



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

CAROLINE YUMI NAKIRI NICOLICHE

**Formação *in-situ* de nanofilme em papel pirolisado 3D para
análises eletroquímicas em fluidos biológicos complexos**

**CAMPINAS
2022**

CAROLINE YUMI NAKIRI NICOLICHE

Formação *in-situ* de nanofilme em papel pirolisado 3D para análises eletroquímicas em fluidos biológicos complexos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Renato Sousa Lima

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Caroline Yumi Nakiri Nicoliche e orientada pelo Prof. Dr. Renato Sousa Lima.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

N644 Nicoliche, Caroline Yumi Nakiri, 1992-
Formação *in-situ* de nanofilme em papel pirolisado 3D para análises eletroquímicas em fluidos biológicos complexos / Caroline Yumi Nakiri Nicoliche. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Renato Sousa Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Eletroquímica. 2. Biossensores. 3. Pirólise. I. Lima, Renato Sousa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: In-situ nanofilm formation on 3D pyrolyzed paper for electrochemical analysis in complex biological fluids

Palavras-chave em inglês:

Electrochemistry

Biosensors

Pyrolysis

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Renato Sousa Lima [Orientador]

Lauro Tatsuo Kubota

Wendell Karlos Tomazelli Coltro

Data de defesa: 10-11-2022

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9883-2440>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3629673632354188>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Sousa Lima (Orientador)

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota (UNICAMP)

Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **Caroline Yumi Nakiri Nicoliche**, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de novembro de 2022.

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio, em
especial minha avó, Shizue, pela
força na luta contra o câncer.
Ao Thomas, pelo companheirismo.
Ao meu avô, Angelo, (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Dr. Renato Lima por ter me dado a oportunidade de fazer parte deste projeto e por toda orientação durante o desenvolvimento.

Ao pesquisador do CNPEM, Dr. Murilo Santiago pelas discussões e orientações essenciais para execução desse projeto.

Ao Angelo Gobbi por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado durante o trabalho.

Ao Gabriel Martos que iniciou as pesquisas do projeto, à Aline Pascon pelas contribuições na caracterização do material e ao Ítalo Bezerra que auxiliou na finalização do trabalho.

Aos demais colegas do LMF pelo suporte, auxílio e descontração durante o mestrado: Alexandre, Anielli, Gabriela, Giulia, Larissa, Ricardo, Vitória, Luis Carlos, Flávio Makoto, Maria Helena e Rui.

Às minhas amigas, Vitoria e Larissa pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, irmã e ao Thomas pelo suporte diário que me deram forças para terminar o trabalho.

Aos colegas do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) e do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), em especial Carlos Costa, Cleyton Biffe, Jefferson Bettini e Mariane Pereira pelo suporte na operação de equipamentos, interpretação e tratamento dos dados de caracterização.

À Petrobrás pelo apoio financeiro do projeto “Desenvolvimento de microdestiladores de petróleo” – Processo 4600562274.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os sensores eletroquímicos são uma alternativa promissora para análise *point-of-care* (POC). Apesar disso, o desenvolvimento de um dispositivo responsivo em meio complexo e escalonável que permita a análise de amostras biológicas ainda é desafiador principalmente devido à passivação do eletrodo pelo meio, o que prejudica o seu desempenho analítico e dificulta a sua comercialização e uso em aplicações de rotina. Para impedir essa passivação, é adotada usualmente uma camada antipassivadora para inibir a adsorção não específica das proteínas sobre a superfície do eletrodo. Porém, essas camadas levam a limitações como perda de sensibilidade, maiores complexidade e tempo de fabricação e redução da durabilidade do sensor. Sem qualquer etapa de modificação química covalente, este trabalho propõe uma estratégia inédita para análises eletroquímicas de fluidos biológicos complexos utilizando papel pirolisado, um material 3D poroso, hidrofóbico e condutor, como eletrodo escalonável, verde e descartável acoplado ao uso de um surfactante disponível comercialmente, o Tween®20 (T20). Esse polissorbato foi capaz de formar de maneira *in-situ* uma nanocamada anfifílica (~2 nm) que levou a dois fenômenos simultâneos cooperativos: i) permeação lenta e gradual da amostra através dos poros do eletrodo, aumentando a sua área eletroativa e ii) proteção da sua superfície contra passivação pela formação de uma camada hidrofílica de solvatação. Além disso, a espessura nanométrica do T20 foi crucial para que não ocorresse um impedimento significativo da cinética da transferência de carga com a sonda redox, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$. O sensor foi caracterizado por diferentes técnicas para estudo i) das suas propriedades físicas (ângulo de contato, LSCM, resistividade, SEM, AFM, Raman e TEM) e eletroquímicas (voltametria cíclica e EIS.), ii) da capilaridade das amostras em função do T20 (SEM e EDS) e iii) da adsorção, espessura e propriedade de antipassivação do T20 (XPS, AFM, μCT , STEM/EELS, dC/dZ por AFM). Após a adição do T20 em solução com albumina de soro bovino (BSA), o biopassivador modelo adotado, a corrente aumentou em 300% com o tempo de incubação. Além disso, houve aumento na sensibilidade, possibilitando sua modulação com o tempo de interação de acordo com a necessidade. Em testes de até 4 h de exposição ao T20, as correntes de pico após 5 min da interação com a sonda redox aumentaram em 19,6% em relação aos dados de 1 h de exposição ao T20. Por fim, aumentou-se a complexidade da matriz para análise do desempenho do sistema em um meio de relevância clínica, o plasma humano não diluído. Enquanto as estratégias de proteção contra a passivação disponíveis na literatura comprometem a sensibilidade, nosso método proporcionou um aumento de corrente de 125% em relação à corrente original após 1 h de exposição ao plasma. O método se mostra, assim, promissor para o desenvolvimento de biossensores visando seu uso em dispositivos POC e testes em massa.

ABSTRACT

Electrochemical sensors are a promising alternative to point-of-care (POC) analysis. Despite this, the development of a responsive and scalable device that allows analysis of biological samples is still a challenge. The main reason for this is due to the electrode surface passivation by the medium, which damage its analytical performance, compromising its commercialization and daily use. To prevent this passivation, an antifouling layer is usually applied to inhibit the non-specific adsorption of proteins on the electrode surface. However, these protection layers lead to limitations such as sensitivity loss, increase of fabrication complexity and time, and reduction of the sensor life span. Without any covalent modification step, this work proposes an unprecedented strategy for electrochemical analysis of complex biological fluids using a pyrolyzed paper, a 3D porous, hydrophobic and conductive material, as a scalable, disposable, and green electrode coupled to a commercially available surfactant, Tween®20 (T20). This polysorbate was capable to form *in-situ* amphiphilic nanolayer (~2 nm) that led to two cooperative simultaneous phenomena: i) a slow and gradual permeation of the samples through electrode porous, increasing its electroactive area and ii) an antifouling surface protection against passivation by a hydrophilic solvation layer. Besides that, the nanometer thickness of T20 was crucial to prevent a significant impediment to the charge transfer kinetics of redox pair, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$. The sensor was characterized through different characterization techniques for i) its physical proprieties (contact angle, LSCM, resistivity, SEM, AFM, Raman, and TEM) and electrochemical properties (cyclic voltammetry and EIS), ii) sample capillarity with T20 (SEM and EDS), and iii) adsorption, thickness, and antifouling propriety of T20 (XPS, AFM, μCT , STEM/EELS, and AFM dC/dZ). After T20 addition in a solution of bovine serum albumin (BSA), a biofouling model adopted, the current increased by 300% with incubation time. In tests of up to 4 h of T20 exposure, the peak current after 5 min of redox probe interaction increased by 19.6% in relation to 1 hour exposition data to T20. At last, the matrix complexity was increased in order to analyze the system performance in a clinically relevant medium, undiluted human plasma. Even though anti-biofouling strategies in literature compromise the sensor sensibility, our method provided a current increase of 125% compared to the original current after 1 h of interaction with human plasm. Therefore, the method shows a promising biosensors development aiming its use in POC and mass diagnosis devices.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	fitas adesivas
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AuNP	nanopartícula de ouro
BDMA	Benzildimetilamina
BS	algumas centenas abaixo da superfície
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C _{dl}	capacitor da dupla camada elétrica
CAAE	Certificado de apresentação de apreciação ética
COVID-19	<i>coronavirus disease of 2019</i>
CPE	<i>constant phase element</i>
CT	condição controle
CTAB	brometo decetiltrimetil amônio
D	coeficiente de difusão
DCE	dupla camada elétrica
d.p.	desvio padrão
DPPT	1, 2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphothioethanol
dC/dZ	medida de gradiente de capacitância por AFM
EDS	<i>energy dispersive spectroscopy</i>
EELS	<i>electron energy loss spectroscopy</i>
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ePAD	<i>Electrochemical paper-based analytical devices</i>
F	constante de Faraday
GA	<i>Glutaraldeído</i>
h	horas
i.c.	intervalo de confiança
I _{ap}	corrente de pico anódico
I _{cp}	corrente de pico catódico
ITO	eletrodo de óxido de estanho e índio
k ⁰	constante de transferência heterogênea de elétrons
LFA	<i>Lateral flow assay</i>
LSCM	<i>laser scanning confocal microscopy</i>
m/m	massa/massa
min	minutos
n	número de amostras
<i>n</i>	número de elétrons na reação
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAD	<i>paper-based analytical devices</i>
PANI	Polianilina
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pCBMA	<i>poly(carboxybetaine methacrylate)</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEDOT	<i>Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)</i>
PEG	polietileno glicol
PEO	polioxietileno
PF	Parafilm®M
POC	<i>point-of-care</i>
POPC	<i>2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>

PP	papel pirolisado
ppb	partes por bilhão
PPP-EFM	<i>PointProbe(R) plus electrostatic force microscopy</i>
pSBEDOT	<i>poly(sulfobetaine-3,4-ethylenedioxythiophene</i>
pSBMA	<i>poly(sulfobetaine methacrylate</i>
R	constante dos gases ideais
R ²	coeficiente de determinação
R _{ct}	resistência de transferência carga
R _s	Resistência da solução
redox	reação de oxirredução
RMS	média quadrática
SAM	<i>self-assembled monolayer</i>
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SDS	<i>Dodecyl sulfato de sódio</i>
SFC	<i>surfactant-free condition</i>
STEM	<i>scanning transmission electron microscopy</i>
SWC	<i>surfactant-with condition</i>
T	temperatura
T20	Tween®20
TEM	<i>transmission electron microscopy</i>
TS	logo abaixo da superfície
v	velocidade de varredura
v/v	volume/volume
VC	voltametria cíclica
W	elemento de Warburg
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>
Y ₀	parâmetro relacionado com o elemento do circuito elétrico
Z'	impedância real
Z''	impedância imaginária
α	constante relacionada com o comportamento de idealidade do CPE
ΔE _p	diferença de potencial dos potenciais de picos de corrente anódicos e catódicos
θ	ângulo de contato
μCT	<i>Computerized microtomography</i>
μPAD	<i>microfluidic paper-based analytical devices</i>
π	número pi
χ ²	qui-quadrado
ψ	parâmetro cinético de Nicholson

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fabricação do eletrodo de PP e detalhes do sensor proposto. **(a)** Etapas de fabricação e **(b)** imagens digitais da célula eletroquímica (1) e do dispositivo final (2).....24
- Figura 2.** Comportamento do filme de PF depositado sobre o PP. **(a)** Imagens digitais do sensor antes e após o aquecimento a 120 °C. **(b)** Ilustração do corte realizado no PP com o PF e indicação da posição onde foi obtida a imagem de SEM e **(c)** imagens de SEM da lateral do corte transversal do sensor no limite do PF (1) e de todas as camadas do sensor (1). AD, PF e PP, representam, respectivamente, a camada adesiva, a camada de PF e o papel pirolisado.29
- Figura 3.** Dados de caracterização física e eletroquímica do PP. **(a)** Mapa de topografia do PP por LSCM (5,8 cm², objetiva 50x). **(b)** Espectro de Raman do papel antes (1) e após (2) o processo da pirólise. **(c)** Histograma com dados obtidos (1) através da imagem binária (2) gerada a partir das imagens de SEM em três regiões distintas. **(d)** Imagem digital da medida de ângulo de contato ao se gotear 10 µL de água deionizada sobre a superfície do papel pirolisado.....31
- Figura 4.** Ilustração do princípio de funcionamento do sensor. **(a)** Fenômeno causado pela adição de T20 de formação da capa de solvatação (1), o fluxo da solução pelo PP mostrado na imagem de SEM do corte transversal de PP (2) e sais de KCl precipitados por entre as fibras após evaporação do solvente (3). **(b)** Comportamento da corrente faradaica pelo tempo sob efeito do T20.....34
- Figura 5.** Resultados obtidos na avaliação do sensor em relação à velocidade de varredura. **(a)** Voltamograma em diferentes velocidades de varreduras (10, 20, 40, 60, 80 e 100 mV s⁻¹), **(b)** gráfico de corrente de pico anódico e **(c)** gráfico do parâmetro ψ por 43,90 v^{-1/2} para Fe(CN)₆^{3/4-} a 1,0 mmol L⁻¹. v = 20 mV s⁻¹.....35
- Figura 6.** Resultados obtidos na avaliação do sensor em diferentes soluções. **(a)** Voltamograma cíclica e **(b)** gráfico com as correntes de picos anódicos (*I_{ap}*) e catódicos (*I_{cp}*) em cada condição para Fe(CN)₆^{3/4-} a 1,0 mmol L⁻¹. v = 20 mV s⁻¹....38
- Figura 7.** Mapas de cores dos valores da impedância imaginária (*Z''*) com gráfico de resistência de transferência de carga pelo tempo, obtido a partir do gráfico de Nyquist. Dados obtidos analisando nas condições **(a)** SFC e **(b)** SWC.39
- Figura 8.** Gráficos de Nyquist e circuito equivalente obtidos durante 1h de medidas contínuas. Dados obtidos analisando nas condições **(a)** SFC e **(b)** SWC. A seta em

preto indica a sequência dos espectros obtidos pelo tempo. Faixa de frequência analisada: 0,1 a $1,0 \cdot 10^5$ Hz.40

Figura 9. Caracterização da capilaridade adquirida pela presença do T20. **(a)** Imagens 2D e 3D de μ CT do PP com camada de T20 após, conforme ilustração **(b)**, incubação por 1 h da solução e secagem por 1 dia e **(c)** e **(d)** imagens de SEM e mapas de EDS para cada parte do eletrodo, topo (1,2), fundo (3,4) e na transversal do eletrodo (5,6), na **(c)** ausência e **(d)** presença de T20. As cores verde e vermelha no mapa de EDS representam $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de K^+ e Cl^- do eletrólito de suporte, respectivamente.43

Figura 10. Resultados das análises de XPS para PP com incubação de BSA e T20. **(a)** Survey spectra para PP (1) e PP após incubação, sem BSA, com T20 por 1 h (2). **(b)** Gráfico de barras das quantidades relativas encontradas. Espectros de alta resolução para **(c)** pico de C 1s para PP (1) e PP/T20 (2), e para **(d)** N no sistema PP/BSA (1) e PP/BSA/T20 (2).45

Figura 11. Resultados das medidas de AFM para determinação da espessura de T20. Imagens de AFM de T20 em **(a)** mica e **(c)** sílica com suas respectivas **(b)** medidas de altura e **(d)** perfis de altura.46

Figura 12. Resultados das medidas de espessura da nanocamada de T20 pelo STEM/EELS. **(a)** espectro individuais de EELS do PP e T20, **(b)**, imagem de TEM da fatia de PP preparado por ultramicrotomia. A fina camada de Au (depositada na superfície superior do PP) é indicada por setas brancas, correspondendo à região escura. Imagem de STEM e espectros de EELS de **(c)** PP e **(d)** PP exposta a T20. As regiões contornadas por um retângulo verde (1) indicam as regiões amplificadas (2) e as linhas coloridas indicam as regiões usadas para integrar os sinais de EELS do sentido de fora para dentro da amostra, como indicado pelas setas (3). Cada linha corresponde a 1 nm. Espectros integrados resultantes de EELS correlacionados com as linhas coloridas como descritos na legenda (4) e zoom dos três primeiros espectros com setas em preto indicando o pico π em aproximadamente 287 eV (5).47

Figura 13. Resultados de AFM e de STEM/EELS para análise da propriedade de antipassivação do sensor. **(a)** Mapas de dC/dZ por AFM e **(b)** valores médios de potencial obtidos do PP, realizados em uma mesma região, antes (1,3) e após exposição de BSA, sem (2) e com (4) T20. **(c)** Imagens de STEM para superfície do PP. Retângulos rosa e azul nas imagens indicam as regiões onde foram obtidos os

espectros de EELS, onde TS indica a parte superior do sensor, e BS, inferior. (d) Imagens de STEM e mapas de C e N (1,3), e espectro de EELS (2,4) obtidos nas regiões de máxima intensidade (I) de N, indicado pelas setas em branco.....	49
Figura 14. Resultados das análises do sensor em diferentes tempos por incubação em única etapa. (a) Voltamograma de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ 1,0 mmol L ⁻¹ com BSA nas condições sem T20, SFC e com T20, SWC após 5, 30 e 60 min de incubação. (b) Gráfico das correntes de pico resultantes em módulo e as (c) taxas de aumento das correntes. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	50
Figura 15. Resultados das análises de sensibilidade do sensor. (a) Curva analítica para solução padrão redox nas condições SFC e SWC em 5, 30 e 60 min. (b) Gráfico com os valores de sensibilidades resultantes para corrente anódica. A linha pontilhada em (b) representa a sensibilidade obtida na condição de solução controle. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	51
Figura 16. Resultados das análises de sensibilidade com eletrodo de disco de ouro. (a) Voltamogramas de 1,0 – 5,0 mmol L ⁻¹ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ nas condições controle e respectiva (b) curvas analíticas para i_{lap} e i_{cp} . $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	52
Figura 17. Resultados das análises de sensibilidade do sensor para rotina de 3 etapas. (a) Curva analítica para solução padrão redox nas condições SFC e SWC em 5, 30 e 60 min. (b) Gráfico com os valores de sensibilidades resultantes para corrente anódica.....	53
Figura 18. Voltamograma do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ 1,0 mmol L ⁻¹ pela rotina de 3 etapas com 1 h e 4 h de incubação nos tempos 5, 30 e 60 min com BSA 1,0% m/v na presença de T20 0,5% v/v. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	54
Figura 19. Voltamograma de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ 1,0 mmol L ⁻¹ nas condições SFC e SWC (sem e com T20 0,5% v/v, respectivamente) após 5, 30 e 60 min de incubação com plasma humano pela rotina de três etapas. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$	55

SUMÁRIO

1.	Introdução	15
2.	Objetivos	22
3.	Material e métodos	23
4.	Resultados e Discussão	27
4.1.	Caracterização do papel pirolisado	27
4.2.	Princípio do método	32
4.3.	Análises eletroquímicas preliminares	34
4.3.1.	Cinética de transferência de carga	34
4.3.2.	Efeitos cooperativos do T20.....	36
4.3.3.	Estudos da cinética da transferência de carga por EIE.....	38
4.4.	Estudos de caracterização	42
4.4.1.	Capilaridade através do papel pirolisado	42
4.4.2.	Adsorção, espessura e propriedade de antipassivação do T20.....	43
4.5.	Desempenho analítico em meio de BSA.....	49
4.6.	Aplicação em meio complexo.....	54
4.7.	Comparação com a literatura	55
5.	Conclusões.....	57
6.	Referências bibliográficas	59

1. Introdução

Diagnósticos em campo e em massa

Plataformas bioanalíticas para análise em campo (*point-of-care*, POC) têm surgido como uma alternativa de grande relevância no diagnóstico de doenças¹⁻⁸. Em 2003, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu um conjunto de critérios a serem seguidos para o desenvolvimento de um teste POC ideal. Esses critérios foram aprimorados e, atualmente, são amplamente conhecidos como o acrônimo em inglês REASSURED. Esse termo diz respeito a plataformas com conectividade em tempo real (*real-time connectivity*), de fácil coleta de amostra e respeitando o meio ambiente (*ease of specimen collection and environmental friendliness*), acessíveis (*affordable*), sensíveis (*sensitive*), específicas (*specific*), fáceis de utilizar (*user-friendly*), rápidas e robustas (*rapid and robust*), sem equipamentos de medida (*equipment-free*) e acessíveis ao usuário final (*deliverable to end-users*)⁹. Através dessas plataformas, é possível descentralizar as análises contribuindo para reduzir o tempo de diagnóstico, assistindo a medicina personalizada e o diagnóstico precoce e estendendo o acesso aos serviços de atendimento à saúde para a população mais carente e em regiões de baixa infraestrutura.

