



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MARIANA FEITOSA CUSTÓDIO

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO MINIATURIZADO PARA A
DETECÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO EM SALIVA**

CAMPINAS

2023

MARIANA FEITOSA CUSTÓDIO

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO MINIATURIZADO PARA A
DETECÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO EM SALIVA**

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

Orientador: Prof. Dr. William Reis de Araujo

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Mariana Feitosa Custódio e orientada pelo prof. Dr. William Reis de Araujo.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

C969d Custodio, Mariana Feitosa, 1994-
Desenvolvimento de sensor eletroquímico miniaturizado para a detecção de ácido úrico em saliva / Mariana Feitosa Custodio. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: William Reis de Araujo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Sensores eletroquímicos. 2. Grafeno gravado a laser. 3. Ácido úrico. 4. Saliva. I. Araujo, William Reis de, 1991-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Development of a miniaturized electrochemical sensor for detection of uric acid in saliva **Palavras-chave em inglês:**

Electrochemical sensors

Laser-scribing graphene

Uric acid

Spittle

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

William Reis de Araujo [Orientador]

Silvia Helena Pires Serrano

Renato Sousa Lima

Data de defesa: 28-07-2023

Programa de Pós-Graduação: Química

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0001-6139-5304>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9701026938473193>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. William Reis de Araujo (Orientador)

Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano (IQ-USP)

Prof. Dr. Renato Sousa Lima (IQ-UNICAMP)

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 **MARIANA FEITOSA CUSTÓDIO**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de julho de 2023.

Control your emotions! Discipline your mind!

Severus Snape

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Ana Lúcia e Joselito, e ao meu querido tio Francisco das Chagas (*in memoriam*) que foram minha força, minha fonte de amor e acreditaram no meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida. Por sustentar-me em todos os momentos e amar-me em qualquer situação. Obrigado, meu Senhor, por ser a luz que guia meus passos, o amor que me protege e por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Ana Lúcia Feitosa Custódio e Joselito Cesar Custódio, por serem o meu porto-seguro, minha base e por lutarem por meus sonhos com tanto esforço. Obrigado mamãe e papai, eu amo vocês mais que tudo.

À minha família, avós e avô, irmã, tios e tias por todo o auxílio e força que dedicaram a mim durante toda essa jornada. Em especial, ao meu tio Francisco das Chagas Lopes Feitosa (em memória), esta vitória também é sua. Obrigada por sempre acreditar em mim.

Ao meu orientador professor Dr. William Reis de Araujo que me recebeu com muita paciência para guiar-me nessa jornada. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e pela oportunidade.

Aos meus amigos que foram meu suporte ao longo deste processo, acreditaram mais em mim do que eu mesma e nunca me deixaram desistir. Obrigada por todo carinho, pelas risadas, por enxugarem minhas lágrimas de desespero também. Esta caminhada se tornou mais bela com vocês.

Ao Fundo de apoio ao ensino, pesquisa e extensão (FAEPEX) pelo apoio e incentivo financeiro – Processo 2387/21.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio para realização do presente trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Código de Financiamento 2018/08782-1 pelos recursos para desenvolvimento da pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos para desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

O ácido úrico (AU) é um importante biomarcador para doenças como a gota, hiperuricemia, doença renal, síndrome de Lesch-Nyhan, hipertensão e colesterol alto. Em vista da relevância clínica deste biomarcador, bem como do conhecimento de adequada correlação entre os níveis séricos com aqueles em saliva, nesta dissertação descrevemos o desenvolvimento de um sensor eletroquímico visando a quantificação de AU em saliva, como alternativa para diagnósticos simples e frequentes. Utilizamos a polietirimida (PEI) como substrato para a fabricação de eletrodos baseados em derivados de grafeno por meio da técnica de carbonização superficial induzida por radiação laser de CO₂ (LSG, sigla em inglês para *Laser-Scribing Graphene*). As caracterizações morfológica e estrutural do sensor foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e por espectroscopia Raman, respectivamente. Visando a detecção não enzimática de AU, o eletrodo de LSG passou por um tratamento anódico (TA) e, posteriormente, foi modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) para melhorar o seu desempenho analítico. Sob as melhores condições experimentais, utilizando a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial, construiu-se uma curva analítica para o sensor LSG/TA/AuNPs na faixa de concentração de 2,0 a 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AU, o qual apresentou uma região linear de resposta no intervalo de 2,0 a 60,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foram realizados ensaios de seletividade do método em relação as principais biomoléculas presentes na saliva e não foram identificadas interferências significativas na resposta eletroanalítica do AU, resultando em desvio padrão relativo (DPR) de 9,3% para a glicose (Gli) e de 2,0 a 3,7% para o lactato (Lac), creatinina (Cre) e ácido ascórbico (AA). Os limites de detecção e quantificação foram 1,34 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 4,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A reprodutibilidade de fabricação dos sensores foi avaliada e gerou um nível satisfatório de variação de resposta, apresentando DPR de 8% ($n=8$ sensores). O desempenho analítico do sensor foi avaliado por meio do método de adição e recuperação em amostras simuladas de saliva, contendo níveis de AU tipicamente de indivíduos saudáveis e hiperuricêmicos, fornecendo recuperações adequadas no intervalo de 94 a 120%.

ABSTRACT

Uric acid (UA) is an important biomarker for diseases such as gout, hyperuricemia, kidney disease, Lesch-Nyhan syndrome, hypertension, and high cholesterol. Given the clinical relevance of this biomarker and the knowledge of adequate correlation between serum levels and those in saliva, in this dissertation, we describe the development of an electrochemical sensor aimed at quantifying UA in saliva, as an alternative for simple and frequent diagnoses. We used polyetherimide (PEI) as a substrate for the manufacture of electrodes based on graphene derivatives through the laser-scribing graphene (LSG) induced by CO₂ laser radiation. The morphological and structural characterizations of the sensor were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Raman spectroscopy, respectively. Aiming at non-enzymatic UA detection, the LSG electrode underwent an anodic treatment (AT) and was subsequently modified with gold nanoparticles (AuNPs) to improve its analytical performance. Under the best experimental conditions, using the Differential Pulse Voltammetry technique, an analytical curve was constructed for the LSG/AT/AuNPs sensor in the UA concentration range of 2.0 to 200.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, which presented a linear response range from 2.0 to 60.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Selectivity tests of the method were carried out evaluating the main biomolecules present in saliva and no significant interferences were identified in the electroanalytical response of the UA, resulting in a relative standard deviation (RSD) of 9.3% for glucose (Gli) and 2.0 to 3.7% for lactate (Lac), creatinine (Cre) and ascorbic acid (AA). The limits of detection and quantification were 1.34 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 4.46 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The manufacturing reproducibility of the sensors was evaluated and generated a satisfactory level of response variation, with an RSD of 8% ($n = 8$ sensors). The analytical performance of the sensor was evaluated using the addition and recovery method on simulated saliva samples, containing UA levels typically from healthy and hyperuricemic individuals, providing adequate recoveries in the range of 94 to 120%.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: GLÂNDULAS RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DA SALIVA.

FIGURA 2: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO ÚRICO.

FIGURA 3: CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO NA SALIVA E NO SORO. OS INTERVALOS DE CONCENTRAÇÃO DE AU EXPRESSOS PARA PACIENTES HIPERURICÊMICOS $4,12 \pm 1,42 \text{ MG DL}^{-1}$ DE AU EQUIVALE A $245 \pm 84 \text{ MMOL L}^{-1}$ E $8,02 \pm 0,89 \text{ MG DL}^{-1}$ EQUIVALE A $477 \pm 51 \text{ MMOL L}^{-1}$.

FIGURA 4: LASER INCIDINDO EM POLÍMERO E INDUZINDO A GRAFITIZAÇÃO E FORMAÇÃO DOS ELETRODOS.

FIGURA 5: ESQUEMA DE FABRICAÇÃO DOS SENSORES LSG, DESTACANDO OS PRINCIPAIS PARÂMETROS UTILIZADOS.

FIGURA 6: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS EM TAMPÃO FOSFATO PH 7,4 (LINHA PRETA) E PARA O AU $0,50 \text{ MMOL L}^{-1}$ (LINHA VERMELHA) NO LSG SEM NENHUM TRATAMENTO PRÉVIO. (B) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS PARA O AU $0,50 \text{ MMOL L}^{-1}$ SEM TRATAMENTO (LINHA PRETA), COM TRATAMENTO ANÓDICO (LINHA VERMELHA) E COM TRATAMENTO CATÓDICO (LINHA AZUL) DO LSG. VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s^{-1} . OS VOLTAMOGRAMAS APRESENTADOS REFEREM-SE AO PRIMEIRO CICLO OBTIDO NA CV.

FIGURA 7: A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE AUNPS UTILIZADAS PARA A MODIFICAÇÃO DO SENSOR TRATADO (TA). FOI UTILIZADO AU $0,50 \text{ MMOL L}^{-1}$ SEM AUNPS (LINHA VERMELHA), COM $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ DE AUNPS (LINHA AZUL), $3,0 \text{ }\mu\text{L}$ DE AUNPS (LINHA MAGENTA), $5,0 \text{ }\mu\text{L}$ DE AUNPS (LINHA VERDE), $8,0 \text{ }\mu\text{L}$ DE AUNPS (LINHA LARANJA) E $10 \text{ }\mu\text{L}$ DE AUNPS (LINHA ROXA). PARÂMETROS: VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s^{-1} . UTILIZADO O PRIMEIRO CICLO OBTIDO NA CV. B) GRÁFICO DE CORRENTE DE PICO DO AU EM FUNÇÃO DO VOLUME DE AUNPS. AS BARRAS DE ERRO FORAM OBTIDAS A PARTIR DE ANÁLISE EM TRIPLICATA ($N = 3$). PARA OS 4 PRIMEIROS PONTOS, OBSERVOU-SE UM COMPORTAMENTO LINEAR DE INCREMENTO DE RESPOSTA COM EQUAÇÃO DA RETA: $Y = 0,586X + 6,912$ COM $R^2 = 0,993$.

FIGURA 8: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA OTIMIZAÇÃO DO TEMPO DE SECAGEM DAS AUNPS, UTILIZANDO O VOLUME DE $5,0 \text{ }\mu\text{L}$. FORAM REALIZADAS AS MEDIDAS COM O

SENSOR SEM TRATAMENTO E SEM AUNPs (LINHA TRACEJADA), SOMENTE COM TRATAMENTO ANÓDICO (LINHA VERMELHA), APÓS 1 H DE SECAGEM DA APLICAÇÃO DE AUNPs (LINHA AZUL), APÓS 2 H DE SECAGEM (LINHA MAGENTA), APÓS 3 H DE SECAGEM (LINHA VERDE) E APÓS 6 H DE SECAGEM (LINHA LARANJA). PARÂMETROS: VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s^{-1} . UTILIZADO O PRIMEIRO CICLO OBTIDO NA CV.

FIGURA 9: AVALIAÇÃO DO TAMANHO DAS AUNPs SINTETIZADAS NESTE TRABALHO.

FIGURA 10: MICROGRAFIAS DA SUPERFÍCIE DO A-B) PEI E DO C-D) SENSOR LSG EM AMPLIAÇÕES DE 500x (À ESQUERDA) E 1000x (À DIREITA).

FIGURA 11: ESPECTROS RAMAN DO SENSOR LSG (PRETO), DO SENSOR TRATADO ANODICAMENTE LSG/TA (MAGENTA) E DO SENSOR TRATADO E MODIFICADO COM AUNPs LSG/TA/AUNPs (AZUL).

FIGURA 12: (A) ESTUDO DO EFEITO DO pH NA RESPOSTA DO ÁCIDO ÚRICO REALIZADO POR CV NA PRESENÇA DE $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ NO SENSOR COM AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS NA FAIXA DE pH DE 5,0 (LINHA PRETA) A 9,0 (LINHA VERDE). VELOCIDADE DE VARREDURA DE 50 mV s^{-1} . (B) GRÁFICO DE POTENCIAL DE PICO EM FUNÇÃO DO pH PARA A RESPOSTA DO ÁCIDO ÚRICO $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. UTILIZADO O PRIMEIRO CICLO OBTIDO NA CV.

FIGURA 13: MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO.

FIGURA 14: (A) VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS REGISTRADOS USANDO O SENSOR COM AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS CONTENDO $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ DE ÁCIDO ÚRICO EM TAMPÃO FOSFATO $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) PARA DIFERENTES TAXAS DE VARREDURA (10, 20, 30, 40, 100 E 200 mV s^{-1}). UTILIZADO O PRIMEIRO CICLO OBTIDO NA CV. (B) GRÁFICO DO LOGARITMO DA CORRENTE DE PICO *VERSUS* O LOGARITMO DA TAXA DE VARREDURA.

FIGURA 15: VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS EM SOLUÇÃO DE $30,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ DE ÁCIDO ÚRICO EM TAMPÃO FOSFATO $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0, LINHA TRACEJADA), UTILIZANDO OITO SENSORES PARA AVALIAR REPRODUTIBILIDADE ($N = 8$). PARÂMETROS: POTENCIAL DE $-0,4$ A $+0,5 \text{ V}$; VELOCIDADE DE VARREDURA DE 30 mV s^{-1} ; STEP DE 5 mV E AMPLITUDE DE 50 mV .

FIGURA 16: (A) VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS COM ELETRODO LSG/TA/AUNPs PARA O ÁCIDO ÚRICO EM TAMPÃO FOSFATO $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) COM CONCENTRAÇÃO FINAL VARIANDO DE $2,0$ A 200 mmol L^{-1} . (B) CURVA ANALÍTICA CONSTRUÍDA USANDO A MÉDIA DAS CORRENTES DE PICO DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO INCLUINDO AS

BARRAS DE ERRO ($N = 3$). PARÂMETROS: FAIXA DE POTENCIAL DE -0,4 A +0,5 V; VELOCIDADE DE VARREDURA DE 30 mV s^{-1} ; STEP DE 5 mV E AMPLITUDE DE 50 mV. EQUAÇÃO DA RETA: $Y = 0,094x + 0,948$ COM $R^2 = 0,998$.

FIGURA 17: VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA O AU $100 \mu\text{MOL L}^{-1}$ (LINHA VERMELHA) E NA PROPORÇÃO DE 1:1 COM (A) GLICOSE (B) LACTATO (C) CREATININA E (D) ÁCIDO ASCÓRBICO NO SENSOR LSG/TA/AuNPs. PARÂMETROS: POTENCIAL DE -0,4 A +0,5 V; VELOCIDADE DE VARREDURA DE 30 mV s^{-1} ; STEP DE 5 mV E AMPLITUDE DE 50 mV.

FIGURA 18: VOLTAMOGRAMAS DE PULSO DIFERENCIAL OBTIDOS PARA O AA $100 \mu\text{MOL L}^{-1}$ (LINHA VERMELHA) E UM EXCESSO DE AA $920 \mu\text{MOL L}^{-1}$ (LINHA AZUL) NO SENSOR LSG/TA/AuNPs. PARÂMETROS: POTENCIAL DE -0,4 A +0,5 V; VELOCIDADE DE VARREDURA DE 30 mV s^{-1} ; STEP DE 5 mV E AMPLITUDE DE 50 mV.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação do desempenho analítico do eletrodo LSG/TA/AuNPs neste trabalho para detecção eletroquímica de ácido úrico com outros métodos eletroquímicos relatados na literatura.

Tabela 2: Detecção de ácido úrico em amostras de saliva artificial empregando o sensor LSG/TA/AuNPs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido Ascórbico

ATP - Trifosfato de Adenosina

AU - Ácido Úrico

AuNPs - Nanopartículas de Ouro

CB - *Carbon Black*

CO₂ - Dióxido de Carbono

Cre – Creatinina

CV - Voltametria Cíclica

CVD - Deposição Química de Vapor

DLS - Espalhamento de Luz Dinâmica

DPR – Desvio padrão relativo

DPV - Voltametria de Pulso Diferencial

EC - Eletroquímica

ERGO - Óxido de Grafeno Reduzido Eletroquimicamente

GA - Glutaraldeído

GC/GCE - Eletrodo de Carbono Vítreo

Gli - Glicose

GO - Óxido de Grafeno

GTP - Trifosfato de Guanosina

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

HGPRT - Hipoxantina-guanina Fosforribosil Transferase

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

IDMS - Espectrometria de Massa por Diluição de Isótopos

ITO - Óxido de Índio e Estanho

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

Lac – Lactato

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

LSG - Técnica de carbonização superficial induzida por radiação laser (sigla em inglês para *laser-scribing graphene*) ou eletrodo gravado a laser

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MNPs - Nanopartículas de Metais

MS - Espectrometria de Massas

MS/MS - Espectrometria de Massas em Tandem

PDMS – Polidimetilsiloxano

PEDOT - Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)

PEI - Polieterimida

PI - Poliimida

PoliPPD - poli(N-fenil-o-fenilenodiamina)

PPy - Polipirrol

Pt - Platina

rGO - Óxido de Grafeno Reduzido

SACNT - Nanotubo de Carbono Superalinhado

SPE - Eletrodo Serigrafado

TA - Tratamento Anódico

TiC - Carboneto de Titânio (IV)

TiO₂ - Óxido de Titânio (IV)

UV - Ultravioleta

ZnO - Óxido de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Saliva.....	17
1.2	Ácido úrico.....	20
1.2.1	Métodos de detecção do ácido úrico	24
1.3	Sensores	26
1.3.1	Grafeno e os sensores gravados a laser	28
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específicos.....	35
3	PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1	Reagentes e materiais.....	36
3.2	Fabricação dos sensores LSG.....	36
3.3	Caracterizações do material de eletrodo.....	37
3.4	Medidas eletroquímicas.....	37
3.5	Síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs)	39
3.6	Estudo de seletividade.....	40
3.7	Avaliação da reprodutibilidade dos sensores.....	40
3.8	Saliva sintética.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Estudo das condições experimentais.....	41
4.1.1	Tratamento eletroquímico do eletrodo	41
4.1.2	Otimização e modificação do sensor com AuNPs.....	43
4.2	Caracterização morfológica e estrutural do sensor	46
4.3	Estudo do efeito do pH na eletro-oxidação do AU	49
4.4	Estudo do transporte de massa	52
4.5	Otimização do <i>step</i> e amplitude do pulso	53
4.6	Teste de reprodutibilidade	53
4.7	Curva analítica.....	54
4.8	Estudo de seletividade.....	56
4.9	Teste de recuperação em amostras de saliva sintética.....	60
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
	BIBLIOGRAFIA.....	63

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos métodos de monitoramentos de saúde são realizados por ferramentas diagnósticas invasivas que dificultam o rastreamento em tempo real do estado fisiológico preciso dos indivíduos ou a coleta frequente para análises cotidianas visando automonitoramento (MOHAN *et al.*, 2020).

A melhoria na qualidade de vida impulsionada pelos avanços na medicina levou a um aumento na expectativa de vida e, uma população mundial envelhecida, elevou os estudos e discussões sobre o uso de tecnologia assistiva e, em particular, em relação a novos dispositivos e métodos de diagnósticos (LEAL-JUNIOR *et al.*, 2019).

