padrão apresentado foram calculados a partir de 3 medidas distintas utilizando Microsoft Excel.



Fonte: elaborado pelos autores.

Estes dados demonstram a possibilidade de obtenção de uma linha base estável (ao menos em termos de R_{ct}) a partir de modificações de superfície de ouro com tióis se utilizarmos tempos mais longos de organização.

5.3.1 Estimativa da taxa de cobertura

A taxa de cobertura para eletrodos de ouro modificados com APT e APT/MCH foi estimada em relação ao tempo utilizando-se três modelos discutidos por CAMPUZANO et al., 2006. Os autores sugerem a possibilidade de se calcular a distribuição/dimensão de “buracos” na superfície de um eletrodo modificado com SAMs e estimar a taxa de cobertura através dos valores de R_{ct} e pico de corrente (i):

$$\theta_{IS}^R = 1 - \left(\frac{R_{ct}^{AuE}}{R_{ct}^{SAM}} \right) \quad (10)$$

$$\theta_{CV}^i = 1 - \left(\frac{i_p^{SAM}}{i_p^{AuE}} \right) \quad (11)$$

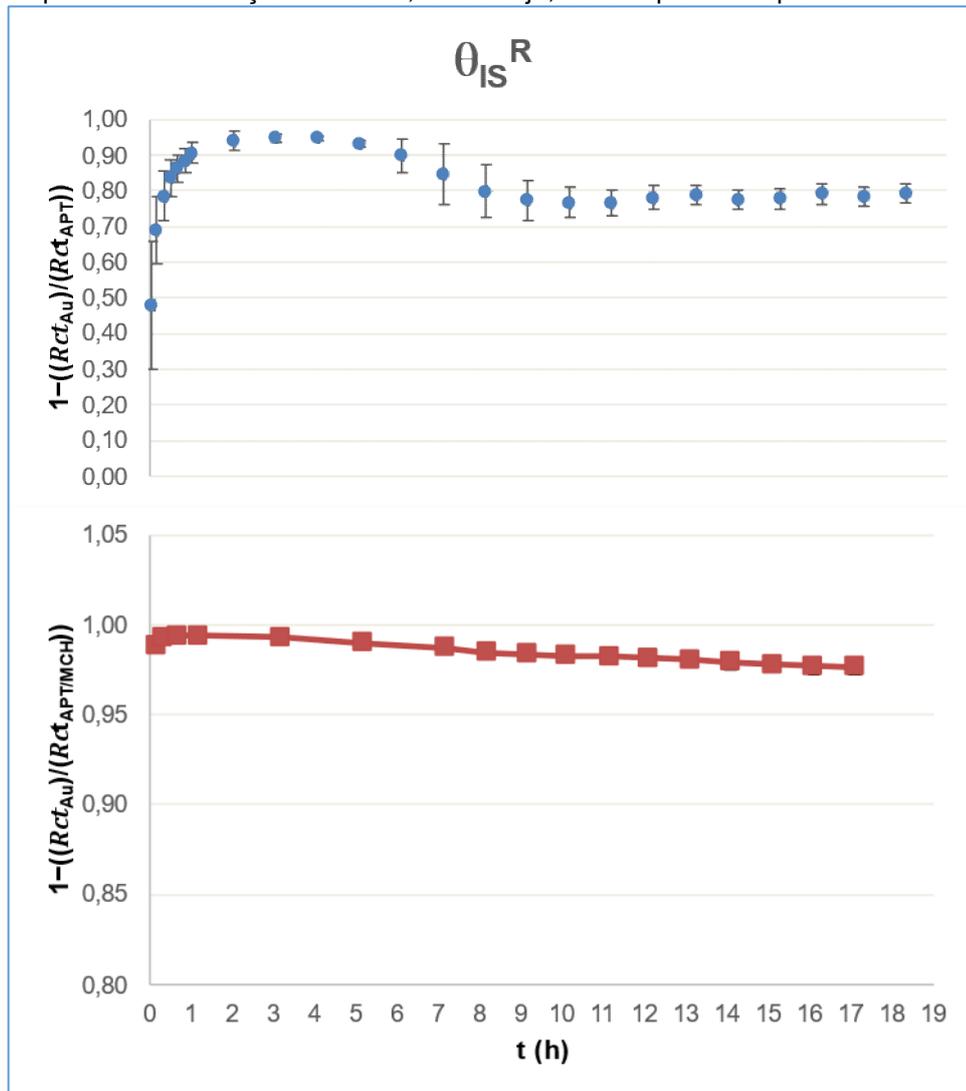
Para essas equações, os termos R_{ct}^{AuE} e R_{ct}^{SAM} correspondem as resistências por transferência de carga calculadas para o eletrodo de ouro (índice AuE) e eletrodo modificado com SAM (índice SAM) respectivamente. Enquanto a estimativa utilizando medidas de CV emprega os picos de corrente para os mesmos casos, i_p^{AuE} picos para eletrodo ouro limpo e i_p^{SAM} , pico para eletrodo modificado.

O mesmo trabalho relata, porém, que para um modelo que trata os defeitos na monocamada formada como se fossem microelétrodos (pinhole model), a equação 12 seria uma melhor opção. (CAMPUZANO et al., 2006):

$$\theta_{IS}^P = 1 - \left(\frac{\sigma_w}{m - \sigma_w} \right) \quad (12)$$

Nesse caso, a avaliação é realizada com base no coeficiente Warburg, σ_w , tomado a partir dos dados para eletrodos de ouro enquanto m é o ângulo da parte linear quando tomamos um gráfico formado com a parte real da impedância versus o inverso da raiz quadrada da frequência angular ($Z' \times \omega^{-1/2}$, ver apêndice D) para os eletrodos modificados.

Figura 22 Valores de taxa de cobertura Θ calculados a partir da equação 10. Em azul, curvas para a primeira modificação com APT, em laranja, valores para a etapa com MCH.

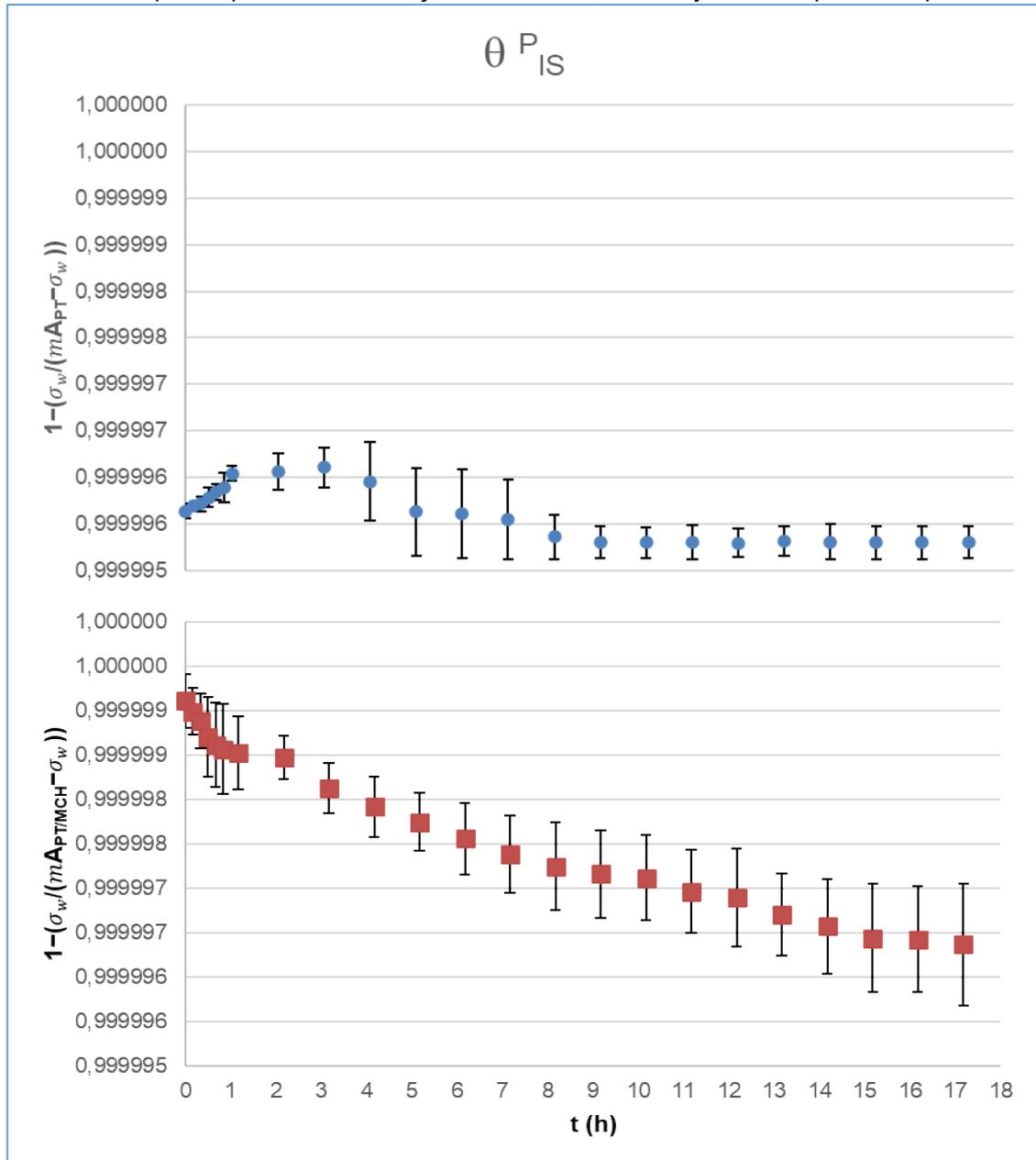


Fonte: Elaborado pelos autores.