Os dispositivos POC podem ser utilizados para monitorar remotamente dados essenciais de um paciente, podendo ser em sua própria residência, agilizando, assim, o atendimento médico. Uma central com especialistas para a interpretação desses dados receberia as informações do paciente e forneceria um retorno simultâneo. Essa rapidez no diagnóstico clínico contribui com a medicina personalizada, a identificação de uma doença nos seus primeiros estágios de desenvolvimento e o prognóstico de pacientes crônicos¹⁰. Esse tipo de análise clínica é particularmente valioso em ambientes com recursos escassos, de difícil acesso a serviços de saúde pública.

Os dispositivos POC são também cruciais no combate a epidemias e pandemias por permitirem a realização de testes em pontos estratégicos de uma cidade ou região, através de sistemas de testagem como por *drive-through*, autotestes e postos de saúde afastados. Isso auxilia na descentralização de serviço dos centros médicos, evitando, assim, a sua superlotação nas áreas de maior número de casos. Esses dispositivos são também essenciais para a testagem em

massa por fornecerem informações importantes sobre as condições de saúde da população, como a progressão do contágio da doença¹¹. Com essas informações, é possível assistir as ações públicas de saúde em relação ao isolamento social e posterior retorno das atividades profissionais. Os dispositivos POC se tornaram ainda mais evidentes com o surto da doença causada por um coronavírus, o SARS-CoV-2, em 2020, a COVID-19, mostrando a importância de tais testes.

Para atenderem ao critério REASSURED, as plataformas POC devem ser de fácil manuseio, sem a necessidade de mão de obra especializada para operar e interpretar os dados, e devem gerar análises rápidas e confiáveis a partir de um sistema de baixo custo, portátil e escalonável¹². Conforme será abordado a seguir, os biossensores eletroquímicos baseados em papel vêm se mostrando capazes de atender a esses requisitos.

Eletrodos baseados em papel

O primeiro trabalho utilizando um sistema à base de papel foi publicado por Müller e Clegg em 1949, onde foi gravado, por aquecimento, um padrão de parafina hidrofóbica em papel filtro para realização de cromatografia de papel automatizada¹³. Porém, somente após o trabalho do grupo do Whitesides em 2007, no qual o papel foi utilizado como substrato para o desenvolvimento de um sensor colorimétrico, que dispositivos analíticos à base de papel (PADs, *paper-based analytical devices*) se popularizaram¹³. Devido às diversas vantagens do papel como sua ampla disponibilidade, baixo custo, biodegradabilidade, compatibilidade de funcionalização e capacidade de gerar fluxo por capilaridade, sem a necessidade de bombas externas, os PADs têm ganhado espaço principalmente como dispositivos POC^{13–15}.

A detecção colorimétrica é uma das técnicas mais empregadas em sistemas microfluídicos à base de papel (μ PAD). Embora possua vantagens como baixo custo e operação simples, os sistemas colorimétricos podem apresentar sensibilidade inferior às técnicas de detecção tradicionais, são limitados pelo número de reações envolvendo o analito capazes de gerar cor e são suscetíveis a perturbações de luminosidade externa, o que limita o seu uso em campo¹⁶. Alternativamente, os dispositivos eletroquímicos à base de papel (ePADs), propostos em 2009 pelo grupo do Henry, são uma estratégia atrativa para a fabricação de

dispositivos POC, combinando baixo custo com sensibilidade elevada e compatibilidades de miniaturização do sensor e da instrumentação analítica¹⁶.

Em relação aos eletrodos dos ePADs, o carbono (C) e metais nobres são os mais utilizados. Os eletrodos metálicos, como Au, Pd, Ag e Pt, oferecem uma alta condutividade, ao passo que o C oferece uma janela de potencial maior, além de ser um material mais barato¹³. Alguns dos materiais de C explorados na construção de ePADs são o grafite, *carbon black*, grafeno e nanotubos de carbono¹⁷. Uma alternativa é o papel pirolisado (PP), um eletrodo que é gerado sem a necessidade de deposição de um material condutor, apenas pela conversão do papel em material gráfico condutor através da pirólise do papel.

A pirólise elimina etapas de transferência de material para o substrato de papel e a geração de resíduos líquidos, baseando-se na grafitização da celulose (ou seja, a formação de C sp²) por meio de aquecimento a temperaturas da ordem de 1000 °C, convertendo o papel em material carbonáceo condutor¹⁸. A pirólise pode ser realizada através de duas técnicas, pelo aquecimento de toda extensão de uma fita de papel em um forno tubular em meio a um gás¹⁹ (Ar, N₂ ou H₂) ou por laser de alta energia como, por exemplo, de CO₂²⁰. Além de ser um processo ecológico, o uso em especial do forno tubular apresenta vantagens, como uma melhor eficiência na conversão da estrutura celulósica em gráfica (acima de 70%) e o fato de permitir o escalonamento do processo em larga escala^{21,22}. Outra vantagem de seu uso é a grafitização de toda a espessura do papel, produzindo um eletrodo com uma estrutura 3D, composta por fibras e poros. Essa estrutura 3D pode ser acessada pela amostra mediante capilaridade promovida, por exemplo, por álcoois, o que eleva a área eletroativa, aumentando, assim, a sensibilidade do método como proposto recentemente pelo nosso grupo²³.

Na literatura, a aplicação do PP na área de eletroquímica está em expansão. Nos últimos anos, eletrodos baseados em PP têm sido aplicados na fabricação de supercapacitores flexíveis à base de papel²⁴, como eletrodo na redução de CO₂ catalisada com nanopartículas de Cu²⁵, como sensor na determinação de glicose em bebidas²⁶, como molde para estruturas fibrosas de metais nobres e para determinação de traços de Zn, Cd e Pb em águas fluviais e pluviais. Na área de biossensores, há poucos trabalhos com uso de eletrodos a base de PP. Um dos trabalhos de aplicação de PP na área propõe a detecção de

Staphylococcus aureus sem utilizar elementos específicos de reconhecimento, através de medidas amperométricas com um eletrodo vestível de PP²⁷.

Biossensores eletroquímicos

Os biossensores são sistemas baseados na transdução de eventos de biointeração (reconhecimento biológico) em um sinal elétrico analiticamente útil, ou seja, que apresenta uma correlação sistemática com a presença e a concentração do analito²⁸. Os mecanismos de reconhecimento desse analito são classificados em dois tipos principais: (i) biocatálise, onde uma ou mais enzimas catalisam uma reação específica envolvendo o analito, e (ii) bioafinidade, em que elementos como ácidos nucleicos e anticorpos são usados para interação específica com o analito²⁹. Os biossensores são formados por dois componentes principais em série. Além do biorreceptor (ou elemento de reconhecimento), há o transdutor que é responsável pela geração do sinal elétrico analiticamente útil. Particularmente, os biossensores eletroquímicos se baseiam em transdutores eletroquímicos, sejam capacitivos ou faradaicos, e exibem vantagens como baixo custo, alta sensibilidade e portabilidade, as quais são essenciais para diagnósticos POC³⁰.

Um dos primeiros biossensores foi desenvolvido em 1962 por Clark e colaboradores, um biossensor eletroquímico de glicose baseado em biocatálise, com a enzima glicose oxidase imobilizada sobre a superfície de um eletrodo de Pt para catalisar a oxidação da glicose³¹. O biossensor de glicose se tornou, atualmente, um exemplo de sucesso comercial e de uso de rotina para testes POC. Décadas seguintes após a comercialização do biossensor amperométrico de glicose pela Yellow Springs Instruments no ano de 1973, biossensores eletroquímicos para detecção de colesterol, lactato e creatinina surgiram no mercado^{30,32}. O glicosímetro continua sendo o biossensor mais usado em aplicações clínicas de rotina e domésticas, representando 90% do mercado de biossensores^{32,33}.

Além das diversas exigências a serem consideradas como o custo por teste, a regulamentação e o *design* da instrumentação, um dos principais motivos que dificultam a comercialização dos biossensores eletroquímicos para o monitoramento de demais doenças é a contaminação do eletrodo após interação com fluidos biológicos (como sangue, plasma e soro), afetando a sua sensibilidade e seletividade. O desenvolvimento de nanointerfaces capazes de preservar a resposta

do biossensor após exposição a fluidos biológicos é um desafio atual e determinante para o sucesso da adaptação comercial desses dispositivos.

Passivação dos eletrodos em fluidos biológicos

A presença de espécies biológicas em fluidos corporais, tais como suor, saliva, sangue e urina, passiva gradualmente a superfície do eletrodo^{34,35}. As moléculas orgânicas presentes, como proteínas, células, lipídeos e polissacarídeos, adsorvem não-especificamente através, principalmente, de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, afetando adversamente o desempenho analítico do biossensor^{35,36}. Em biossensores do tipo *label-free*, essa camada influencia a superfície do eletrodo de duas maneiras: (i) reduzindo a área eletroativa e (ii) dificultando o acesso da espécie eletroativa (sonda redox) à superfície do eletrodo³⁵⁻³⁷. O primeiro efeito reduz a corrente faradaica, podendo prejudicar a sensibilidade do método, ou seja, podendo aumentar os riscos de falsos negativos em diagnósticos clínicos⁵. Já o segundo efeito diminui a cinética de transferência de carga da sonda em solução, gerando respostas não específicas as quais podem afetar a seletividade clínica do teste, levando a falsos positivos.

As estratégias para contornar a passivação da superfície do eletrodo envolvem modificações químicas e/ou físicas com camadas semipermeáveis que previnem a interação do eletrodo com as proteínas, mas permitem a penetração das sondas. Os materiais mais utilizados são o polietileno glicol (PEG)^{38,39}, polímeros zwitteriônicos⁴⁰⁻⁴⁴, peptídeos⁴⁵⁻⁴⁸, monocamadas auto-montadas (SAM, *self-assembled monolayer*)^{38,49}, albumina do soro bovino (BSA, *bovine 19 érum albumine*)³⁴ ou camadas mistas⁵⁰. Como limitação, a maioria dessas membranas semipermeáveis prejudica o desempenho dos eletrodos, pois também diminui a cinética de transferência de carga envolvendo o analito e a superfície do eletrodo³. Como solução, alguns trabalhos propõem a adição de um material condutor, por exemplo, um polímero condutor, para minimizar as perdas na taxa das reações redox⁵¹. Porém, esse método resulta em um maior número de etapas de fabricação, aumentando o seu custo. Essas camadas podem também afetar a durabilidade, a reprodutibilidade e o escalonamento do sensor, prejudicando a sua viabilidade de comercialização e uso na prática clínica^{32,34}.

Em suma, o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de baixo custo, escalonáveis e capazes de garantir análises rápidas, reprodutíveis, sensíveis e acuradas em fluidos biológicos complexos (não diluídos) é ainda um desafio para a área. Pudemos observar essa dificuldade ao longo da pandemia da COVID19, com os métodos convencionais como PCR (*Polymerase chain reaction*), ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), que são métodos laboriosos e caros, e LFA (*Lateral flow assay*), método com acurácia inferior e focado em resultados qualitativos, ainda sendo aqueles mais usados mundialmente na linha de frente de combate à disseminação do vírus⁸.

Nossa proposta

Considerando os impactos da passivação dos eletrodos em biofluidos e as limitações dos métodos de proteção propostos na literatura, propusemos um novo método para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em PP viáveis comercialmente e capazes de realizar análises sensíveis e reprodutíveis mesmo após longa exposição a meios biológicos como plasma. Esse método não apenas protege o eletrodo de processos de passivação, mas também leva a um aumento da sensibilidade ao longo dessa exposição do eletrodo.

O nosso sistema se baseia em dois fenômenos que ocorrem de maneira simultânea: (i) a formação de uma camada antipassivadora de Tween[®]20 (T20), um surfactante comercial, em escala nanométrica e (ii) a permeação gradual da solução por capilaridade através dos poros do eletrodo hidrofóbico de PP.

A camada de T20 formada inibiu a passivação total do eletrodo e, simultaneamente, permitiu o acesso da solução pelos poros do PP por capilaridade. Esse fenômeno promoveu reações redox nas regiões parcialmente passivadas e em áreas novas ao longo do *bulk* do PP, gerando um aumento da corrente elétrica e de sensibilidade em função do aumento da área eletroativa. Além disso, a escala nanométrica do T20 foi essencial para que não houvesse uma interferência significativa na cinética de transferência de carga. Caso contrário, uma camada de antipassivação espessa poderia ampliar o impedimento dessa cinética, diminuindo a sensibilidade do método.

Ao contrário do que ocorre com os métodos descritos na literatura nos quais há perda de sensibilidade com a camada de proteção, obtivemos um aumento

de corrente faradaica após 1 h de exposição do sensor (PP com a nanocamada de PP) a plasma humano não diluído. Esse é um resultado até então inédito. O método também gerou uma sensibilidade analítica modulável com o tempo, aumentando gradualmente mesmo após períodos longos de exposição a meio biológico (4 h). Os resultados obtidos demonstraram a capacidade do sistema, um método escalonável, de baixo custo e verde, em garantir análises reprodutíveis e sensíveis em biofluidos. Os dados e discussões apresentados foram compilados e publicados recentemente no periódico científico *ACS Applied Materials & Interfaces*⁵².

Esta dissertação irá abordar inicialmente (i) a fabricação dos eletrodos de PP, (ii) considerações sobre o princípio do método e (iii) estudos eletroquímicos preliminares. Em seguida, serão descritas as caracterizações dos fenômenos de (iv) capilaridade através do PP, (v) adsorção do nanofilme de T20, sendo apresentadas, por exemplo, medidas da espessura desse nanofilme, e (vi) estudos sobre a sua propriedade de antipassivação. O comportamento do sistema PP/T20 foi avaliado utilizando-se a albumina de soro bovino, BSA, como agente passivador modelo, uma vez que essa biomolécula é o constituinte proteico principal do sangue, correspondendo a cerca de 60% das proteínas que compõem o sangue humano³⁴. Por fim, serão discutidos (vii) o desempenho analítico do método em função do tempo de exposição a BSA e (viii) a sua resposta após incubação a um biofluido complexo real, que consistiu em plasma humano não diluído.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consiste em desenvolver uma plataforma de baixo custo, escalonável, reprodutível e verde que permita determinações eletroquímicas sensíveis e acuradas em amostras biológicas complexas. Para esse fim, como solução proposta, foi usado o papel pirolisado em combinação com um surfactante para (i) promoção da capilaridade gradual e lenta da amostra na estrutura porosa do eletrodo e (ii) proteção de sua superfície contra passivação.

Quanto aos objetivos específicos, almeja-se obter uma fabricação reprodutível e robusta dos dispositivos, compreender o princípio de funcionamento do método através de estudos com técnicas de caracterização sofisticadas e avaliar seu desempenho analítico após exposição a BSA e plasma humano. Por meio de diversas técnicas de caracterização de superfícies, avaliamos os fenômenos de capilaridade através do PP, da adsorção do nanofilme de T20, inclusive a sua espessura e da propriedade de antipassivação utilizando-se meio biológico controlado (BSA). Em seguida, utilizando medidas eletroquímicas, o desempenho analítico também é testado em meio a BSA e plasma humano. Visamos, assim, demonstrar o potencial da plataforma para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos capazes de assegurar análises de alto desempenho analítico em meio biológico de relevância clínica.

3. Material e métodos

Reagentes químicos

O material utilizado para a fabricação dos eletrodos de PP consistiu em papel cromatográfico #1 Whatman® (Cytiva, EUA), fita adesiva (Adelbras, Brasil), filme Parafilm M® (Ampcor, Suíça) e tinta de prata (SPI supplies, EUA). Todas as soluções foram preparadas em água deionizada (purificado por Milli-Q). As sondas redox ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) e ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) foram adquiridas, respectivamente, pela Merck (Darmstadt, Alemanha) e Nuclear (Guarulhos, Brasil). Tampão fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) em pastilhas, cloreto de potássio (KCl) e monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano (nome comercial, Tween®20) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). O uso do plasma humano foi aprovado pela Comissão de Ética Nacional em Pesquisa, conforme Certificado de apresentação de apreciação ética (CAAE) de número 45450321.8.0000.5404.

Fabricação do dispositivo

O processo de pirólise do papel aplicado foi adaptado de acordo com descrito na literatura⁵³. Uma folha do papel Whatman #1 foi cortada em tiras de 11 x 2,5 cm, onde foram pirolisadas em um forno de tubo Lindberg/Blue M (Thermo Fisher Scientific, USA) sob fluxo constante de nitrogênio (99,99%), 20 L min⁻¹. O sistema foi aquecido até 1000° C por 1 h com rampa de aquecimento de 20° C min⁻¹. Ao fim do processo, o forno foi resfriado naturalmente a temperatura ambiente.

Para sua conexão elétrica com o potenciostato, o PP foi conectado eletricamente através da tinta de prata, fixando-o em uma lâmina de vidro (76 x 26 mm), contendo uma trilha de Pt, fabricada previamente por técnica de fotolitografia e deposição de filme fino por evaporadora por feixe de elétrons. Para delimitar a área de detecção, foi usado o filme Parafilm, PF, com uma área circular de 2 mm de diâmetro perfurado com auxílio de um *punch*. O sistema foi aquecido por 12 min a 120 °C, tempo e temperatura suficientes para que o PF derreta, penetrando parcialmente nos poros do PP de modo a aumentar a sua estabilidade mecânica. As

principais etapas de fabricação e imagens da célula eletroquímica e do dispositivo finalizado são ilustradas na **Figura 1a,b**, respectivamente.

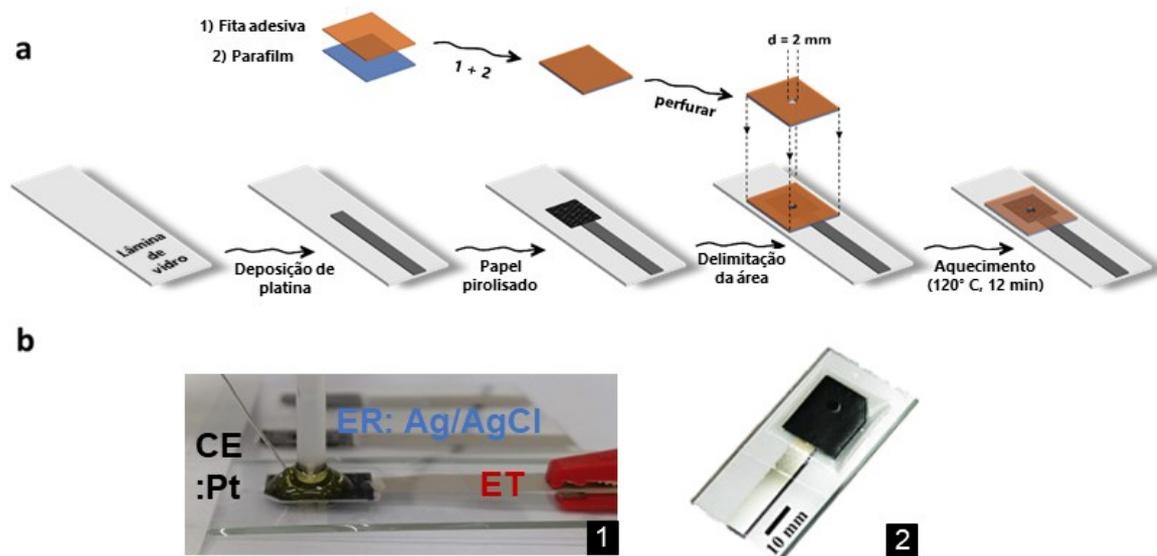


Figura 1. Fabricação do eletrodo de PP e detalhes do sensor proposto. (a) Etapas de fabricação e (b) imagens digitais da célula eletroquímica (1) e do dispositivo final (2).