Nas últimas décadas, o monitoramento da saúde por meio da análise minimamente invasiva de fluidos ganhou atenção crescente nas áreas de diagnóstico e tratamento médico e monitoramento de drogas para fins terapêuticos, forenses e de exposição ambiental (BELLAGAMBI *et al.*, 2020).

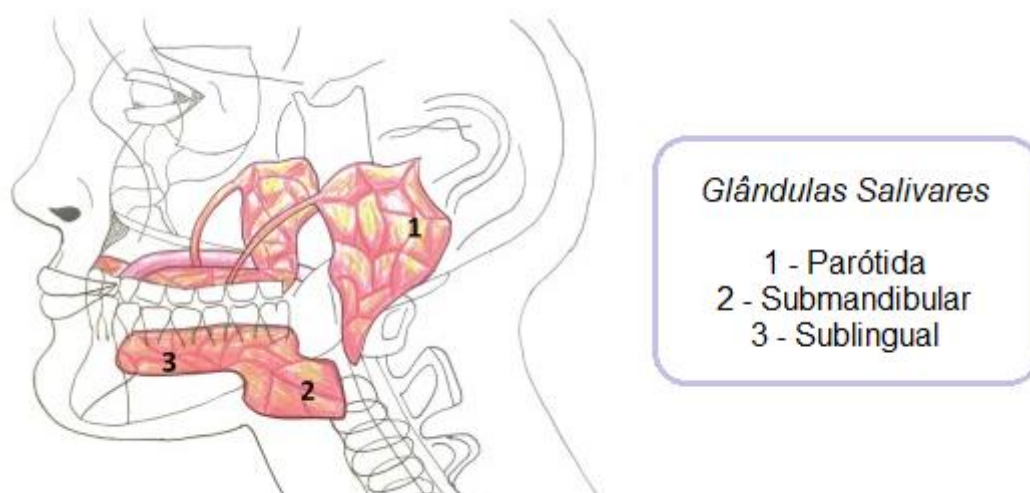
1.1 Saliva

A saliva é um fluido corporal complexo, uma fonte potencial de informação clínica e indispensável para a saúde bucal e o bem-estar geral dos seres humanos. É composta aproximadamente de 99% de água e 1% de proteínas, íons e enzimas que transformam a saliva em uma solução viscoelástica que realiza uma variedade de tarefas vitais (BELLAGAMBI *et al.*, 2020; ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

O termo saliva refere-se ao meio biológico exócrino claro, levemente ácido, hipotônico e muco seroso. É sintetizada e secretada pelas glândulas salivares, ilustradas na Figura 1, que são inervadas pelo sistema nervoso autônomo, e podem ser classificadas em glândulas salivares maiores, que compreendem a parótida, submandibular e sublingual, e as glândulas salivares menores (labial, bucal, lingual, palatina e retromolares) ou de acordo com a natureza histoquímica da saliva secretada, ou seja, serosa, mucosa ou mista. Para a quantidade total de saliva, a contribuição das glândulas submandibular, parótida e sublingual é de 65, 23 e 4%, respectivamente, enquanto os 8% restantes são produzidos pelas glândulas menores.

Assim, a saliva serosa é um fluido aquoso, enquanto a saliva mucosa é mais viscosa (BELLAGAMBI *et al.*, 2020; ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

Figura 1: Glândulas responsáveis pela produção da saliva.



Fonte: Adaptado de (ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019). Reproduzido com autorização, 2023.

As glândulas parótidas secretam saliva serosa que é rica em amilase, sulfomucinas e sialomucinas, através do ducto de Stensen na boca. As glândulas submandibulares produzem saliva mucosa que consiste principalmente em glicoproteínas, cistatinas sulfatadas e fatores de crescimento epidérmico e neural, e atinge a cavidade oral através dos ductos de Whartońs. As glândulas sublinguais produzem saliva mucosa que atinge a cavidade oral através dos ductos de Whartońs e Bartholińs e é composta por mucinas e altos níveis de lisozimas (ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

A saliva tem uma pequena capacidade tampão devido à presença de bicarbonato, fosfato e proteínas. A faixa normal de pH está entre 6,0 e 7,0 para saliva não estimulada, no entanto, a composição da saliva depende fortemente da taxa de fluxo e assim, os valores de pH podem se estender de 5,3 a 7,8. Ressalta-se que o fluxo salivar é uma medida bastante individualizada, portanto, os valores relatados na literatura variam. Na saliva de boca inteira não estimulada, a faixa média de fluxo é de 0,3 a 0,4 mL min⁻¹. Adultos nominalmente saudáveis normalmente produzem 500-

1500 mL/dia de saliva serosa e mucinosa, com um fluxo basal ao redor de 0,5 mL min⁻¹ (BELLAGAMBI *et al.*, 2020; ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

Além dos componentes salivares descritos, compostos do plasma permeiam as glândulas salivares altamente vascularizadas por vias transcelulares e paracelulares. O mecanismo de transferência mais comum do sangue para o fluido oral é a ultrafiltração onde os analitos podem transpor as glândulas salivares através das junções comunicantes entre as células das unidades secretoras, porém este mecanismo envolve apenas moléculas com peso molecular inferior a 1900 Da. Outro mecanismo é a transudação de compostos plasmáticos para a cavidade oral a partir do fluido crevicular ou diretamente da mucosa oral. Os analitos também são transferidos por difusão passiva através das membranas salivares de moléculas altamente lipofílicas, como hormônios esteroides e algumas drogas. Assim, alterações na composição do sangue também podem levar a modificações na composição da saliva tornando a sua análise uma alternativa ao sangue para aplicações clínicas, já que a análise salivar pode ser um bom indicador do estado hormonal, emocional, metabólico, nutricional e imunológico de um indivíduo (BELLAGAMBI *et al.*, 2020; GLEERUP *et al.*, 2021; ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

A vantagem de usar saliva para fins de diagnóstico é que pode ser facilmente coletada na atenção primária (recepção do paciente) de forma rápida, não invasiva e barata. Além disso, a aquisição é indolor para o paciente, o armazenamento e o envio da amostra são fáceis e a preparação da amostra é simples (GLEERUP *et al.*, 2021; ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

Nos últimos anos, especialmente devido ao progresso das técnicas analíticas, a análise da saliva ganhou popularidade na proteômica. As ciências “ômicas” salivares podem atualmente ser identificadas como “Salivômica”. Diagnósticos pautados no uso da saliva como amostra clínica já foram sugeridos para detecção de doenças endocrinológicas, autoimunes e metabólicas, doenças cardiovasculares, câncer, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e distúrbios do Sistema Nervoso Central (BELLAGAMBI *et al.*, 2020; GLEERUP *et al.*, 2021).

Testes com saliva são atualmente usados nas áreas de toxicologia, endocrinologia, doenças infecciosas e forense, com testes de diagnósticos estabelecidos disponíveis para detecção de álcool, infecções por HIV, análises

hormonais e testes de drogas. O diagnóstico baseado em saliva pode ser aplicado à medicina personalizada para avaliar as condições fisiológicas do paciente, rastrear a progressão de uma doença e monitorar a eficácia das terapias (BELLAGAMBI *et al.*, 2020; CARRO *et al.*, 2017).

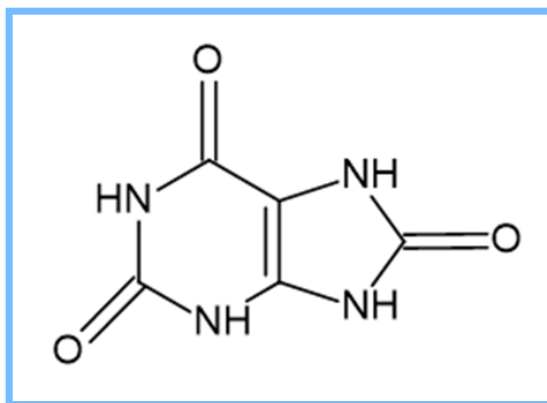
A saliva contribui para o bem-estar humano. A sua síntese e secreção são complexas e as suas propriedades permitem o desempenho de uma multiplicidade de funções importantes. A variedade de analitos moleculares e microbianos contidos neste fluido corporal podem servir como indicadores eficazes para distúrbios locais, sistêmicos e infecciosos, tornando a aplicação da saliva para fins de diagnóstico uma alternativa potencial e um fluido de diagnóstico universal (CARRO *et al.*, 2017; ROBLEGG; COUGHRAN; SIRJANI, 2019).

1.2 Ácido úrico

O ácido úrico (2,6,8-trihidroxipurina; AU) é um produto do metabolismo das purinas em macacos e humanos. É sintetizado endogenamente no fígado, intestinos, músculos e endotélio vascular. A sua estrutura química é mostrada na Figura 2, com uma massa molar de 168,1 g mol⁻¹ e pKa de 5,8. É uma substância cristalina branca e insípida, dificilmente solúvel em água ou etanol, e é fracamente alcalina e, portanto, pode formar sal com ácido forte. É uma das principais biomoléculas presentes em líquidos fisiológicos e desempenha um papel crucial nos processos metabólicos humanos (ELANGO VAN *et al.*, 2020; SAITO *et al.*, 2021; SAMOSON *et al.*, 2022; WANG; WEN; KONG, 2020).

O ácido úrico é um antioxidante natural devido a sua capacidade de se ligar ao ferro e inibir a oxidação do ascorbato, evitando assim o aumento da produção de radicais livres no sangue humano. Pode auxiliar na remoção do superóxido ao prevenir a degradação da superóxido dismutase, bloqueando assim a formação de peroxinitrito que pode causar danos à célula (LAKSHMI *et al.*, 2011).

Figura 2: Estrutura molecular do ácido úrico.



Fonte: Autora, 2023.

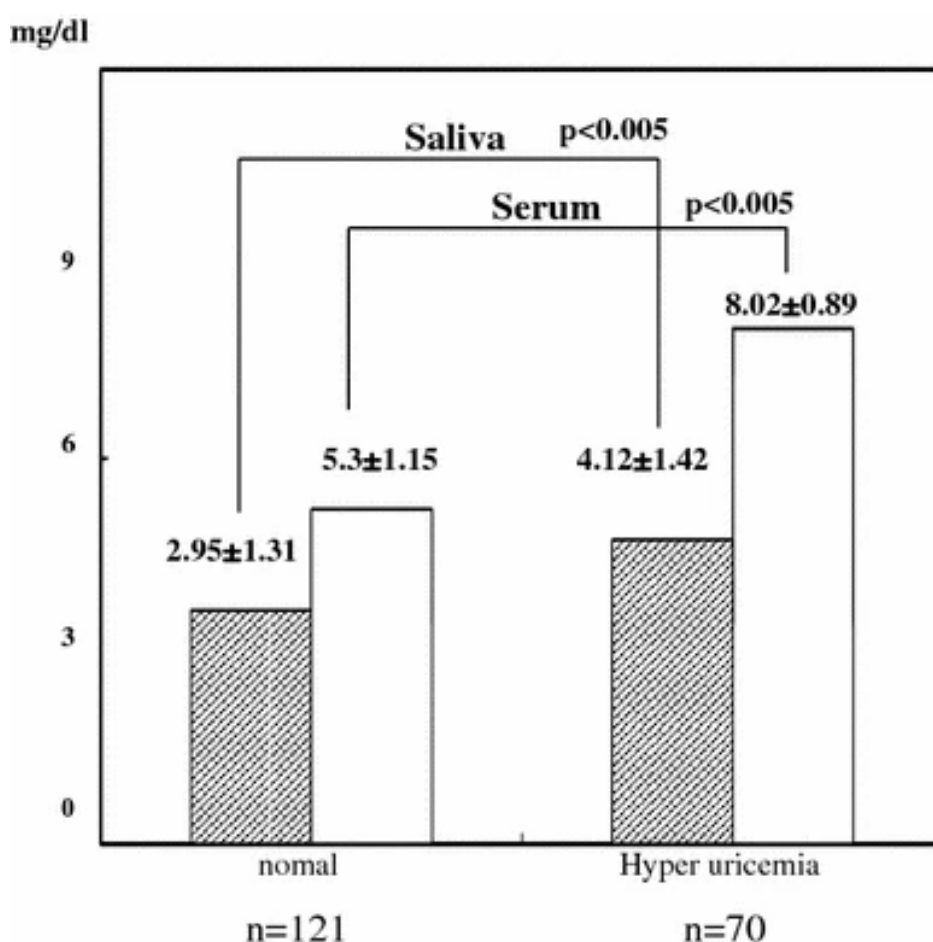
Uma purina é um heterociclo aromático que possui nove átomos em sua estrutura sendo composto de carbono, nitrogênio e oxigênio. Possuem um anel de pirimidina de seis membros e um anel de imidazol de cinco membros fundidos. Estão presentes em cerca de metade do material genético e em intermediários para transferência de energia como o trifosfato de adenosina (ATP) e o trifosfato de guanosina (GTP). A sua degradação metabólica é regulada pela xantina oxidoreductase que converte a hipoxantina em xantina e a xantina em ácido úrico (DEMIO, 2007; KUMARI, 2018; SAITO *et al.*, 2021).

Na maioria dos mamíferos, o AU pode ser oxidado a alantoína para gerar dióxido de carbono (CO_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da enzima urato oxidase (uricase), e eventualmente à amônia pela urease. Porém, os seres humanos não possuem a enzima urato oxidase e dependem de alguns mecanismos para regular os níveis séricos de ácido úrico tais como o aumento de sua excreção pelos transportadores de AU e o aumento da atividade da hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT) que recicla as purinas. O nível de AU é mantido em um estado relativamente estável de acordo com sua produção e excreção, atuando como um importante antioxidante no corpo humano (KIMURA; TSUKUI; KONO, 2021; SAITO *et al.*, 2021; WANG; WEN; KONG, 2020).

Estudos demonstraram que há uma correlação positiva entre o AU sérico e o AU salivar. Shibasaki e colaboradores relataram a significância clínica do AU na saliva e a associação com a concentração sérica de AU em pacientes com hiperuricemia, Figura 3. Zhao e colaboradores publicaram um estudo de caso no qual

o AU salivar foi monitorado em um paciente com gota, utilizando o alopurinol e benzobromarona como drogas terapêuticas. Uma diminuição no nível salivar de AU de $513 \pm 67 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($619 \mu\text{mol L}^{-1}$ no plasma) para menos de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($360 \mu\text{mol L}^{-1}$ no plasma) indicou a eficácia da terapia. Na literatura, a correlação AU salivar/AU sérico proposta é de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ para $360 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SHIBASAKI *et al.*, 2012; VERNEROVÁ *et al.*, 2021; ZHAO; HUANG, 2015).

Figura 3: Correlação entre a concentração de ácido úrico na saliva e no soro. Os intervalos de concentração de AU expressos para pacientes hiperuricêmicos $4,12 \pm 1,42 \text{ mg dL}^{-1}$ de AU equivale a $245 \pm 84 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $8,02 \pm 0,89 \text{ mg dL}^{-1}$ equivale a $477 \pm 51 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: (SHIBASAKI *et al.*, 2012): Reproduzido com autorização, 2023.

Os níveis normais de AU, para um ser humano saudável, na saliva pode variar em $199 \pm 27 \mu\text{mol L}^{-1}$, já no sangue e na urina variam de $0,14$ a $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ e de $1,40$ a $4,50 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente. O alto nível de AU pode levar à

precipitação de cristais de urato monossódico nas articulações, tecidos moles, rins e outros órgãos. Indivíduos podem ser diagnosticados com hiperuricemia patológica quando o nível de AU sérico atinge $408 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o AU salivar $340 \mu\text{mol L}^{-1}$ (KANNAN *et al.*, 2016; MAZZARA *et al.*, 2021; SAITO *et al.*, 2021; VERNEROVÁ *et al.*, 2021; WANG; WEN; KONG, 2020).

Muitos fatores podem alterar a concentração de AU como, por exemplo, a idade, o sexo, o tipo de alimentação e variantes genéticas hereditárias. A diferença hormonal entre os gêneros leva a uma melhor resposta à excreção do AU nas mulheres uma vez que, os níveis de ácido úrico aumentam na puberdade nos homens, enquanto as mulheres experimentam um aumento apenas na menopausa. A ingestão de álcool, principalmente cerveja, o consumo de carne vermelha e frutos do mar que são alimentos ricos em purinas e a ingestão de bebidas e alimentos que possuem uma alta concentração de açúcar (frutose) pode aumentar a excreção de ácido úrico (DEMIO, 2007; KIMURA; TSUKUI; KONO, 2021; MAZZARA *et al.*, 2021; SAITO *et al.*, 2021).

Variações nas concentrações de AU no corpo humano pode levar à doença da gota e aumentar o risco de doenças cardiovasculares, síndrome de Lesch-Nyhan, diabetes tipo 2, colesterol alto, pressão alta, doenças renais. Por outro lado, baixos níveis de AU podem estar relacionados à esclerose múltipla, doenças de Parkinson e Alzheimer (MAZZARA *et al.*, 2021).

A gota é um distúrbio metabólico com manifestações clínicas nos tecidos sinoviais e no rim, causando uma resposta inflamatória dolorosa definida como uma artrite aguda devido a cristalização do ácido úrico nos tecidos. Os cristais macroscópicos se formam lentamente durante os períodos assintomáticos, resultando em excesso de armazenamento tecidual, ou seja, ocorre como resultado cumulativo de hiperuricemia de longa duração (DEMIO, 2007; WANG; WEN; KONG, 2020).

As manifestações articulares da hiperuricemia são evitáveis, porém não tem valor realizar uma medição do nível de AU quando ocorre um ataque agudo e terapias para a prevenção da gota não devem ser instituídas durante um surto agudo de artrite, pois pioram a dor e outros sintomas inflamatórios associados ao aumento da descamação dos micro cristais (DEMIO, 2007).

Desta forma, manter o AU em um nível saudável é importante. Os pacientes devem fazer testagens frequentes para que as terapias preventivas possam ser

aplicadas para reduzir ou eliminar os ataques de gota, bem como para evitar lesões nas articulações e nos rins pois, aproximadamente, 20 a 60% dos pacientes com gota também apresentam disfunção renal leve ou moderada (DEMIO, 2007; LAKSHMI *et al.*, 2011).

Monitorar a concentração de AU em fluidos biológicos pode ser usado como um alerta não apenas porque o AU desempenha um papel vital na função do corpo humano, mas porque níveis mais altos ou mais baixos de AU podem desencadear ou revelar uma série de doenças. Isso requer o desenvolvimento de um sistema de monitoramento acessível e confiável, a fim de fornecer dados para o tratamento precoce de pacientes (LAKSHMI *et al.*, 2011; WANG; WEN; KONG, 2020).

1.2.1 Métodos de detecção do ácido úrico

Há vários métodos descritos na literatura e utilizados cotidianamente para a detecção de AU. O método fosfotungstico foi uma das primeiras formas de detectar AU, em meados do século XX. O método se baseia no princípio de que o ácido fosfotungstico pode produzir um composto azulado sob a ação do AU, permitindo desenvolvimento de métodos colorimétricos, onde o AU provoca a redução do ácido fosfotungstico para formar o azul de tungstênio que pode ser detectado por espectrofotometria. Porém este método apresenta algumas desvantagens como baixa reprodutibilidade, baixa operacionalidade e as soluções de cianeto utilizadas são tóxicas e instáveis (PILEGGI; DI GIORGIO; WYBENGA, 1972; WANG; WEN; KONG, 2020).