A figuras 22 e 23 ilustram o comportamento da taxa de cobertura para o tempo avaliado nos experimentos.

Um rápido crescimento no valor de θ_{IS}^R é observado durante a primeira hora de imersão, seguido por um pseudoplano até próximo de 5 horas quando observamos um decréscimo até uma estabilização. Por esse método, estima-se um fator de 0,780 de cobertura, ou seja, cerca de 78,0% da superfície coberta para o eletrodo modificado Au/APT.

Figura 23. Valores de taxa de cobertura θ calculados a partir da equação 9, descrita na seção 7.1.3. Em azul, curvas para a primeira modificação com APT e, em laranja, valores para a etapa com MCH.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Ao avaliarmos $\theta^{P_{IS}}$, observamos um comportamento bem parecido para a primeira modificação, um rápido crescimento no valor, seguido de processo lento de sua redução até atingir equilíbrio por volta de 10 horas. Já para a segunda modificação, o comportamento apenas mostra uma diminuição no valor de $\theta^{P_{IS}}$ com um comportamento tendendo a uma estabilização para períodos maiores dos que os adquiridos aqui.

Vale notar a diferença de valores estimados para cobertura entre θ_{IS}^R e θ_{IS}^P , enquanto os valores do primeiro estão compreendidos entre as primeiras casas decimais, o segundo está compreendido após 5 casas decimais, ou seja, os valores estão muito mais próximos da unidade. A tabela 1 resume os dados para taxa de cobertura calculados por diferentes métodos, incluindo o valor obtido por CV.

Tabela 1. Valores de cobertura do eletrodo de ouro calculados a partir dos valores de R_{ct} pelos diferentes métodos propostos por (CAMPUZANO et al., 2006)

Θ (em relação ao eletrodo de ouro não modificado)		
	APT	MCH
θ_{CV}^i	0,605	0,803
θ_{IS}^R	0,780	0,976
θ_{IS}^P	0,999995	0,999997

Fonte: Elaborado pelos autores.

Em todos os casos a taxa de cobertura aumenta ao longo de cada processo, o que já era esperado, uma vez que a camada formada com MCH tem o intuito de bloquear áreas deixadas expostas durante a formação de SAM com aptâmero.

Os diferentes valores obtidos são provenientes das considerações empregadas nos modelos usados. Enquanto o valor calculado por CV corresponde a fração coberta para o potencial de pico, o valor calculado por EIE corresponde a fração coberta no equilíbrio (OCP). Além do que o acoplamento de processos faradaicos e capacitivos podem ser resolvidos por EIE, e não por CV o que segundo os autores, também afeta a precisão dos resultados obtidos pela equação 11.

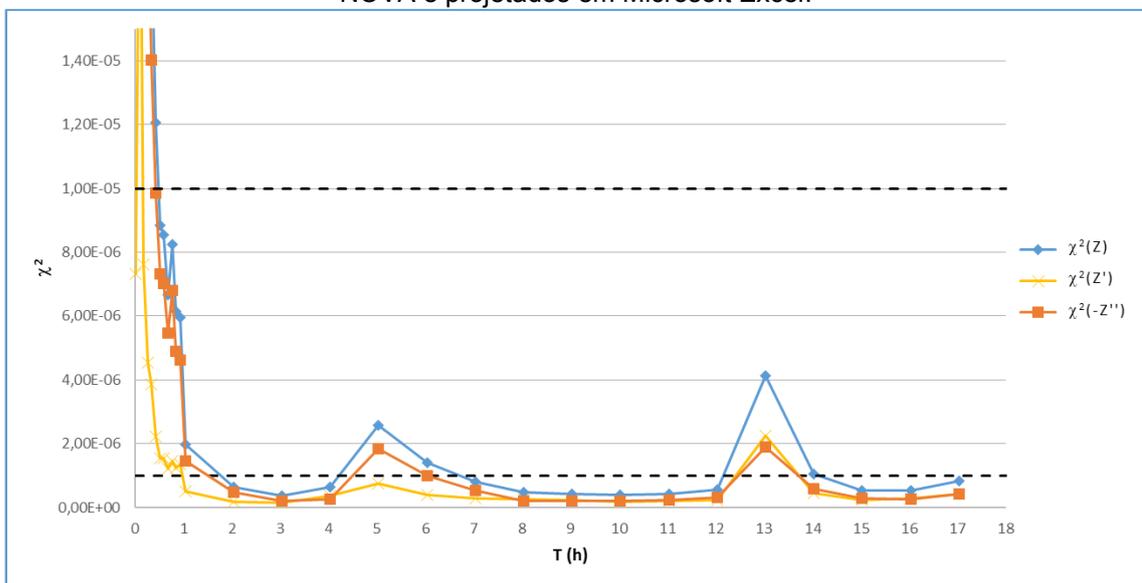
5.3.2 O teste de Kronig-Kramer

Os dados obtidos durante medidas de EIE foram submetidos a uma análise matemática para determinar a confiabilidade dos dados. O chamado teste de Kronig-Kramer (KK-test) realiza uma simulação de um sistema de resistências em série com capacitores $(RC)_n$ que reproduzam os dados obtidos. E a partir dos valores de uma das componentes (real ou Imaginária) tenta calcular os correspondentes da outra (ver Anexo A). Para cumprir os requisitos de Kronig-Kramer, dados obtidos por EIE devem apresentar:

- a) Linearidade: quando a resposta obtida é linear e a perturbação no sistema é pequena;
- b) Estabilidade: quando o sistema não apresenta mudança com o tempo (dentro do tempo de uma medida);
- c) Causalidade: quando a resposta obtida está relacionada apenas ao sinal de excitação aplicado.

O resultado é representado em termos de pseudo-chi quadrado (χ^2_{ps}), quanto menor esses valores, melhor é a qualidade do ajuste teórico ao sistema e mais confiável é a medida. Como regra geral valores abaixo de 10^{-6} representam um ajuste excelente, atendendo aos critérios observados. Valores entre 10^{-6} e 10^{-5} são considerados razoáveis, e se estiverem entre 10^{-5} e 10^{-4} , marginais, devendo tomar-se cuidado ao utilizá-los. Valores acima da faixa de 10^{-4} são considerados ruins e não confiáveis. (BOUKAMP, 1995; “Kramers-kronig test for Windows”, 2004; “User Manual”, 2021)

Figura 24. Curva de pseudo-chi quadrado (χ^2_{ps}) versus tempo de imersão em APT durante o processo de avaliação de modificação com APT. Os valores foram calculados através do software NOVA e projetados em Microsoft Excel.



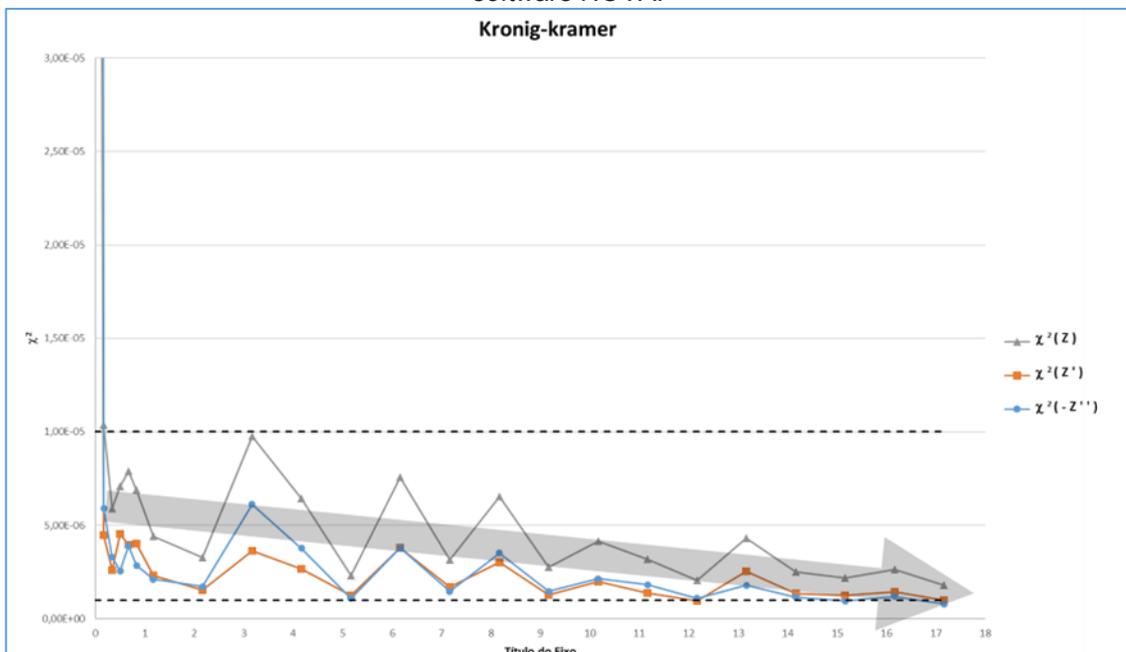
Fonte: Elaborado pelos autores

Para o processo de modificação Au/APT (figura 24), os valores encontram-se na faixa considerada marginal durante os primeiros 30 minutos de imersão, indicando que o sistema provavelmente é instável (está sofrendo mudanças significativas com o

tempo). Após isso os valores observados indicam um ajuste razoável até aproximadamente 2 horas e, após esse período, o ajuste é considerado excelente e o sistema cumpre perfeitamente os requisitos do teste.