Análises eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas no potenciostato Autolab, PGSTAT302N (Metrohm, Suíça). A célula eletroquímica foi composta por 3 eletrodos, Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹ (Metrohm) como eletrodo de referência e um fio de platina enrolado (1,0 cm²) como contra eletrodo. Foi utilizado o par redox Fe(CN)₆^{3/4-} com KCl 1,0 mol L⁻¹ e o tampão PBS 10,0 mmol L⁻¹ como eletrólito suporte. As concentrações de T20 e BSA foram 0,5% v/v e 1,0% m/v, respectivamente, ambas em eletrólito.

Para as medidas de voltametria cíclica (VC), foram analisadas amostras de 200,0 µL em 8 ciclos sequenciais, sendo que, para o cálculo das médias e desvios, os 3 primeiros ciclos foram descartados (n = 5). A velocidade de varredura aplicada foi de 20,0 mV s⁻¹ no intervalo de potencial entre -0,05 e +0,55 V. As medidas de VC foram realizadas sequencialmente após 5, 30 e 60 min de interação da amostra com o mesmo eletrodo. Esses dados foram tratados para obtenção das correntes de pico e das diferenças de potencial associadas à sonda Fe(CN)₆^{3/4-} a partir do *software* da Metrohm, NOVA 2.1. Já os experimentos de espectroscopia de

impedância eletroquímica (EIE) foram obtidos continuamente por 1 h em uma faixa de frequência de 0,1 a $1,0 \times 10^5$ Hz. Os dados dos elementos elétricos foram calculados adotando o circuito elétrico equivalente de Randles na simulação realizada pelo *software* NOVA 2.1. Os valores de resistência de transferência carga (R_{ct}) foram obtidos a partir dos diâmetros do semicírculo dos gráficos de Nyquist gerados.

Para comparação do desempenho do sistema de PP com eletrodo de Au, medidas com um eletrodo de disco de Au (1,0 mm de diâmetro) foram realizadas utilizando os mesmos eletrodos de referência e contra eletrodo citados acima. Antes das análises, o eletrodo de Au foi polido com pastas de diamante de 0,25 e 1,0 μm de diâmetro (Arotec, São Paulo, Brasil), seguido de limpeza com isopropanol. O eletrodo foi posteriormente limpo eletroquimicamente em H_2SO_4 1,0 mol L^{-1} através de 8 varreduras de VC entre $-0,5$ e $+1,7$ V sob a velocidade de $50,0$ mV s^{-1} .

Para obtenção da curva analítica, foram analisados padrões da sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4-}$ em diferentes concentrações (1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mmol L^{-1}) por VC. Para cada condição avaliada, foram utilizados 3 dispositivos distintos ($n = 15$). A precisão dos dados foi calculada a partir do desvio padrão (d.p.) e do intervalo de confiança (i.c.). Os valores de i.c. foram obtidos através da distribuição t de Student a um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi usado como parâmetro de linearidade das curvas analíticas, enquanto os valores de sensibilidade foram obtidos diretamente pelo coeficiente angular das curvas⁵⁴.

Preparo das amostras de PP e caracterização

Para caracterização, as amostras foram preparadas a partir do seguinte procedimento: o papel pirolisado foi incubado por 1 h com a solução do eletrólito com ou sem a presença de T20 0,5% v/v e BSA 1,0% m/v (conforme indicado ao longo do texto), seguido de lavagem com o eletrólito por 3 vezes. O sensor foi, então, armazenado em dessecadora por no mínimo 24 h e, no máximo, por 1 semana. As técnicas usadas para avaliação da morfologia e topografia dos eletrodos foram SEM (*scanning electron microscopy*, FEI Quanta 650 FEG), LSCM (*laser scanning confocal microscopy*, Keyence VK-X200) e espectroscopia de Raman (XploRA Plus, Horiba). A hidrofobicidade do PP foi investigada através de medidas de ângulo de contato (Attension, Theta Lite). Para análise do fenômeno de capilaridade através

dos poros do PP, as técnicas de μ CT (*Computerized microtomography*, SkyScan1272, Bruker), e EDS (*energy dispersive spectroscopy*, Oxford) foram usadas. Em seguida, a adsorção do T20 sobre PP e a sua propriedade de antipassivação foram confirmadas por XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*, Thermo Scientific) e AFM (*atomic force microscopy*, ParkSystems NX10) através de medidas de gradiente de capacitância, dC/dZ , e TEM (*transmission electron microscopy*, Jeol JEM 2100 FEG-TEM). As medidas de STEM (*scanning transmission electron microscopy*, Jeol JEM 2100 FEG-TEM) nos permitiram também estimar a espessura da nanocamada de T20 sobre PP.

As medidas de topografia e de gradiente de capacitância (dC/dZ) por AFM foram realizadas em ambiente inerte de N_2 pelo modo pulsante com ponta de Pt/Ir (PPP-EFM, NanoSensors) sob valores de frequência e constante elástica de 75 kHz e $3,0 \text{ N m}^{-1}$, respectivamente. As imagens de LSCM foram obtidas com laser 408 nm usando diferentes lentes objetivas (10, 20, 50 e 100x). O espectro de Raman foi obtido com laser de 638 nm e lentes objetivas de 50x. Uma fonte de potencial de 20 kV com corrente de 175 μA , rotação de $0,4^\circ$ e 3 *frames* a cada rotação foi usada para as imagens de μ CT das amostras. Para as imagens de SEM e mapas de EDS, foi aplicado um baixo vácuo (100 Pa) em potencial de 7kV. Já as imagens de TEM e STEM foram obtidas com uma fonte de 200 kV.

Para as medidas de STEM, uma camada de Au de 70 nm foi depositada sobre a superfície das amostras de PP para identificar a superfície superior, as quais, em seguida, foram mergulhadas na resina Eponate 12 com benzildimetilamina (BDMA) por 16 h a 60° C . Por fim, as amostras foram cortadas em uma espessura de 60 nm usando lâmina de diamante (Pelco 122-MT-30) à temperatura ambiente em um ultramicrotomo (RMC Boeckeler PowerTome XL).

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do papel pirolisado

O papel selecionado para a pirólise, Whatman #1, é muito utilizado na fabricação dos dispositivos de papel, pois possui características vantajosas como uma menor quantidade de aditivos, minimizando, assim, o efeito do contaminante nas propriedades elétricas, e maior uniformidade das fibras, o que contribui para a reprodutibilidade dos sensores fabricados a partir de lotes distintos de papel⁵⁵. Para utilização do papel em ePADs, é necessário que o papel seja submetido a um processo que o transforme parcialmente ou totalmente em material condutor para obtenção do contato elétrico. As principais técnicas empregadas para definição das trilhas condutoras são impressão por tinta condutora, pirólise a laser ou em forno, deposição de filmes finos metálicos e escrita direta com lápis comerciais ou canetas esferográficas contendo tinta condutora^{18,56}. Particularmente, a pirólise em forno se mostra uma alternativa viável ao aproveitar a tridimensionalidade do papel, ou seja, uma maior área útil do eletrodo e um aumento de condutividade na fabricação do dispositivo⁵⁷.

O processo da pirólise pode ser resumido em 2 etapas. Primeiramente, há a perda da maior quantidade de massa devido a intermediários voláteis (como a água), com formação de intermediários não voláteis a partir da degradação térmica da celulose, que ocorre na faixa de temperatura de 216 a 336 °C. Em uma segunda etapa, de 336 a 500 °C, os demais compostos, como os intermediários formados e aditivos presentes da produção do papel, são degradados, produzindo material em forma de gases, líquidos e sólidos^{18,58}. A 600 °C, a maior parte da celulose já foi decomposta (>98%), porém, estudos anteriores mostraram que a pirólise em 1000 °C resulta em um papel de menor resistência elétrica^{19,59}. Nessa etapa, grande parte dos grupos oxigenados é eliminada, seguido da formação de uma estrutura gráfica devido à geração de C hibridizado sp². Logo, há um aumento na condutividade do material em função da deslocalização de elétrons na ligação π ^{18,60}.

O processo de pirólise do papel aplicado foi adaptado conforme descrito na literatura⁵³. Uma folha do papel cromatográfico foi cortada com auxílio de uma guilhotina em tiras de 11,0 x 2,5 cm. Para obtenção do papel gráfico, as tiras foram

pirolisadas em um forno de tubo sob fluxo constante de nitrogênio (99,99%) de 20 L min⁻¹. O fluxo de nitrogênio foi acionado 5 min antes do início do aquecimento, visando a ocorrência da queima do papel em ambiente inerte. A rampa de aquecimento programada foi de 20 °C min⁻¹ a partir da temperatura ambiente (aproximadamente 25° C) até 1000 °C, permanecendo nessa temperatura por mais 1 h. Ao final do processo, o forno, com o papel pirolisado, foi resfriado naturalmente a temperatura ambiente, o qual, em seguida, foi recortado em tiras de aproximadamente 1 cm.

O PF tem sido adotado como alternativa de baixo custo para definição de canais microfluídicos através do seu aquecimento, obtendo-se canais de resolução superior aos produzidos pela cera⁶¹. Neste trabalho, o PF foi utilizado para delimitar a área de detecção do PP e, além disso, aumentar sua resistência mecânica, considerando a fragilidade do PP resultante do processo da grafitação, como mostrado abaixo na **Figura 2**. Uma camada de PF perfurada circularmente em uma área de 2 mm de diâmetro com auxílio de um *punch* foi colocada sobre o PP e, em seguida, derretida parcialmente mediante aquecimento por 12 min a 120 °C, tempo e temperatura suficientes para que o PF penetre parcialmente no PP. Adicionalmente, foi necessário incluir uma camada de fita adesiva no conjunto, pois os testes eletroquímicos preliminares com a sonda Fe(CN)₆^{-3/4} (não mostrados) apresentaram um aumento da diferença de potencial entre picos de oxidação e redução (ΔE_p), indicando uma baixa reversibilidade eletroquímica que se deve, possivelmente, ao fato do PF não isolar totalmente a superfície do PP da solução eletrolítica após aquecimento.

A **Figura 2a** representa o PF antes e após o aquecimento do sistema. A fim de mostrar a permeação do PF pelo PP, foi obtida uma imagem lateral de SEM do dispositivo seccionado transversalmente com auxílio de uma lâmina de corte em meio de nitrogênio líquido. A **Figura 2b** mostra a região onde foi obtida a imagem, e pode ser observado na imagem de SEM, na **Figura 2c**, que a região com o PF permanece bem definida após o aquecimento. As manchas em claro se devem à presença de potássio e cloro decorrente da adição de uma solução de KCl 1,0 mol L⁻¹ para se observar a permeação do líquido pelo sistema, que será discutida nas próximas seções deste trabalho.

Foi obtida também imagem de SEM resultante da superposição de imagens por elétrons retro espalhados e dos elétrons secundários do corte

transversal do eletrodo. Como esses elétrons carregam a informação da massa elementar e da topografia da amostra, respectivamente, foi possível a diferenciação das camadas que compõem o dispositivo. Como pode ser observado na **Figura 2c**, o PF penetrou pela estrutura do PP por cerca de $15,5\ \mu\text{m}$, indicando a profundidade da camada por dentro da estrutura do PP. Essa camada também gerou resistência mecânica e flexibilidade suficientes ao eletrodo para sua manipulação sem danificação do material. Outros métodos para contornar a baixa resistência mecânica disponíveis na literatura são através da adição de nanotubos de carbono²⁴, permeação parcial de uma camada de polímero⁵³ ou do uso de um ligante como a quitosana²⁷. Além disso, a espessura média do PP observada foi de $79,5\ \mu\text{m}$, com um desvio padrão (d.p.) de $9,1\ \mu\text{m}$, enquanto a camada formada pelo PF e da fita adesiva (AD) foi de $147,5\ \mu\text{m}$ com d.p. de $10,1\ \mu\text{m}$.

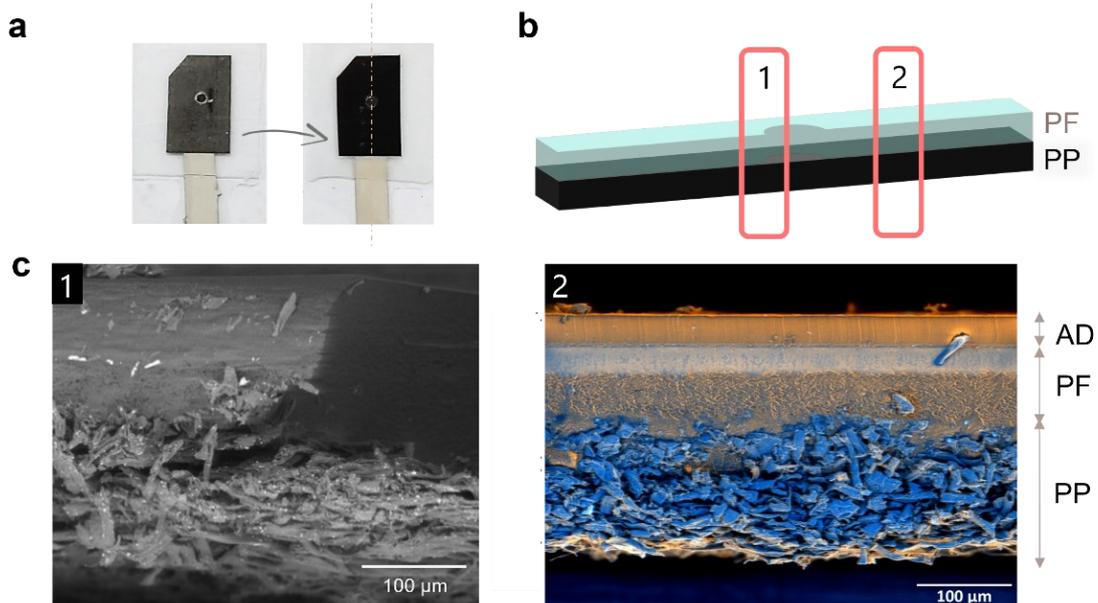


Figura 2. Comportamento do filme de PF depositado sobre o PP. **(a)** Imagens digitais do sensor antes e após o aquecimento a $120\ ^\circ\text{C}$. **(b)** Ilustração do corte realizado no PP com o PF e indicação da posição onde foi obtida a imagem de SEM e **(c)** imagens de SEM da lateral do corte transversal do sensor no limite do PF (1) e de todas as camadas do sensor (2). AD, PF e PP, representam, respectivamente, a camada adesiva, a camada de PF e o papel pirolisado.

Importante ressaltar que, considerando todas as etapas de fabricação do dispositivo desenvolvido, apresentamos ao final um sensor de baixo custo. Apesar de fazer uso de sala limpa e deposição de filme fino de Pt para a fabricação de trilhas condutoras, essas etapas de fabricação são bem estabelecidas na indústria

de microeletrônicos e semicondutores e são escalonáveis, permitindo a sua produção em larga escala. Além disso, deve-se salientar que as lâminas de vidro com as trilhas não são descartáveis, podendo ser reutilizadas por diversas vezes, como foi realizado ao longo deste trabalho. Uma alternativa para tornar o sistema totalmente descartável seria usar o próprio PP como trilha, com deposição de Ag sobre a trilha para fabricação do eletrodo de referência⁵³.

As propriedades do PP foram analisadas por diferentes técnicas de caracterização, discutidas a seguir. A topografia do PP foi investigada através de LSCM, enquanto as observações das fibras superficiais do PP foram obtidas por imagens de SEM. Também foram realizadas medidas de condutividade do PP. A conversão da celulose em material grafitico foi verificada pela medida de espectroscopia de Raman e a hidrofobicidade do material foi confirmada através de medidas de ângulo de contato.

As medidas realizadas por LSCM, como mostradas na **Figura 3a**, demonstraram que a superfície do PP é rugosa, com rugosidade de $5,7 \mu\text{m}$ (d.p.: 0,9) calculada através da média quadrática (RMS) da altura em uma área de $5,8 \text{ cm}^2$. A espectroscopia Raman é uma técnica poderosa para estudo de materiais a base de carbono, que possibilita a avaliação do nível de oxidação do material, a distância entre defeitos do retículo cristalino formado e dos tamanhos de sua rede cristalina⁶². Comparando-se os resultados das medidas do papel antes e após a pirólise, apresentados na **Figura 3b**, foi possível observar a transformação da estrutura desordenada, dada pela banda D, em estrutura grafitica, associada com a banda G. A banda D é relacionada com a desordem estrutural da rede de carbono causada pela presença de grupos funcionais de oxigênio no plano basal e/ou defeitos devido à formação de grãos e presença de vacâncias, portanto relativo à hibridização do C sp^3 . Já a banda G representa a reparação dos defeitos, como na formação da rede π grafitica C sp^2 , a partir das reações de deoxigenação, levando a um material com cristalinos grafiticos maiores e de melhor condutividade⁶³. Essas características estão de acordo com a baixa resistividade do PP, avaliada através da medida da resistência elétrica do material como discutido abaixo.

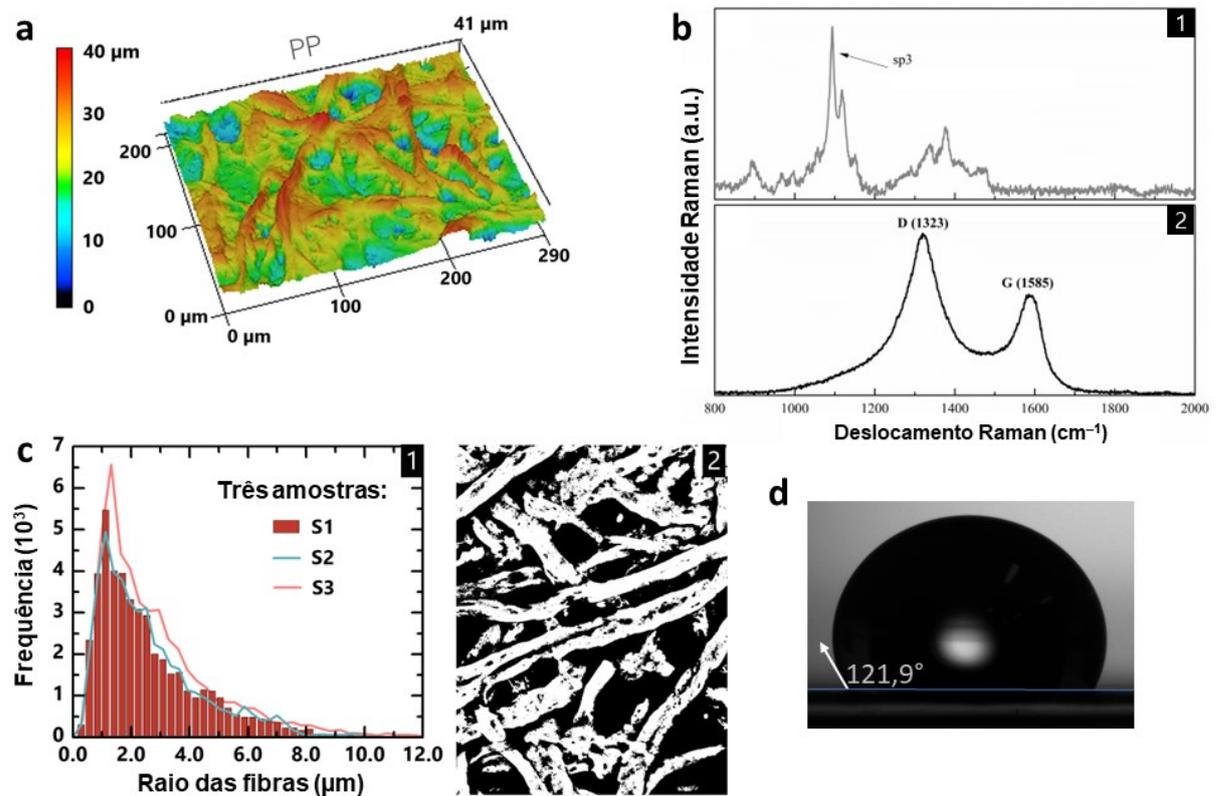


Figura 3. Dados de caracterização física e eletroquímica do PP. **(a)** Mapa de topografia do PP por LSCM ($5,8 \text{ cm}^2$, objetiva 50x). **(b)** Espectro de Raman do papel antes (1) e após (2) o processo da pirólise. **(c)** Histograma com dados obtidos (1) através da imagem binária (2) gerada a partir das imagens de SEM em três regiões distintas. **(d)** Imagem digital da medida de ângulo de contato ao se gotear $10 \mu\text{L}$ de água deionizada sobre a superfície do papel pirolisado.