Devido às desvantagens, o método fosfotungstico se tornou incapaz de atender às necessidades da detecção moderna de AU, que exige rapidez, eficiência, precisão e baixa geração de resíduos tóxicos e/ou perigosos. Atualmente, os métodos de detecção de AU são geralmente divididos em quimioluminescência, fluorescência, espectrofotometria, cromatografia líquida de alta performance (HPLC)/espectrometria de massas (MS), cromatografia de íons, HPLC/espectrometria de massas por diluição de isótopos (IDMS), eletroforese capilar com detector amperométrico ou com detecção de quimioluminescência, colorimetria e eletroquímica. Alguns métodos possuem estratégias para detecção enzimática, enquanto outros seguem uma rota não enzimática (SAMOSON *et al.*, 2022; WANG; WEN; KONG, 2020).

A detecção seletiva de forma direta de AU pode ser difícil, então detectar os subprodutos da sua reação de oxidação se tornou uma opção mais simples e operacional. Com o avanço da tecnologia, o método atualmente adotado em laboratórios clínicos para análise de AU envolve a utilização de uma abordagem enzimática, que utiliza a oxidação específica do ácido úrico pelo oxigênio para produzir peróxido de hidrogênio, alantoína e dióxido de carbono, na presença de uricase. Os métodos enzimáticos se tornaram a estratégia mais prática na detecção de AU por meio de medidas UV-Vis ou fluorescência (LAKSHMI *et al.*, 2011; WANG; WEN; KONG, 2020).

Outros métodos para detecção de AU incluem cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de absorção ultravioleta (UV), eletroquímica (EC) e espectrometria de massas em tandem (MS/MS). O método de detecção mais amplamente utilizado é o HPLC-UV devido ao seu desempenho e baixo custo. O método HPLC-MS tem alta sensibilidade para detecção de AU e possui a melhor faixa linear e o melhor limite de detecção entre os métodos de HPLC, porém há poucos relatos sobre seu uso na detecção de AU, o que pode ser devido ao alto custo do equipamento (ERDEN; KILIÇ, 2013; WANG; WEN; KONG, 2020).

Embora a maior parte desses métodos sejam precisos e sensíveis, os custos operacionais podem ser altos e as técnicas utilizadas são inadequadas para análises descentralizadas, isto é, nos locais de necessidade. Portanto, é essencial desenvolver métodos analíticos portáteis, sensíveis, simples e rápidos para detecção de AU em análises de rotina (GHOREISHI; BEHPOUR; SAEIDINEJAD, 2012; GUAN *et al.*, 2021; SAMOSON *et al.*, 2022).

Técnicas eletroquímicas têm sido aplicadas para a determinação de muitos analitos em uma grande variedade de matrizes. Nos últimos anos, os sensores eletroquímicos tornaram-se cada vez mais promissores no campo de análise, pois as técnicas de transdução eletroquímica oferecem vantagens quando comparadas aos métodos espectroscópicos tais como resposta rápida, miniaturização do dispositivo, portabilidade, sensibilidade, baixo custo e consumo mínimo de energia (LAKSHMI *et al.*, 2011; LIU; ZHAO, 2020; MOHAN *et al.*, 2020).

Em um método eletroquímico enzimático, a uricase é imobilizada no eletrodo por materiais orgânicos ou inorgânicos, o que pode melhorar a tolerância da enzima à temperatura e ao pH. Este método apresenta alta sensibilidade e boa

seletividade, entretanto, carecem em estabilidade devido a possível inativação de enzimas naturais com a variação de temperatura, força iônica e pH do ambiente que ficam armazenadas ou durante as análises, o que torna a operação destes sensores relativamente complicada e com um elevado custo como método de detecção clínica (WANG; WEN; KONG, 2020).

Em um sistema catalítico homogêneo, a eficiência enzimática é alta, porém a enzima apresenta limitações já descritas anteriormente. Isto posto, há grande interesse em desenvolver métodos simples e rápidos para determinação de ácido úrico, como análises de rotina, e usar a propriedade redox do AU para detecção direta pode ser uma alternativa, pois nessa estratégia não há participação da uricase, o que reduz o custo e melhora a praticabilidade (WANG; WEN; KONG, 2020).

Os sensores eletroquímicos não enzimáticos são relativamente sensíveis, simples, baratos e rápidos em comparação com os sensores eletroquímicos enzimáticos. Como o AU pode ser facilmente oxidado em eletrodos comuns em soluções aquosas, a detecção diretamente por voltametria é mais conveniente e rápida. Em uma estratégia não enzimática, a detecção eletroquímica direta de AU pode sofrer interferência de outras substâncias e assim, torna-se imprescindível a modificação de eletrodos com materiais que proporcionem melhora de seletividade (LAKSHMI *et al.*, 2011; WANG; WEN; KONG, 2020).

Sensores não enzimáticos para a detecção de AU, recentemente desenvolvidos, têm empregado várias nanopartículas de metais (MNPs) como materiais catalíticos, onde o AU pode ser detectado através de sua oxidação em um eletrodo modificado com um material catalítico mais estável quando comparado ao uso de enzimas, o que pode contribuir com a sensibilidade dos métodos (SAMOSON *et al.*, 2022).

1.3 Sensores

Um sensor é um dispositivo que responde a um estímulo físico como calor, luz, som, pressão, magnetismo ou movimento, e transmite um pulso elétrico como meio de medir a mudança em qualquer propriedade intrínseca do material constituinte. A origem da palavra sensor vem do latim *sentire*, que significa sentir. Os sensores têm a propriedade de “sentir” seus arredores para determinar as relações de dependência.

O sinal de um sensor é tipicamente de natureza eletrônica, sendo uma alteração de corrente, tensão ou impedância/condutância causada pela alteração da composição ou quantidade do parâmetro analisado (DA RÓZ *et al.*, 2017; STETTER; PENROSE; YAO, 2003).

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define um sensor químico como: “um dispositivo que transforma informações químicas, desde a concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal analiticamente útil” (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991). Analisando a estrutura de um sensor químico típico, ele é composto por duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor físico-químico. O receptor permite que a concentração do analito seja transformada em uma quantidade de energia que pode ser detectada no transdutor. Se este receptor for um componente biológico, então o dispositivo é chamado de biossensor. O principal papel do receptor é efetuar o reconhecimento, de forma seletiva, do analito desejado na presença de espécies químicas potencialmente interferentes. Os receptores, portanto, ajudam a evitar resultados falsos positivos. Já o transdutor tem como função converter a energia que transporta a informação química sobre a amostra, devido a interação receptor-analito, em um valor mensurável (BANDODKAR; WANG, 2014; HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991).

Os sensores são dispositivos práticos e têm sido amplamente utilizados em aplicações como monitoramento ambiental, de saúde, segurança, higiene, industrial, e diversos outros campos. O entusiasmo frente ao mundo dos sensores vem de sua capacidade de fornecer respostas rápidas sobre o mundo ao nosso redor, sendo beneficiados com o avanço da ciência e tecnologia, principalmente em termos de biomateriais e nanomateriais (DA RÓZ *et al.*, 2017; STETTER; PENROSE; YAO, 2003).

Sensores eletroquímicos são uma classe de sensores químicos em que um eletrodo é usado como elemento transdutor na presença de um analito. Em geral, as respostas eletroquímicas são baseadas principalmente nas medidas de potencial, resistência ou corrente elétrica. Os sensores eletroquímicos podem ser facilmente adaptados para detectar uma ampla gama de analitos, mantendo-se baratos. Além disso, esses sensores podem ser integrados em dispositivos robustos, portáteis ou

miniaturizados, permitindo a adaptação para aplicações específicas (DA RÓZ *et al.*, 2017; KIMMEL *et al.*, 2012).

Cronologicamente, o uso de sensores eletroquímicos começou na década de 1950 com o monitoramento de oxigênio industrial devido às exigências das leis trabalhistas da época. Leland C. Clark propôs o conceito de um sensor de oxigênio usando dois eletrodos em uma célula com uma membrana permeável ao oxigênio separando os eletrodos e a solução eletrolítica. O oxigênio se difundia através da membrana e era reduzido no eletrodo indicador, o que gerava uma corrente proporcional à concentração de oxigênio na amostra. Apesar de sua popularidade comercial, o sinal de corrente elétrica obtido nos sensores de oxigênio Clark era instável, e os analisadores de oxigênio requeriam pré-calibração frequente, dificultando seu uso (DA RÓZ *et al.*, 2017; NEI, 2007).

Os sensores eletroquímicos baseiam-se principalmente em medições potenciométricas, amperométricas, voltamétricas e em impedância ou admitância. Os sensores potenciométricos têm se concentrado majoritariamente na análise de íons pequenos e os dispositivos amperométricos têm aplicações dedicadas a moléculas orgânicas clinicamente relevantes, como a glicose, lactato, ácido úrico e outros (FERREIRA *et al.*, 2019; STETTER; PENROSE; YAO, 2003; WANG *et al.*, 2008).

Atualmente, os paradigmas que envolvem pesquisa e desenvolvimento de sensores eletroquímicos permitem o estudo de novos materiais, aplicações de amostras de diferentes naturezas, novos métodos de fabricação e estratégias para aumentar a seletividade e os limites de detecção (BAKKER; TELTING-DIAZ, 2002; DA RÓZ *et al.*, 2017; STETTER; PENROSE; YAO, 2003).

1.3.1 Grafeno e os sensores gravados a laser

A escolha do material do substrato é uma etapa importante e essencial para fabricar os dispositivos eletrônicos e com propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas as aplicações. As versões comerciais dos sistemas de eletrodos são comumente baseadas em carbono, um material facilmente disponível e de baixo custo, com boas propriedades elétricas. Substratos poliméricos e comerciais como poliuretano, polidimetilsiloxano (PDMS), polieterimida (PEI), poliimida (PI) são

materiais à base de carbono, porém, devido à baixa condutividade elétrica desses materiais, devem ser combinados com uma matriz condutora como, por exemplo, o grafeno, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas ou óxido metálico para formar um compósito condutor, de forma a ser utilizado como materiais de eletrodos. As propriedades eletroquímicas das nanoestruturas de carbono, como cinética de transferência de elétrons mais rápida, baixa corrente residual e ampla janela de potencial, tornam estas nanoestruturas candidatas promissoras para aplicações em (bio)sensores eletroquímicos (CARDOSO *et al.*, 2019; GUAN *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2021).

A poliimida é, atualmente, um dos materiais poliméricos mais utilizados para aplicações que necessitam de um substrato que possui alta resistência mecânica e alta resistência térmica. No entanto, este material tem a desvantagem de apresentar uma fraca ligação ao laminado e assim favorecer a delaminação (KYRIAZIS *et al.*, 2021; YI *et al.*, 2020).

A polieterimida também conhecida como poli(bisfenol A anidrido-co-1,3-fenilenodiamina) é polimerizada pela oxidação de aminas em amida. Classificada como uma classe especial de poliimida que contém imida cíclica em sua estrutura dorsal. É um polímero termoplástico amorfo de alto desempenho, apresenta boa estabilidade química e térmica e boa resistência química à maioria dos solventes, possui uma temperatura de transição vítrea de 217 °C e uma alta resistência à tração de 101 Mpa (DANESHKHAH *et al.*, 2020; TOUSI *et al.*, 2019; YILDIZ *et al.*, 2022).

O polímero PEI tem uma vantagem importante em relação a PI em termos de módulo de elasticidade superior e semelhante à maioria dos epóxis e, portanto, tem forte adesão e não promove a delaminação. Essas propriedades, combinadas com sua baixa inflamabilidade e densidade, justificam o PEI como um excelente material para fabricação de sensores (KYRIAZIS *et al.*, 2021; YILDIZ *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, eletrodos modificados com material carbonáceo têm sido amplamente pesquisados no campo da química eletroanalítica. Materiais à base de carbono têm sido o foco de diversos estudos devido às suas propriedades, estrutura e abundância juntamente com o fato de serem ambientalmente mais adequados em termos de descarte. Entre eles, o grafeno ganhou enorme atração pela comunidade científica devido às suas propriedades únicas (VIEIRA SEGUNDO;

VILAR, 2016; XU *et al.*, 2018). O grafeno foi descoberto em 2004 por pesquisadores da Universidade de Manchester, trabalho que lhes rendeu o Nobel de Física em 2010. É um material que consiste em uma folha plana de átomos de carbono densamente empacotados em uma estrutura de anéis de benzeno, formando uma camada monoatômica com átomos hibridizados na forma sp^2 . É amplamente usado para descrever propriedades de muitos materiais à base de carbono, incluindo grafite, fulerenos, nanotubos, etc. (NOVOSELOV *et al.*, 2004; VIEIRA SEGUNDO; VILAR, 2016).

Sua estrutura eletrônica resulta em propriedades superiores tais como rápida mobilidade eletrônica, comportamento de automontagem, excelentes condutividades elétrica e térmica, boa resistência mecânica e flexibilidade, impermeabilidade a gases, alta transparência óptica e elevada área superficial específica, as quais proporcionam um bom desempenho eletroquímico em sensoriamento bioquímico (LAHCEN *et al.*, 2020; VIEIRA SEGUNDO; VILAR, 2016; XU *et al.*, 2018).

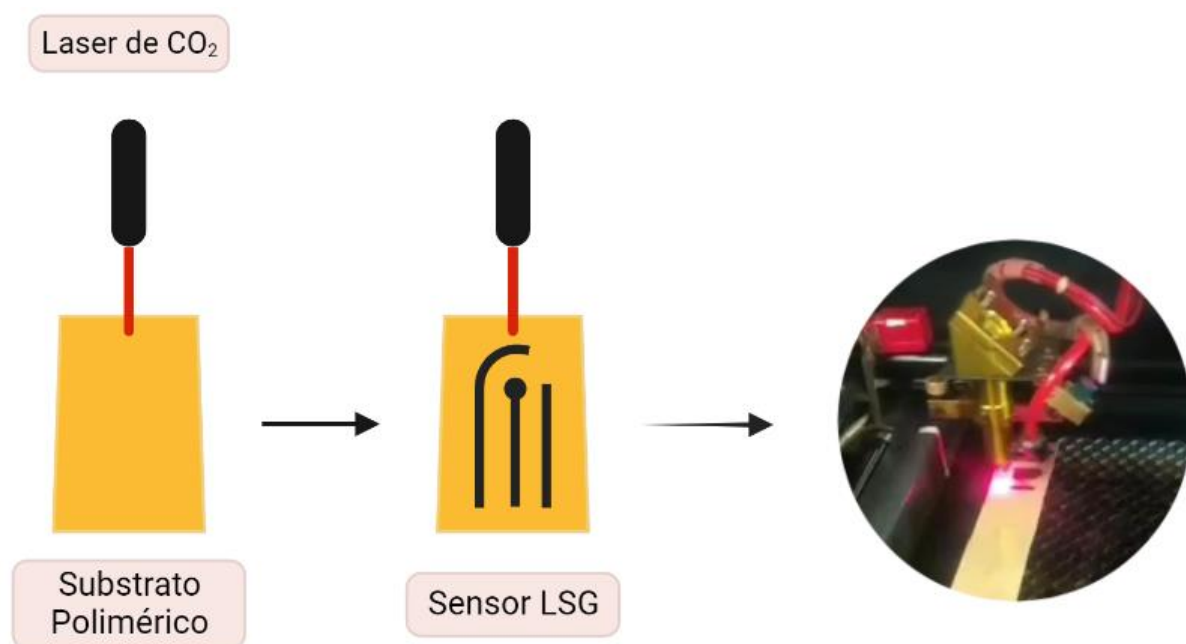
Diversas técnicas foram desenvolvidas para a produção de grafeno, dentre elas a decomposição térmica, esfoliação mecânica e deposição química em fase vapor (CVD). Entretanto, os métodos químicos úmidos para a síntese de grafeno são lentos e exigem uma série de etapas de oxidação e redução, lavagens extensas, centrifugação e um menor controle sobre o número de folhas e quantidade de funcionalidades de oxigênio. Além disso, soluções aquosas de grafeno tendem a se acumular na superfície para produzir grafite. Assim, a composição geral do grafeno depende das condições experimentais selecionadas e pode levar a grafeno multicamadas (CARDOSO *et al.*, 2019; LAHCEN *et al.*, 2020).

A gravação a laser de diferentes substratos surgiu como um novo método para produção de eletrodos a base de grafeno 3D e tem vantagens sobre o processo de CVD como síntese sem máscara, morfologia porosa, grande área superficial, custo-benefício e alta atividade eletrocatalítica (LAHCEN *et al.*, 2020; RAUF *et al.*, 2021).

A técnica de gravação a laser consiste na carbonização superficial localizada de um material polimérico induzindo à formação de derivados de grafeno com estrutura 3D porosa, exibindo alta condutividade elétrica e comumente

referenciados como LSG (*laser-scribed graphene*), Figura 4. Este processo permite padronizar filmes de grafeno porosos com uma área superficial de $\sim 340 \text{ m}^2/\text{g}$ usando um laser infravermelho de CO_2 ou ultravioleta, no qual não é necessário o uso de processos de alta temperatura, solventes ou tratamentos subsequentes. Uma vez que, em uma etapa e em condições ambiente, a radiação laser é capaz de quebrar ligações e reorganizar estruturas químicas, convertendo foto-termicamente átomos de carbono sp^3 em átomos de carbono sp^2 , ou seja, gerando um material condutor. A energia da irradiação do laser resulta em vibrações da rede, resultando em altas temperaturas localizadas, quebrando as ligações C–O, C=O e N–C. Por fim, os compostos aromáticos se reorganizam e formam as estruturas gráficas (CARDOSO *et al.*, 2019; SAMOSON *et al.*, 2022).

Figura 4: Laser incidindo em polímero e induzindo a grafitização e formação dos eletrodos.



Fonte: Autora, 2023.

O LSG pode ser facilmente padronizado na superfície do substrato na forma de um sistema de três eletrodos com um *design* controlado por computador e sem uso de máscara. O grafeno resultante possui uma camada mesoporosa

tridimensional e excelente condutividade elétrica que contribui significativamente para o desenvolvimento de sistemas eletrônicos biodegradáveis. Uma grande vantagem do método a laser é que múltiplos eletrodos podem ser produzidos em um único substrato com fabricação rápida e em larga escala. Essas vantagens tornam o LSG um material promissor para o desenvolvimento de eletrodos flexíveis para monitoramento rápido no local de necessidade. O método de fabricação a laser é um método de síntese verde em comparação com os métodos tradicionais, pois não necessita de condições controladas ou solventes (LAHCEN *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2021; RAUF *et al.*, 2021; SAMOSON *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2018).

A produção de eletrodos LSG é essencialmente fundamentada em dois aspectos principais: a seleção do material empregado e a abordagem adotada no processo de fabricação. O aspecto único da técnica LSG é a conversão fototérmica ou transformação de materiais de carbono não condutores em estruturas gráficas condutoras. A potência do laser é determinada pelo tipo de laser, velocidade de gravação, distância focal e outros parâmetros instrumentais que podem controlar os perfis de temperatura localizados. O aumento instantâneo da temperatura na área de incidência do laser influencia a estrutura molecular e atômica do carbono, pois com a indução do processo de carbonização ocorre a acomodação térmica do material carbonáceo o que pode levar à formação de estruturas amorfas ou cristalinas (KURRA *et al.*, 2019; LAHCEN *et al.*, 2020).