Já para a modificação com MCH (figura 25), os valores de χ^2 também passam da faixa marginal para razoável em torno de 30 minutos. No entanto os valores permaneceram nessa faixa durante todo o procedimento, já que a velocidade com a qual decrescem é baixa. Acredita-se a partir dos dados que, uma vez que seja dado ao sistema tempo suficiente, o sistema atinja valores considerados excelentes.

Figura 25. Curva de pseudo-chi quadrado (χ^2_{ps}) versus tempo de imersão em MCH (Após APT) durante o processo de avaliação de adsorção por EIE. Os valores foram calculados através do software NOVA.



Fonte: Elaborado pelos autores

Podemos dizer que o comportamento dos valores de χ^2 acompanha o sinal avaliado R_{ct} para os processos de modificação com APT e MCH. Uma mudança muito rápida de valores nos primeiros instantes, seguida de uma mudança lenta após um certo período. Para a primeira modificação, temos um alcance do estado de equilíbrio bem mais rápido do que aquele para a segunda modificação.

5.3.3 Análise da reversibilidade da sonda redox

Entender a dependência entre pico de corrente, i , e velocidade de varredura de potencial para um sistema que envolve transferência de elétrons é um pré-requisito para análises por voltametria cíclica, pois as reações que ocorrem no eletrodo dependem, basicamente, de dois componentes:

- a) Transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo
- b) Transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo.

Em alguns casos ainda podem ocorrer reações químicas acopladas a algum destes processos. É possível que as espécies eletroativas adsorvam na superfície do eletrodo, modificando processos de transferência de carga e causando interferências no resultado. Portanto, antes de estudar a reatividade da espécie analisada, é necessário avaliar se essa se mantém homogênea na solução. (ELGRISHI et al., 2018; KHALAFI et al., 2021; PACHECO et al., 2013)

Sabemos que a escala de tempo de uma medida de voltametria depende da velocidade de varredura. Velocidades maiores levam a uma diminuição da chamada camada difusa. conseqüentemente, maiores picos de corrente são observados. Essa dependência é descrita pela equação de Randles–Sevcik:

$$I_p = 2,9 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C_{bulk} v^{1/2} \quad (13)$$

n é o número de elétrons da reação observada, A é a área do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa (cm^2/s), C é a concentração da espécie eletroativa (mol/cm^3) e v é a velocidade de varredura (V/s).

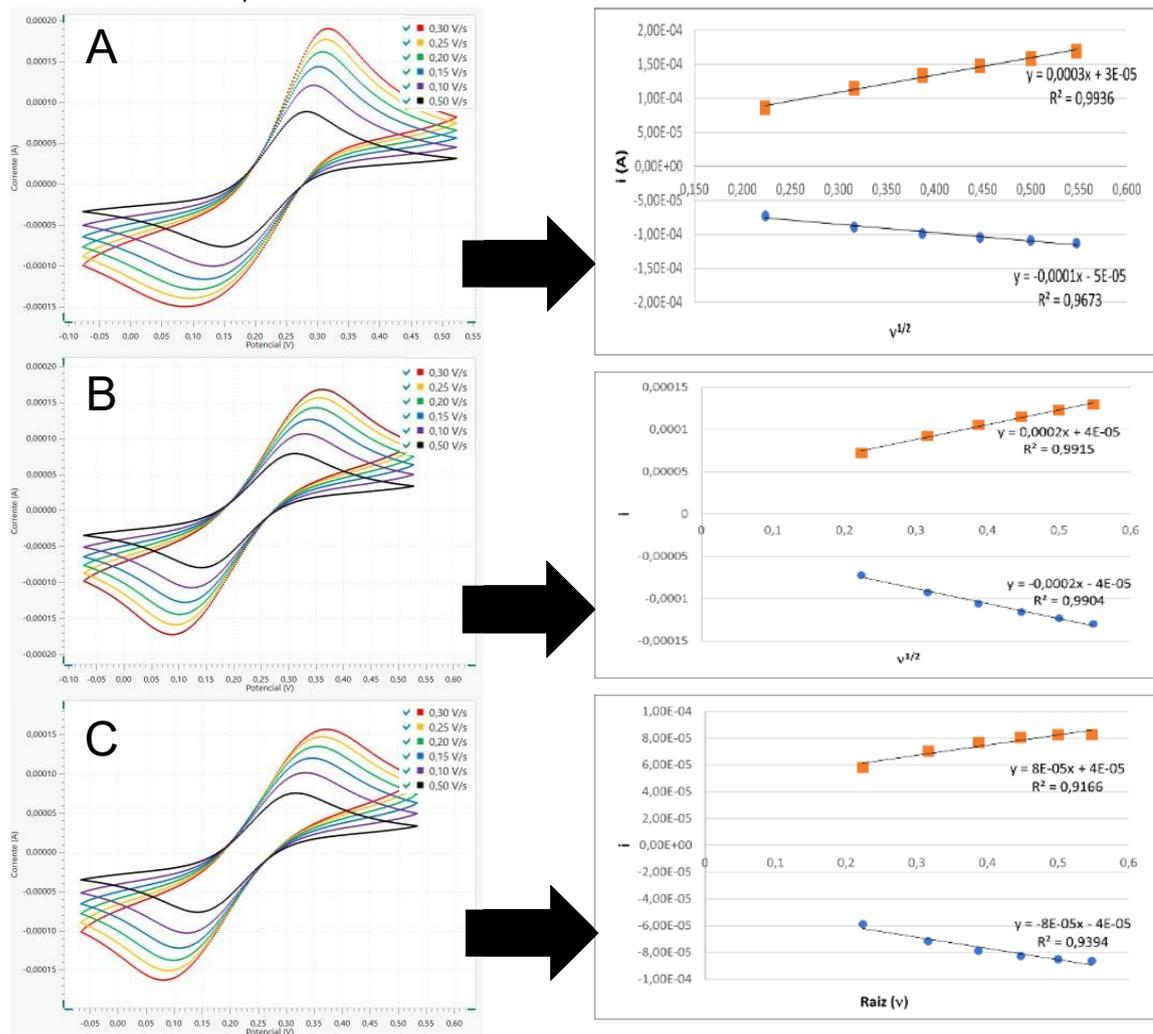
Para uma reação eletroquimicamente reversível envolvendo espécies livremente difusas, a equação de Randles–Sevcik descreve como o pico de corrente varia linearmente com raiz quadrada da velocidade de varredura. Neste caso, a reação ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, a equação Nernst é válida. Como a cinética da reação de transferência de carga é rápida ($K_s > 10^{-1} \text{ cm}/\text{s}$), apenas a etapa de transferência de massa irá ditar as regras do processo. Quando a velocidade de transferência de carga é lenta (comparada com a velocidade de varredura) as concentrações das espécies

oxidadas e reduzida não são mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto, um comportamento nerstniano. Consideramos o processo como irreversível. (ELGRISHI et al., 2018; KHALAFI et al., 2021; PACHECO et al., 2013)

Para uma reação quase reversível ($10^{-1} > K_s > 10^{-5}$ cm/s), a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga. A equação de Nernst é parcialmente satisfeita. (ELGRISHI et al., 2018; KHALAFI et al., 2021; PACHECO et al., 2013)

A fim de avaliar o processo para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, foram realizadas medidas de voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura tanto para o eletrodo de ouro não modificado como para as etapas de modificação.

Figura 26. Voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura para as etapas de modificação de eletrodos de ouro. A) Ouro apenas, B) Modificação com APT e C) Modificação com APT/MCH. As medidas foram realizadas após a estabilização na solução de medida. A direita os respectivos plots de picos de corrente versus raiz da velocidade de varredura.



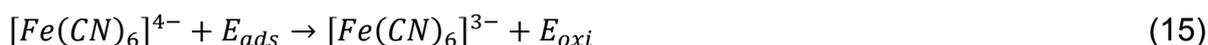
Fonte: Elaborado pelos autores.

A análise dessas medidas resultou na obtenção de relações lineares entre picos de corrente em relação a raiz da velocidade de varredura (figura 26). Os coeficientes angulares das retas obtidas para os eletrodos modificados Au/APT e Au/APT/MCH foram menores do que aqueles observadas para o eletrodo de ouro apenas. Os valores seguem uma trajetória esperada para processo de passivação, com esses coeficientes seguindo a ordem $Au > Au/APT > Au/APT/MCH$.

A cinética de reação para o par redox utilizado pode ser considerada quase reversível. Isso é avaliado observando-se a razão i_{ano}/i_{cat} próximo de 1. No entanto, isso não ocorre para o eletrodo de ouro não modificado, onde os picos catódicos se mostram maiores e o sistema só se aproxima da reversibilidade quando submetido a velocidades menores de varredura. Isso sugere a ocorrência de processos electrocatalíticos, quando ocorrem reações paralelas na superfície do eletrodo de ouro, geralmente envolvendo compostos orgânicos, durante os ciclos de voltametria.