Uma tira de $7,0 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ do papel pirolisado foi utilizada para conferir as propriedades elétricas do material. Através de um multímetro, a sua resistência elétrica foi medida através de três pontos de mesma distância em uma mesma tira de PP. Considerando a espessura média de $0,09 \text{ cm}$ do PP, o valor de resistividade foi da ordem de $128 \text{ m}\Omega \text{ cm}$, valor inferior à de outros papeis reportados na literatura (aproximadamente $325 \text{ m}\Omega \text{ cm}$ para papel sulfite¹⁹)

As fibras de celulose de três diferentes amostras de PP foram observadas a partir de imagens de SEM, e todas se apresentaram irregularmente distribuídas pelo papel. As imagens obtidas foram tratadas por ImageJ em conjunto com a extensão DiameterJ, a fim de se obter informações sobre tamanho das fibras e dos poros⁶⁴. Para isso, as imagens foram segmentadas e transformadas em uma imagem binária preta e branca, como apresentado na **Figura 3c**. Em seguida, um segundo algoritmo foi aplicado, o *Fiber Diameter Histogram*, que possibilitou a determinação dos diâmetros das fibras de acordo com cada *pixel* ao longo de seu

comprimento. Os diâmetros médios das fibras e dos poros para 3 amostras de PP foram de 4,0 μm (d.p.: 0,3) e de 11,9 μm (d.p.: 1,30), valores uniformes apesar da distribuição randômica das fibras. Esse dado suporta a reprodutibilidade satisfatória observada nas medidas eletroquímicas, as quais serão discutidas na seção 4.5.

A natureza hidrofóbica do PP foi confirmada através de medidas de ângulo de contato. Testes foram realizados em três regiões diferentes do papel, de um mesmo lote de pirólise, com 10 μL de água deionizada. O ângulo obtido foi de 121,0° (i.c.: 20,5°, n = 3). Na **Figura 3d** é apresentado o ângulo de contato obtido para uma das regiões. De acordo com o modelo proposto por Cassie-Baxter, esse caráter hidrofóbico se deve não apenas à estrutura gráfica do material (composição), mas também a sua rugosidade. Esse parâmetro pode gerar o confinamento de ar entre a amostra líquida e o sólido, aumentando a hidrofobicidade do sistema⁶⁵.

4.2. Princípio do método

O T20 é conhecido por sua aplicação em formulações biológicas devido à sua alta biocompatibilidade e habilidade de prevenir a agregação de proteínas por promover sua estabilidade coloidal⁶⁶⁻⁶⁸. Portanto, ao optar em utilizá-lo no nosso sistema, surfactante não atuaria como interferente ou como um reagente adicional, dado que é muito utilizado no armazenamento de amostras biológicas. Nesse projeto, como será abordado adiante, o T20 formou uma camada nanométrica fortemente adsorvida sobre as fibras gráficas na superfície e pelos poros do PP, resultado da sua natureza anfifílica. O polissorbato, T20, é um surfactante não iônico com uma extremidade hidrofílica composta por cadeias de polioxietileno (PEO) conectadas a uma cauda hidrofóbica composta por um ácido graxo.

Essa terminação linear de ácido láurico, responsável pela adsorção no PP por interações hidrofóbicas, e segmentos hidrofílicos de PEO que ficam expostos à amostra, seguem uma conformação mais favorável, gerando uma adsorção orientada das moléculas de T20. Devido à presença de grupos oxigenados, o PEO se comporta como receptor de prótons, criando, assim, uma camada de solvatação forte, uma espécie de colchão d'água, que previne as interações hidrofóbicas do PP com as proteínas presentes nos fluidos corporais⁶⁹. Além dessa propriedade de antipassivação, a nanocamada de T20 atua como surfactante, diminuindo a tensão

interfacial e promovendo a difusão lenta e gradual da solução através dos poros de PP, como ilustrado na **Figura 4a**.

A capilaridade das soluções aquosas através dos poros do PP promovida pelo T20 gera um acesso gradual da sonda redox a superfícies novas do eletrodo, causando um aumento da área eletroativa e, assim, da concentração superficial de excesso⁷⁰. Ademais, a capacidade do filme de T20 em formar camadas de solvatação quando exposto ao fluido biológico acarreta uma proteção do PP contra a adsorção não específica de biomoléculas (efeito de antipassivação) como discutido acima. Isso facilita o acesso da sonda à superfície do PP, minimizando as perdas na cinética de transferência de carga¹⁰. É importante destacar que a espessura nanométrica do T20 (~2 nm conforme as análises de TEM que serão discutidas posteriormente) também contribuiu para minimizar o bloqueio das reações redox. Como resultado, os fenômenos listados acima (capilaridade, efeito antipassivação e espessura nanométrica do T20) geram um aumento nas correntes faradaicas obtidas pelo sistema PP/T20 e na sensibilidade em função do tempo como ilustra a **Figura 4b**.

A estratégia proposta é inédita na área de biossensores eletroquímicos. Poucos trabalhos conseguem manter a sensibilidade analítica após a proteção do eletrodo contra a passivação, como discutido na seção 4.7. E, somado com o uso de um material condutor barato, escalonável e verde, o sistema proposto poderá contribuir no avanço do desenvolvimento de dispositivos POC capazes de realizar análises de relevância clínica que auxiliarão a sociedade.

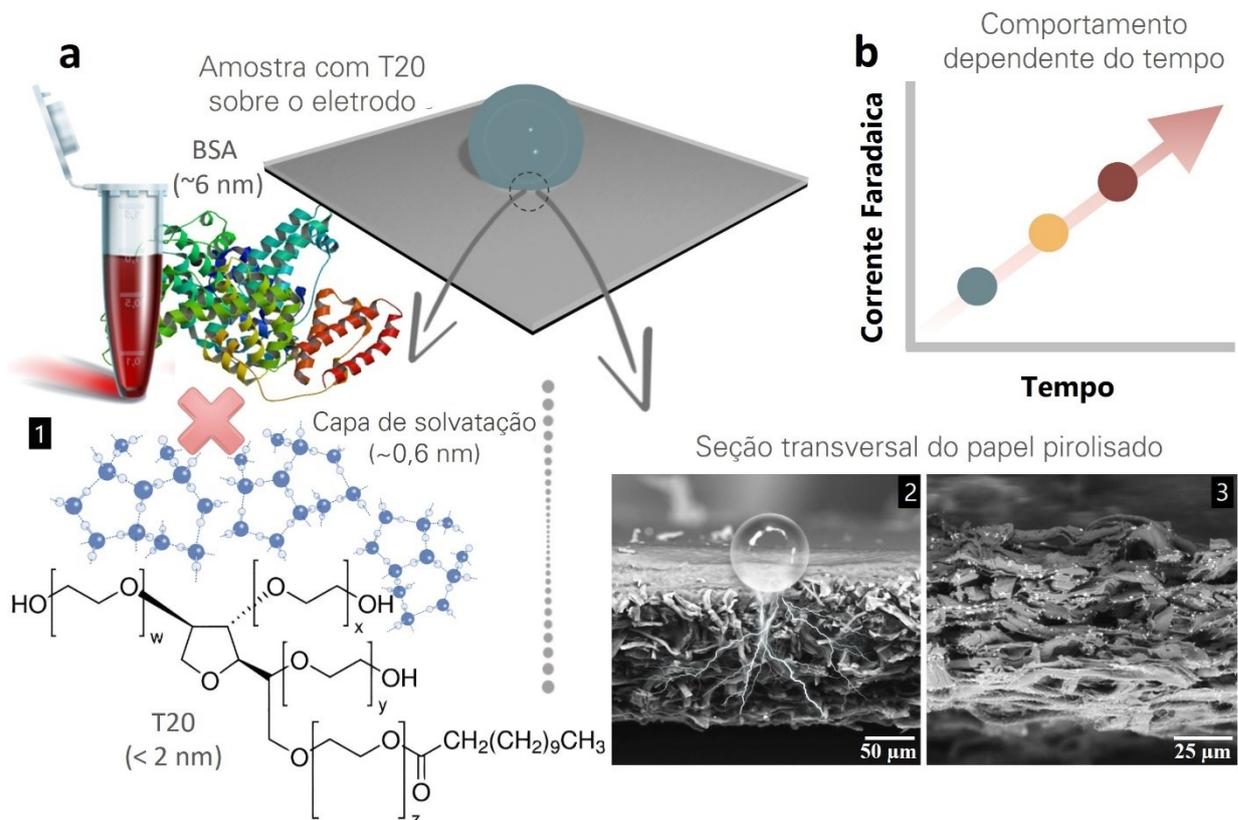


Figura 4. Ilustração do princípio de funcionamento do sensor. **(a)** Fenômeno causado pela adição de T20 de formação da capa de solvatação (1), o fluxo da solução pelo PP mostrado na imagem de SEM do corte transversal de PP (2) e sais de KCl precipitados por entre as fibras após evaporação do solvente (3). **(b)** Comportamento da corrente faradaica pelo tempo sob efeito do T20.

4.3. Análises eletroquímicas preliminares

4.3.1. Cinética de transferência de carga

Nesta seção são descritos estudos sobre as propriedades eletroquímicas do sensor na presença e ausência do T20 e do BSA. A princípio, a fim de avaliar o comportamento eletroquímico do sensor, foram realizadas medidas de voltametria cíclica, VC, do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4-}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e tampão PBS $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte. O voltamograma resultante se mostrou uma curva típica de macroeletrodos, como esperado, com difusão linear semi-infinita^{71,72}, como mostrado na **Figura 5a**. Não foram observados outros picos, indicando a ausência de contaminantes no papel¹⁹. O valor de ΔE_p obtido foi de 90 mV para a velocidade de varredura (v) de 20 mV s^{-1} , sugerindo que o processo redox é quasi-reversível⁷⁰. O resultado era esperado devido à resistividade

moderada do PP de $128 \text{ m}\Omega \text{ cm}$, valor inferior a, por exemplo, Au e Ag que possuem resistividades da ordem de $<0,1 \text{ m}\Omega \text{ cm}$ ⁷³. A relação dos picos anódicos e catódicos, I_{ap}/I_{cp} , resultou em 1,05, indicando uma boa reversibilidade química. Para avaliar a cinética de transferência de carga, variou-se ν de 10 a 100 mV s^{-1} . Como observado na **Figura 5b**, as correntes de pico de oxidação e redução aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade aplicada ($R^2 > 0,99$), que é consistente com processos redox controlados por difusão linear. Com base no *inset* presente na **Figura 5b**, observa-se que há um aumento na diferença de potencial com a velocidade de varredura, indicando uma limitação na cinética de transferência de carga⁷⁰.

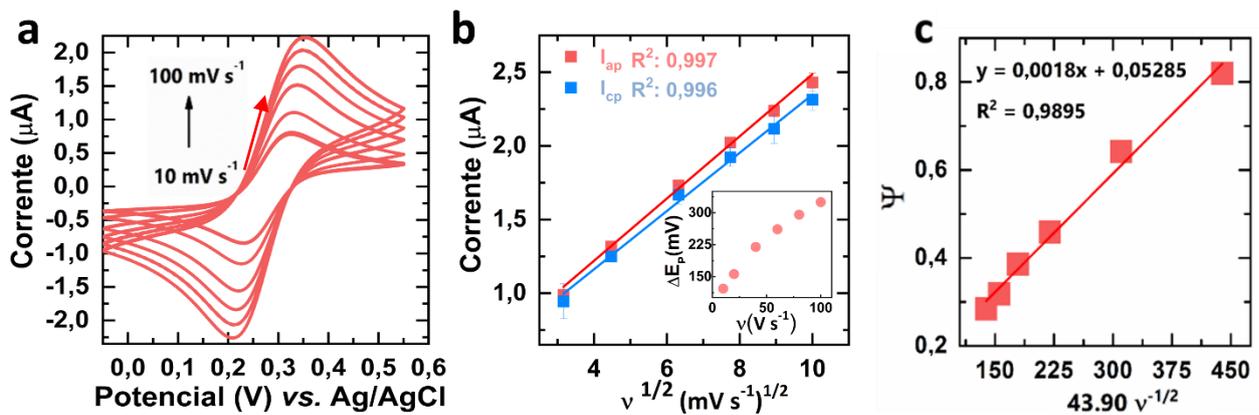


Figura 5. Resultados obtidos na avaliação do sensor em relação à velocidade de varredura. **(a)** Voltamograma em diferentes velocidades de varreduras (10, 20, 40, 60, 80 e 100 mV s^{-1}), **(b)** gráfico de corrente de pico anódico e **(c)** gráfico do parâmetro ψ por $43,90 \nu^{-1/2}$ para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4-}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Com esses dados foi possível também calcular a constante de transferência heterogênea de elétrons (k^0) a fim de se obter informações mais quantitativas sobre a reversibilidade eletroquímica. A constante foi calculada baseada no parâmetro cinético de Nicholson⁷⁴, ψ , cujo valor foi obtido pela **Equação 1** abaixo, demonstrada por Lavagnini e colaboradores⁷⁵.

$$\psi = \frac{(-0,6288 + 0,0021(n\Delta E_p))}{(1 - 0,017(n\Delta E_p))} \quad \text{Equação 1}$$

Onde n é o número de elétrons envolvidos na reação e ΔE_p é a diferença de potencial entre os picos de oxidação e redução. A partir do valor do parâmetro ψ ,

foi calculada a constante k^0 pelo coeficiente angular do gráfico ψ por $[\pi D_n F / (RT)] v^{-1/2}$. Considerando o coeficiente de difusão, D para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4-}$ de $4,24 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em $25 \text{ }^\circ\text{C}$, o valor da constante $[\pi D_n F / (RT)]$ é dado como $43,90^{74,75}$. Portanto o valor de k^0 obtido foi de $1,8 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, superior à maioria dos eletrodos à base de papel reportados na literatura, como mostrado na **Tabela 1**. Essa constante de transferência heterogênea de elétrons moderada mesmo com alta taxa de grafitação do papel se deve provavelmente à porosidade da superfície do PP, a presença de grupos funcionais oxigenados e à baixa resistividade ($128 \text{ m}\Omega \text{ cm}$)⁷⁶.

Tabela 1. Valores de k^0 reportados para eletrodos de diferentes materiais.

ELETRODO	k^0 (cm s ⁻¹)
Papel pirolisado com acetato de celulose ⁵³	$1,5 \times 10^{-3}$
Espuma de óxido de grafeno reduzido ⁷⁷	$2,4 \times 10^{-4}$
Impresso de carbono comercial ⁷⁷⁻⁷⁹	$\sim 5 \times 10^{-4}$
Diamante dopado com boro comercial ⁷⁸	$3,62 \times 10^{-3}$
Carbono vítreo comercial ⁷⁸	$4,60 \times 10^{-3}$
Grafite de lápis comercial ⁷⁸	$3,02 \times 10^{-3}$
Papel carbono ⁷⁸	$1,6 \times 10^{-3}$
Grafite em pó com esmalte de unha ⁷⁹	$5,82 \times 10^{-3}$
ITO ⁷⁹	$2,57 \times 10^{-3}$
Papel pirolisado (este trabalho)	$1,8 \times 10^{-3}$
Papel pirolisado com T20 (este trabalho)	$1,2 \times 10^{-3}$

Os valores calculados de k^0 são uma aproximação considerando um coeficiente de difusão de um sistema em meio a tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com eletrodo de pasta de carbono, determinado por cronoamperometria. Para um cálculo rigoroso, devem ser obtidos valores de D nas mesmas condições propostas, considerando a porosidade do PP.

4.3.2. Efeitos cooperativos do T20

Para observar os efeitos do T20 no sistema, inicialmente, o sensor foi testado através de medidas de VC para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em quatro condições distintas, como mostrado na **Figura 6a**. O sensor, primeiramente, foi

analisado em uma solução da sonda redox com somente o eletrólito (condição controle, CT). Em seguida, foram testados os seguintes casos: solução da sonda com T20 0,05% v/v (condição T20), solução da sonda com BSA 1,0% m/v (condição *SFC*, *surfactant-free condition*) e, por fim, solução da sonda, com BSA e T20 (condição *SWC*, *surfactant-with condition*).

O sistema foi testado inicialmente somente com BSA, condição *SFC*, que, como esperado, impactou o desempenho do PP. Na ausência do T20, a sua adição à solução da sonda resultou em um aumento do ΔE_p para 268 mV, como mostrado na **Figura 6b** quando comparado com a condição CT. Com base no parâmetro de Nicholson, esse sistema possui um comportamento irreversível ($\psi \geq 7$). Isso se deve, provavelmente, à adsorção não-específica da proteína sobre o PP.

Na solução da sonda redox com T20, o voltamograma mostrou novamente uma curva típica de macroeletrodos, como mostra a **Figura 6a**. No entanto, com a penetração da solução através dos poros do PP em função da presença do filme de T20, o PP, nesse caso, se comporta como um eletrodo poroso. Logo, além da difusão linear semi-infinita sobre as suas superfícies planas (fibras externas e internas no interior de poros maiores), é provável que haja o aprisionamento da sonda em camada fina estacionária a qual ocorre no interior dos seus poros menores⁸⁰. A constante de transferência heterogênea de elétrons obtida pelo sistema PP/T20 foi 33% inferior àquela obtida para PP nativo (**Tabela 1**). Logo, apesar da sua espessura reduzida, da ordem de 2 nm, o filme de T20 reduz parcialmente a cinética das reações redox.

Observa-se também que houve uma maior separação de ΔE_p quando comparado com o voltamograma da solução sem T20, a condição CT, partindo de 90 para 193 mV. Contudo, o sistema ainda se comportou como um processo quasi-reversível, como revelado através da análise de parâmetro de Nicholson ($\psi \leq 7$)⁷⁵. Apesar desse comportamento quasi-reversível indicar um impedimento às reações redox pelo T20 como afirmado anteriormente, houve um aumento de corrente em um fator 3 vezes em relação ao valor original na ausência de T20. Esse acréscimo, como discutido anteriormente, está relacionado com a elevação da área eletroativa, que se deve à capilaridade da sonda redox através dos poros do papel e à espessura nanométrica desse filme.