Com base nas condições do laser e na natureza química dos precursores de carbono, é possível controlar a microestrutura, funcionalidade, densidade de defeitos e, assim, as propriedades associadas dos eletrodos LSG. Portanto, ao efetuar variações nos parâmetros do sistema do laser (velocidade, potência, distância focal do laser e resolução da gravação), é possível controlar a morfologia do LSG produzido de uma estrutura gráfica porosa “plana” a nanofibras de carbono auto alinhadas longas (DALLINGER *et al.*, 2020; KURRA *et al.*, 2019).

A natureza das unidades de repetição química presentes no substrato desempenha um papel fundamental na fabricação de eletrodos LSG. Por exemplo, uma breve revisão na literatura, mostrou que os substratos PI e PEI são convertidos em grafeno com sucesso, enquanto polímeros com grupos não aromáticos sofrem degradação quase completa sem qualquer formação de grafeno (LAHCEN *et al.*, 2020).

A modificação química da superfície do eletrodo é uma estratégia para melhorar o desempenho analítico de eletrodos convencionais para diversas aplicações, especialmente sensores (GHOREISHI; BEHPOUR; SAEIDINEJAD, 2012). Podemos definir um eletrodo modificado como qualquer eletrodo cuja resposta (eletro)química muda significativamente após a modificação de sua superfície. A aplicação de eletrodos modificados em eletroanálise oferece muitas vantagens como diminuir os sobrepotenciais redox, aumentar a taxa de transferência eletrônica, aumentar a sensibilidade de detecção e melhorar a seletividade (LAKSHMI *et al.*, 2011).

O grafeno é um material base promissor para sensores, pois pode atuar como um bom transportador de elétrons e meio condutor para combinar com diferentes nanopartículas metálicas, que aceleram o transporte de elétrons e promovem melhora da cinética de transferência de carga na superfície do eletrodo (LU *et al.*, 2021).

Nanopartículas metálicas são comumente utilizadas para o desenvolvimento de eletrodos modificados, pois podem apresentar boa biocompatibilidade, grande área superficial e excelente propriedade catalítica, pois podem acelerar a transferência de elétrons e reduzir a sobretensão do processo eletroquímico (GHOREISHI; BEHPOUR; SAEIDINEJAD, 2012; LEE; YU; KIM, 2017; MAZZARA *et al.*, 2021).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm mostrado um excelente desempenho em aplicações de sensoriamento, eletrônica e biomédica devido às suas propriedades ópticas e eletrônicas especiais. Devido ao seu pequeno tamanho dimensional, boa condutividade e excelente atividade catalítica, as nanopartículas de ouro têm aplicações potenciais na preparação de sensores e biossensores eletroquímicos. Além disso, as AuNPs, quando integradas aos nanomateriais à base de carbono, aumentam o desempenho eletrocatalítico e a sensibilidade dos sensores (ELANGO VAN *et al.*, 2020; GHOREISHI; BEHPOUR; SAEIDINEJAD, 2012; GUAN *et al.*, 2021; SAMOSON *et al.*, 2022).

Examinando a literatura, alguns dos tipos de sensores eletroquímicos que foram explorados para detecção do ácido úrico incluem principalmente o uso de eletrodos convencionais, como o de carbono vítreo modificado (GCE, sigla para *glassy*

carbon electrode), eletrodo de platina e ouro que são modificados com nanomateriais, enzimas ou polímeros. Há relatos de uso de eletrodo de pasta de carbono modificado com nanomateriais ou biocomponentes; uso de eletrodos impressos que também podem ser modificados com diversos materiais para detecção seletiva de AU; e biossensores enzimáticos que utilizam a uricase para catalisar a oxidação do AU e detectar assim o peróxido de hidrogênio produzido (SUN *et al.*, 2023; WANG; WEN; KONG, 2020).

Neste trabalho, focamos no uso do PEI como substrato alternativo e conveniente para a fabricação de sensores eletroquímicos via carbonização superficial induzida por radiação laser de CO₂, avaliamos os parâmetros de fabricação para otimizar o sensor LSG, bem como modificamos a superfície eletródica com AuNPs visando a detecção não enzimática e de baixo custo de AU para análises de rotina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um sensor eletroquímico miniaturizado de análise não enzimática para detecção e avaliação do nível de ácido úrico presente na saliva.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um sensor eletroquímico miniaturizado por meio do método de gravação a laser de CO₂ utilizando PEI como substrato.
- b) Modificar a superfície do sensor com nanopartículas de ouro.
- c) Otimizar um método não enzimático de detecção do AU.
- d) Aplicar os sensores para detecção e quantificação do ácido úrico em amostras de saliva sintética.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e materiais

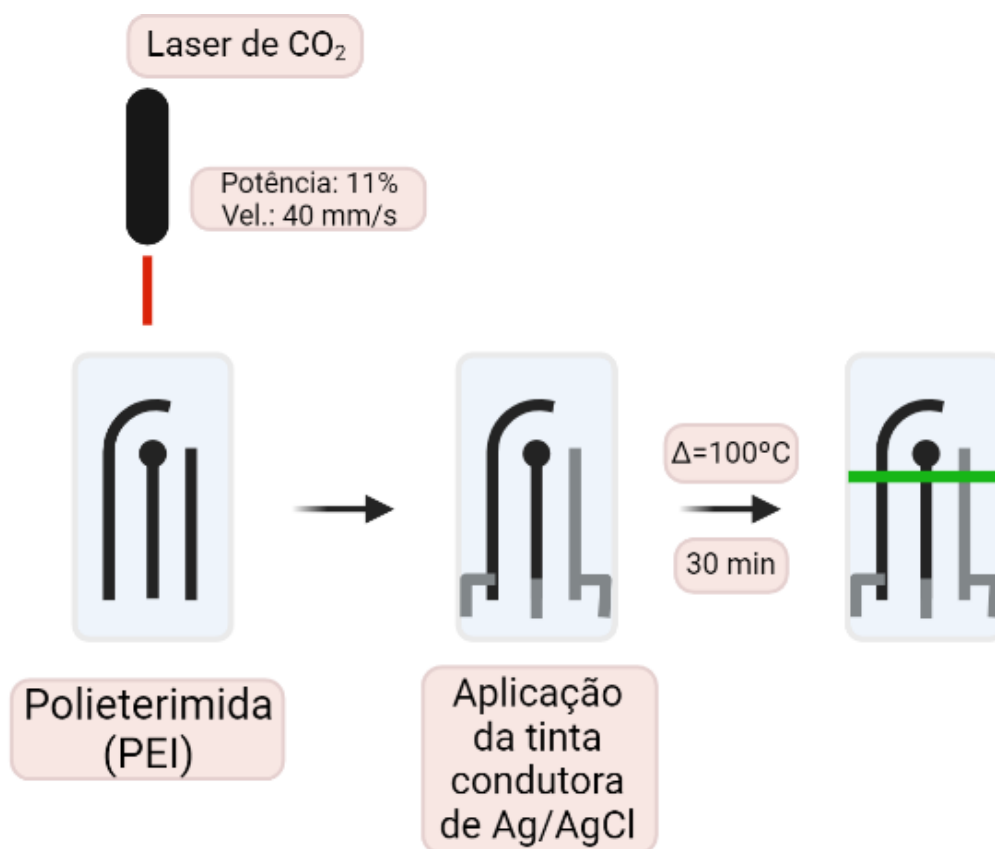
Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Hidróxido de sódio, fosfato de sódio monohidratado, fosfato de potássio monobásico, ácido úrico, ácido sulfúrico, ácido ascórbico, ácido láctico, glicose, creatinina, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, ureia, ácido tetracloroáurico e citrato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As tintas condutoras de Ag/AgCl foram obtidas da Creative Materials (MA, EUA). Folhas de polietereimida (PEI) foram adquiridas da MagiDeal (Hong Kong, China).

3.2 Fabricação dos sensores LSG

Os sensores eletroquímicos LSG foram gravados sobre placas de substrato PEI com o auxílio de uma impressora de corte com laser de CO₂ equipada com tubo laser de 50 W (Multivisi – Visutec Router VS4040C, Brasil). Para a fabricação do *design* dos eletrodos, foi utilizado o *software* Corel Draw 2018, a potência do laser foi escolhida em 11% e a velocidade em 40 mm s⁻¹. Estes parâmetros foram escolhidos baseados em ensaios de otimização prévios, buscando menores valores de resistência elétrica das trilhas produzidas.

Em seguida, foi realizada a deposição da tinta condutora de Ag/AgCl para a fabricação do pseudo-referência e dos contatos elétricos utilizando a técnica de serigrafia com auxílio de pincel. Após a deposição, foi realizada a cura da tinta por meio de tratamento térmico a 100 °C por um período de 30 min em estufa de secagem FANEM® SP-Brasil modelo 315 SE. Por fim, aplicou-se uma fita isolante Norbond® Saint Gobain para delimitar a área dos eletrodos e a cela eletroquímica. A Figura 5 traz uma representação esquemática do processo de fabricação dos sensores.

Figura 5: Esquema de fabricação dos sensores LSG, destacando os principais parâmetros utilizados.



Fonte: Autora, 2023.

3.3 Caracterizações do material de eletrodo

A análise morfológica do sensor foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (modelo TM3000) com voltagens aplicadas de 10 kV e magnificações de 500 e 1000 vezes. Os espectros Raman foram adquiridos com um espectrômetro Raman Horiba T64000 com laser de 532 nm, potência de 30 mW, objetiva de 100x e 15 s de exposição e acúmulo de 5 varreduras.

3.4 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando o PalmSens3 um potenciostato/galvanostato/analizador de impedância da PalmSens Compact

Electrochemical Interfaces (Randhoeve, Houten, Holanda) e monitoradas usando o software PSTrace 5.9.

Para análise exploratória, foi utilizada a técnica de Voltametria Cíclica (CV, sigla do inglês para *cyclic voltammetry*) com uma varredura na faixa de $-0,2$ a $+1,0$ V e com uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Foram realizadas medidas sem tratamento superficial do eletrodo LSG, medidas com eletrodo após um tratamento anódico (TA) em meio de NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando o potencial de $+1,8$ V por 200 s e medidas com eletrodo tratado catodicamente (TC) em meio de H_2SO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ aplicando o potencial de $-1,5$ V por 200 s. Todos os pré-tratamentos superficiais foram realizados por meio da técnica cronoamperométrica utilizando um volume de solução de $100 \text{ }\mu\text{L}$. Para as medidas de CV, adicionou-se $100 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), mediu-se a resposta do branco analítico na faixa de potenciais de $-0,2$ a $+1,0$ V por CV. Na sequência, adicionou-se ácido úrico na concentração final de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ e efetuou-se nova análise para comparação do desempenho dos eletrodos produzidos.

Após a otimização do pré-tratamento eletroquímico e escolha do método anódico, foi realizada a otimização do volume de suspensão de AuNPs utilizado para modificar a superfície do eletrodo de trabalho. Avaliaram-se as quantidades de $1,0 \text{ }\mu\text{L}$, $3,0 \text{ }\mu\text{L}$, $5,0 \text{ }\mu\text{L}$, $8,0 \text{ }\mu\text{L}$ e $10 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão de AuNPs. Após adicionar as AuNPs, aguardou-se a secagem por cerca de 30 min. Realizou-se a medida do branco e do analito para cada condição na faixa de potencial de $-0,4$ a $+0,5$ V.

Para o estudo do transporte de massa envolvido na reação redox no sensor desenvolvido, foram realizadas medidas de CV na faixa de velocidade de 10 a 200 mV s^{-1} utilizando tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) como eletrólito suporte e a concentração de AU $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para estudar o efeito do pH na resposta voltamétrica do AU, realizou-se medidas de CV na faixa de pH de $5,0$ a $9,0$ utilizando soluções de fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com os valores de pH ajustados ao intervalo desejado.

Visando aplicações analíticas, utilizou-se a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) e as condições ótimas do sensor, isto é, tratamento prévio com NaOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, adição de $5,0 \text{ }\mu\text{L}$ de AuNPs e pH do meio igual a $7,0$. Realizou-

se a otimização dos parâmetros da técnica com a alteração do *step* em 3 mV, 5 mV, 7 mV, 9 mV e 12 mV, o tempo de pulso utilizado foi de 0,05 s. Após a escolha da melhor condição para o *step* (5 mV), seguiu-se para otimização da amplitude dos pulsos que variou em 30 mV, 50 mV, 70 mV, 90 mV e 120 mV, escolhendo-se o valor de 50 mV como ótimo. Todos os ensaios foram realizados em meio de tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 0,10 mmol L⁻¹ de ácido úrico.

A construção da curva analítica e a detecção de AU nas amostras foram realizadas por DPV efetuando varredura de potenciais na faixa de -0,4 a +0,5 V com velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹, com *step* de 5 mV e amplitude de pulso de 50 mV. As medidas foram realizadas em triplicata em sensores diferentes (*n* = 3).

3.5 Síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs)

Para a síntese de AuNPs, preparou-se 100 mL de uma solução de 2,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de HAuCl₄ e 5,0 mL de uma solução de 1,0% (m/m) de citrato de sódio. Aqueceu-se a solução de HAuCl₄ a 80 °C em banho maria sob agitação. Esse processo levou cerca de 30 min. Na sequência, adicionou-se rapidamente os 5,0 mL da solução 1,0% de citrato de sódio e manteve-se a solução sob aquecimento e agitação, tampada com um vidro de relógio, por 15 min. Observou-se a mudança da coloração da solução de amarelada para vinho. Por fim, o aquecimento do sistema foi suspenso e a agitação mantida por mais 15 min em placa de agitação. A solução foi resfriada à temperatura ambiente. Este procedimento foi baseado no estudo de Melo Jr. e colaboradores (MELO JR. *et al.*, 2012).

A otimização quanto ao tempo de secagem da suspensão de nanopartículas sobre o eletrodo de trabalho foi realizada com os tempos de 1h, 2h, 3h e 6h utilizando o volume de 5 µL e deixando secar em um ambiente protegido de corrente de ar para evitar o espalhamento da gota.

Para avaliação do tamanho das nanopartículas aplicou-se a técnica de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS), equipamento Zetasizer Nano modelo ZS – Zen 3600 da Malvern Panalytical (Malvern, Worcestershire, Inglaterra). Utilizou-se água ultrapura como meio dispersante para a suspensão a 25 °C.

3.6 Estudo de seletividade

Para análise de potenciais interferentes do método, foram preparadas soluções de ácido láctico, glicose, creatinina e ácido ascórbico. Para avaliação da seletividade, foram realizados ensaios na proporção de 1:1 entre ácido úrico:interferente ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Estes testes foram realizados nas condições otimizadas.

Para avaliar a resposta somente do ácido ascórbico, visto que é o principal interferente voltamétrico para a determinação de ácido úrico pela região de potencial em que oxidam, utilizou-se as condições otimizadas do método proposto em meio de tampão fosfato pH 7,0 com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e com $920 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA.

3.7 Avaliação da reprodutibilidade dos sensores

Para análise de reprodutibilidade foram utilizados oito sensores LSG fabricados sob as condições ótimas do método. Analisou-se uma solução de ácido úrico na concentração final de $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e calculou-se o desvio padrão relativo da intensidade dos picos de corrente utilizando o método desenvolvido por DPV.

3.8 Saliva sintética

Saliva sintética foi preparada a partir do procedimento reportado por Bao e colaboradores (BAO; KAUR; KIM, 2019). Resumidamente, constituiu-se da mistura de 13,2 mg de NaCl, 96,4 mg de KCl, 17,2 mg de CaCl_2 , 65,0 mg de KH_2PO_4 , 20,4 mg de uréia e 17,4 mg de ácido láctico em 100 mL de água deionizada. Para a avaliação da performance do método proposto, foi realizado um estudo de adição e recuperação em que foram adicionadas concentrações de 200 e $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU para mimetizar os níveis usuais para indivíduos saudáveis e hiperuricêmicos, respectivamente. Para análises das amostras fortificadas foi realizada a diluição com um fator de 20 vezes em tampão fosfato pH 7,0, para compreender o intervalo de análise da curva de calibração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

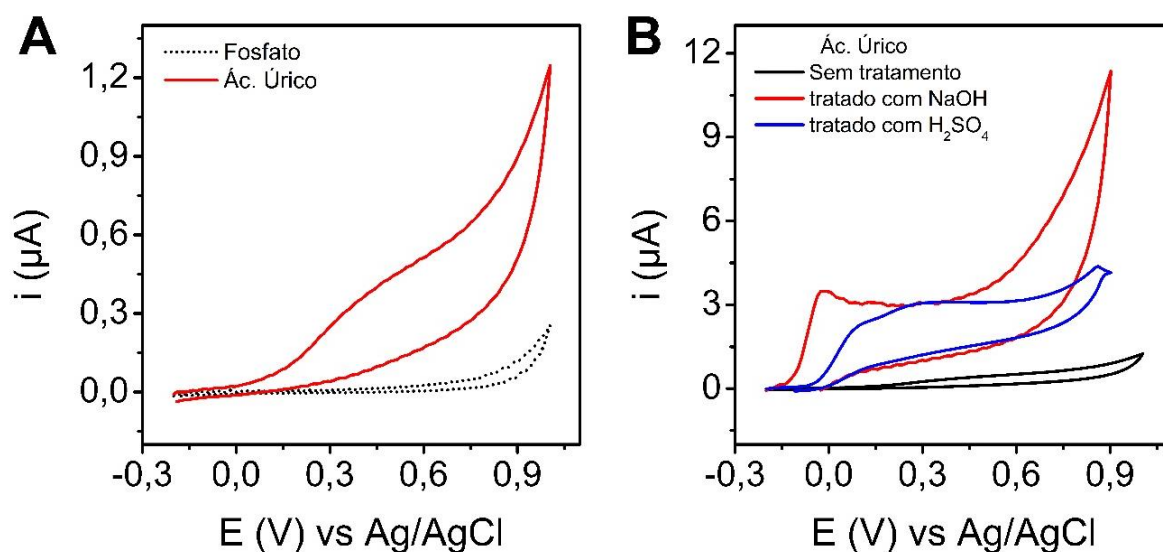
4.1 Estudo das condições experimentais

Objetivando desenvolver um sensor para testes frequentes de ácido úrico, o qual é uma espécie de grande relevância clínica para diversas doenças, dentre elas a gota, este trabalho partiu da proposta em utilizar a propriedade redutora do AU, onde não há participação da uricase, para ser um método direto de detecção. Assim, avaliou-se a performance dos eletrodos fabricados pela técnica LSG para a determinação desta espécie. Visando a melhor detectabilidade e desempenho eletrocatalítico, avaliou-se tratamentos eletroquímicos superficiais na resposta voltamétrica de AU.

4.1.1 Tratamento eletroquímico do eletrodo

Uma análise exploratória do AU foi realizada por meio da voltametria cíclica para verificar a resposta do AU no sensor LSG sem tratamento da superfície eletródica, Figura 6A, fazendo uma varredura na faixa de $-0,2$ a $+1,0$ V.