O mecanismo de electrocatálise é explicado pela reação de um composto electroquimicamente instável, que está adsorvido na superfície do eletrodo de trabalho, com o produto de oxidação do par redox.

Conforme o potencial caminha para valores mais positivos, a espécie electroativa é oxidada ($[Fe(CN)_6]^{3-}$). Nesse momento, o composto adsorvido, E_{ads} reage com essa espécie, agindo como agente redutor e restaurando a espécie electroativa ao seu estado original. Como resultado, vemos um crescimento nos valores do pico anódico (oxidação) e uma diminuição nos valores de pico catódico (redução). (LIBANSKY et al., 2017; RODRIGUEZ; KOPER, 2014; ROUNTREE et al., 2014; SANDFORD et al., 2019; SONG et al., 2016)



Esses dados, no entanto, necessitam de uma avaliação mais aprofundada, a fim de esclarecer os reais mecanismos envolvidos no processo.

É possível comparar esses dados com os valores obtidos no caso de eletrodos modificados com APT e APT/MCH. Para ambos os processos, essa indicação de reações electroquimicamente catalisadas é inexistente ou, ao menos, muito diminuída. Esse efeito pode ser observado ao avaliarmos as relações entre os picos de corrente

i_{ano}/i_{cat} , o valor fica próximo à unidade em todas as velocidades de varredura avaliadas (tabela 2.), logo a reversibilidade do sistema é obtida ao modificarmos a superfície. Isso nos leva a crer que o processo de modificação foi eficiente, limitando o processo de transferência de carga na superfície do eletrodo.

Tabela 2. Parâmetros obtidos da relação entre picos de corrente versus raiz da velocidade de varredura para o par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ em PBS utilizando eletrodos de ouro não modificados e eletrodos de ouro modificados por SAMs.

Au					
v (V/s)	Raiz(v)	i_{ano}	i_{cat}	i_{ano}/i_{cat}	
0,30	0,548	1,70E-04	-1,13E-04	1,503	Coefficiente Angular ($A v^{-1/2} s^{1/2}$)
0,25	0,500	1,60E-04	-1,09E-04	1,468	0,0003
0,20	0,447	1,48E-04	-1,05E-04	1,417	Intercepto (A)
0,15	0,387	1,34E-04	-9,87E-05	1,357	3,00E-05
0,10	0,316	1,15E-04	-8,91E-05	1,291	R²
0,05	0,224	8,65E-05	-7,19E-05	1,202	0,9936
Au/APT					
v (V/s)	Raiz(v)	i_{ano}	i_{cat}	i_{ano}/i_{cat}	
0,30	0,548	1,29E-04	-1,30E-04	0,997	Coefficiente Angular ($A v^{-1/2} s^{1/2}$)
0,25	0,500	1,23E-04	-1,23E-04	0,996	0,0002
0,20	0,447	1,15E-04	-1,16E-04	0,995	Intercepto (A)
0,15	0,387	1,05E-04	-1,06E-04	0,996	4,00E-05
0,10	0,316	9,24E-05	-9,27E-05	0,997	R²
0,05	0,224	7,22E-05	-7,21E-05	1,001	0,9915
Au/APT/MCH					
v (V/s)	Raiz(v)	i_{ano}	i_{cat}	i_{ano}/i_{cat}	
0,30	0,548	8,27E-05	-8,63E-05	0,958	Coefficiente Angular ($A v^{-1/2} s^{1/2}$)²
0,25	0,500	8,25E-05	-8,51E-05	0,969	8,00E-05
0,20	0,447	8,05E-05	-8,27E-05	0,973	Intercepto (A)
0,15	0,387	7,68E-05	-7,86E-05	0,977	4,00E-05
0,10	0,316	7,03E-05	-7,17E-05	0,982	R²
0,05	0,224	5,82E-05	-5,90E-05	0,987	0,9166

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Testes na presença de saxitoxina

O estudo de formação de monocamada de tióis em ouro discutido nos tópicos acima demonstrou que tempos relativamente longos de fabricação são necessários para se obter camadas mais bem definidas e menores desvios durante as medidas. No entanto o processo foi avaliado utilizando-se soluções com volume de 10,0 mL (volume de trabalho da célula eletroquímica) o que nos leva ao uso de uma quantidade excessiva de material para a fabricação de um único eletrodo. Para fins de estudo e avaliação, o processo é sim muito importante, mas se torna inviável na prática.

Para diminuir esse problema, a fabricação dos dispositivos foi avaliada utilizando-se um volume cerca de 16 vezes menor de solução. Uma vez limpos, os chips de ouro foram inseridos em tubos eppendorff contendo cerca de 600 μ L (0,6 mL) de solução contendo APT e incubados por um período de 24 horas. Após esse tempo, o processo foi repetido, mas com o mesmo volume de solução contendo MCH.

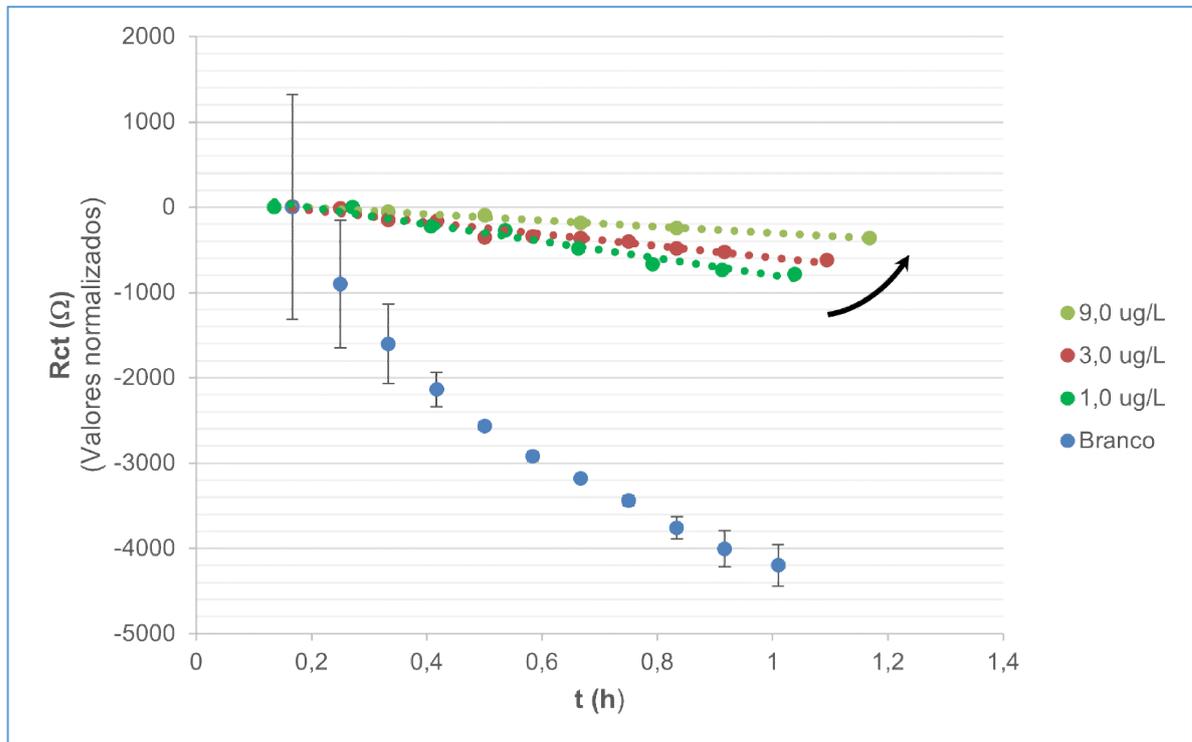
Os intervalos de tempo foram escolhidos por serem considerados mais do que suficientes para a formação de uma boa camada auto-organizada e estável (em termos de R_{ct}) além da praticidade relacionada à logística do processo.

Com o intuito de avaliar o deslocamento em R_{ct} na presença de STX, o sistema foi avaliado sob EIE em soluções contendo 1,0, 3,0 e 9,0 μ g L^{-1} de saxitoxina com eletrodos modificados com camadas Au/APT(24h)/MCH(24h) durante 1 hora. O processo também foi realizado com solução “em branco”, sem saxitoxina. Os resultados, em termos de R_{ct} , são mostrados na figura 27.

Nesse momento, dois fatos merecem atenção:

- a) A priori, esperava-se que a curva sem STX não sofresse variações significativas com o tempo uma vez que vimos na sessão 7.3 que para tempos longos os valores para o sistema Au/APT/MCH tende a permanecer estável. Isso nos leva a crer que o volume de solução utilizado cause grande efeito no deslocamento de valores de R_{ct} durante o processo de estabilização para cada eletrodo, sendo necessária uma etapa de estabilização além da etapa de formação.
- b) É possível observar que, ao menos durante o período de análise, a presença de STX altera a cinética de mudança dos valores de R_{ct} . Sua influência é inversamente proporcional a sua concentração. Quanto maior a concentração de STX, menor é a velocidade da mudança.

Figura 27. Valores de R_{ct} para diferentes concentrações de STX após fabricação de eletrodo modificado do tipo Au/APT/MCH. Com o aumento da concentração, é possível visualizar uma mudança na cinética de decaimento. Em azul também é mostrada a medida “branco”, sem presença de SXT.