Para observar o efeito de antipassivação do T20, avaliou-se a solução com BSA na presença do T20, SWC. Neste caso, o sistema retorna a ser quasi-reversível ($\psi \leq 7$), com correntes de pico e diferença de potencial similares aos valores obtidos com T20 na ausência da proteína. Apesar da diminuição da reversibilidade do eletrodo, a proximidade do perfil do voltamograma do SWC com solução da sonda com T20 evidenciam, assim, as propriedades do T20 de amplificação da corrente e de proteção do PP contra adsorções não específicas de proteínas.

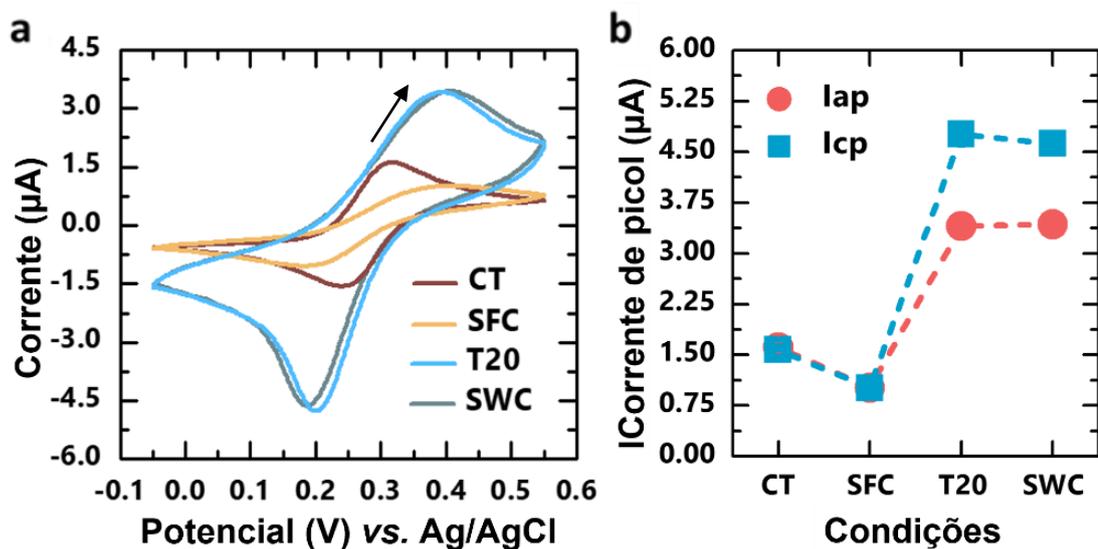


Figura 6. Resultados obtidos na avaliação do sensor em diferentes soluções. **(a)** Voltamograma cíclica e **(b)** gráfico com as correntes de picos anódicos (I_{ap}) e catódicos (I_{cp}) em cada condição para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4-}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.3.3. Estudos da cinética da transferência de carga por EIE

As condições SWF e SFC foram também avaliadas através de medidas de EIE para sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) ao longo de 1 h. De acordo com os dados sem a presença de T20, apresentados na **Figura 7a**, como esperado, houve um aumento na impedância imaginária (Z''), o componente capacitivo da impedância, e na R_{ct} com o tempo, indicando que a passivação dificultou no acesso da sonda à superfície do eletrodo. Já com T20, ocorreu o oposto, com redução de Z'' e dos valores de R_{ct} . Essa redução é consistente com os dois fenômenos que estão ocorrendo simultaneamente, como abordados acima: i) o aumento da área do eletrodo e, logo, da concentração superficial de excesso da sonda dada a

capacidade de capilaridade das soluções pelos poros do PP; e ii) a propriedade antipassivação da nanocamada de T20 sobre PP. Esses fenômenos geraram um efeito sinérgico para aumento da cinética de transferência de carga. É importante ressaltar que essas alterações em Z'' foram particularmente altas até 3 min, mostrando que a cinética da capilaridade é heterogênea, sendo maior nos primeiros minutos de incubação.

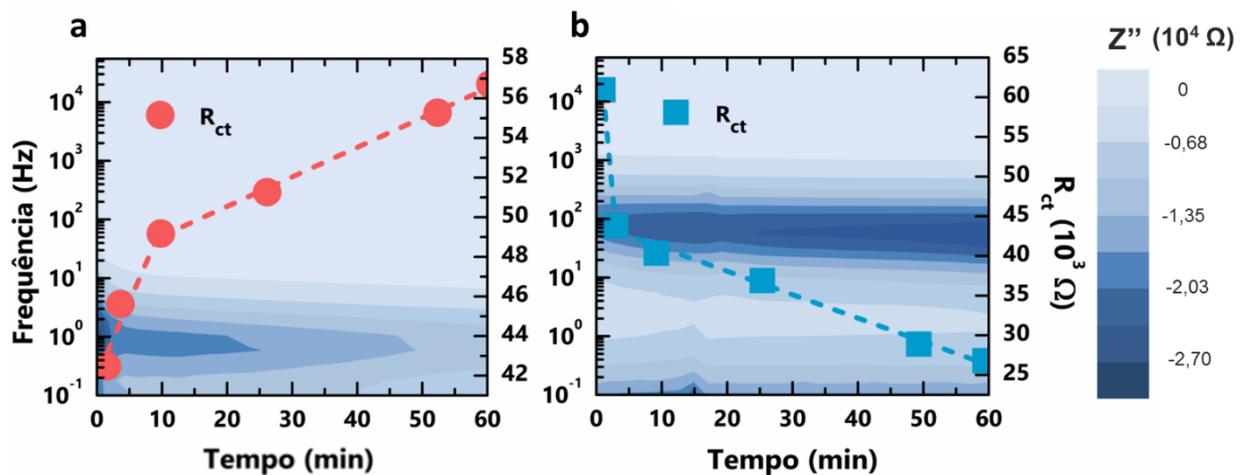


Figura 7. Mapas de cores dos valores da impedância imaginária (Z'') com gráfico de resistência de transferência de carga pelo tempo, obtido a partir do gráfico de Nyquist. Dados obtidos analisando nas condições (a) *SFC* e (b) *SWC*.

Um outro fenômeno que pode ter contribuído para o aumento da cinética das reações redox na condição *SWC* é o comportamento do PP como um eletrodo poroso à medida que ocorre a permeação da sonda através dos poros do material. Mais especificamente, nos micro e nanoporos, pode ser alcançado o regime de difusão em camada delgada em que há o confinamento da camada de difusão, sendo observados o processo de ciclagem redox através das paredes dos poros e a ausência dos efeitos difusionais^{81,82}. Como consequência, são esperados aumentos na reversibilidade eletroquímica (redução de R_{ct}) e na taxa de transporte de massa, o que de fato ocorreu como indicado pela diminuição da impedância de Warburg (W) nos gráficos de Nyquist obtidos durante os testes de EIE por 1 h conforme discussão abaixo.

Analisando-se os gráficos de Nyquist mostrados nas **Figura 8a,b**, observou-se que, para ambas as condições, *SFC* e *SWC*, o perfil obtido possui um semicírculo, seguido de uma reta inclinada, onde são relacionados às limitações dos

processos de transporte de carga e de massa, respectivamente. Assim, o circuito equivalente RC de Randles contendo a impedância difusional, W , foi usado para modelar os dados obtidos⁷⁰. Como mostrado no *inset* da **Figura 8b**, esse circuito é composto pelos seguintes elementos: uma resistência dada pelo somatório de efeitos não compensados com a resistência da solução (R_s), R_{ct} , um elemento de constante de fase (CPE, *constant phase element*) para representar a capacitância da dupla camada elétrica (C_{dl}) não ideal e W , representando a difusão linear semi-infinita das espécies iônicas do *bulk* para a dupla camada elétrica. Os valores obtidos para esses elementos estão citados na **Tabela 2**.

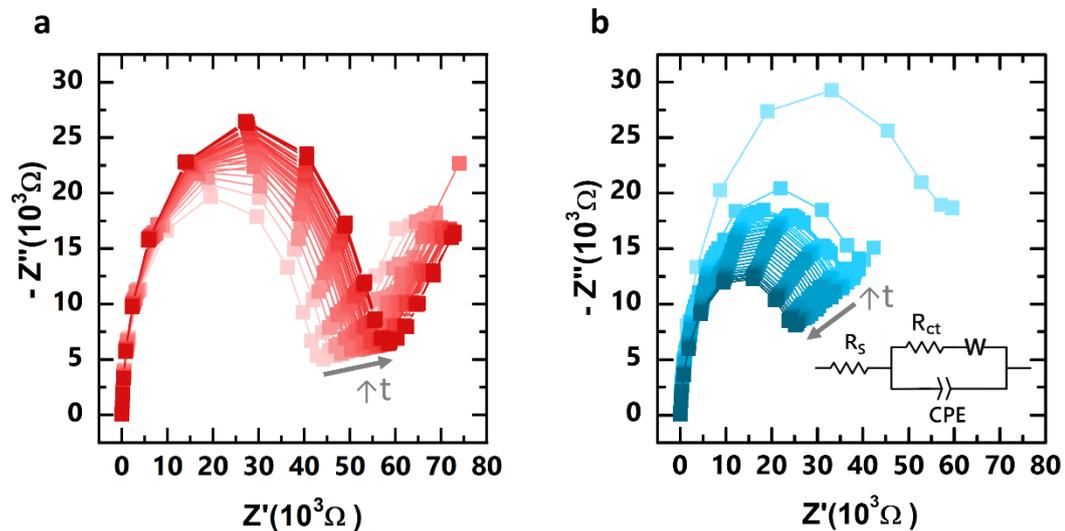


Figura 8. Gráficos de Nyquist e circuito equivalente obtidos durante 1h de medidas contínuas. Dados obtidos analisando nas condições **(a)** SFC e **(b)** SWC. A seta em preto indica a sequência dos espectros obtidos pelo tempo. Faixa de frequência analisada: 0,1 a 1,0 10^5 Hz.

Tabela 2. Valores obtidos para cada elemento do circuito equivalente simulado. R_s , R_{ct} , CPE, W e χ^2 representam a resistência da solução, resistência de transferência de carga, elemento de fase constante, elemento de Warburg e qui-quadrado, respectivamente. Y_0 é um parâmetro referente ao inverso da impedância do elemento e α é um parâmetro empírico da idealidade do CPE.

Condição	SFC			SWC		
Tempo (min)	5	30	60	5	30	60
R_s (Ω)	47,543	47,108	46,536	50,463	49,94	48,539
R_{ct} ($k\Omega$)	45,29	50,602	54,918	34,792	32,238	26,005
CPE						
Y_0 ($\mu S s^\alpha$)	0,049314	0,05592	0,059992	4,3126	6,7352	9,6095
α	0,9751	0,97481	0,97484	0,96946	0,96651	0,94051
W						
Y_0 ($\mu S s^{0,5}$)	48,387	50,71	51,23	104,64	178,24	366,33
χ^2	0,00312	0,00351	0,00276	0,01618	0,03085	0,09877

A correspondência do circuito equivalente de *Randles* com os dados obtidos foi confirmada através de simulações realizadas pelo software NOVA 2.1.4, onde se obteve valores de qui-quadrado, χ^2 , entre 0,00276 e 0,09877, próximos a zero, indicando uma boa convergência, como mostrado na **Tabela 2**. Apesar de ambas as condições avaliadas mostrarem a presença do elemento de Warburg, observa-se que esse elemento foi mais proeminente para a condição *SFC*, revelando a limitação das reações de transferência de carga pela difusão linear. Esse resultado era esperado dada a ausência da capilaridade nessa condição. Assim, os processos redox ocorrem apenas sobre a superfície do macroeletrodo, com o transporte de massa sendo baseado na difusão linear já que o diâmetro do eletrodo é infinitamente superior à espessura da camada de difusão⁷⁰. Já na condição *SWC*, em concordância com a presença da difusão em camada delgada como supracitado, os valores de W foram reduzidos significativamente comparados com o caso sem T20, *SFC*, como pode ser observado na **Tabela 2** com o aumento no valor de Y_0 , parâmetro relacionado com o inverso da impedância de Warburg.

Em relação aos dados obtidos para CPE, pode-se observar um aumento no valor de Y_0 , neste caso, parâmetro relacionado com a capacitância, indicando uma maior polarização do eletrodo. O valor é condizente com o aumento da área na presença de T20, portanto, um maior carregamento da dupla camada elétrica (DCE). Junto ao valor de CPE, é dado α , uma constante empírica, relacionada com o comportamento de idealidade do elemento CPE, cujo valor varia entre 0 e 1. Sendo $\alpha = 1$ para quando o elemento CPE se comporta como capacitor ideal e $\alpha = 0$ como resistor⁸³. A sua diminuição da condição *SFC* para *SWC* indica o afastamento do sistema de um capacitor ideal na presença de T20, possivelmente relacionado com o comportamento como material poroso devido à permeação da solução pelas fibras⁸⁴. Ademais, os valores obtidos de α são bastante próximos a 1, indicando que o comportamento do elemento CPE é bastante próximo ao de um capacitor ideal, C_{dl} . Considerando isso, a simulação foi refeita, considerando o elemento C_{dl} no lugar do CPE, e os valores obtidos para χ^2 foram um pouco superiores, entre 0,045 a 0,26204, porém, os demais elementos mantiveram as tendências anteriores, com capacitância média de 0,043 μF para condição *SFC* e 5,514 μF para *SWC*.

4.4. Estudos de caracterização

4.4.1. Capilaridade através do papel pirolisado

A resposta do sensor depende de 2 fenômenos principais, da capilaridade das soluções através dos poros de PP e da formação da nanocamada de T20 com propriedades de antipassivação. Esses fenômenos foram investigados por diferentes técnicas de caracterização, mais especificamente, a permeação da solução pelo PP foi estudada por ângulo de contato, μ CT, SEM e EDS.

A medida de ângulo de contato, θ , obtida anteriormente (**Figura 3**) para PP, foi de $121,0^\circ$. Entretanto, com a exposição do PP a T20 em água ([ver vídeo 1](#)), seu valor chega a zero devido à ação do T20 como surfactante e a propriedade de hidrofiliçidade adquirida. Por esses fenômenos, o T20 levou a permeação da solução pelos poros do PP, aumentando, assim, a interação da solução com a superfície do eletrodo. O mesmo resultado é observado quando o tratamento com T20 é realizado previamente, no dia anterior, com 1 h de exposição e lavagem seguidos da secagem do PP em dessecadora por 24 h ([ver vídeo 2](#)). A capilaridade persiste mesmo após lavagem e com eletrodo seco, indicando a adsorção irreversível do T20 ao PP.

É importante ressaltar que, mesmo com a permeação da solução pelo PP, a concentração de T20 foi selecionada de modo a evitar que a solução atingisse a região do contato elétrico dos eletrodos. Testes com outras concentrações de T20 de 1,0% e 0,1% v/v foram realizados (dados não mostrados). Nas medidas com 1% de T20, os valores de corrente anódica e catódicas eram superiores àqueles obtidos com T20 0,5%, indicando uma capilaridade mais proeminente como esperado. Porém, a reprodutibilidade foi inferior. Em muitos casos, observou-se que o líquido permeava por toda espessura do PP, atingindo a lâmina de vidro e, assim, criando um caminho preferencial de capilaridade, o que pode ter contribuído para diminuir a precisão das medidas.

O efeito da capilaridade do sistema foi verificado por μ CT, SEM e EDS após a incubação da solução de eletrólito com e sem T20 sobre o sensor por 1 h. A imagem de μ CT na **Figura 9a** mostrou o surgimento de ramificações, indicando a presença de materiais mais eletricamente densos devido aos íons depositados entre as fibras após a evaporação do solvente. Portanto, a solução espalha radial e heterogeneamente, atingindo regiões internas laterais à área de detecção. Esse

avanço radial da solução alcançou distâncias de até 2,3 mm da área de detecção. Mapas obtidos por SEM acoplada com EDS, na presença e ausência de T20, foram obtidos em 3 regiões do sensor: na superfície do eletrodo, na parte inferior do eletrodo e através do corte vertical do eletrodo, como ilustrado na **Figura 9b**. Para visualização da penetração da solução pelas fibras do PP, foram obtidos mapas de EDS para os íons K^+ e Cl^- , como pode ser visualizado na **Figura 9c,d**. Na ausência de T20, os sais presentes na solução, pertencentes ao eletrólito de suporte, concentram-se na região superior do eletrodo, ou seja, a solução não penetra por entre os poros do PP. Por outro lado, com T20, a solução permeou por toda a espessura do PP, como mostrado pelo mapa por EDS.

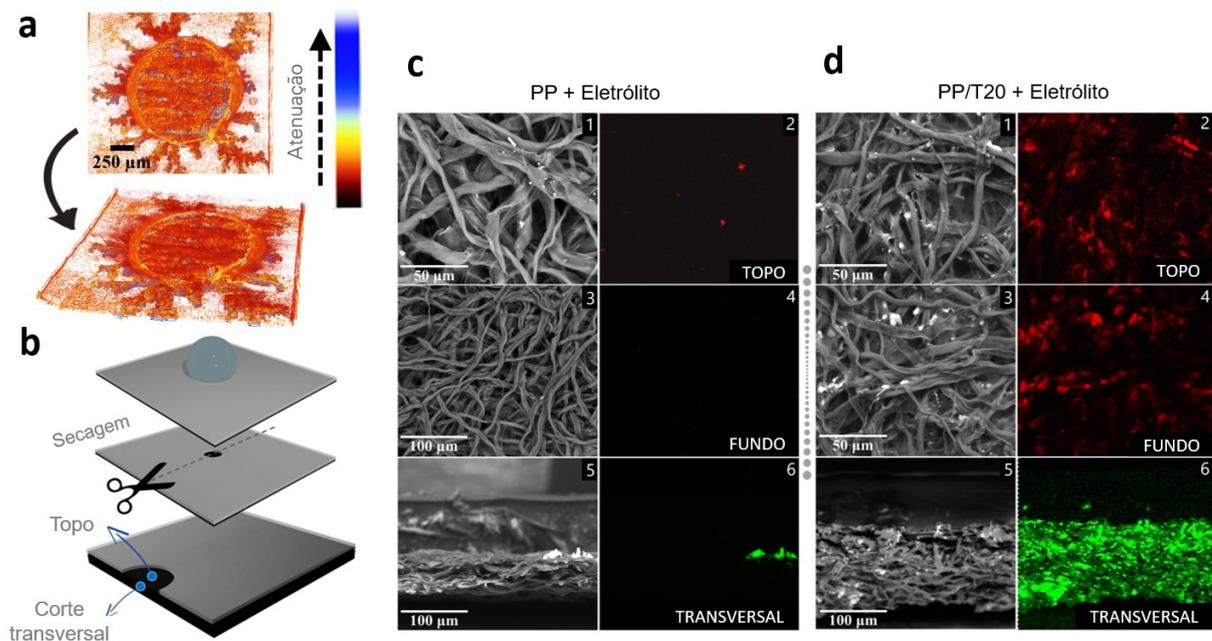


Figura 9. Caracterização da capilaridade adquirida pela presença do T20. (a) Imagens 2D e 3D de μ CT do PP com camada de T20 após, conforme ilustração (b), incubação por 1 h da solução e secagem por 1 dia e (c) e (d) imagens de SEM e mapas de EDS para cada parte do eletrodo, topo (1,2), fundo (3,4) e na transversal do eletrodo (5,6), na (c) ausência e (d) presença de T20. As cores verde e vermelha no mapa de EDS representam $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de K^+ e Cl^- do eletrólito de suporte, respectivamente.