Figura 6: (A) Voltamogramas cíclicos obtidos em tampão fosfato pH 7,4 (linha preta) e para o AU 0,50 mmol L⁻¹ (linha vermelha) no LSG sem nenhum tratamento prévio. (B) Voltamogramas cíclicos para o AU 0,50 mmol L⁻¹ sem tratamento (linha preta), com tratamento anódico (linha vermelha) e com tratamento catódico (linha azul) do LSG. Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Os voltamogramas apresentados referem-se ao primeiro ciclo obtido na CV.



Fonte: Autora, 2023.

É possível verificar que o eletrodo LSG apresentou um sinal de fundo baixo e estável bastante atrativo para uso como sensor eletroquímico. Quando adicionado o AU, o mesmo apresentou um processo de oxidação irreversível, com pico de corrente pouco definido (Figura 6A).

Na sequência, avaliou-se alguns tratamentos superficiais prévios, visando introduzir grupos funcionais que possam atuar como centros catalíticos para a transferência eletrônica. Estudos mostram que o pré-tratamento em eletrodos à base de carbono pode melhorar o desempenho como aumento da atividade eletroquímica, uma redução no sobrepotencial e aumentar a molhabilidade do sensor. Acredita-se que este resultado ocorra devido à geração de grupos oxigenados, como álcoois, ácidos ou espécies carboniladas pela oxidação do material do eletrodo (LAKSHMI *et al.*, 2011).

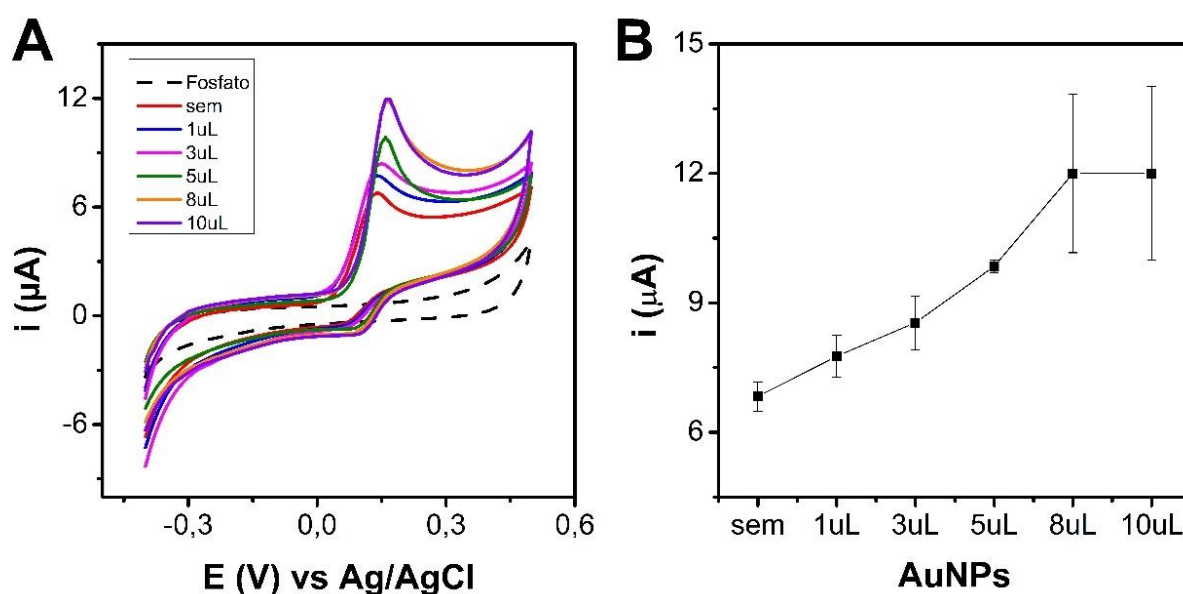
Na Figura 6B pode-se observar as respostas do sensor após tratamentos anódico e catódico em sua superfície, utilizando NaOH 0,10 mol L⁻¹ e aplicando +1,8 V e H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ aplicando -1,5 V, respectivamente. Destaca-se que ambos os tratamentos superficiais do eletrodo causaram um aumento expressivo dos sinais de corrente (cerca de 6x) com uma cinética superior e com um efeito catalítico, uma vez que houve uma diminuição do sobrepotencial em cerca de 300 mV para o tratamento catódico e cerca de 450 mV para o tratamento anódico. Em vista da melhor resposta analítica (maior corrente e menor potencial) obtida para o tratamento com NaOH 0,10 mol L⁻¹, esta condição foi escolhida para os demais estudos eletroquímicos do trabalho.

4.1.2 Otimização e modificação do sensor com AuNPs

Após a escolha do tratamento, verificou-se a modificação do sensor com nanopartículas de ouro e se haveriam mudanças na resposta do ácido úrico, levando em consideração que as nanopartículas são utilizadas como estratégia para melhorar o desempenho analítico de eletrodos, tanto pelo aumento superficial de área quanto pela possibilidade de associar efeitos catalíticos com seu uso (ELANGO VAN *et al.*, 2020; GHOREISHI; BEHPOUR; SAEIDINEJAD, 2012).

Para avaliar a modificação do sensor com nanopartículas metálicas, preparou-se uma solução de nanopartículas de ouro a partir de ácido tetracloreáurico e citrato de sódio, então a superfície do sensor foi modificada com as AuNPs recém preparadas e mediu-se a resposta na ausência e na presença destas. Visando obter a melhor condição analítica, foi realizado um estudo de otimização da quantidade de AuNPs adicionadas no sensor. Avaliou-se a modificação, utilizando a técnica de *drop-casting*, com volumes de 1,0 µL, 3,0 µL, 5,0 µL, 8,0 µL e 10 µL da suspensão de AuNPs. Após adicioná-las, aguardou-se a secagem por cerca de 30 min. Realizou-se a medida do branco e do analito para cada condição na faixa de potencial de -0,4 a +0,5 V. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 7A.

Figura 7: A) Voltamogramas cíclicos obtidos para a otimização da quantidade de AuNPs utilizadas para a modificação do sensor tratado (TA). Foi utilizado AU 0,50 mmol L⁻¹ sem AuNPs (linha vermelha), com 1,0 µL de AuNPs (linha azul), 3,0 µL de AuNPs (linha magenta), 5,0 µL de AuNPs (linha verde), 8,0 µL de AuNPs (linha laranja) e 10 µL de AuNPs (linha roxa). Parâmetros: Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. Utilizado o primeiro ciclo obtido na CV. B) Gráfico de corrente de pico do AU em função do volume de AuNPs. As barras de erro foram obtidas a partir de análise em triplicata ($n = 3$). Para os 4 primeiros pontos, observou-se um comportamento linear de incremento de resposta com equação da reta: $y = 0,586x + 6,912$ com $R^2 = 0,993$.



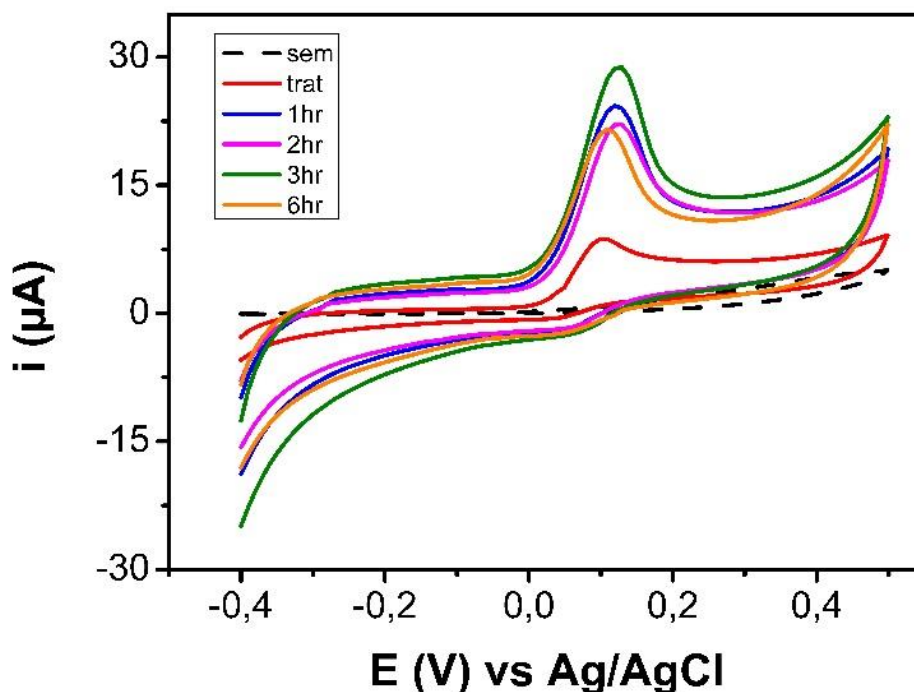
Fonte: Autora, 2023.

Observou-se que com o aumento do volume de AuNPs utilizado na modificação superficial do eletrodo de trabalho, houve um aumento da corrente de pico do AU. No entanto, conforme Figura 7B, nota-se que a partir de 8,0 µL, observa-se uma saturação na resposta do sensor, bem como maior variabilidade dos resultados. Essa variação ocorre devido à necessidade de executar duas etapas de aplicação e secagem das AuNPs ao usar volumes de 8,0 µL e 10 µL, pois a área do sensor não é capaz de acomodar todo o volume da gota de uma só vez. Assim, a melhor condição experimental foi de 5,0 µL de AuNPs onde o sinal ficou bem definido e houve uma resposta intensificada, a qual foi escolhida para prosseguir com os testes

levando em consideração também manter o baixo custo do sensor desenvolvido (menor consumo de ouro).

Avaliou-se como o tempo de secagem das AuNPs interferiria na resposta do AU. Na Figura 8, encontram-se os voltamogramas obtidos para o ensaio de estabilidade, na qual os sensores foram secados a temperatura e iluminação ambiente. Verificou-se que a melhor resposta foi obtida com o tempo de secagem em 3 horas e este foi o tempo adotado como ótimo para a produção do sensor.

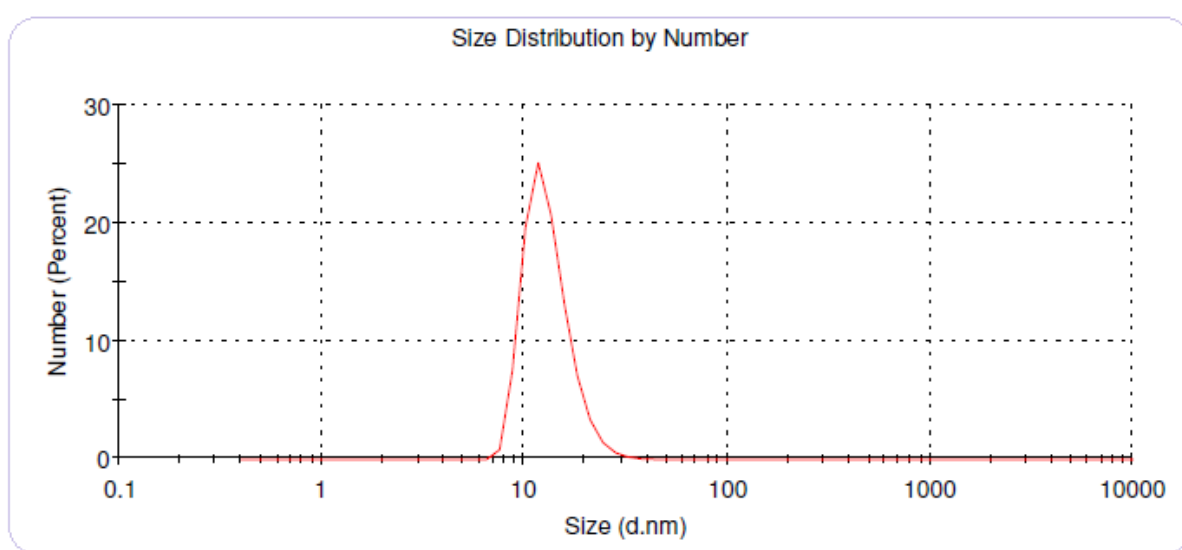
Figura 8: Voltamogramas cíclicos obtidos para otimização do tempo de secagem das AuNPs, utilizando o volume de 5,0 μL . Foram realizadas as medidas com o sensor sem tratamento e sem AuNPs (linha tracejada), somente com tratamento anódico (linha vermelha), após 1 h de secagem da aplicação de AuNPs (linha azul), após 2 h de secagem (linha magenta), após 3 h de secagem (linha verde) e após 6 h de secagem (linha laranja). Parâmetros: Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Utilizado o primeiro ciclo obtido na CV.



Fonte: Autora, 2023.

Tendo em vista que o tamanho das nanopartículas metálicas pode alterar as propriedades físico-químicas das mesmas, levando a mudanças de toxicidade e efeitos catalíticos, por exemplo, o tamanho das AuNPs sintetizadas foi avaliado através da técnica de DLS (RAGHAVENDRA *et al.*, 2014). Considerando uma geometria esférica da mesma, conforme trabalho base utilizado como referência, o tamanho encontrado foi de $13,15 \pm 3,67$ nm, Figura 9. Este resultado ressalta o baixo diâmetro e dispersão de tamanho obtido na síntese realizada.

Figura 9: Avaliação do tamanho das AuNPs sintetizadas neste trabalho.

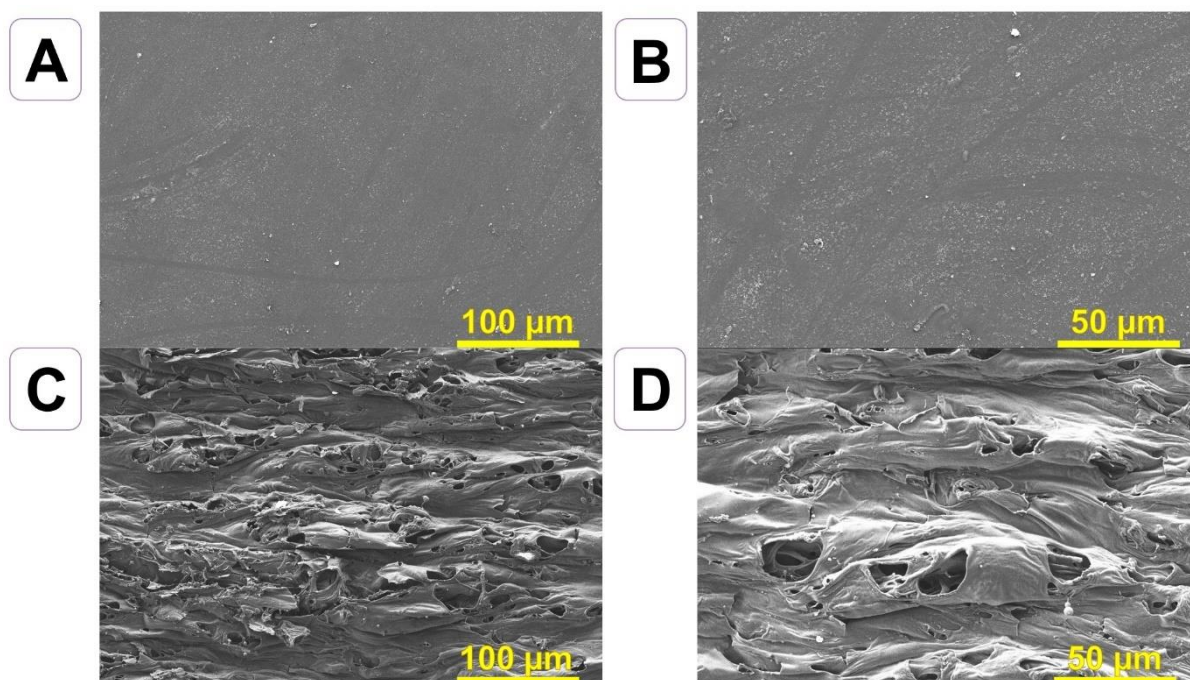


Fonte: Autora, 2023.

4.2 Caracterização morfológica e estrutural do sensor

A morfologia da superfície do eletrodo foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura. A Figura 10 apresenta as imagens do substrato PEI e do eletrodo LSG com magnificações de 500 e 1000 vezes. As imagens MEV revelaram uma superfície plana e homogênea do PEI antes da carbonização induzida por laser e uma morfologia tridimensionalmente heterogênea e com elevada porosidade e presença de cavidades no material LSG, o que favorece o aumento da área eletroativa do eletrodo (LEE; YU; KIM, 2017).

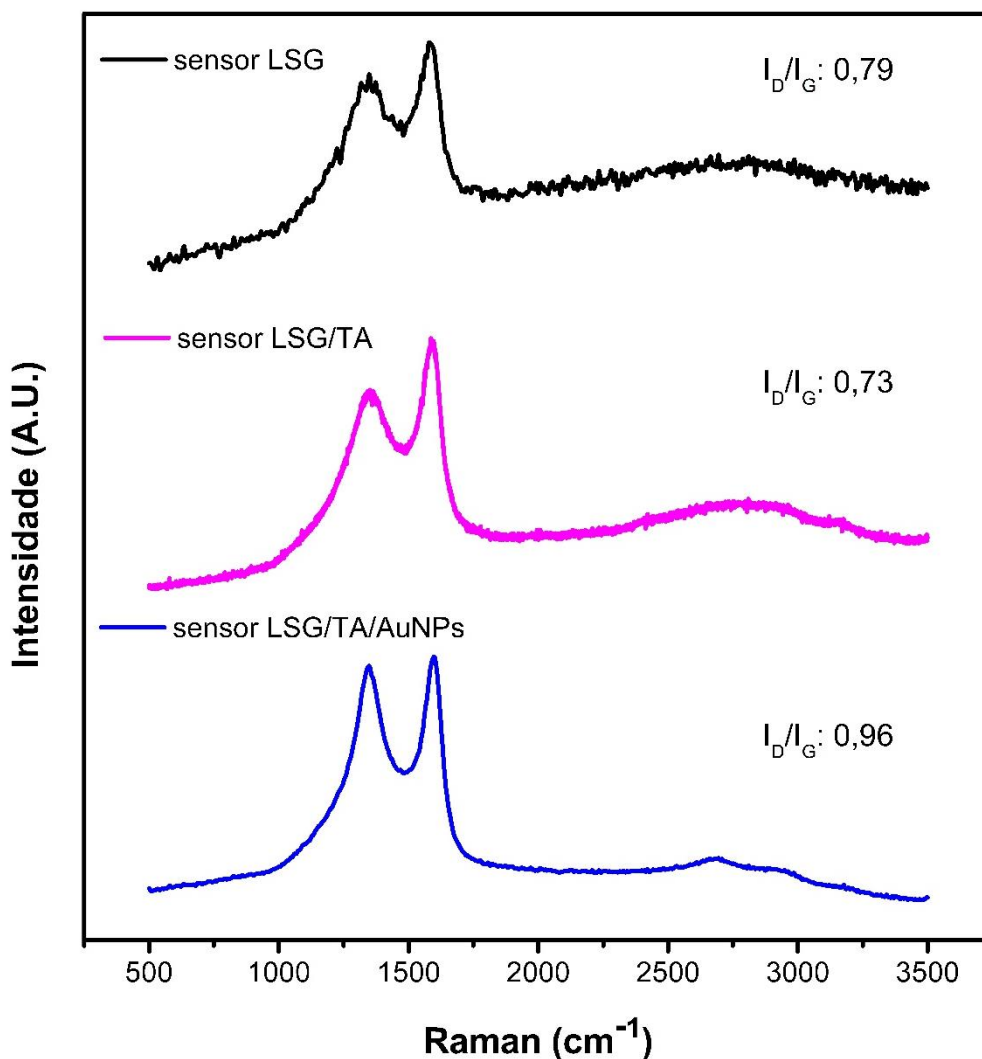
Figura 10: Micrografias da superfície do A-B) PEI e do C-D) sensor LSG em ampliações de 500x (à esquerda) e 1000x (à direita).