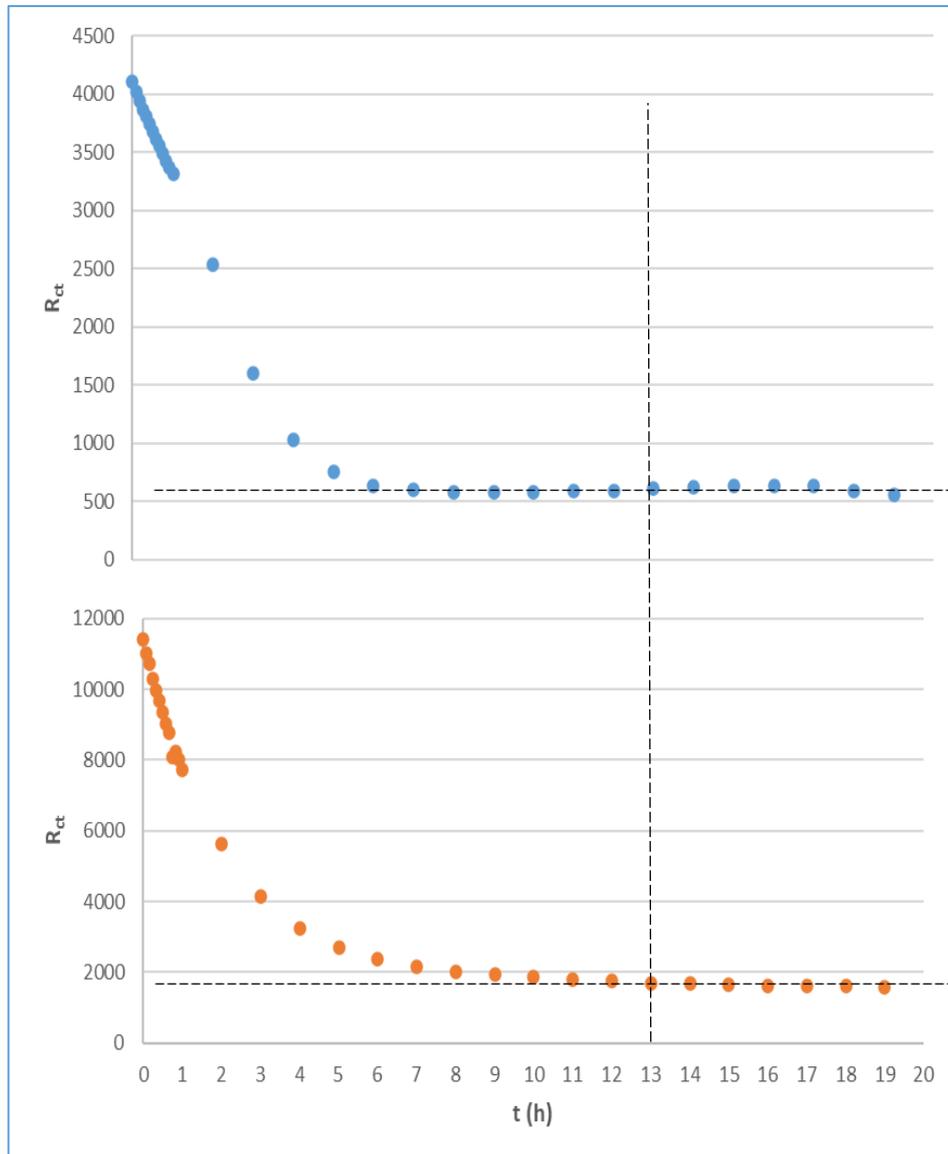
Fonte: 1 Elaborado pelos autores.

A partir dessas observações, optou-se por uma nova avaliação dos eletrodos modificados, nas mesmas condições de preparação descritas no presente tópico (imersão por 24h em 0,6 mL) a fim de verificar o processo de estabilização após a formação de SAM.

Os dados, mostrados na figura 28, obtidos se mostram similares aos observados anteriormente, diferenciando-se pela ausência de rápido incremento de R_{ct} nas primeiras horas do processo e por um aparente deslocamento de 2 horas para uma estabilização de valores.

Outro fato interessante é a magnitude dos valores iniciais e finais para cada etapa. Em ambas as etapas de modificação os valores no início das medidas de R_{ct} são muito superiores aos obtidos para avaliação em tempo real. No entanto, observamos um aumento do valor de equilíbrio para a camada formada por APT e uma diminuição para o equilíbrio envolvendo a camada formada por APT/MCH.

Figura 28. Valores de R_{ct} obtidos em função do tempo para estabilização após imersão em soluções por 24h. Os valores diminuem de forma parecida com as medidas anteriores, porém a partir de valores muito mais elevados.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Os valores altos para o início das curvas refletem uma possível SAM altamente empacotada na superfície do eletrodo, que se ajusta ao longo do tempo ao substituímos a solução teste para um volume maior (10mL). Além disso, justamente pela formação de uma camada mais compacta, o valor de R_{ct} observado para o equilíbrio é ligeiramente maior.

Já o valor ligeiramente menor para o equilíbrio na etapa de modificação com MCH pode ser explicado se pensarmos que uma maior cobertura para SAM formada com APT deixa uma menor área disponível para adsorção com MCH, levando a uma menor contribuição deste para os valores de R_{ct} .

Pode-se concluir que as curvas obtidas na sessão 7.3 são resultantes da combinação de, no mínimo, 2 processos distintos no caso da formação de camada com APT, um processo de cobertura da camada de ouro que leva a um aumento nos valores de R_{ct} e, ao mesmo tempo, um ajuste da camada formada, levando a uma diminuição nos valores de R_{ct} . Para o processo envolvendo a camada APT/MCH e para o sistema Au/APT/MCH/STX, temos um número maior de contribuições.

6 CONCLUSÃO

O trabalho de revisão sistemática aqui empregado teve o intuito de avaliar a metodologia empregada na fabricação de um dispositivo biossensor baseado em aptâmero utilizada pelo grupo de pesquisa e propor modificações com o intuito de aumentar a reprodutibilidade e diminuir possíveis fontes de interferência durante medidas eletroquímicas. A partir dessas proposições, realizou-se um estudo do comportamento eletroquímico do sistema através das técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica.

Ficou claro que uma boa revisão teórica e entendimento das técnicas utilizadas a priori são essenciais para o desenvolvimento/otimização de procedimentos de fabricação de dispositivos. As modificações propostas para este trabalho se mostraram úteis tanto para economia de material, pois diminui custos associados ao processo de fabricação de dispositivos, como para obtenção de resultados reprodutíveis para o processo de modificação de eletrodos de ouro por SAMs.

Estudos de voltametria cíclica com ouro em PBS mostraram que uma janela de potencial de cerca de 0,6 V localizada entre -0,1 e 0,5 V em relação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl está disponível para o sistema utilizado. Para potenciais acima desse valor, observamos picos de oxidação e decapagem de ouro da superfície. Para valores abaixo, temos formação de peróxidos, que atua como material corrosivo, degradando a superfície do eletrodo. A avaliação de picos de corrente em relação a diferentes velocidades de varredura indica possíveis reações paralelas ocorrendo juntamente com o processo catódico durante uma varredura de CV. Isso pode ser devido a contaminantes presentes no sistema indicando possível falha no processo de limpeza ou uma possível interferência da sonda utilizada para aquisição de sinal. Um estudo mais aprofundado do sistema se faz necessário.

A possibilidade de acompanhamento do processo de formação de SAM por EIE se mostrou muito útil durante o trabalho. Estudos com imersão de eletrodos de ouro em soluções contendo tíois demonstraram que durante o processo de adsorção de tíois sobre ouro os valores de R_{ct} sobem rapidamente nas primeiras horas, o que é condizente com uma rápida reação de fisissorção seguida por quimissorção. No entanto, tendem a convergir para um valor com baixo desvio após longos períodos, quando o valor de R_{ct} apresentam um lento decréscimo até atingir um patamar onde não ocorre mudança significativa, o que também faz sentido quando se pensa em um lento rearranjo estrutural das SAMs. No entanto, existem indícios de que esses valores dependam do volume utilizado para modificação e do volume utilizado para o equilíbrio.

Medidas com STX mostraram que a velocidade de mudança nos valores de R_{ct} são inversamente proporcionais à concentração de STX. Ainda, assim se faz necessário o estudo com diferentes concentrações deste analito e avaliação do tempo de complexação após o período de estabilização para avaliar o comportamento de detecção e reprodutibilidade do método.

A partir deste trabalho, observamos que um dos parâmetros fundamentais na construção de um biossensor usando SAMs é a necessidade de se conhecer a cinética de formação e organização de monocamadas formadas por tíois, pois, uma vez que é dado tempo suficiente ao sistema para se organizar, é possível obter uma linha de base consistente, reprodutível e com baixo desvio entre medidas.

6.1 perspectivas futuras

Este trabalho faz parte de um projeto de desenvolvimento de dispositivos comerciais e de interesse público, portanto, acredita-se que tenha potencial para a geração de conhecimento técnico e científico. No entanto, ainda há muitas questões a serem discutidas sobre os dados adquiridos e sobre o sistema analisado. Questões essas que merecem a atenção, sobretudo, na perspectiva de torná-lo um produto, com garantia de reprodutibilidade e confiabilidade, com todas as etapas integradas numa só unidade.