4.4.2. Adsorção, espessura e propriedade de antipassivação do T20

Confirmado o espalhamento radial da solução através do sistema PP/T20, prosseguimos com estudos sobre (i) a presença da camada de T20 formada sobre a superfície do PP através de medidas de XPS, (ii) a sua espessura em superfícies

lidas por AFM e sobre o próprio PP por STEM/EELS e (iii) a sua propriedade de antipassivação do T20 pelas técnicas de XPS, AFM e STEM/EELS. Para cada análise, o sensor foi exposto por 1 h a uma solução do eletrólito de suporte sem e com T20. A BSA foi usada para avaliação da propriedade de antipassivação do T20 e a sua adição foi sucedida das etapas de lavagem com o próprio eletrólito.

A presença de T20 na superfície do PP foi inicialmente observada por XPS pela diminuição na relação sp^2/sp^3 quando comparada com o material sem exposição ao T20 (3,74 para PP e 0,08 para o sistema PP/T20) e também pelo aumento relativo da quantidade de oxigênio presente (0,03 para PP e 0,24 para PP/T20), como mostrado na **Figura 10b**. Para estudo da propriedade de antipassivação através das medidas de XPS, o sistema foi estudado com uso de BSA, onde se utilizou o nitrogênio (N) como marcador da presença de BSA, indicado na **Figura 10d**. Pelos dados obtidos pelo XPS do sensor exposto ao BSA na presença ou não de T20, a relação da quantidade de N encontrado em relação ao carbono presente na amostra foi de 0,1 na ausência de T20. Já com o T20, o valor reduziu para 0,04, mostrando, portanto, a baixa adsorção do BSA na superfície do PP. Medidas de dC/dZ por AFM e STEM também confirmaram essa propriedade de antipassivação do T20, as quais serão discutidas ao final desta seção.

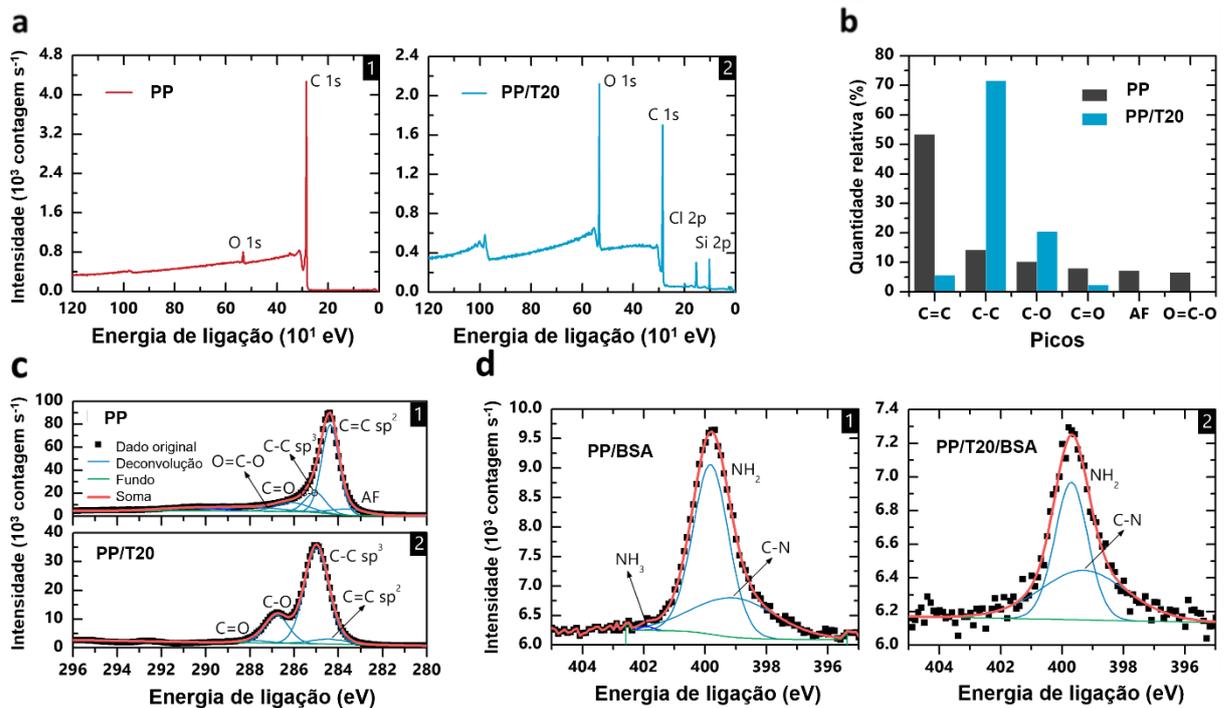


Figura 10. Resultados das análises de XPS para PP com incubação de BSA e T20. **(a)** *Survey spectra* para PP (1) e PP após incubação, sem BSA, com T20 por 1 h (2). **(b)** Gráfico de barras das quantidades relativas encontradas. Espectros de alta resolução para **(c)** pico de C 1s para PP (1) e PP/T20 (2), e para **(d)** N no sistema PP/BSA (1) e PP/BSA/T20 (2).

Através do AFM foi possível medir a espessura nanométrica da camada formada de T20 em substrato de silício e mica, como mostrado nas imagens na **Figura 11a,c**. No substrato de mica, a espessura encontrada foi de 2,8 nm (d. p.: 0,2) para 5 amostras analisadas e 2,1 nm (d. p.: 0,3) em sílica, conforme mostrado na **Figura 11b** e **Figura 11d**, respectivamente. Com as imagens de STEM, foi possível obter a espessura do T20 no próprio PP, concordando com os dados acima mesmo na presença da rugosidade do PP. Esses resultados serão discutidos a seguir.

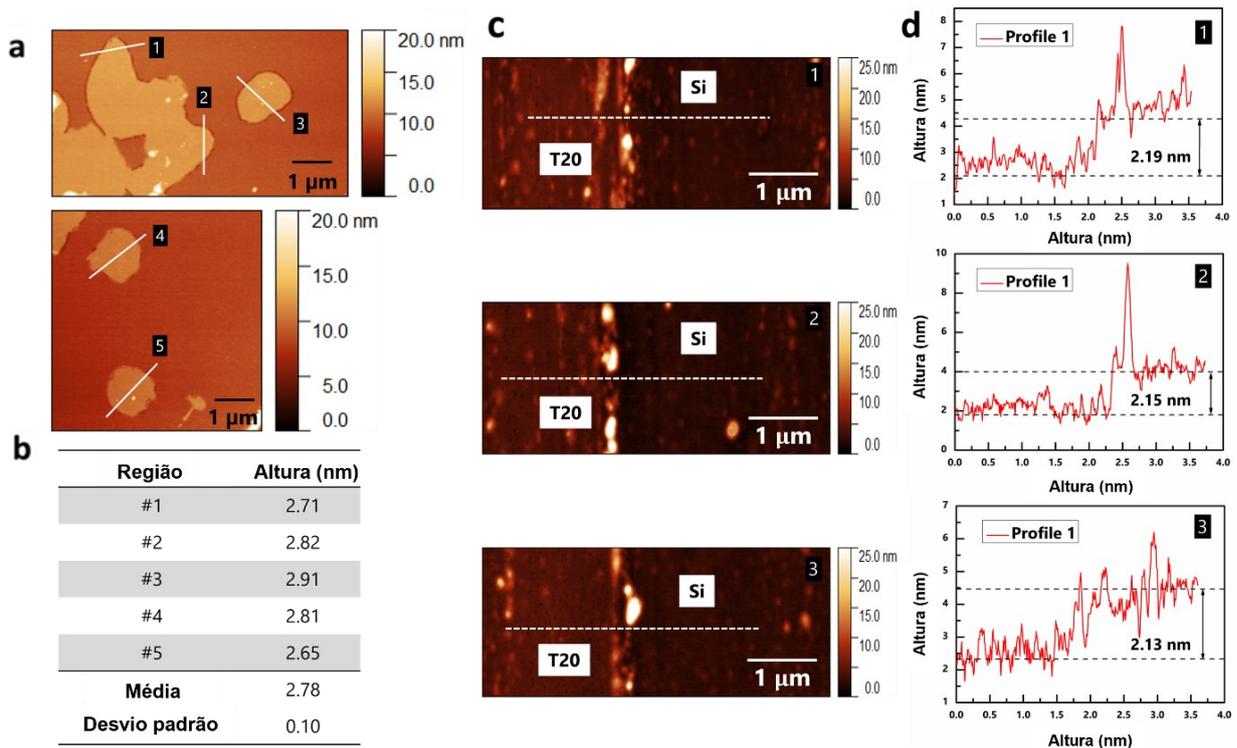


Figura 11. Resultados das medidas de AFM para determinação da espessura de T20. Imagens de AFM de T20 em (a) mica e (c) sílica com suas respectivas (b) medidas de altura e (d) perfis de altura.

Para a identificação dos componentes nas imagens de STEM no PP, foi realizada medida de espectroscopia de perda de energia por elétrons (EELS, *electron energy loss spectroscopy*). Através do espectro de energia obtido por EELS a partir dos elétrons após a interação com o material, pode-se correlacionar a energia com elementos químicos presentes, assim como as vibrações de ligação⁸⁵. Para diferenciação da superfície do PP com o seu interior, uma camada de Au foi depositada. Assim, foram obtidas varreduras de espectros de EELS a partir de onde o primeiro sinal da amostra foi identificado em direção ao interior do PP, como indicado na imagem de TEM na **Figura 12c,d**. Os sinais foram integrados, correspondendo a uma espessura de 1 nm da amostra. Em todos os espectros do PP, conforme apresentado na **Figura 12a,c**, é possível observar 2 picos bem definidos, picos π (~287 eV) e σ (~304 eV), que foram atribuídos a composição do PP. Quando avaliado o sistema PP/T20, como mostrado na **Figura 12d**, os dois primeiros espectros revelam a presença de um ombro no pico π , semelhante ao espectro do T20 puro, mostrado na **Figura 12a**, uma indicação da presença do T20. Portanto, o dado sugere a formação de uma camada do polissorbato na espessura

de 2 nm no PP. Isso implica na adsorção de uma monocamada da molécula, em concordância com valores alcançados na literatura em superfície lisa de poliestireno (2,1 nm)⁶⁶ e em octadeciltrietoxisilano (1,9 nm)⁸⁶. Essa espessura nanométrica é essencial por minimizar a cinética de transferência de carga e, sinergicamente com a capilaridade adquirida, tornou a contaminação causada pelo BSA insignificante ao sinal eletroanalítico. Isso foi crucial para garantir um potencial promissor na aplicação em fluidos complexos biológicos.

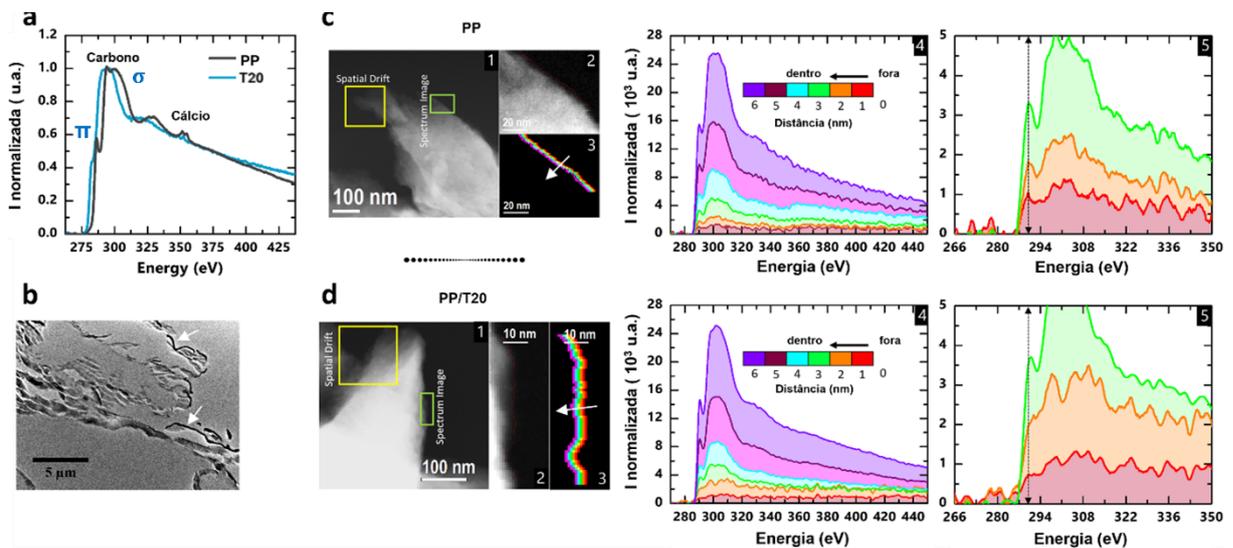


Figura 12. Resultados das medidas de espessura da nanocamada de T20 pelo STEM/EELS. **(a)** espectro individuais de EELS do PP e T20, **(b)**, imagem de TEM da fatia de PP preparado por ultramicrotomia. A fina camada de Au (depositada na superfície superior do PP) é indicada por setas brancas, correspondendo à região escura. Imagem de STEM e espectros de EELS de **(c)** PP e **(d)** PP exposta a T20. As regiões contornadas por um retângulo verde (1) indicam as regiões amplificadas (2) e as linhas coloridas indicam as regiões usadas para integrar os sinais de EELS do sentido de fora para dentro da amostra, como indicado pelas setas (3). Cada linha corresponde a 1 nm. Espectros integrados resultantes de EELS correlacionados com as linhas coloridas como descritos na legenda (4) e zoom dos três primeiros espectros com setas em preto indicando o pico π em aproximadamente 287 eV (5).

Foram também realizadas análises de AFM para medidas elétricas de dC/dZ , cujo valor expressa a capacidade de polarização das superfícies avaliadas⁸⁷. A área analisada foi a mesma região, de $9 \mu\text{m}^2$, antes da incubação e após incubação e secagem. Os resultados são mostrados na **Figura 13a**. Analisando-se os valores médios de potenciais obtidos, que constam na **Figura 13b**, na área na ausência de T20, o BSA reduziu os potenciais medidos em 46,7% em relação à amostra controle de PP (antes da exposição ao BSA). Nas análises do sensor com somente T20, sem interferentes, o sistema mostrou uma maior polarização, com um

aumento de 16,1%, que provavelmente está relacionado com a maior concentração de grupos oxigenados na amostra. Já analisando-se o sistema PP/T20/BSA, os valores obtidos foram bastante similares ao do sistema com somente T20, mostrando a propriedade de antipassivação da camada de T20. Essa característica também foi possível de ser confirmada através das medidas de STEM/EELS.

Com EELS, também foi possível monitorar a presença da proteína BSA através do pico de nitrogênio. Obteve-se espectro de EELS em duas regiões do PP, logo abaixo da superfície (TS) e algumas centenas de nanômetros abaixo (BS). Na ausência do T20, a BSA se concentra somente na superfície do PP, como apresentado na **Figura 13c**. No sistema PP/T20, por outro lado, o pico de N de BSA na superfície do PP foi comparável com o ruído do sinal, mostrando ausência da proteína, o que evidencia a propriedade de antipassivação do T20 contra a biopassivação do PP pela proteína. Entretanto, na **Figura 13d**, onde são mostrados mapas de C e N para regiões de alguns micrômetros abaixo da superfície do PP, a BSA também foi encontrada. Possivelmente, isso se deve ao resíduo no interior do PP não removido durante a lavagem com eletrólito no preparo de amostra. Apesar da BSA presente, as análises eletroquímicas não foram prejudicadas, obtendo-se uma boa reprodutibilidade, como será demonstrada na próxima seção.

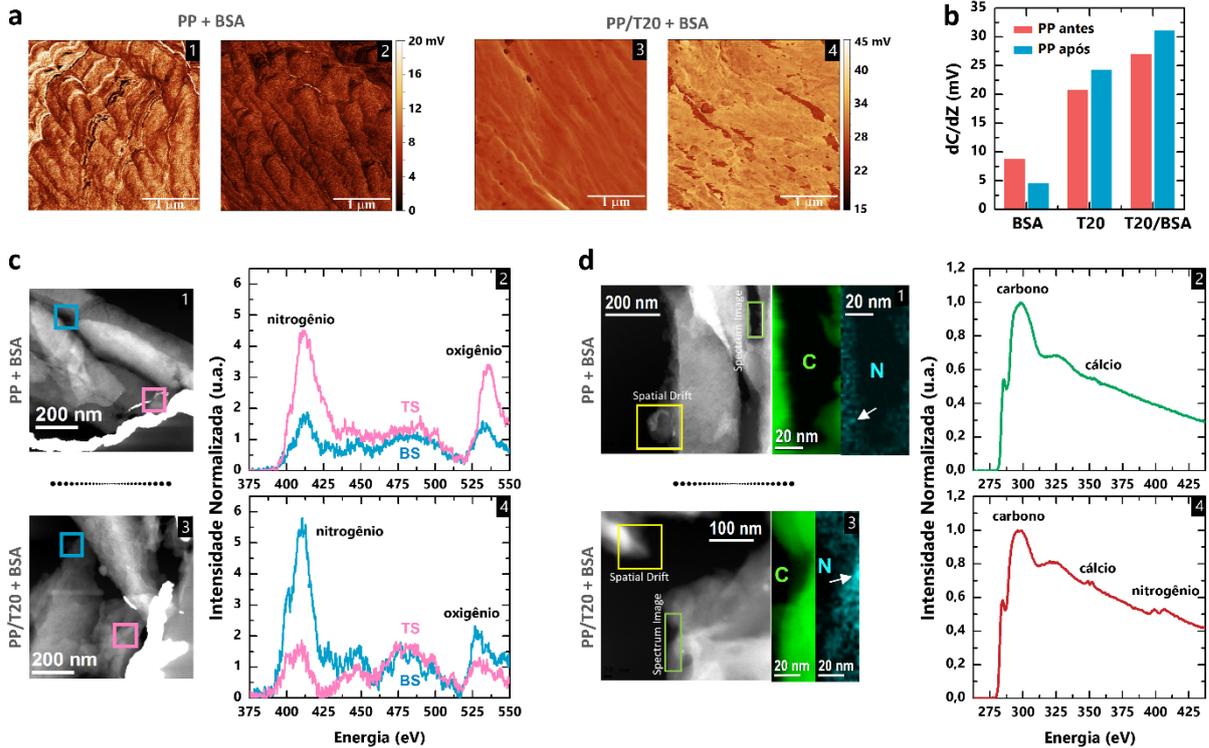


Figura 13. Resultados de AFM e de STEM/EELS para análise da propriedade de antipassivação do sensor. **(a)** Mapas de dC/dZ por AFM e **(b)** valores médios de potencial obtidos do PP, realizados em uma mesma região, antes (1,3) e após exposição de BSA, sem (2) e com (4) T20. **(c)** Imagens de STEM para superfície do PP. Retângulos rosa e azul nas imagens indicam as regiões onde foram obtidos os espectros de EELS, onde TS indica a parte superior do sensor, e BS, inferior. **(d)** Imagens de STEM e mapas de C e N (1,3), e espectro de EELS (2,4) obtidos nas regiões de máxima intensidade (I) de N, indicado pelas setas em branco.

4.5. Desempenho analítico em meio de BSA

A fim de demonstrar o desempenho do sistema proposto em relação ao tempo e sensibilidade, realizaram-se análises para uma mesma concentração de sonda redox em 3 tempos e, depois, análises com soluções de diferentes concentrações da sonda com BSA, nas condições sem e com T20.

Primeiramente, para uma concentração fixa da sonda de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, foram realizadas medidas de VC em diferentes tempos, 5, 30 e 60 min após a adição da solução da sonda redox. As análises foram avaliadas em duas condições no eletrodo, uma com BSA e T20, condição SWC, e na ausência de T20, condição SFC. O voltamograma obtido, apresentado na **Figura 14a**, mostrou um aumento linear da corrente anódica (I_{ap}) e catódica (I_{ac}) durante 1 h de exposição. Calculando-se a taxa de aumento para I_{cp} , mostrada na **Figura 14c**, para a condição SWC, a taxa foi 20 vezes maior que para PP na condição SFC. Isso se deve à passivação

pela BSA que prejudicou o desempenho do eletrodo como já observado nas discussões anteriores.