Fonte: Autora, 2023.

A análise estrutural do material LSG foi realizada por espectroscopia Raman para verificar a característica do material carbonáceo formado. A Figura 11 apresenta os espectros Raman do sensor carbonizado (LSG), do sensor após o tratamento anódico (LSG/TA) e o sensor modificado com as nanopartículas de ouro (LSG/TA/AuNPs), respectivamente.

Figura 11: Espectros Raman do sensor LSG (preto), do sensor tratado anodicamente LSG/TA (magenta) e do sensor tratado e modificado com AuNPs LSG/TA/AuNPs (azul).



Fonte: Autora, 2023.

As caracterizações Raman revelam duas bandas bem intensas nas regiões de 1354 e 1607 cm^{-1} , características de materiais carbonáceos e conhecidas como bandas D e G, respectivamente. Estas bandas indicam o grau de material de carbono com hibridizações sp^3 e sp^2 , respectivamente. A desordem na estrutura do grafeno resulta em uma ampla banda de desordem, chamada de banda D, que mostrou ser dispersiva, ou seja, a posição muda de acordo com a frequência de excitação. Diversos fatores podem afetar a força do espalhamento da banda D como,

por exemplo, alterações no ambiente do átomo de C que afeta a periodicidade da estrutura do carbono. O alongamento da ligação C-C dá origem a banda G que é comum a todos os sistemas de carbono sp^2 . A banda G é altamente sensível a efeitos de tensão e pode ser usada para sondar qualquer modificação na estrutura geométrica plana do grafeno. A razão das intensidades da banda D e G, conhecidas como I_D/I_G indica o grau de desordem do material (DRESSELHAUS *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2005; LEE; YU; KIM, 2017). O sensor LSG antes e após o tratamento anódico forneceram razões de I_D/I_G de 0,79 e 0,73, respectivamente, indicando um elevado grau de defeitos estruturais (Figura 11). Estes defeitos podem ser atribuídos possivelmente à presença de vários grupos funcionais oxigenados presentes na superfície do material carbonizado, uma vez que este processo é realizado sem controle do ambiente (atmosfera oxidante). Já após a modificação com AuNPs, esta razão I_D/I_G aumentou para 0,96, confirmando a inclusão deste nanomaterial na superfície do eletrodo de trabalho, diminuindo os domínios sp^2 . Vale destacar ainda, que a banda 2D destes materiais, que usualmente ocorre por volta de 2700 cm^{-1} , apresenta baixa intensidade e pouca definição, o que pode estar associado ao maior empilhamento de camadas destes derivados de grafeno, assemelhando a um óxido de grafeno ou óxido de grafite em termos de defeitos e empilhamento (DÍEZ-BETRIU *et al.*, 2013).

4.3 Estudo do efeito do pH na eletro-oxidação do AU

O estudo do pH se faz necessário visto que o meio reacional pode influenciar na resposta. Podemos com isso avaliar a relação entre o número de elétrons e prótons através do gráfico de potencial de pico em função do pH. Para melhor compreender a dependência de prótons na transferência eletrônica de uma espécie, podemos escrever uma reação química genérica, como exemplificada na Eq. 1.

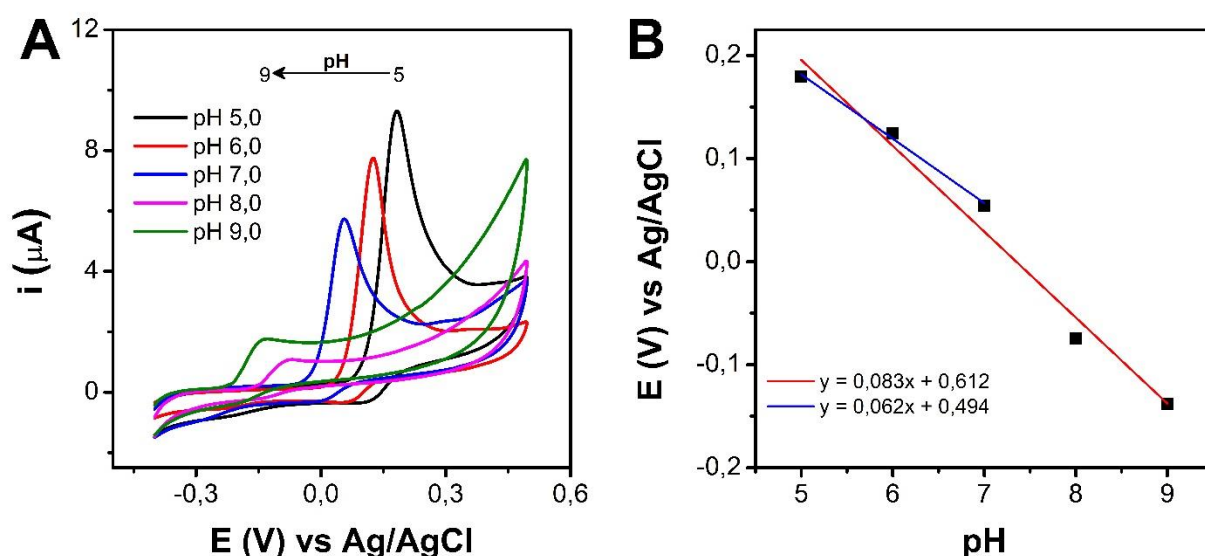


onde n e p indicam os coeficientes estequiométricos da reação de redução entre a espécie Ox e Red. Assim, podemos escrever uma equação de Nernst para este equilíbrio redox, conforme a Equação 2, onde K é uma constante que leva os valores de potencial padrão e concentração das espécies no equilíbrio (DA RÓZ *et al.*, 2017).

$$E = K - \frac{p}{n} 0,0592 \text{ pH} \quad \text{Eq. 2}$$

A influência do pH na oxidação do AU foi avaliada na faixa de pH de 5,0 a 9,0, com variação de uma unidade, como mostrado na figura 12A. O gráfico resultante de potencial de pico em função do pH encontra-se na figura 12B. Verifica-se que a maior intensidade de corrente de oxidação foi obtida em meio mais ácido e que há uma tendência de diminuir com o aumento do pH.

Figura 12: (A) Estudo do efeito do pH na resposta do ácido úrico realizado por CV na presença de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ no sensor com as condições otimizadas na faixa de pH de 5,0 (linha preta) a 9,0 (linha verde). Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . (B) Gráfico de potencial de pico em função do pH para a resposta do ácido úrico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. Utilizado o primeiro ciclo obtido na CV.



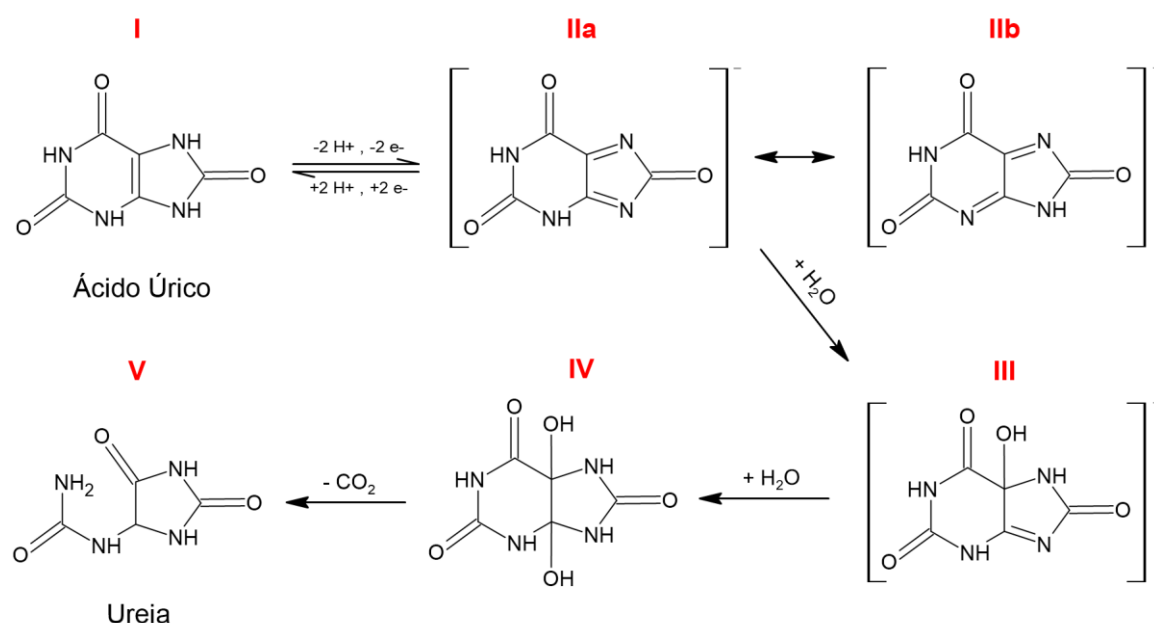
Fonte: Autora, 2023.

Os valores de potenciais de pico diminuíram linearmente com o aumento do pH a uma taxa de 83 mV/pH no intervalo avaliado de pH 5,0 a 9,0. Conforme a Equação 2, este valor indicaria um processo de 3 prótons para 2 elétrons, porém, este mecanismo seria estruturalmente inviável de ocorrer, sendo o mais provável que envolva uma mesma proporção entre elétrons e prótons (BRETT; BRETT, 1993). Contudo, observa-se uma mudança no comportamento do AU para os pHs 8,0 e 9,0

indicando uma possível mudança no seu mecanismo de reação. Estudando apenas os pHs de 5,0 a 7,0 que apresentaram uma região de resposta linear, verificou-se uma taxa de variação de 62 mV/pH o que indica um processo de mesma proporção de próton:elétron. Além disso, vale destacar que a reação de oxidação do ácido úrico é irreversível e assim, deveríamos corrigir o coeficiente angular por número de elétrons aparente e coeficiente de transferência de carga (β).

Na literatura, já é bem relatado que o ácido úrico sofre uma reação de oxidação envolvendo dois elétrons e dois prótons, Figura 13, o que leva à formação de um composto quinóide aniônico instável (**IIa,b**). Em $\text{pH} \geq 6$, o produto pode sofrer duas adições nucleofílicas de água resultando nos intermediários **III** e **IV**, respectivamente, onde seguido por uma reação de decomposição, resulta em ureia (**V**) (LAKSHMI *et al.*, 2011).

Figura 13: Mecanismo proposto para reação de oxidação do ácido úrico.



Fonte: (LAKSHMI *et al.*, 2011); Modificado pela Autora, 2023.

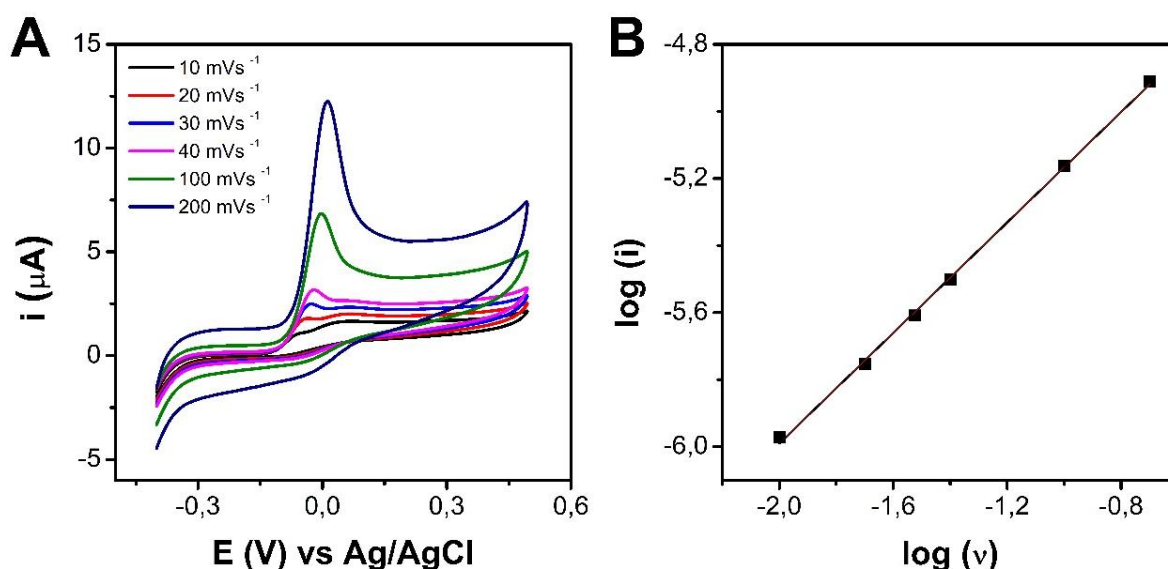
Tendo em vista que o objetivo é trabalhar nas condições mais próximas do meio salivar, escolhemos o pH 7,0 como o melhor meio para prosseguir, pois apesar de não ser a condição ótima de sensibilidade analítica, é o pH correspondente ao

intervalo de pH salivar mais comum 6,8 a 7,2, segundo o consenso existente na literatura sobre o pH bucal (TOLENTINO, 2009). Uma vantagem adicional desta condição é a antecipação no potencial de pico em relação aos meios mais ácidos, pois se encontra em uma melhor faixa analítica (mais próximo de 0,0 V).

4.4 Estudo do transporte de massa

Para investigar os fenômenos de transporte de massa envolvidos nos processos redox do ácido úrico, variou-se a velocidade de varredura adotando variações de 10 a 200 mV s^{-1} , como mostrado na Figura 14A.

Figura 14: (A) Voltamogramas cíclicos registrados usando o sensor com as condições otimizadas contendo $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido úrico em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) para diferentes taxas de varredura (10, 20, 30, 40, 100 e 200 mV s^{-1}). Utilizado o primeiro ciclo obtido na CV. (B) Gráfico do logaritmo da corrente de pico *versus* o logaritmo da taxa de varredura.



Fonte: Autora, 2023.

Por meio do gráfico de $\log(I_p)$ vs. $\log(v)$, usando a inclinação da curva, podemos verificar se o processo é difusional e/ou adsorptivo. Em um processo

controlado por difusão, I_p é proporcional a $v^{1/2}$, expressando uma inclinação de 0,5 no gráfico, enquanto em um processo controlado por adsorção, I_p é proporcional a v e, portanto, obtém-se uma inclinação de 1,0 (MENDES *et al.*, 2019).

Neste estudo, o processo anódico do ácido úrico apresentou uma inclinação de 0,824, Figura 14B, indicando uma característica majoritariamente adsortiva do processo eletroquímico do AU na superfície do sensor desenvolvido.

4.5 Otimização do *step* e amplitude do pulso

Utilizando a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial, pois é uma técnica mais sensível devido à minimização da corrente capacitiva frente aos métodos de varredura linear, realizamos a otimização dos parâmetros para a construção da curva analítica do método proposto.

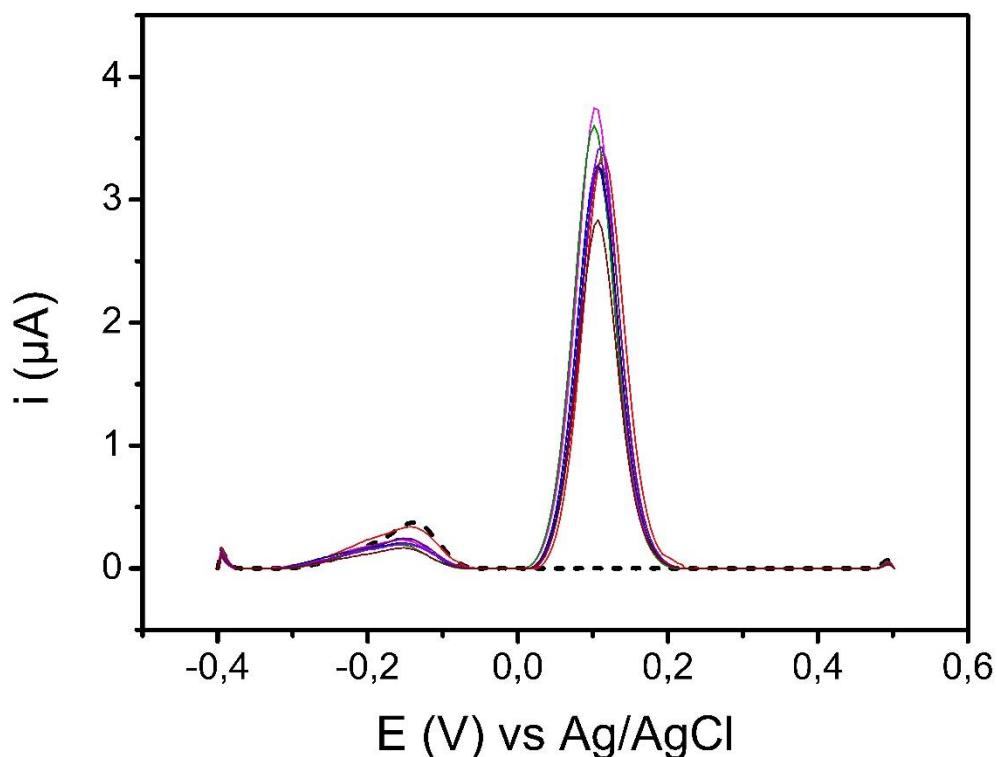
A resposta de 0,10 mmol L⁻¹ de AU foi avaliada com a alteração do *step* em 3 mV, 5 mV, 7 mV, 9 mV e 12 mV. Escolhendo a melhor condição para o *step* em 5 mV, seguiu-se para otimização da amplitude dos pulsos que variou em 30 mV, 50 mV, 70 mV, 90 mV e 120 mV, sendo 50 mV o valor ótimo.

A partir dos dados de otimização dos parâmetros da DPV, observou-se que o *step* de 5 mV proporcionou o maior sinal de resposta e assim foi escolhido como ótimo. No entanto, nos ensaios de amplitude de pulsos, notou-se que valores maiores de amplitude como 90 e 120 mV proporcionavam picos mais intensos, no entanto também mais largos e assim, escolheu-se a amplitude de 50 mV pelo compromisso de intensidade e resolução do pico de oxidação.

4.6 Teste de reprodutibilidade

Para a análise da reprodutibilidade, foram empregados oito sensores distintos e solução de 30,0 μ mol L⁻¹ de AU em tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 7,0), utilizando a técnica de DPV na faixa de potencial de -0,4 a +0,5 V, Figura 15. As medidas apresentaram um desvio padrão relativo de 8%, calculado a partir das correntes de pico obtidas.

Figura 15: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução de $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido úrico em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0, linha tracejada), utilizando oito sensores para avaliar reprodutibilidade ($n = 8$). Parâmetros: Potencial de $-0,4$ a $+0,5$ V; Velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} ; *step* de 5 mV e amplitude de 50 mV .