Medidas de EIE tem a capacidade de resolver contribuição de fatores eletroquímicos que influenciam em sua resposta, portanto, apresentam diversas formas de interpretação e uso de dados gerados, possibilitando talvez obter métodos

de análise com maior confiabilidade. No entanto, é preciso tempo e esforço para entender e comparar a quantidade de dados gerados e relacioná-los com o objeto de interesse, nesse caso, a formação de complexo entre APT e STX.

Um melhor entendimento das possibilidades de análise dos dados de EIE e CV além da incorporação de outras técnicas capazes de corroborar no entendimento sobre o sistema certamente serão foco de estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ALTINTAS, Z. (ED.). **Biosensors and Nanotechnology: Applications in Health Care Diagnostics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2018.
- AMRESCO Buffers**. AMRESCO Inc., , 2001. Disponível em: <www.amresco-inc.com>
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed ed. New York: Wiley, 2001.
- BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimeno na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- BERNARDES, N. B. et al. Intoxicação Alimentar: Um problema de Saúde Pública. **ID on line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 12, n. 42, p. 894–906, 31 out. 2018.
- BORTOLI, S.; PINTO, E. Cap. 21. CIANOTOXINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, HISTÓRICO, LEGISLAÇÃO E MÉTODOS DE ANÁLISES. Em: **Ecologia de Reservatórios e Interfaces**. [s.l.] Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências, 2015.
- BORTOLI, S.; PINTO, E. CIANOTOXINAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, HISTÓRICO, LEGISLAÇÃO E MÉTODOS DE ANÁLISES. **São Paulo**, p. 19, [s.d.].
- BOUKAMP, B. A. A Linear Kronig-Kramers Transform Test for Immittance Data Validation. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 142, n. 6, p. 1885–1894, 1 jun. 1995.
- BRENTANO, D. M.; CARDOSO, G. C. Cianotoxinas em um manancial dominado por *Cylindrospermopsis raciborskii* e a avaliação da toxicidade aguda deste ambiente. **Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação; SEMINÁRIO DE PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO DO IFSC - 2014**, 25 jul. 2014.
- BRIDGEWATER, L. L. et al. (EDS.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd edition ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- CALDAS, J. **População de algas que soltam toxina é uma das maiores desde 2007 em SC**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2016/05/populacao-de-algas-que-soltam-toxina-e-uma-das-maiores-desde-2007-em-sc.html>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

- CAMPUZANO, S. et al. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, n. 1, p. 112–121, jan. 2006.
- CHEESEMAN, J. Food Security in the Face of Salinity, Drought, Climate Change, and Population Growth. Em: **Halophytes for Food Security in Dry Lands**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 111–123.
- CHEMISTRY (IUPAC), T. I. U. OF P. AND A. **IUPAC - biosensor (B00663)**. Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org/terms/view/B00663>>. Acesso em: 25 ago. 2022.
- CHEN, J. et al. Population, water, food, energy and dams. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 18–28, abr. 2016.
- CHORUS, I.; WELKER, M. (EDS.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. Second edition ed. Boca Raton: CRC Press, an imprint of Informa, 2021.
- CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL DE 1988. . 5 out. 1988.
- D. YOUNG, H.; A. FREEDMAN, R. **Física III, Sears e Zemansky: eletromagnetismo**. 14. ed. São Paulo, Brasil: Pearson Education do Brasil, 2015.
- DE SOUZA, R. V.; DA SILVA, B. C.; NOVAES, A. L. T. A aquicultura de Santa Catarina em números. **Documentos**, n. 354, 29 jul. 2022.
- EIRAS, S. DE P.; COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C. DE. Métodos de otimização em química. **Revista Chemkeys**, n. 3, p. 1–18, 17 set. 2018.
- ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 2, p. 197–206, 13 fev. 2018.
- ETHERIDGE, S. M. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives. **Toxicon**, v. 56, n. 2, p. 108–122, ago. 2010.
- FISCHER, L. M. et al. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, v. 86, n. 4–6, p. 1282–1285, abr. 2009.
- G1 SC. **Cultivo de ostras e mariscos é proibido em Palhoça por excesso de toxina**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2021/10/03/cultivo-de-ostras-e-mariscos-e-proibido-em-palhoca-por-excesso-de-toxina.ghtml>>. Acesso em: 21 set. 2022.

G1 SC; NSC TV. **Estudo identifica toxina na Lagoa do Peri que pode contaminar mexilhões e ser letal aos humanos | Santa Catarina | G1.**

Disponível em: <<https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2021/05/20/estudo-identifica-toxina-letal-que-pode-contaminar-mexilhoes-na-lagoa-do-peri-em-florianopolis.ghtml>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

General Handling Protocol for Aptamer. AMSBIO, , [s.d.]. Disponível em: <www.amsbio.com>

HAVERROTH, C. Presidente da Epagri Giovani Canola Teixeira. p. 42, [s.d.].

ISO - International Organization for Standardization. Disponível em: <<https://www.iso.org/home.html>>. Acesso em: 24 ago. 2022.

JEONG-YEOL YOON. **Introduction to biosensors.** New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016.

KHALAFI, L. et al. Why Is Voltammetric Current Scan Rate Dependent? Representation of a Mathematically Dense Concept Using Conceptual Thinking. **Journal of Chemical Education**, v. 98, n. 12, p. 3957–3961, 14 dez. 2021.

KOMÁRKOVÁ, J.; LAUDARES-SILVA, R.; SENNA, P. A. C. Extreme morphology of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in the Lagoa do Peri, a freshwater coastal lagoon, Santa Catarina, Brazil. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes**, v. 94, p. 207–222, 16 set. 1999.

Kramers-kronig test for Windows. Inorganic Materials Science Research Group, , 2004.

KREWSKI, D. et al. Toxicity testing in the 21st century: progress in the past decade and future perspectives. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 1–58, jan. 2020.

LAGOS, N. et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1359–1373, out. 1999.

LASIA, A. **Electrochemical Impedance Spectroscopy and its Applications.** New York, NY: Springer New York, 2014.

LEUNG, K. K. et al. Elucidating the Mechanisms Underlying the Signal Drift of Electrochemical Aptamer-Based Sensors in Whole Blood. **ACS Sensors**, v. 6, n. 9, p. 3340–3347, 24 set. 2021.

LIBANSKY, M. et al. Basic electrochemical properties of sputtered gold film electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 452–460, 10 out. 2017.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, jul. 2008.

MACEDO, C. F. EUTROFIZAÇÃO E QUALIDADE DA ÁGUA NA PISCICULTURA: CONSEQUÊNCIAS E RECOMENDAÇÕES. **Bol. Inst. Pesca**, p. 15, 2010.

MAKAR, A. B. et al. Formate assay in body fluids: application in methanol poisoning. **Biochemical Medicine**, v. 13, n. 2, p. 117–126, jun. 1975.

Maré alta para os frutos do mar | Veja Saúde. Disponível em: <<https://saude.abril.com.br/alimentacao/mare-alta-para-os-frutos-do-mar/>>.

Acesso em: 23 ago. 2022.

MARIA CECÍLIA MIOTTO. **Caracterização ecofisiológica e molecular de duas cepas de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtoras de saxitoxina, isoladas da Lagoa do Peri, Florianópolis, SC.** Tese (doutorado)—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, 2016.

MARNIEMI, J.; PARKKI, M. G. Radiochemical assay of glutathione S-epoxide transferase and its enhancement by phenobarbital in rat liver in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 17, p. 1569–1572, 1 set. 1975.

MCPARTLIN, D. A. et al. Use of biosensors for the detection of marine toxins. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 49–58, 30 jun. 2016.

MELEGARI, S. P. **ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO TÓXICA DA SAXITOXINA E AVALIAÇÃO DE SUA ADSORÇÃO EM MATERIAIS ALTERNATIVOS PARA APLICAÇÃO EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ÁGUA.** Tese—Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MELO, E. S. DE et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **Pubvet**, v. 12, n. 10, p. 1–9, out. 2018.

MILLER, T. et al. Cyanobacterial Toxins of the Laurentian Great Lakes, Their Toxicological Effects, and Numerical Limits in Drinking Water. **Marine Drugs**, v. 15, n. 6, p. 160, 2 jun. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de Consolidação.** , 28 set. 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/farmacia-popular%20old/legislacao/prc-5-portaria-de-consolida-o-n-5-de-28-de-setembro-de-2017.pdf/view>>. Acesso em: 21 set. 2022

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para Diagnóstico Laboratorial em Saúde Pública: orientações para o sistema nacional de laboratórios de saúde pública.** Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde, 2021a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR** MINISTÉRIO DA SAÚDE **MANUAL DE TREINAMENTO.** Brasília : Ministério da Saúde: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis., 2021b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica dos surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA).** Brasil: Ministério da Saúde, jan. 2022a. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/arquivos/apresentacao-surtos-dtha-2022.pdf/view>>. Acesso em: 21 set. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA).** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: 21 set. 2022b.

MONDARDO, R. I. **Avaliação da filtração em margem como pré-tratamento à filtração direta descendente na remoção de células de cianobactérias e saxitoxinas.** Tese (doutorado)—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, 2009.

MONDARDO, R. I. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. p. 291, [s.d.].