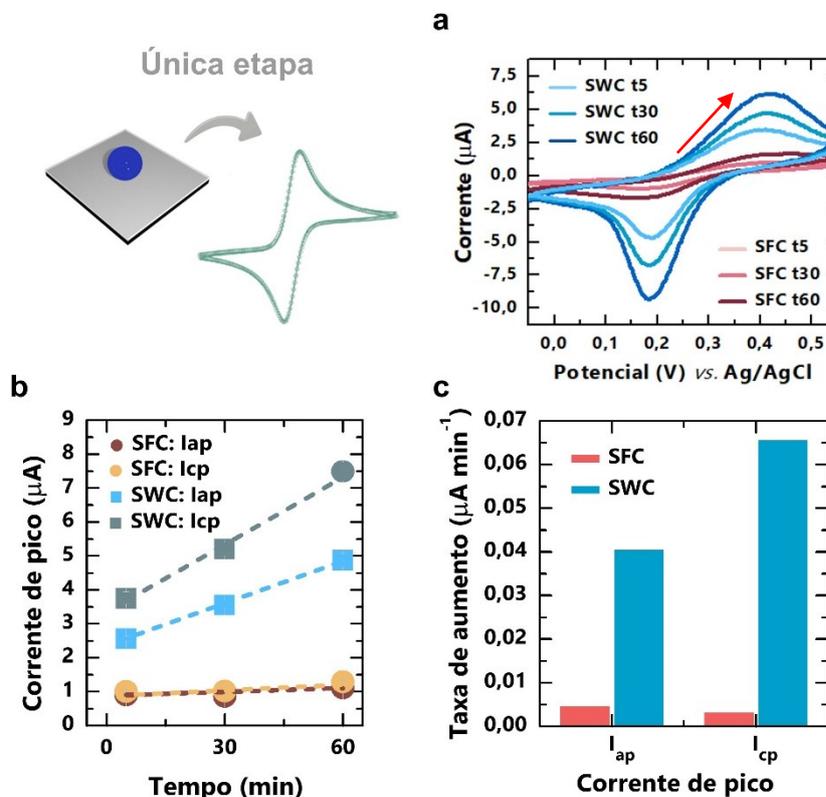


Figura 14. Resultados das análises do sensor em diferentes tempos por incubação em única etapa. **(a)** Voltamograma de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com BSA nas condições sem T20, SFC e com T20, SWC após 5, 30 e 60 min de incubação. **(b)** Gráfico das correntes de pico resultantes em módulo e as **(c)** taxas de aumento das correntes. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Em seguida, o experimento foi repetido nas mesmas condições, em diferentes tempos, porém, para diferentes concentrações da sonda ($1,0$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$), a fim de investigar a sensibilidade do sistema em cada tempo. As correntes de pico medidas nos três tempos de incubação aumentaram linearmente com a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ ($R^2 > 0,98$), como mostrado na **Figura 15a**. Interessante notar que, além do sinal da corrente, os valores de sensibilidade obtidos com T20 também aumentaram com o tempo, indo de $1,7$ (5 min) a $3,5 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$ (60 min) para I_{ap} , como mostrado no gráfico de barras da **Figura 15b** Essa dependência com o tempo enfatiza a capacidade do eletrodo de modular a sensibilidade de modo simples, dispensando a necessidade de realizar quaisquer ajustes, tanto em relação ao procedimento analítico, quanto à arquitetura do eletrodo.

Observa-se também que as sensibilidades para após 30 min e 60 min do sistema também superaram a sensibilidade na condição CT do PP (**Figura 15b**).

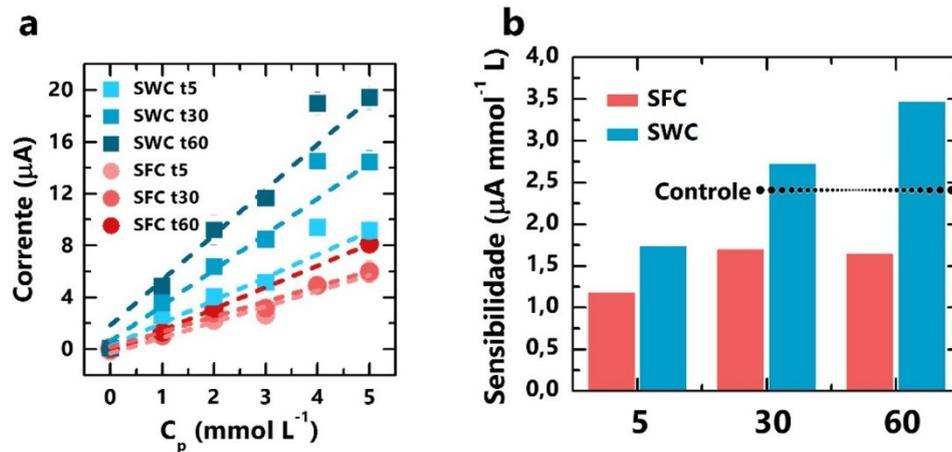


Figura 15. Resultados das análises de sensibilidade do sensor. **(a)** Curva analítica para solução padrão redox nas condições *SFC* e *SWC* em 5, 30 e 60 min. **(b)** Gráfico com os valores de sensibilidades resultantes para corrente anódica. A linha pontilhada em **(b)** representa a sensibilidade obtida na condição de solução controle. $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Interessantemente, a sensibilidade na ausência do T20 alcançada em 30 e 60 min foi levemente maior que em 5 min. Isso pode ter ocorrido devido à porosidade do PP que reteve bolhas de ar que se deslocaram durante o tempo de análise⁶⁵.

Para cada ponto da curva analítica obtida para o cálculo da sensibilidade, foram utilizados 3 eletrodos distintos. Os intervalos de confiança obtidos para cada ponto foram mínimos em todos os gráficos mostrados, como pode ser observado pelas barras de erro, obtendo-se valores de erro relativo de no mínimo 3% a um máximo de 14%, indicando uma boa reprodutibilidade do sistema.

Como os eletrodos de Au são muito utilizados na área de sensores pela facilidade da funcionalização de sua superfície através da reação com tiol⁸⁸, o eletrodo foi comparado com o PP. Foram obtidas curvas analíticas usando um eletrodo de disco de ouro com a mesma solução da sonda, porém sem T20 e BSA. Os voltamogramas obtidos constam na **Figura 16a**. As sensibilidades do eletrodo de ouro obtidas, apresentados na **Figura 16b**, foram de $1,4 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$ e $1,3 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$ para I_{ap} e I_{cp} , respectivamente, valores inferiores àqueles obtidos pelo PP com T20 e, além disso, também inferiores quando comparados com PP na condição

controle ($2,4 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$), evidenciando as vantagens do eletrodo de PP em relação a um eletrodo bastante utilizado na área de biossensores¹⁷.

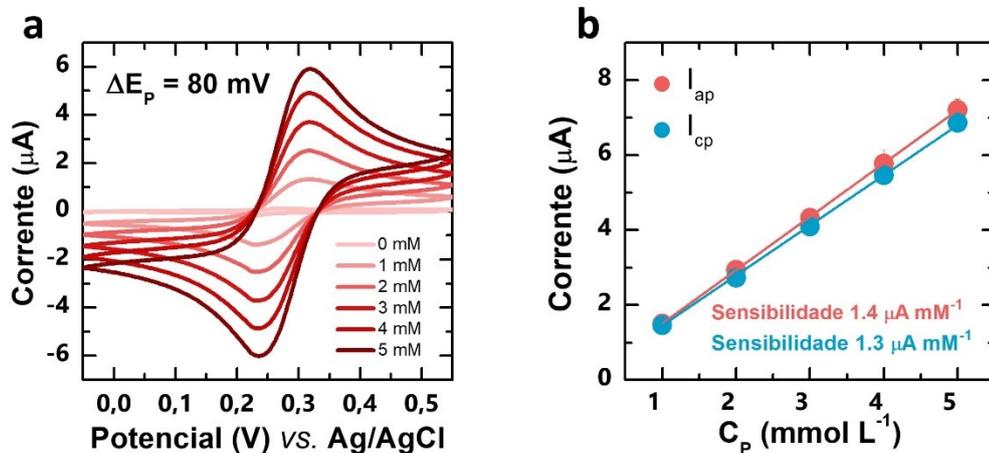


Figura 16. Resultados das análises de sensibilidade com eletrodo de disco de ouro. (a) Voltamogramas de $1,0 - 5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ nas condições controle e respectiva (b) curvas analíticas para I_{ap} e I_{cp} . $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

As medidas de VC anteriormente discutidas foram baseadas em um protocolo de uma única etapa, ou seja, com exposição simultânea da sonda, BSA e, eventualmente, T20. Enquanto essa rotina de única etapa é o ideal para experimentos em campo, uma vez que minimiza os riscos de erro de amostragem e do usuário, uma prática comum nas análises em biossensores envolve uma rotina de 3 etapas. Geralmente, é realizada a incubação da amostra com o antígeno, seguida de lavagem com água ou eletrólito para remoção de amostra que não interagiu e, por fim, a exposição do sensor a uma solução contendo a sonda para a realização das medidas eletroquímicas. Nesse sentido, o desempenho do nosso eletrodo foi avaliado utilizando esse procedimento. Primeiramente, uma solução com BSA, sem e com T20, foi incubada sobre o eletrodo por 1 h, seguido da remoção do excesso pelo eletrólito e adição da sonda ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ de 1 a 5 mmol L^{-1}), conforme ilustrado na **Figura 17**. A detecção foi realizada após 5, 30 e 60 min da interação da sonda com o eletrodo.

Neste processo, a etapa de limpeza remove apenas superficialmente a solução de incubação devido à sua forte adsorção, o que faz com que o T20 continue permeando pelo PP, atingindo novas regiões e, portanto, resultando em valores maiores que pelo método de uma única etapa, como mostra a **Figura 17a**.

As sensibilidades obtidas também foram superiores, resultando em $17,7 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$ para I_{ap} após 1 h, por exemplo. Por outro lado, na ausência de T20, o desempenho do eletrodo foi severamente prejudicado, com as sensibilidades similares em todos os tempos, por volta de $1,0 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$.

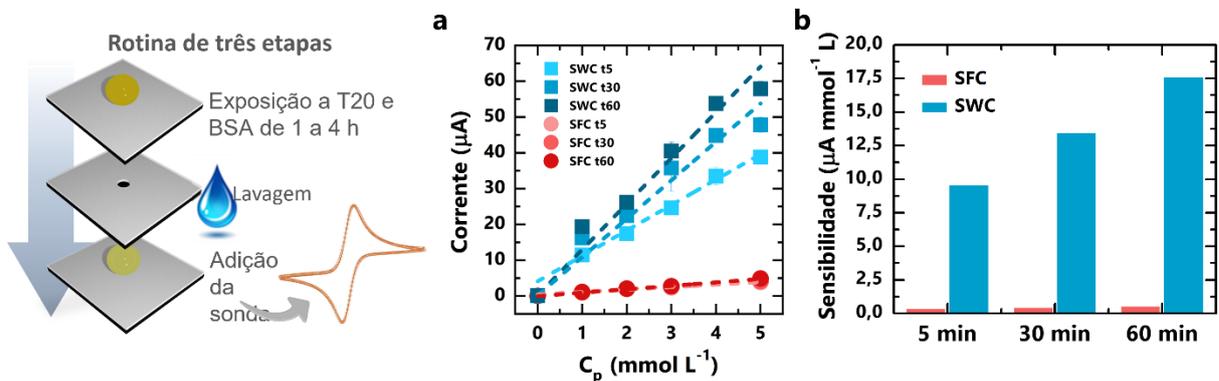


Figura 17. Resultados das análises de sensibilidade do sensor para rotina de 3 etapas. **(a)** Curva analítica para solução padrão redox nas condições SFC e SWC em 5, 30 e 60 min. **(b)** Gráfico com os valores de sensibilidades resultantes para corrente anódica.

O sistema ainda mostrou possuir potencial em testes de longo período de exposição, como apresentado nos voltamogramas na **Figura 18**. A solução de incubação com BSA e T20 permaneceu por 4 h sobre o PP e, após lavagens, resultou em correntes 19,6% (I_{ap}) e 17,1% (I_{ac}) superiores aos valores obtidos com 1 h de incubação. A proximidade entre os valores de 4 h de incubação com o de 1 h pode indicar uma saturação da área alcançada pela penetração do T20 para a concentração selecionada.

O sistema PP com T20 nas duas modalidades mostrou um relevante ganho na sensibilidade de forma modulável e simples através da seleção do tempo. Essa alternativa dispensa o uso de estratégias através de modificação com nanomateriais como via adsorção direta, montagem por camadas, ou por ligação covalente¹³.

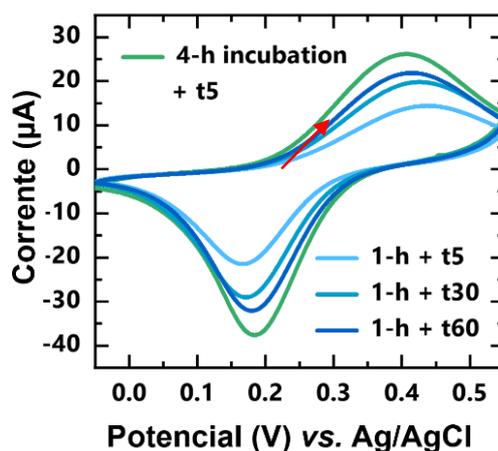


Figura 18. Voltamograma do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ pela rotina de 3 etapas com 1 h e 4 h de incubação nos tempos 5, 30 e 60 min com BSA 1,0% m/v na presença de T20 0,5% v/v. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.6. Aplicação em meio complexo

Experimentos de prova de conceito usando soluções de BSA são relevantes para análise do comportamento do sistema simplificado para uma única proteína, entretanto, não permitem a verificação do efeito da antipassivação em amplo espectro e simulação do desempenho do sensor com amostras biológicas reais. Visto que o plasma humano possui uma vasta quantidade e variedade de moléculas passivadoras com diferentes pesos moleculares, a fim de demonstrar o potencial do sensor como POC, testamos através da rotina de três etapas uma amostra de plasma humano como matriz complexa.

A amostra biológica foi incubada por 1 h e, na ausência de T20, o sinal da corrente para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ é mínimo, como pode ser observado no voltamograma da **Figura 19**. O sinal mínimo de corrente, inferior àquele obtido nos sistemas anteriores para a BSA, mostra a alta capacidade do plasma de passivar o eletrodo. Já na presença da nanocamada de T20, foi possível obter sinais de corrente que aumentaram com tempo de interação com a sonda. Os sinais de corrente faradaica obtidos foram 2,9 (5 min), 3,3 (30 min) e 3,6 μA (60 min), para I_{ac} . Comparando com a condição controle, cujo valor de corrente foi de 1,6 μA , as correntes foram até 125% maiores, demonstrando a eficiência do T20 mesmo na presença de proteínas adversas.

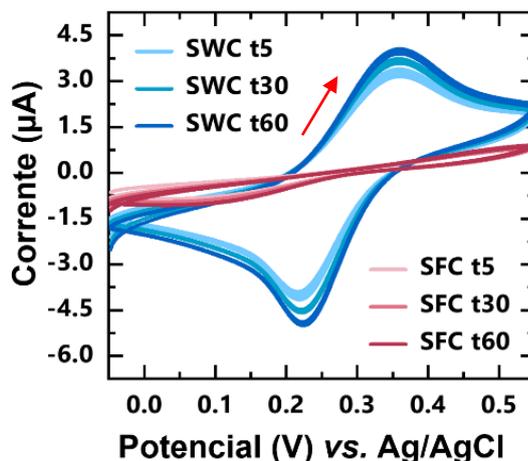


Figura 19. Voltamograma de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ nas condições SFC e SWC (sem e com T20 0,5% v/v, respectivamente) após 5, 30 e 60 min de incubação com plasma humano pela rotina de três etapas. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

4.7. Comparação com a literatura

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com outras estratégias de antipassivação na literatura, descritas na **Tabela 3**, a maioria das camadas propostas afetam em algum grau a sensibilidade do biossensor. Além disso, a maioria dos sistemas não foram desafiadas em meio biológico complexo. Os valores de diminuição de sensibilidade encontrados variaram de 75% a 8,8%, quando comparados os dados de corrente obtidos antes da camada de passivação e após a sua adição. O tempo de preparo dessas camadas é mais extenso, chegando a 1 dia para, por exemplo, a formação da camada lipídica⁴⁹, exigindo diversas etapas e um maior consumo de reagente, principalmente nos trabalhos que envolvem a funcionalização covalente do eletrodo. Em contraste, o nosso trabalho obteve um ganho de intensidade de corrente, de 154%, 249% e 276%, considerado o aumento em relação ao controle, 5, 30 e 60 minutos após a adição da solução de T20 com a sonda. Essas vantagens em relação às demais propostas de solução à antipassivação dadas pela literatura mostram o potencial do sistema proposto utilizando materiais simples e acessíveis capazes de realizar análise em meios biológicos reais.

Tabela 3. Dados de desempenho de camadas de proteção encontrados na literatura.

MATERIAL	IMPACTO NA SENSIBILIDADE (%)	MEIO
pSBMA⁷⁷	-12	Soro bovino sem diluição
pCBMA⁸⁹	N/a	Soro bovino sem diluição
pCBMA⁴³	-30	Soro bovino sem diluição
Zwiteriônico misto SAM⁹⁰	-66	N/a
Peptídeo zwiteriônico /PEDOT⁴⁵	-75	Plasma humano sem diluição
pSBEDOT⁴⁴	N/a	Plasma humano sem diluição
Bicamada lipídica (DPPT E POPC)⁴⁹	baixo	Sangue humano
Aptâmero⁴⁶	-55	50% soro de bezerro
Peptídeo zwiteriônico⁴⁷	-10	BSA, HSA, LYS, and soro humano
Glicoproteína lubrificina⁴⁸	baixo	50% saliva humana
PEG/PANI³⁹	-8.8	Soro humano
BSA/AuNP/GA³⁴	-12	Soro e plasma humano
Papel pirolisado com T20	+300	BSA e plasma humano

5. Conclusões

O sistema proposto se mostrou capaz de realizar análises eletroquímicas sensíveis em meio biológico complexo através da adição de um reagente de baixo custo e disponível comercialmente sobre o papel pirolisado. O sistema atendeu parte dos requisitos do REASSURED para plataformas POC, mostrando-se biodegradável, de baixo custo, sensível e rápido. Sendo que, com uso de equipamentos portáteis como potenciostato miniaturizado, celular e *machine learning*, permitiria uma conectividade em tempo real e com fácil interpretação dos dados para o usuário⁹¹. A nanocamada hidrofílica formada de maneira *in-situ* pelo polissorbato, T20, possibilitou a capilaridade das amostras através dos poros de PP e inibiu a sua passivação pelas proteínas presentes. Além disso, a sua espessura nanométrica (2 nm) foi crucial para minimizar a inibição do acesso da solução à superfície eletródica do PP, logo, não gerando um impedimento significativo à cinética da transferência de carga das reações redox. Enquanto as camadas antipassivadoras descritas na literatura normalmente comprometem a sensibilidade, o método proposto permitiu um aumento de corrente após 1 h de exposição ao plasma puro. Além disso, o método apresentou um bom desempenho eletroanalítico de modo reprodutível, com sensibilidade superior a eletrodos de disco de ouro. Mesmo em longos períodos, a sensibilidade aumentou gradualmente em incubações de até 4 h, o que possibilita modular o desempenho do sensor conforme a necessidade, simplesmente mediante registro do sinal analítico após um dado tempo de incubação. A nanocamada de T20 pode ser produzida de modo *in-situ* ou antes da adição de amostra, aumentando a flexibilidade do seu uso para desenvolvimento comercial.