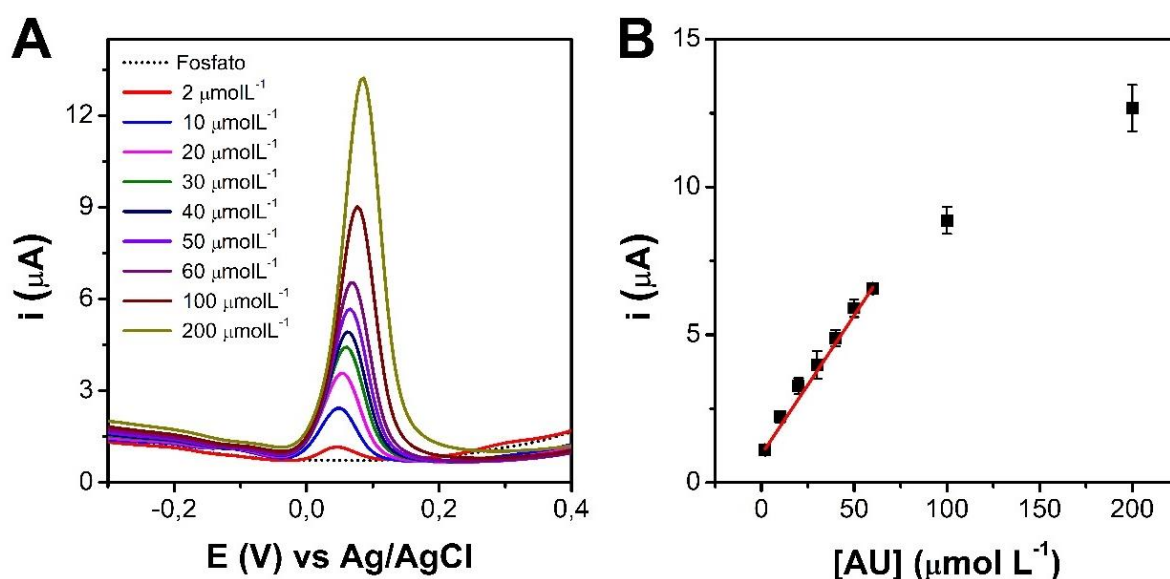


Fonte: Autora, 2023.

4.7 Curva analítica

Após todas as otimizações experimentais e da técnica, construiu-se uma curva analítica na faixa de concentrações de $2,0$ a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AU. A Figura 16A apresenta os voltamogramas obtidos por DPV e, na Figura 16B, encontra-se a curva analítica. Nota-se uma região linear de $2,0$ a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a qual temos uma sensibilidade de $0,094 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ e um R^2 de $0,998$.

Figura 16: (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo LSG/TA/AuNPs para o ácido úrico em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) com concentração final variando de $2,0$ a $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica construída usando a média das correntes de pico de oxidação do ácido úrico incluindo as barras de erro ($n = 3$). Parâmetros: faixa de potencial de $-0,4$ a $+0,5 \text{ V}$; velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} ; *step* de 5 mV e amplitude de 50 mV . Equação da reta: $y = 0,094x + 0,948$ com $R^2 = 0,998$.



Fonte: Autora, 2023.

O limite de detecção (LD) foi calculado levando em consideração 3 vezes o desvio padrão do sinal do branco analítico dividido pela sensibilidade e o limite de quantificação (LQ) como sendo 10 vezes o desvio padrão do sinal do branco dividido pela sensibilidade. O valor de LD e LQ foi de $1,34 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $4,46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 1 traz um comparativo das características do sensor proposto e dos parâmetros analíticos mais relevantes com outros sensores propostos na literatura para detecção de ácido úrico, incluindo métodos enzimáticos e não enzimáticos. Nota-se que o método desenvolvido, apesar de curta faixa linear de resposta, apresenta uma boa sensibilidade e um LD competitivo. Assim, o baixo custo de fabricação, associado com uma reprodutibilidade adequada de manufatura, torna-o bastante atrativo para o sensoriamento de AU.

Tabela 1: Comparação do desempenho analítico do eletrodo LSG/TA/AuNPs neste trabalho para detecção eletroquímica de ácido úrico com outros métodos eletroquímicos relatados na literatura.

Eletrodo	Faixa linear (µM)	LD (µM)	Referência
PEDOT-GO/ITO	2–1000	0,75	(HUANG <i>et al.</i> , 2020)
Co ₃ O ₄ -ERGO/SPE	5–500	1,5	(TURKKAN <i>et al.</i> , 2022)
GC/TiC/TiC+TiO ₂ @PolyPPD	10-5000	10,0	(ZENASNI <i>et al.</i> , 2021)
GA/Uricase/Quitosana/SACNT/Pt	100-1000	1,0	(YANG <i>et al.</i> , 2021)
ITO-rGO-AuNPs	10-500	10,9	(MAZZARA <i>et al.</i> , 2021)
ITO-ERGO/ZnO	1-400	0,45	(ERYIGIT <i>et al.</i> , 2022)
PPy-CB-Co ₃ O ₄ /GCE	0,75-305	0,46	(AHMED <i>et al.</i> , 2022)
LSG/TA/AuNPs	2-60	1,34	Este trabalho

PEDOT: poli (3,4-etilenodioxitiofeno); GO: óxido de grafeno; ITO: óxido de índio e estanho; ERGO: óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente; SPE: eletrodo serigrafado; GC/GCE: carbono vítreo; TiC: carboneto de titânio (IV); TiO₂: óxido de titânio (IV); PoliPPD: poli(N-fenil-o-fenilenodiamina); GA: glutaraldeído; SACNT: Nanotubo de carbono superalinhado; Pt: platina; rGO: óxido de grafeno reduzido; ZnO: óxido de zinco; PPy: polipirrol; CB: *carbon black*; AuNPs: nanopartículas de ouro; LSG: eletrodo gravado a laser; TA: tratado anodicamente

4.8 Estudo de seletividade

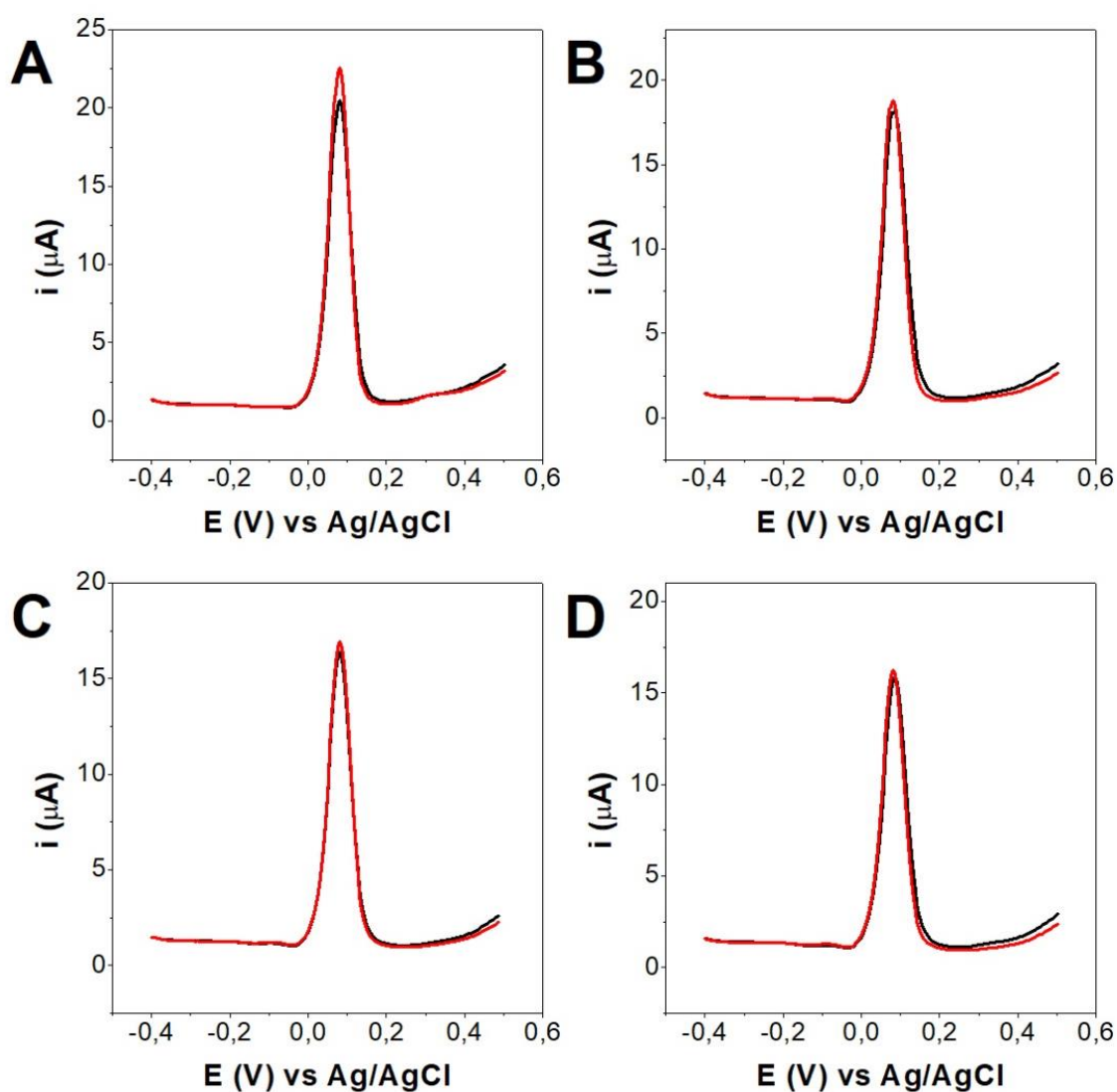
Tendo em vista que o meio salivar é composto por uma infinidade de biomoléculas, como ácido ascórbico (AA), ácido láctico (Lac), glicose (Gli) e creatinina (Cre). Estas biomoléculas majoritárias podem ser interferentes diretos quando se trabalha com a determinação de ácido úrico e assim foram avaliadas suas respostas

no sensor desenvolvido. Entende-se por interferência quando duas ou mais espécies interferem quimicamente/fisicamente ou coexistem no meio alterando significativamente a resposta do seu analito (TUKIMIN; ABDULLAH; SULAIMAN, 2018).

Realizou-se uma avaliação do nível de interferência do AA, Lac, Gli e Cre na resposta do ácido úrico com o nosso sensor LSG/TA/AuNPs nas condições já otimizadas, utilizando um ensaio de 1:1 (AU:interferente) com a concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para cada espécie.

Ao avaliar a resposta do AU na presença destes interferentes, constatou-se que houve variação de corrente de pico de $-9,3\%$ para a Gli (Figura 17A) e de $-2,0$ a $-3,7\%$ para o Lac (Figura 17B), Cre (Figura 17C) e AA (Figura 17D). A concentração de AU na saliva de indivíduos saudáveis é tipicamente de $199 \pm 27 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, uma concentração maior que a de ácido ascórbico de $5,30 \mu\text{mol L}^{-1}$, de creatinina $4,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $17,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de ácido láctico $110 \pm 20 \mu\text{mol L}^{-1}$, apenas a glicose se encontra em maior concentração $430 \pm 130 \mu\text{mol L}^{-1}$. (GUPTA *et al.*, 2015; TÉKUS *et al.*, 2012; VENKATAPATHY *et al.*, 2014; VERNEROVÁ *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2019).

Figura 17: Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para o AU 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha) e na proporção de 1:1 com (A) Glicose (B) Lactato (C) Creatinina e (D) Ácido Ascórbico no sensor LSG/TA/AuNPs. Parâmetros: potencial de $-0,4$ a $+0,5$ V; velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} ; *step* de 5 mV e amplitude de 50 mV .



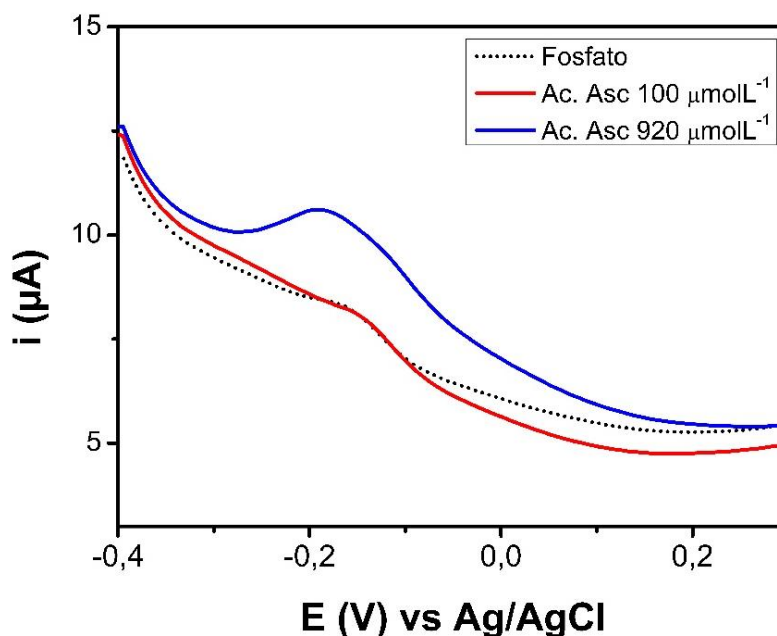
Fonte: Autora, 2023.

Destaca-se que nenhuma das espécies avaliadas aparentam ser eletroativas na janela de potenciais avaliadas no sensor desenvolvido ou apresentam baixa detectabilidade. No entanto, em amostras biológicas, muitas moléculas pequenas, como o ácido ascórbico, têm forte redutibilidade e podem ser facilmente

oxidadas eletroquimicamente em soluções aquosas. Com isso, a detecção eletroquímica do AU comumente sofre interferência do AA por oxidarem em regiões de potenciais muito próximas, ou seja, o método proposto precisa ser, além de rápido e simples, sensível e seletivo para superar esta interferência do AA.

Realizou-se uma análise com o método proposto, nas condições otimizadas, apenas com o ácido ascórbico para verificar sua região de resposta. A Figura 18, traz os voltamogramas obtidos com as análises levando em consideração uma concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e um excesso do mesmo com concentração de $920 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 18: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o AA $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha) e um excesso de AA $920 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha azul) no sensor LSG/TA/AuNPs. Parâmetros: potencial de $-0,4$ a $+0,5$ V; velocidade de varredura de 30 mV s^{-1} ; step de 5 mV e amplitude de 50 mV .



Fonte: Autora, 2023.

Podemos verificar que a região de resposta do AA é diferente da região de resposta do AU com o método proposto, além de apresentar uma baixa

detectabilidade, uma vez que apenas a solução de $920 \mu\text{mol L}^{-1}$ causou uma resposta de corrente apreciável. Desta forma, avaliando o nível de interferência já relatado anteriormente e a concentração típica desta espécie em saliva, confirmamos que, neste caso, o método se torna sensível e seletivo para o AU.

4.9 Teste de recuperação em amostras de saliva sintética

Para avaliar a aplicabilidade do sensor proposto (LSG/TA/AuNPs) na análise prática, a resposta eletroquímica foi estudada em saliva artificial que possui uma concentração eletrolítica semelhante à saliva humana. A saliva foi preparada de acordo com o método utilizado por Bao e colaboradores (BAO; KAUR; KIM, 2019) e seu pH ajustado para 6,9. Vale destacar que foram avaliadas amostras sintéticas devido a necessidade de aprovação prévia do comitê de ética em pesquisa para uso de amostras de biofluidos humanos, o que iria requerer um tempo adicional para a conclusão deste trabalho.

Antes da detecção eletroquímica de AU, as amostras de saliva contendo AU foram preparadas e, em seguida, foram diluídas por um fator de 20 vezes em tampão fosfato pH 7,0. A diluição se faz necessária para trabalharmos dentro da faixa linear do nosso método levando em consideração que pacientes saudáveis possuem concentração de AU em torno de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ e pacientes clínicos que sofrem de gota, por exemplo, possuem níveis muito superiores de concentrações de AU. Desta forma, com o método de adição de padrão, podemos avaliar a aplicação do sensor proposto para casos reais (ELANGO VAN *et al.*, 2020). As análises foram realizadas por meio de calibração interna devido ao efeito de matriz observado, quando analisadas as amostras de saliva sintética.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos, com recuperações na faixa de 94 a 120%, o que demonstra a potencialidade do LSG/TA/AuNPs para a determinação de AU salivar.

Tabela 2: Detecção de ácido úrico em amostras de saliva artificial empregando o sensor LSG/TA/AuNPs.

Concentração de ácido úrico adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ácido úrico detectado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
200,0	240,0	120,0%
200,0	188,2	94,10%
400,0	436,0	109,0%
400,0	390,0	97,50%

Este trabalho apresentou um sensor não enzimático para a detecção de ácido úrico salivar com baixo limite de detecção e faixa linear que atende a necessidade clínica para diagnósticos. O eletrodo proposto LSG/TA/AuNPs apresentou desempenho analítico comparável ou superior aos obtidos com diversos outros sensores eletroquímicos, com a vantagem do método de fabricação (LSG) que pode ser escalável e de baixo custo (não requer equipamentos caros, moldes ou infraestrutura sofisticada para manufatura), bem como ausência de elemento biológico de reconhecimento para análises seletivas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Pensando em uma plataforma de detecção portátil, um método de baixo custo, com uso de baixos volumes de amostra, que possa ser aplicado de forma a obter um diagnóstico rápido e com coleta não invasiva por meio da saliva, neste trabalho, desenvolvemos um sensor eletroquímico não enzimático para detecção de ácido úrico. Os eletrodos LSG apresentaram melhor resposta eletroanalítica após o tratamento anódico em NaOH 0,10 mol L⁻¹. Verificou-se ainda que o uso de nanopartículas de ouro melhorou o desempenho analítico dos sensores. Sabendo que o pH influencia diretamente na resposta analítica, o eletrodo foi testado em diferentes pHs, e foi escolhido a condição de pH 7,0 para os ensaios quantitativos visando o compromisso entre detectabilidade e menor potencial de detecção. O eletrodo LSG/TA/AuNPs apresentou uma adequada sensibilidade, permitindo calibrá-lo na faixa de 2,0 µmol L⁻¹ a 60 µmol L⁻¹, propiciando um baixo limite de detecção de 1,34 µmol L⁻¹. Foram testados alguns biomarcadores como glicose, lactato, creatinina e ácido ascórbico que poderiam ser interferentes diretos para detecção de AU, porém não mostraram alterações significativas na resposta do AU utilizando o método proposto. Obtivemos uma adequada reprodutibilidade, com desvio padrão relativo de 8% ($n = 8$ sensores). Nossos resultados demonstraram confiabilidade do sensor LSG/TA/AuNPs para a determinação de ácido úrico quando aplicado em amostras de saliva artificial, com recuperação de 94 a 120%, indicando potencialidade para aplicações no monitoramento do AU em amostras reais. Com todos os resultados obtidos, a perspectiva é aplicar futuramente o sensor para amostras reais obtendo, junto ao Comitê de Ética, aprovação para o estudo.