O'NEILL, K.; MUSGRAVE, I. F.; HUMPAGE, A. Low dose extended exposure to saxitoxin and its potential neurodevelopmental effects: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 7–16, dez. 2016.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ED.). **Declaração Universal dos Direitos Humanos.** , 10 dez. 1948. Disponível em:

<<https://www.unicef.org/brazil/declaracao-universal-dos-direitos-humanos>>.

Acesso em: 24 ago. 2022

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013.

PICARDO, M. et al. Recent advances in the detection of natural toxins in freshwater environments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 75–86, mar. 2019.

POMPÊO, M. et al. (EDS.). **Ecologia de Reservatórios e Interfaces**. [s.l.] Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências, 2015.

PREFEITURA DE FLORIANÓPOLIS. **Parque Municipal Lagoa do Peri**. Portal Municipal de Turismo de Florianópolis. Disponível em: <<https://turismo.pmf.sc.gov.br/o-que-fazer/item/parque-municipal-lagoa-do-peri>>.

Acesso em: 21 set. 2022.

RAMOS, T. K. et al. Saxitoxins from the freshwater cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* can contaminate marine mussels. **Harmful Algae**, v. 103, p. 102004, mar. 2021.

REDAÇÃO ND, CRICIÚMA. **Consumo de marisco em praia de SC causa episódios de intoxicação alimentar | ND Mais**. Disponível em: <<https://ndmais.com.br/saude/consumo-de-marisco-em-praia-de-sc-causa-episodios-de-intoxicacao-alimentar/>>. Acesso em: 21 set. 2022.

REGUEIRAS, A. V. B. **Comparação de métodos de identificação e quantificação de cianobactérias e suas toxinas na Albufeira do Torrão (Rio Tâmega)**. Dissertação (Mestrado)—Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2009.

RODRIGUEZ, P.; KOPER, M. T. M. Electrocatalysis on gold. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 27, p. 13583–13594, 2014.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747, 2010.

ROUNTREE, E. S. et al. Evaluation of Homogeneous Electrocatalysts by Cyclic Voltammetry. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 9983–10002, 6 out. 2014.

SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195–212, jun. 2018.

SANDFORD, C. et al. A synthetic chemist's guide to electroanalytical tools for studying reaction mechanisms. **Chem. Sci.**, v. 10, n. 26, p. 6404–6422, 2019.

SANTOS, J. V. **Validação e revalidação de métodos para a análise de micotoxinas: Aflatoxina B1, B2, G1, G2, Desoxinivalenol, Zearalenona e Ocratoxina**. Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto: [s.n.].

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. **Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA)**. Disponível em: <<https://www.dive.sc.gov.br/index.php/dtha>>. Acesso em: 21 set. 2022.

SERRANO, P. C. et al. Electrochemical impedance biosensor for detection of saxitoxin in aqueous solution. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 25, p. 6393–6399, out. 2021.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

SLUYTERS, J. H. On the impedance of galvanic cells: I. Theory. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 79, n. 10, p. 1092–1100, 1960.

SONG, P. et al. A mechanistic study of the EC' mechanism – the split wave in cyclic voltammetry and square wave voltammetry. **RSC Adv.**, v. 6, n. 74, p. 70237–70242, 2016.

SUBRAMANIAN, R.; LAKSHMINARAYANAN, V. A study of kinetics of adsorption of alkanethiols on gold using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 45, n. 27, p. 4501–4509, set. 2000.

TESTAI, E. et al. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 5, p. 385–419, 27 maio 2016.

TIAN, Y. et al. Recent progress in micro/nano biosensors for shellfish toxin detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 176, p. 112899, mar. 2021.

US EPA, O. **Detection Methods for Cyanotoxins**. Collections and Lists. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/detection-methods-cyanotoxins>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

User Manual. Metrohm Autolab B.V., , jan. 2021.

VERICAT, C. et al. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1805, 2010.

VISCIANO, P. et al. Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1051, 6 jul. 2016.

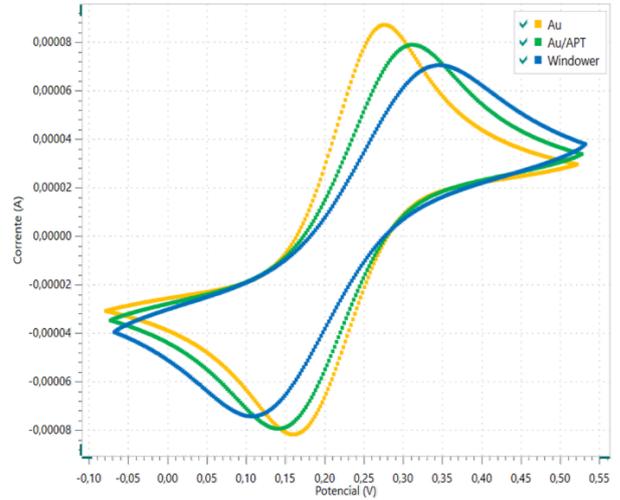
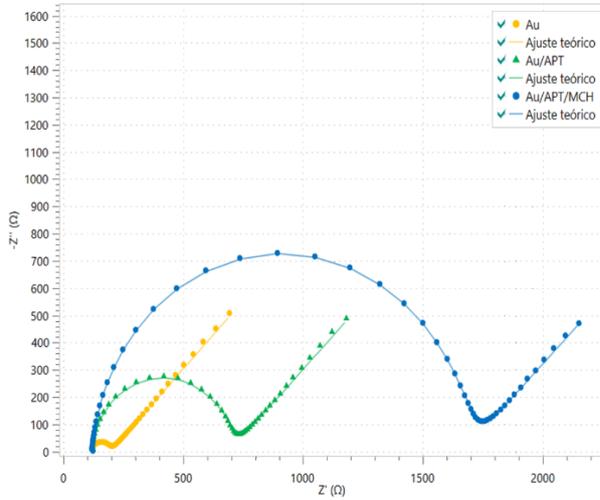
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: 21 set. 2022a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Natural toxins in food**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/natural-toxins-in-food>>. Acesso em: 21 set. 2022b.

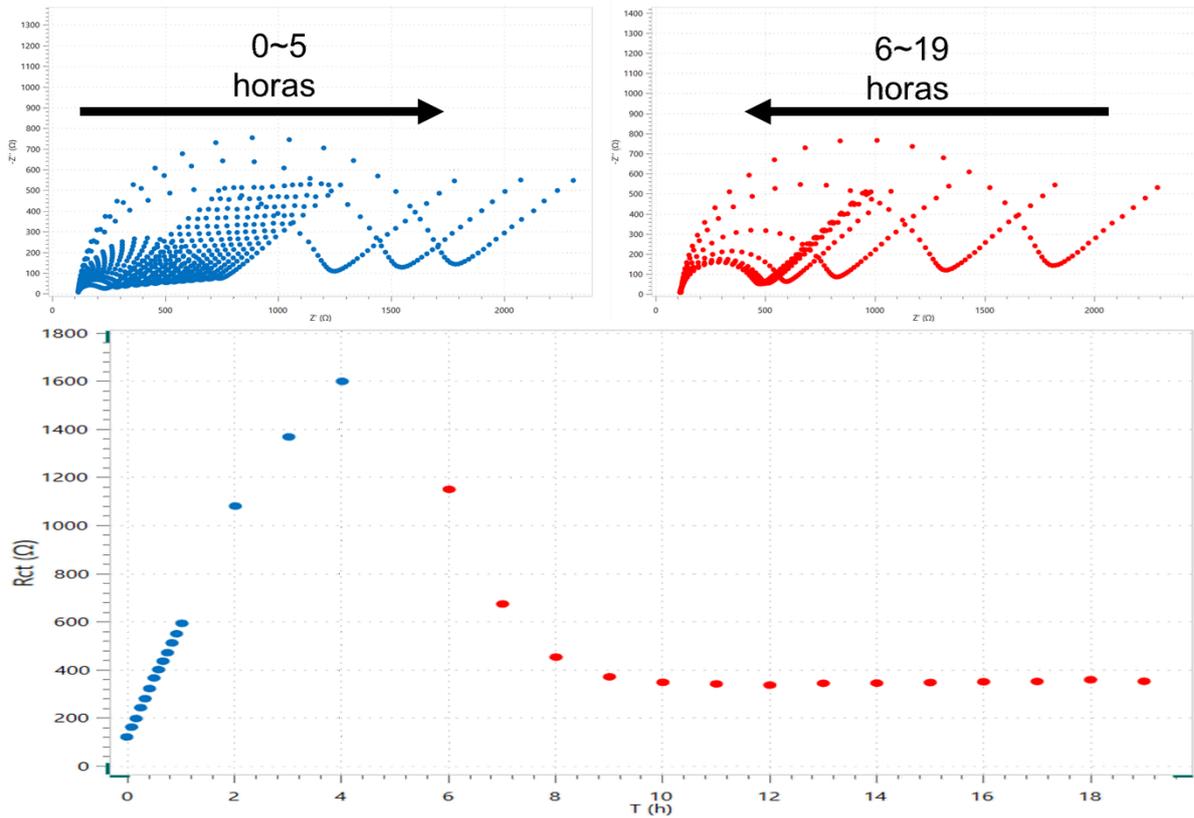
XU, X. et al. Structural Changes of Mercaptohexanol Self-Assembled Monolayers on Gold and Their Influence on Impedimetric Aptamer Sensors. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 22, p. 14697–14704, 19 nov. 2019.