A plataforma descrita neste trabalho demonstrou-se valiosa como solução para diagnóstico POC, com versatilidade de aplicação conforme a demanda e condições da amostra e ambiente, mantendo o seu alto desempenho e sua viabilidade de comercialização, atendendo o quesito de especificidade do REASSURE. Os resultados aqui apresentados foram publicados na revista *ACS Applied Materials & Interfaces* em janeiro de 2022, onde foi possível aplicar o sistema no diagnóstico da COVID19 em parceria com a UFABC⁵². No trabalho, foram depositadas nanopartículas de ouro e proteínas *spike* por *drop-casting* no PP com T20 previamente incubado pelo método de 3 etapas, e, através de medidas de

EIE, foi possível identificar satisfatoriamente a presença de anticorpos do SARS-CoV-2 no soro de dezenas de pacientes.

Ademais, o sistema se mostrou adaptável para aplicação em análises ambientais na quantificação de fosfato em amostras de água de lago e de torneira com outro reagente de promoção de capilaridade, o isopropanol²³. Os resultados mostraram a alta capacidade do método de capilaridade das amostras através dos poros de PP, indicada pelo aumento da sensibilidade das análises eletroquímicas. Nesse caso, a sensibilidade ($- 1,9 \times 10^{-6} \text{ mA cm}^{-2} \text{ ppb}^{-1}$) e o limite de detecção (1,1 ppb) para fosfato foram melhorados, respectivamente, por fatores de 33 e 99 em relação aos dados obtidos sem a adição de isopropanol.

Como perspectivas para continuação do trabalho, a estabilidade do sistema em relação ao tempo poderia ser estudada em diferentes tipos de armazenagem, como, por exemplo, em geladeira e dissecadora, acompanhando a variação do desempenho do sensor. Outro estudo complementar ao trabalho seria avaliar quando substituído por outros surfactantes com propriedades químicas distintas ao T20, como, por exemplo, observar o efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico, sobre a superfície do eletrodo, ou, ainda, o brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), um surfactante catiônico, na interação com a sonda, entre outros.

6. Referências bibliográficas

1. Gooding, J. J. & Liu, S. M. *A New Year Period Emphasizing the Need for Better Sensors*. *ACS Sensors* vol. 5 597–598 (American Chemical Society, 2020).
2. Russo, M. J. *et al.* Antifouling Strategies for Electrochemical Biosensing: Mechanisms and Performance toward Point of Care Based Diagnostic Applications. *ACS Sens* 6, 1482–1507 (2021).
3. Labib, M., Sargent, E. H. & Kelley, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. *Chemical Reviews* vol. 116 9001–9090 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00220> (2016).
4. Farka, Z., Juřík, T., Kovář, D., Trnková, L. & Skládal, P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges. *Chem Rev* 117, 9973–10042 (2017).
5. Cohen, L. & Walt, D. R. Highly Sensitive and Multiplexed Protein Measurements. *Chem Rev* 119, 293–321 (2019).
6. Seo, G. *et al.* Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano* 14, 5142 (2020).
7. Shan, B. *et al.* Multiplexed Nanomaterial-Based Sensor Array for Detection of COVID-19 in Exhaled Breath. *ACS Nano* 14, 12125–12132 (2020).
8. Yousefi, H. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 Viral Particles Using Direct, Reagent-Free Electrochemical Sensing. *J Am Chem Soc* 143, 1722–1727 (2021).
9. Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X.-S., Ramsay, A. R. & Peeling, R. W. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. doi:10.1038/s41564-018-0295-3.
10. Clifford, A. *et al.* Strategies for Biomolecular Analysis and Continuous Physiological Monitoring. *J Am Chem Soc* 143, 5281–5294 (2021).
11. Rader, B. *et al.* Use of At-Home COVID-19 Tests — United States, August 23, 2021–March 12, 2022. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 71, 489–494 (2022).
12. Gooding, J. J. & Ligler, F. S. Virus Detection: What Were We Doing before COVID-19 Changed the World? *ACS Sens* 5, 1503–1504 (2020).
13. Noviana, E. *et al.* Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications. *Chem Rev* 121, 11835–11885 (2021).
14. Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J. & Henry, C. S. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Anal Chem* 87, 19–41 (2015).
15. Choi, J. R. Development of Point-of-Care Biosensors for COVID-19. *Front Chem* 8, 517 (2020).
16. Ataide, V. N., Mendes, L. F., Gama, L. I. L. M., de Araujo, W. R. & Paixaõ, T. R. L. C. Electrochemical paper-based analytical devices: ten years of development. *Analytical Methods* 12, 1030–1054 (2020).
17. Noviana, E., McCord, C. P., Clark, K. M., Jang, I. & Henry, C. S. Electrochemical paper-based devices: sensing approaches and progress toward practical applications. *Lab Chip* 20, 9–34 (2019).
18. Lima, R. S., Strauss, M. & Santhiago, M. Flexible Carbon-Based Electrochemical Devices: Exploring the Three-Dimensional Architecture of Paper. *Reference Module in Biomedical Sciences* (2021) doi:10.1016/B978-0-12-822548-6.00026-1.

19. Giuliani, J. G. *et al.* Development and characterization of carbon based electrodes from pyrolyzed paper for biosensing applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 765, 8–15 (2016).
20. de Araujo, W. R. *et al.* Single-Step Reagentless Laser Scribing Fabrication of Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Angewandte Chemie* 129, 15309–15313 (2017).
21. Kalinke, C. *et al.* State-of-the-art and perspectives in the use of biochar for electrochemical and electroanalytical applications. *Green Chemistry* 23, 5272–5301 (2021).
22. de Araujo, W. R. & Paixão, T. R. L. C. *Paper-Based Analytical Devices for Chemical Analysis and Diagnostics.* (Elsevier, 2021).
23. Shimizu, F. M. F. M. *et al.* Alcohol-Triggered Capillarity through Porous Pyrolyzed Paper-Based Electrodes Enables Ultrasensitive Electrochemical Detection of Phosphate. *ACS Sens* 6, 3125–3132 (2021).
24. Lee, D. *et al.* Coffee-Driven Green Activation of Cellulose and Its Use for All-Paper Flexible Supercapacitors. *ACS Appl Mater Interfaces* 9, 22568–22577 (2017).
25. Gomez, F. J. V., Chumanov, G., Silva, M. F. & Garcia, C. D. CO₂ reduction using paper-derived carbon electrodes modified with copper nanoparticles. *RSC Adv* 9, 33657–33663 (2019).
26. Duran, G. M., Benavidez, T. E., Giuliani, J. G., Rios, A. & Garcia, C. D. Synthesis of CuNP-modified carbon electrodes obtained by pyrolysis of paper. *Sens Actuators B Chem* 227, 626–633 (2016).
27. de Brito Ayres, L., Brooks, J., Whitehead, K. & Garcia, C. D. Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Using Paper-Derived Electrochemical Biosensors. *Anal Chem* (2022) doi:10.1021/acs.analchem.2c03970.
28. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 16, 121–131 (2001).
29. Soleymani, L. & Li, F. Mechanistic Challenges and Advantages of Biosensor Miniaturization into the Nanoscale. *ACS Sens* 2, 458–467 (2017).
30. Bahadir, E. B. & Sezgintürk, M. K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and bioterror/bio warfare analyses. *Anal Biochem* 478, 107–120 (2015).
31. Turner, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev* 42, 3184–3196 (2013).
32. Gooding, J. J. Finally, a simple solution to biofouling. *Nat Nanotechnol* 14, 1089–1090 (2019).
33. Monošik, R., Stred'ansky, M. & Šturdík, E. Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. *J Clin Lab Anal* 26, 22–34 (2012).
34. Sabaté del Río, J., Henry, O. Y. F., Jolly, P. & Ingber, D. E. An antifouling coating that enables affinity-based electrochemical biosensing in complex biological fluids. *Nature Nanotechnology* 2019 14:12 14, 1143–1149 (2019).
35. Jiang, C. *et al.* Antifouling Strategies for Selective in Vitro and in Vivo Sensing. *Chemical Reviews* vol. 120 3852–3889 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00739> (2020).
36. Lin, P. H. & Li, B. R. Antifouling strategies in advanced electrochemical sensors and biosensors. *Analyst* vol. 145 1110–1120 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c9an02017a> (2020).

37. Campuzano, S., Pedrero, M., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. Antifouling (Bio)materials for Electrochemical (Bio)sensing. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 423 20, 423 (2019).
38. Pelaz, B. *et al.* Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* 9, 6996–7008 (2015).
39. Hui, N., Sun, X., Niu, S. & Luo, X. PEGylated polyaniline nanofibers: Antifouling and conducting biomaterial for electrochemical DNA sensing. *ACS Appl Mater Interfaces* 9, 2914–2923 (2017).
40. Li, H. *et al.* A biomimetic phosphatidylcholine-terminated monolayer greatly improves the in vivo performance of electrochemical aptamer-based sensors. *Wiley Online Library* 56, 7492–7495 (2017).
41. Cui, M. *et al.* Mixed Self-Assembled Aptamer and Newly Designed Zwitterionic Peptide as Antifouling Biosensing Interface for Electrochemical Detection of alpha-Fetoprotein. *ACS Sens* 2, 490–494 (2017).
42. Dhanapala, L., Jones, A. L., Czarnecki, P. & Rusling, J. F. Sub-zeptomole Detection of Biomarker Proteins Using a Microfluidic Immunoarray with Nanostructured Sensors. *Anal Chem* 92, 8021–8025 (2020).
43. Yang, W., Xue, H., Carr, L. R., Wang, J. & Jiang, S. Zwitterionic poly(carboxybetaine) hydrogels for glucose biosensors in complex media. *Biosens Bioelectron* 26, 2454–2459 (2011).
44. Wu, H. *et al.* Highly sensitive and stable zwitterionic poly(sulfobetaine-3,4-ethylenedioxythiophene) (PSBEDOT) glucose biosensor. *Chem Sci* 9, 2540–2546 (2018).
45. Wang, G. *et al.* Zwitterionic peptide anchored to conducting polymer PEDOT for the development of antifouling and ultrasensitive electrochemical DNA sensor. *Biosens Bioelectron* 92, 396–401 (2017).
46. Yu, Z. *et al.* Lengthening the aptamer to hybridize with a stem-loop DNA assistant probe for the electrochemical detection of kanamycin with improved sensitivity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2020 412:11 412, 2391–2397 (2020).
47. Song, Z. *et al.* Designed zwitterionic peptide combined with sacrificial Fe-MOF for low fouling and highly sensitive electrochemical detection of T4 polynucleotide kinase. *Sens Actuators B Chem* 305, 127329 (2020).
48. Russo, M. J. *et al.* Lubricin (PRG4) reduces fouling susceptibility and improves sensitivity of carbon-based electrodes. *Electrochim Acta* 333, 135574 (2020).
49. Liu, Y., Chen, D., Zhang, W. & Zhang, Y. Mobile DNA tetrahedron on ultra-low adsorption lipid membrane for directional control of cell sensing. *Sens Actuators B Chem* 307, 127570 (2020).
50. Lísalová, H. *et al.* Ultralow-Fouling Behavior of Biorecognition Coatings Based on Carboxy-Functional Brushes of Zwitterionic Homo- and Copolymers in Blood Plasma: Functionalization Matters. *Anal Chem* 89, 3524–3531 (2017).
51. Feng, T. *et al.* Low-fouling nanoporous conductive polymer-coated microelectrode for in vivo monitoring of dopamine in the rat brain. *Anal Chem* 91, 10786–10791 (2019).
52. Nicoliche, C. Y. N. C. Y. N. *et al.* In Situ Nanocoating on Porous Pyrolyzed Paper Enables Antibiofouling and Sensitive Electrochemical Analyses in Biological Fluids. *ACS Appl Mater Interfaces* 14, 2522–2533 (2022).
53. Damasceno, S. *et al.* Delayed Capillary Flow of Elastomers: An Efficient Method for Fabrication and Nanofunctionalization of Flexible, Foldable, Twistable, and Stretchable Electrodes from Pyrolyzed Paper. *Adv Electron Mater* 6, 1900826 (2020).

54. Shoog, D. A. & West, D. M. *Fundamentals of analytical chemistry*. (Thomson Brooks/Cole, 2013). doi:10.1016/b978-0-323-85208-1.00006-1.
55. Evans, E., Moreira Gabriel, E. F., Tomazelli Coltro, W. K. & Garcia, C. D. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. *Analyst* 139, 2127–2132 (2014).
56. Santhiago, M., Henry, C. S. & Kubota, L. T. Low cost, simple three dimensional electrochemical paper-based analytical device for determination of p-nitrophenol. *Electrochim Acta* 130, 771–777 (2014).
57. Dungchai, W., Chailapakul, O. & Henry, C. S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal Chem* 81, 5821–5826 (2009).
58. Wang, Q. *et al.* Initial pyrolysis mechanism and product formation of cellulose: An Experimental and Density functional theory(DFT) study. *Scientific Reports* 2020 10:1 10, 1–18 (2020).
59. Damasceno, S. Dispositivos Eletroquímicos Flexíveis Empregando Papel Pi-rolisado. (Universidade Estadual de São Paulo, 2019).
60. Paixão, T. R. L. C. & Garcia, C. D. Chemistry of paper—properties, modification strategies, and uses in bioanalytical chemistry. *Paper-based Analytical Devices for Chemical Analysis and Diagnostics* 15–39 (2022) doi:10.1016/B978-0-12-820534-1.00008-6.
61. Kim, Y. S., Yang, Y. & Henry, C. S. Laminated and infused Parafilm® – paper for paper-based analytical devices. *Sens Actuators B Chem* 255, 3654–3661 (2018).
62. Pimenta, M. A. *et al.* Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* vol. 9 1276–1291 Preprint at <https://doi.org/10.1039/b613962k> (2007).
63. Pimenta, M. A. *et al.* Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9, 1276–1290 (2007).
64. Hotaling, N. A., Bharti, K., Kriel, H. & Simon, C. G. DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool. *Biomaterials* 61, 327–338 (2015).
65. Deng, Y. *et al.* Recent development of super-wettable materials and their applications in oil-water separation. *J Clean Prod* 266, 121624 (2020).
66. Zhang, Z. *et al.* Adsorption of polysorbate 20 and proteins on hydrophobic polystyrene surfaces studied by neutron reflectometry. *Colloids Surf B Biointerfaces* 168, 94–102 (2018).
67. Delgado-Magnero, K. H., Valiente, P. A., Ruiz-Peña, M., Pérez-Gramatges, A. & Pons, T. Unraveling the binding mechanism of polyoxyethylene sorbitan esters with bovine serum albumin: A novel theoretical model based on molecular dynamic simulations. *Colloids Surf B Biointerfaces* 116, 720–726 (2014).
68. Jiang, R. *et al.* Tween 20 regulate the function and structure of transmembrane proteins of *Bacillus cereus*: Promoting transmembrane transport of fluoranthene. *J Hazard Mater* 403, 123707 (2021).
69. Ostuni, E., Chapman, R. G., Holmlin, R. E., Takayama, S. & Whitesides, G. M. A survey of structure– property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *ACS Publications* 17, 5605–5620 (2001).
70. Bard, A. J., Faulkner, L. R. & White, H. S. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2001).
71. Zhao, H. *et al.* Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. *Sens Actuators B Chem* 327, (2021).

72. Siddiqui, S., Arumugam, P. U., Chen, H., Li, J. & Meyyappan, M. Characterization of carbon nanofiber electrode arrays using electrochemical impedance spectroscopy: Effect of scaling down electrode size. *ACS Nano* 4, 955–961 (2010).
73. Christodouleas, D. C. *et al.* Fabrication of Paper-Templated Structures of Noble Metals. *Adv Mater Technol* 2, 1600229 (2017).
74. Nicholson, R. S. & Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Anal Chem* 36, 706–723 (1964).
75. Lavagnini, I., Antiochia, R. & Magno, F. An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data. *Electroanalysis* 16, 505–506 (2004).
76. Huang, W. & McCreery, R. Electron transfer kinetics of Fe(CN)₆³⁻ on laser-activated and CN--modified Pt electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 326, 1–12 (1992).
77. Hu, Y. *et al.* Antifouling Zwitterionic Coating via Electrochemically Mediated Atom Transfer Radical Polymerization on Enzyme-Based Glucose Sensors for Long-Time Stability in 37 °c Serum. *Langmuir* 32, 11763–11770 (2016).
78. Torrinha, Á., Martins, M., Tavares, M., Delerue-Matos, C. & Morais, S. Carbon paper as a promising sensing material: Characterization and electroanalysis of ketoprofen in wastewater and fish. *Talanta* 226, (2021).
79. de Lima, L. F., Ferreira, A. L., Maciel, C. C., Ferreira, M. & de Araujo, W. R. Disposable and low-cost electrochemical sensor based on the colorless nail polish and graphite composite material for tartrazine detection. *Talanta* 227, 122200 (2021).
80. Christodouleas, D. C. *et al.* Fabrication of Paper-Templated Structures of Noble Metals. *Adv Mater Technol* 2, 1600229 (2017).
81. Pernaut, J. M. & Matencio, T. DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE CÉLULAS ELETROQUÍMICAS EM CAMADA DELGADA. 22, (1999).
82. Kaliyaraj Selva Kumar, A., Lu, Y. & Compton, R. G. Voltammetry of Carbon Nanotubes and the Limitations of Particle-Modified Electrodes: Are Carbon Nanotubes Electrocatalytic? *Journal of Physical Chemistry Letters* 13, 8699–8710 (2022).
83. von Hauff, E. Impedance Spectroscopy for Emerging Photovoltaics. *Journal of Physical Chemistry C* 123, 11329–11346 (2019).
84. Duran, G. M., Benavidez, T. E., Giuliani, J. G., Rios, A. & Garcia, C. D. Synthesis of CuNP-modified carbon electrodes obtained by pyrolysis of paper. *Sens Actuators B Chem* 227, 626–633 (2016).
85. Egerton, R. F. Electron energy-loss spectroscopy in the TEM. *Reports on Progress in Physics* 72, 016502 (2008).
86. Graca, M., Bongaerts, J. H. H., Stokes, J. R. & Granick, S. Friction and adsorption of aqueous polyoxyethylene (Tween) surfactants at hydrophobic surfaces. *J Colloid Interface Sci* 315, 662–670 (2007).
87. Nicoliche, C. Y. N. C. Y. N., Costa, G. F. G. F., Gobbi, A. L. A. L., Shimizu, F. M. F. M. & Lima, R. S. R. S. Pencil graphite core for pattern recognition applications. *Chemical Communications* 55, 4623–4626 (2019).
88. Xu, X. *et al.* Revisiting the factors influencing gold electrodes prepared using cyclic voltammetry. *Sens Actuators B Chem* 283, 146–153 (2019).
89. Yang, W. *et al.* The effect of lightly crosslinked poly(carboxybetaine) hydrogel coating on the performance of sensors in whole blood. *Biomaterials* 33, 7945–7951 (2012).

90. Wang, Y. S., Yau, S., Chau, L. K., Mohamed, A. & Huang, C. J. Functional Biointerfaces Based on Mixed Zwitterionic Self-Assembled Monolayers for Biosensing Applications. *Langmuir* 35, 1652–1661 (2019).
91. Nicoliche, C. Y. N. *et al.* Converging Multidimensional Sensor and Machine Learning Toward High-Throughput and Biorecognition Element-Free Multidetermination of Extracellular Vesicle Biomarkers. *ACS Sens* 5, 1864–1871 (2020).