Vale mencionar alguns desafios e/ou limitações do método que podem ser melhor estudados futuramente, como etapa de modificação eletródica ser manual e assim, efeitos ambientais como temperatura e umidade afetam a secagem e reprodutibilidade das análises. É necessário avaliar a estabilidade dos sensores para longos períodos de tempo e determinar seu tempo de vida útil, uma vez que o pré-tratamento eletroquímico e as AuNPs podem perder atividade. A técnica de LSG possibilita produção em larga escala, mas etapa de padronização do pseudo-referencia ainda é limitante.

BIBLIOGRAFIA

AHMED, J.; FAISAL, M.; ALSAREII, S. A.; HARRAZ, F. A. Highly sensitive and selective non-enzymatic uric acid electrochemical sensor based on novel polypyrrole-carbon black-Co₃O₄ nanocomposite. **Advanced Composites and Hybrid Materials**, v. 5, n. 2, p. 920–933, 5 jun. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s42114-021-00391-1>>.

BAKKER, E.; TELTING-DIAZ, M. Electrochemical Sensors. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 2781–2800, 1 jun. 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac0202278>>.

BANDODKAR, A. J.; WANG, J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 363–371, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779914000699>>.

BAO, C.; KAUR, M.; KIM, W. S. Toward a highly selective artificial saliva sensor using printed hybrid field effect transistors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 285, p. 186–192, abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400519300796>>.

BELLAGAMBI, F. G.; LOMONACO, T.; SALVO, P.; VIVALDI, F.; HANGOUËT, M.; GHIMENTI, S.; BIAGINI, D.; DI FRANCESCO, F.; FUOCO, R.; ERRACHID, A. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 124, p. 115781, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993619304182>>.

BRETT, A. M. C. F. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica : princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1993. 471 p.

CARDOSO, A. R.; MARQUES, A. C.; SANTOS, L.; CARVALHO, A. F.; COSTA, F. M.; MARTINS, R.; SALES, M. G. F.; FORTUNATO, E. Molecularly-imprinted chloramphenicol sensor with laser-induced graphene electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 124–125, p. 167–175, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566318308285>>.

CARRO, E.; BARTOLOMÉ, F.; BERMEJO-PAREJA, F.; VILLAREJO-GALENDE, A.; MOLINA, J. A.; ORTIZ, P.; CALERO, M.; RABANO, A.; CANTERO, J. L.; ORIVE, G.

Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, v. 8, n. 1, p. 131–138, 26 jan. 2017. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.dadm.2017.04.002>>.

DA RÓZ, A. L.; FERREIRA, M.; DE LIMA LEITE, F.; DE OLIVEIRA, O. N.

Nanoscience and its Applications. [s.l.: s.n.]1–228 p.

DALLINGER, A.; KELLER, K.; FITZEK, H.; GRECO, F. Stretchable and Skin-Conformable Conductors Based on Polyurethane/Laser-Induced Graphene. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 17, p. 19855–19865, 29 abr. 2020.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.0c03148>>.

DANESHKHAH, A.; VIJ, S.; SIEGEL, A. P.; AGARWAL, M. Polyetherimide/carbon black composite sensors demonstrate selective detection of medium-chain aldehydes including nonanal. **Chemical Engineering Journal**, v. 383, p. 123104, mar. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894719325161>>.

DEMIO, P. C. Gout. *In*: **Integrative Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 713–720.

DÍEZ-BETRIU, X.; ÁLVAREZ-GARCÍA, S.; BOTAS, C.; ÁLVAREZ, P.; SÁNCHEZ-MARCOS, J.; PRIETO, C.; MENÉNDEZ, R.; DE ANDRÉS, A. Raman spectroscopy for the study of reduction mechanisms and optimization of conductivity in graphene oxide thin films. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 41, p. 6905–6912, 3 out. 2013. Disponível em:

<<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/tc/c3tc31124d>>. Acesso em: 6 jul. 2023.

DRESSELHAUS, M. S.; JORIO, A.; HOFMANN, M.; DRESSELHAUS, G.; SAITO, R. **Perspectives on carbon nanotubes and graphene Raman spectroscopy** Nano

LettersAmerican Chemical Society, 10 mar. 2010. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/nl904286r>>. Acesso em: 6 jul. 2023.

ELANGO VAN, A.; SUDHA, K.; JEEVIKA, A.; BHUVANESHWARI, C.; KALIMUTHU, P.; BALAKUMAR, V. Construction of ternary Au@GO coupled with poly-L-ethionine nanocomposite as a robust platform for electrochemical recognition of uric acid in diabetic patients. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering**

Aspects, v. 602, p. 125050, out. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775720306439>>.

ERDEN, P. E.; KILIÇ, E. A review of enzymatic uric acid biosensors based on amperometric detection. **Talanta**, v. 107, p. 312–323, mar. 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013000532>>.

ERYIGIT, M.; KURT URHAN, B.; DOGAN, H. O.; OZER, T. O.; DEMIR, U. ZnO Nanosheets-Decorated ERGO Layers: An Efficient Electrochemical Sensor for Non-Enzymatic Uric Acid Detection. **IEEE Sensors Journal**, v. 22, n. 6, p. 5555–5561, 15 mar. 2022. Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/9707766/>>.

FERREIRA, P. C.; ATAÍDE, V. N.; SILVA CHAGAS, C. L.; ANGNES, L.; TOMAZELLI COLTRO, W. K.; LONGO CESAR PAIXÃO, T. R.; REIS DE ARAUJO, W. Wearable electrochemical sensors for forensic and clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 119, p. 115622, out. 2019. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993619301177>>.

GHOREISHI, S. M.; BEHPOUR, M.; SAEIDINEJAD, F. Electrochemical determination of tryptophan, uric acid and ascorbic acid at a gold nanoparticles modified carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2447, 2012.

Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ay00017b>>.

GLEERUP, H. S.; JENSEN, C. S.; HØGH, P.; HASSELBALCH, S. G.; SIMONSEN, A. H. Lactoferrin in cerebrospinal fluid and saliva is not a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease in a mixed memory clinic population. **EBioMedicine**, v. 67, p. 103361, maio 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396421001547>>.

GUAN, Q.; GUO, H.; XUE, R.; WANG, M.; ZHAO, X.; FAN, T.; YANG, W.; XU, M.; YANG, W. Electrochemical sensor based on covalent organic frameworks-MWCNT-NH₂/AuNPs for simultaneous detection of dopamine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 880, p. 114932, jan. 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572665720311619>>.

GUPTA, S.; SANDHU, S. V.; BANSAL, H.; SHARMA, D. Comparison of Salivary and Serum Glucose Levels in Diabetic Patients. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 91–96, 1 jan. 2015. Disponível em:

<<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1932296814552673>>.

HUANG, X.; SHI, W.; LI, J.; BAO, N.; YU, C.; GU, H. Determination of salivary uric acid by using poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and graphene oxide in a disposable paper-based analytical device. **Analytica Chimica Acta**, v. 1103, p. 75–83, mar. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267019315272>>.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247–1250, 1 jan. 1991. Disponível em:

<<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199163091247/html>>.

KANNAN, A.; SIVANESAN, A.; KALAIVANI, G.; MANIVEL, A.; SEVVEL, R. A highly selective and simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and nitrite based on a novel poly-N-acetyl- <scp>I</scp> -methionine (poly-NALM) thin film. **RSC Advances**, v. 6, n. 99, p. 96898–96907, 2016. Disponível em:

<<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA18440E>>.

KIM, U. J.; FURTADO, C. A.; LIU, X.; CHEN, G.; EKLUND, P. C. Raman and IR spectroscopy of chemically processed single-walled carbon nanotubes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 44, p. 15437–15445, 9 nov. 2005.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja052951o>>. Acesso em: 6 jul. 2023.

KIMMEL, D. W.; LEBLANC, G.; MESCHIEVITZ, M. E.; CLIFFEL, D. E. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 17 jan. 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac202878q>>.

KIMURA, Y.; TSUKUI, D.; KONO, H. Uric Acid in Inflammation and the Pathogenesis of Atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12394, 17 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12394>>.

KUMARI, A. Purine Structures. In: **Sweet Biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 89–91.

KURRA, N.; JIANG, Q.; NAYAK, P.; ALSHAREEF, H. N. Laser-derived graphene: A three-dimensional printed graphene electrode and its emerging applications. **Nano**

Today, v. 24, p. 81–102, fev. 2019. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013218305589>>.

KYRIAZIS, A.; FEDER, J.; RAGER, K.; VON DER HEIDE, C.; DIETZEL, A.; SINAPIUS, M. Reducing the Weakening Effect in Fibre-Reinforced Polymers Caused by Integrated Film Sensors. **Journal of Composites Science**, v. 5, n. 10, p. 256, 28 set. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2504-477X/5/10/256>>.

LAHCEN, A. A.; RAUF, S.; BEDUK, T.; DURMUS, C.; ALJEDAIBI, A.; TIMUR, S.; ALSHAREEF, H. N.; AMINE, A.; WOLFBEIS, O. S.; SALAMA, K. N. Electrochemical sensors and biosensors using laser-derived graphene: A comprehensive review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 168, p. 112565, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566320305571>>.

LAKSHMI, D.; WHITCOMBE, M. J.; DAVIS, F.; SHARMA, P. S.; PRASAD, B. B. Electrochemical Detection of Uric Acid in Mixed and Clinical Samples: A Review. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 305–320, fev. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201000525>>.

LEAL-JUNIOR, A. G.; DIAZ, C. A. R.; AVELLAR, L. M.; PONTES, M. J.; MARQUES, C.; FRIZERA, A. Polymer Optical Fiber Sensors in Healthcare Applications: A Comprehensive Review. **Sensors**, v. 19, n. 14, p. 3156, 18 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/19/14/3156>>.

LEE, C.-S.; YU, S.; KIM, T. One-Step Electrochemical Fabrication of Reduced Graphene Oxide/Gold Nanoparticles Nanocomposite-Modified Electrode for Simultaneous Detection of Dopamine, Ascorbic Acid, and Uric Acid. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 17, 30 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4991/8/1/17>>.

LIU, H.; ZHAO, C. Wearable electrochemical sensors for noninvasive monitoring of health—a perspective. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 23, p. 42–46, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S245191032030065X>>.

LU, Z.; WU, L.; DAI, X.; WANG, Y.; SUN, M.; ZHOU, C.; DU, H.; RAO, H. Novel flexible bifunctional amperometric biosensor based on laser engraved porous graphene array electrodes: Highly sensitive electrochemical determination of

hydrogen peroxide and glucose. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123774, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389420317635>>.

MAZZARA, F.; PATELLA, B.; AIELLO, G.; O'RIORDAN, A.; TORINO, C.; VILASI, A.; INGUANTA, R. Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using r-GO/NPs based sensors. **Electrochimica Acta**, v. 388, p. 138652, ago. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468621009427>>.

MELO JR., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. do C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900030&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.

MENDES, L. F.; SOUZA E SILVA, Â. R.; BACIL, R. P.; SERRANO, S. H. P.; ANGNES, L.; PAIXÃO, T. R. L. C.; DE ARAUJO, W. R. Forensic electrochemistry: Electrochemical study and quantification of xylazine in pharmaceutical and urine samples. **Electrochimica Acta**, v. 295, p. 726–734, fev. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468618323600>>.

MOHAN, A. M. V.; RAJENDRAN, V.; MISHRA, R. K.; JAYARAMAN, M. Recent advances and perspectives in sweat based wearable electrochemical sensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 131, p. 116024, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993620302533>>.

NEI, L. Some Milestones in the 50-year History of Electrochemical Oxygen Sensor Development. **ECS Transactions**, v. 2, n. 25, p. 33–38, 7 fev. 2007. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1149/1.2409016>>.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666–669, 22 out. 2004. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1102896>>.

PILEGGI, V. J.; DI GIORGIO, J.; WYBENGA, D. K. A one-tube serum uric acid method using phosphotungstic acid as protein precipitant and color reagent. **Clinica Chimica Acta**, v. 37, p. 141–149, mar. 1972. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898172904251>>.

RAGHAVENDRA, R.; ARUNACHALAM, K.; ANNAMALAI, S. K.; ARUNACHALAM, A. M. **Diagnostics and therapeutic application of Gold nanoparticles** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/259267805>>. Acesso em: 6 jul. 2023.

RAUF, S.; LAHCEN, A. A.; ALJEDAIBI, A.; BEDUK, T.; ILTON DE OLIVEIRA FILHO, J.; SALAMA, K. N. Gold nanostructured laser-scribed graphene: A new electrochemical biosensing platform for potential point-of-care testing of disease biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 180, p. 113116, maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566321001536>>.

ROBLEGG, E.; COUGHRAN, A.; SIRJANI, D. Saliva: An all-rounder of our body. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 133–141, set. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641119303704>>.

SAITO, Y.; TANAKA, A.; NODE, K.; KOBAYASHI, Y. Uric acid and cardiovascular disease: A clinical review. **Journal of Cardiology**, v. 78, n. 1, p. 51–57, jul. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0914508720304159>>.

SAMOSON, K.; SOLEH, A.; SAISAHAS, K.; PROMSUWAN, K.; SAICHANAPAN, J.; KANATHARANA, P.; THAVARUNGKUL, P.; CHANG, K. H.; LIM ABDULLAH, A. F.; TAYAYUTH, K.; LIMBUT, W. Facile fabrication of a flexible laser induced gold nanoparticle/chitosan/ porous graphene electrode for uric acid detection. **Talanta**, v. 243, p. 123319, jun. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914022001151>>.

SHIBASAKI, K.; KIMURA, M.; IKARASHI, R.; YAMAGUCHI, A.; WATANABE, T. Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia. **Metabolomics**, v. 8, n. 3, p. 484–491, 8 jun. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11306-011-0334-z>>.

STETTER, J. R.; PENROSE, W. R.; YAO, S. Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 150, n. 2, p. S11, 2003. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1149/1.1539051>>.

SUN, M.; CUI, C.; CHEN, H.; WANG, D.; ZHANG, W.; GUO, W. Enzymatic and Non-Enzymatic Uric Acid Electrochemical Biosensors: A Review. **ChemPlusChem**, v. 88, n. 9, 13 set. 2023. Disponível em: <<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cplu.202300262>>.

TÉKUS, É.; KAJ, M.; SZABÓ, E.; SZÉNÁSI, N.; KEREPESI, I.; FIGLER, M.; GÁBRIEL, R.; WILHELM, M. Comparison of blood and saliva lactate level after maximum intensity exercise. **Acta Biologica Hungarica**, v. 63, n. Supplement 1, p. 89–98, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.akademiai.com/doi/abs/10.1556/ABiol.63.2012.Suppl.1.9>>.

TOLENTINO, E. de S. **Avaliação do pH da saliva e da saburra lingual antes e após a utilização de soluções enxaguantes orais e sua relação com parâmetros de halitose**. 2009. Universidade de São Paulo, Bauru, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25132/tde-28052009-145508/>>.

TOUSI, M. M.; ZHANG, Y.; WAN, S.; YU, L.; HOU, C.; YAN, N.; FINK, Y.; WANG, A.; JIA, X. Scalable Fabrication of Highly Flexible Porous Polymer-Based Capacitive Humidity Sensor Using Convergence Fiber Drawing. **Polymers**, v. 11, n. 12, p. 1985, 2 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/11/12/1985>>.

TUKIMIN, N.; ABDULLAH, J.; SULAIMAN, Y. Review—Electrochemical Detection of Uric Acid, Dopamine and Ascorbic Acid. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 7, p. B258–B267, 21 abr. 2018. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.0201807jes>>.

TURKKAN, G.; BAS, S. Z.; ATACAN, K.; OZMEN, M. An electrochemical sensor based on a Co₃O₄–ERGO nanocomposite modified screen-printed electrode for detection of uric acid in artificial saliva. **Analytical Methods**, v. 14, n. 1, p. 67–75, 2022. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D1AY01744F>>.

VENKATAPATHY, R.; GOVINDARAJAN, V.; OZA, N.; PARAMESWARAN, S.; PENNAGARAM DHANASEKARAN, B.; PRASHAD, K. V. Salivary Creatinine Estimation as an Alternative to Serum Creatinine in Chronic Kidney Disease Patients. **International Journal of Nephrology**, v. 2014, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijn/2014/742724/>>.

VERNEROVÁ, A.; KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, L.; MELICHAR, B.; ŠVEC, F. Non-

invasive determination of uric acid in human saliva in the diagnosis of serious disorders. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 59, n. 5, p. 797–812, 27 abr. 2021. Disponível em:

<<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2020-1533/html>>.

VIEIRA SEGUNDO, J. E. D.; VILAR, E. O. **Grafeno: Uma revisão sobre propriedades, mecanismos de produção e potenciais aplicações em sistemas energéticos** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* 2016. Disponível em: <www.ufcg.edu.br>. Acesso em: 5 jun. 2023.

WANG, Q.; WEN, X.; KONG, J. Recent Progress on Uric Acid Detection: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 359–375, 3 jul. 2020.

Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2019.1637711>>.

WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043–2081, 27 mar. 2008. Disponível em:

<<http://www.mdpi.com/1424-8220/8/4/2043>>.

WU, W.-C.; CHEN, H.-Y. T.; LIN, S.-C.; CHEN, H.-Y.; CHEN, F.-R.; CHANG, H.-T.; TSENG, F.-G. Nitrogen-doped carbon nanodots prepared from polyethylenimine for fluorometric determination of salivary uric acid. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 3, p. 166, 9 mar. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00604-019-3277-0>>.

XU, G.; JARJES, Z. A.; DESPREZ, V.; KILMARTIN, P. A.; TRAVAS-SEJDIC, J. Sensitive, selective, disposable electrochemical dopamine sensor based on PEDOT-modified laser scribed graphene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 107, p. 184–191, jun. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631830126X>>.

YANG, M.; WANG, H.; LIU, P.; CHENG, J. A 3D electrochemical biosensor based on Super-Aligned Carbon NanoTube array for point-of-care uric acid monitoring.

Biosensors and Bioelectronics, v. 179, p. 113082, maio 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566321001196>>.

YI, C.; LI, W.; SHI, S.; HE, K.; MA, P.; CHEN, M.; YANG, C. High-temperature-resistant and colorless polyimide: Preparations, properties, and applications. **Solar**

Energy, v. 195, p. 340–354, jan. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038092X1931148X>>.

YILDIZ, A.; EMANETOĞLU, U.; YENIGUN, E. O.; CEBECI, H. Towards optimized carbon nanotubes (CNTs) reinforced polyetherimide (PEI) 3D printed structures: A comparative study on testing standards. **Composite Structures**, v. 296, p. 115853, set. 2022. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263822322006201>>.

ZENASNI, M.; QUINTERO-JAIME, A.; SALINAS-TORRES, D.; BENYUCEF, A.; MORALLÓN, E. Electrochemical synthesis of composite materials based on titanium carbide and titanium dioxide with poly(N-phenyl-o-phenylenediamine) for selective detection of uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 895, p. 115481, ago. 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572665721005075>>.

ZHAO, J.; HUANG, Y. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker for monitoring the efficacy of urate-lowering therapy in a patient with chronic gouty arthropathy.

Clinica Chimica Acta, v. 450, p. 115–120, out. 2015. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898115003769>>.