ZHENG, X. et al. A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation. **Toxicon**, v. 101, p. 41–47, jul. 2015.

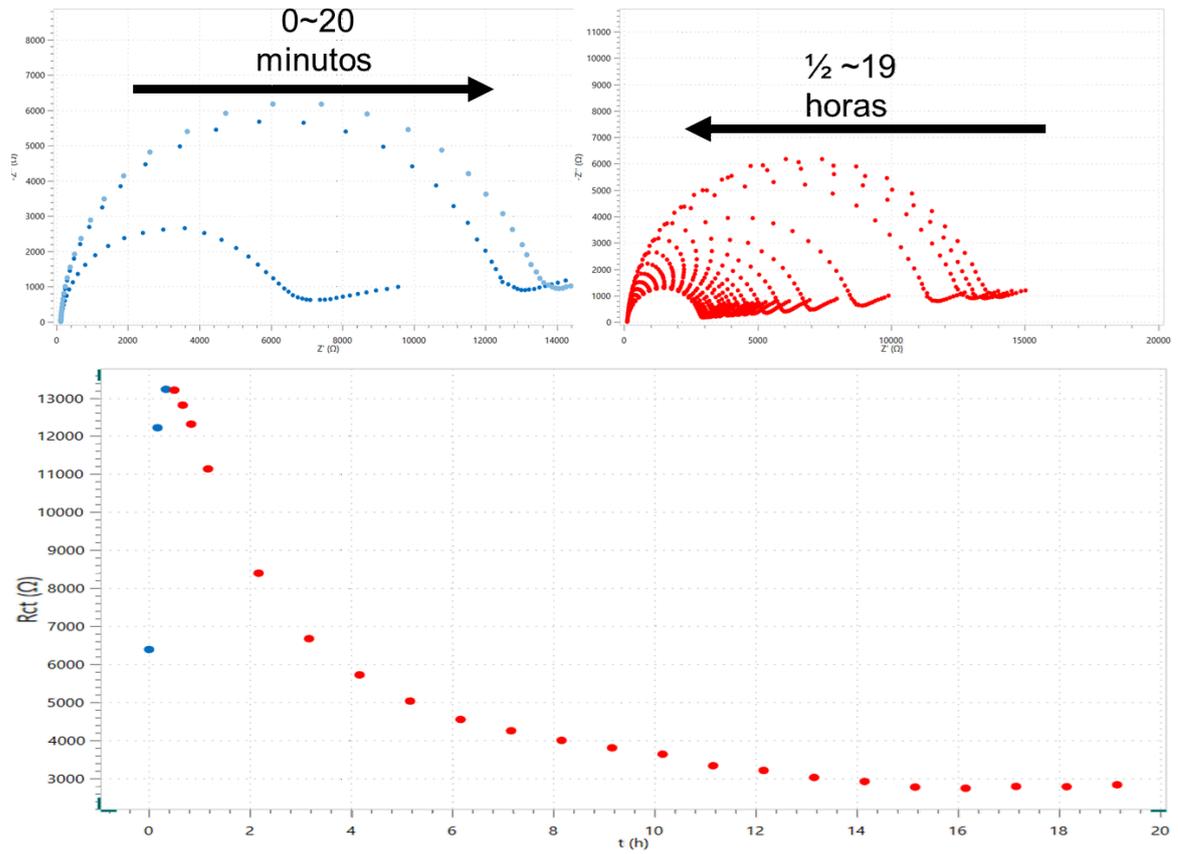
APÊNDICE A –Diagrama de argand (Nyquist) e curvas de voltametria cíclica para as etapas de fabricação de dispositivo. Medidas tomadas após equilíbrio.



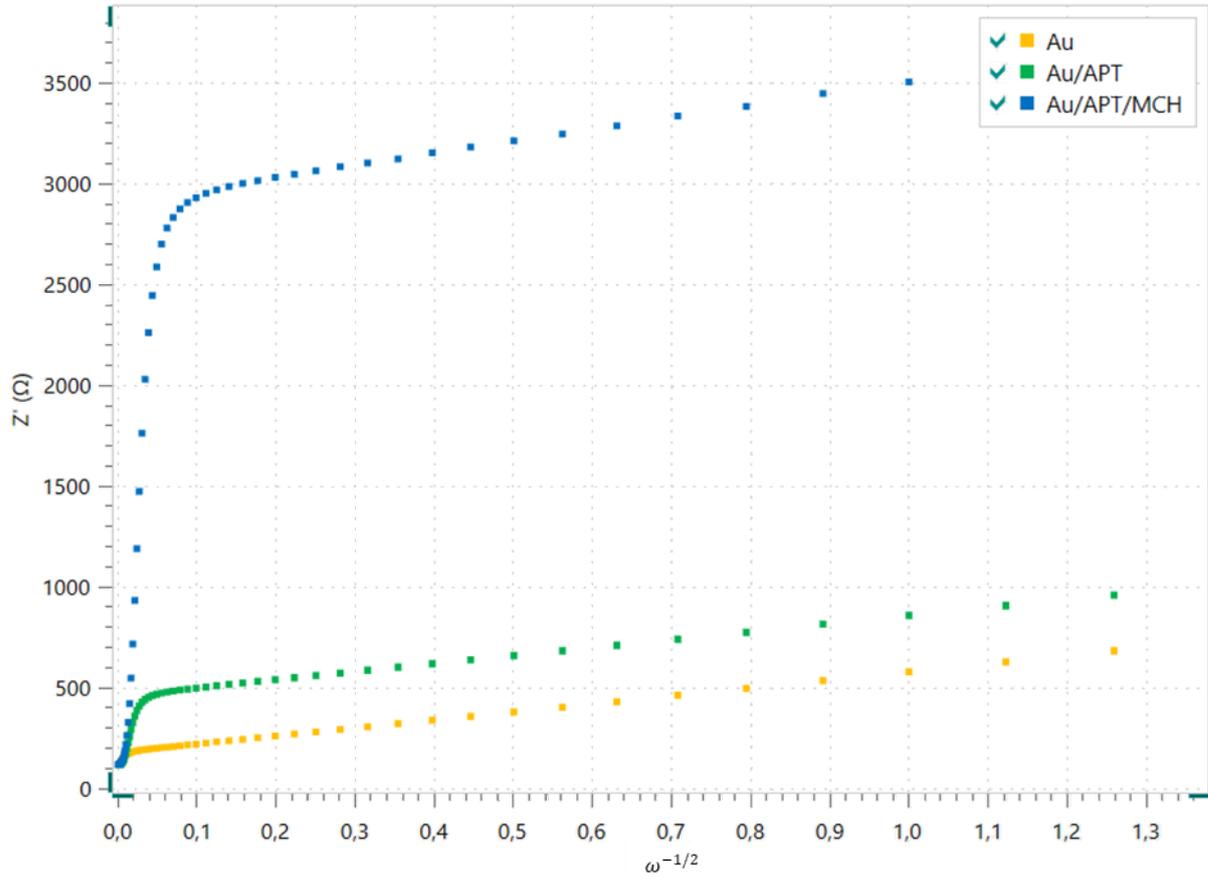
APÊNDICE B –Diagrama de argand (nyquist) obtidos pela técnica de EIE ao longo de 19 horas para a modificação de superfície de ouro com aptâmero e curva de valores de R_{ct} obtida pelo tratamento desses dados.



APÊNDICE C –Diagrama de argand (Nyquist) obtidos pela técnica de EIE ao longo de 19 horas para a modificação de superfície de ouro com MCH após a etapa de modificação com aptâmero e curva de valores de R_{ct} obtida pelo tratamento desses dados.



APÊNDICE D – Gráfico formado pela parte real da impedância versus o inverso da raiz quadrada da frequência angular ($Z' \times \omega^{-1/2}$) utilizados para calcular θ_{IS}^P .



ANEXO A – Print manual do usuário Metrohm NOVA.

The result of the test is the value of pseudo, χ_{ps}^2 , the sum of squares of the relative residuals. In each case the χ^2 for the real and the imaginary part is reported (overall χ^2 is a sum of real and imaginary χ^2). Large χ^2 values indicate that the data quality is low. A small value, on the other hand, usually indicates a good fit.

The equations used in the Kramers-Kronig test are provided below:

$$\chi_{ps}^2 = \sum_{i=1}^N \frac{[Z_{re,i} - Z_{re}(\omega_i)]^2 + [Z_{im,i} - Z_{im}(\omega_i)]^2}{[(Z_{re,i})]^2 + [(Z_{im,i})]^2}$$

$$\chi_{re}^2 = \sum_{i=1}^N \frac{[Z_{re,i} - Z_{re}(\omega_i)]^2}{[(Z_{re,i})]^2 + [(Z_{im,i})]^2}$$

$$\chi_{im}^2 = \sum_{i=1}^N \frac{[Z_{im,i} - Z_{im}(\omega_i)]^2}{[(Z_{re,i})]^2 + [(Z_{im,i})]^2}$$

Where:

- $Z_{re,i}$ and $Z_{im,i}$ are the real and imaginary parts of the i^{th} data point, respectively
- $Z_{re}(\omega_i)$ and $Z_{im}(\omega_i)$ are the real and imaginary parts of the fit function calculated at the frequency ω_i , respectively
- ω_i is the frequency at where the i^{th} data point was taken