

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ederlino Ramos Dias

**DEVELOPMENT OF A REDOX-FREE
ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR GLUCOSE
DETECTION**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, com especialização em Instrumentação orientada pela Professora Doutora Goreti Sales e pelo Professor Doutor Lino Marques, coorientada por Rita Cardoso, Akmaral Suleimenova e apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

DEVELOPMENT OF A REDOX-FREE ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR GLUCOSE DETECTION

Ederlino Ramos Dias

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Thesis submitted to the University of Coimbra in compliance with the requirements for the degree of Master in Biomedical Engineering

Orientadores: Goreti Sales, Lino Marques
Coorientadoras: Akmaral Suleimenova, Rita Cardoso

Coimbra de 2023

Este trabalho foi desenvolvido em:



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Esta cópia da dissertação é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da dissertação e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

Agradecimentos

Agradeço profundamente ao BioMark pelo apoio, pelo suporte e por toda a disponibilidade, que foram determinantes para o sucesso desta dissertação. Em particular, agradeço à Rita Cardoso e à Akmaral Suleimenova, por todo o esforço e por toda a ajuda que me ofereceram, sem elas, nada disto seria possível. Agradeço também à Doutora Goreti Sales e ao Doutor Lino Marques por oferecerem todas as condições necessárias para a realização deste projeto e pela disponibilidade prestada.

Resumo

A sustentabilidade dos dispositivos *point-of-care* (POC) tem sido crucial para a implementação dos biossensores no diagnóstico médico. Espera-se que os dispositivos POCs sejam sensíveis, seletivos, de fácil utilização e de baixo custo.

Neste trabalho, desenvolveu-se um biossensor eletroquímico que dispensasse a necessidade de adicionar um mediador redox externo, utilizando métodos simples e de baixo custo, baseados na tecnologia de *screen printing*. Como prova de conceito, os dispositivos foram utilizados para produzir um biossensor para a glucose, em resposta ao atual aumento da população diabética. Recorreu-se à técnica de impressão polimérica molecular para o desenvolvimento de um elemento de (bio)reconhecimento adequado, com um mediador redox acoplado. Os elétrodos foram de tinta de carbono, impressa em substratos de PVC, recorrendo a um processo adequado a uma produção em escala. A reprodutibilidade do processo de produção foi avaliada por monitorização do comportamento do um par redox ($K_3[Fe(CN)_6]$)/($K_4[Fe(CN)_6]$). Foram utilizadas a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica, para confirmar as excelentes propriedades dos elétrodos para aplicações analíticas.

O polímero impresso molecularmente (PIM) foi gerado *in-situ*, em *bulk*, por eletropolimerização de pirrol na presença da molécula alvo (glucose) e de um mediador redox reversível; este mediador ficaria na matriz do elétrodo e forneceria diretamente as correntes decorrentes da sua oxidação/redução. A partir do processo metabólico natural, escolheu-se como mediador redox o FAD (do inglês, *flavin adenine dinucleotide*), um cofator que participa no metabolismo enzimático da glucose. Para garantir uma boa polimerização, foram determinados os picos dos potenciais de todos os componentes envolvidos por duas técnicas (cronoamperometria e a voltametria cíclica). O desempenho analítico do biossensor foi testado por incubação consecutiva em soluções padrão de glucose de concentrações crescentes, registando os sinais produzidos por voltametria de impulso diferencial (DPV, do inglês, *differential pulse voltammetry*). Os dados obtidos indicaram boas características analíticas, nomeadamente no que diz respeito a reprodutibilidade, sensibilidade e seletividade.

Palavras-chaves: Pirrol, FAD, Polímero Impresso Molecularmente, Biossensor Eletroquímico, *Diabetes Mellitus*.

Abstract

The sustainability of point-of-care devices (POC) is becoming critical for implementing biosensors for health diagnostics. POC devices are expected to be sensitive, selective, relatively easy to use, and inexpensive.

In this work, a homemade redox-free electrochemical biosensor was developed using low-cost and straightforward methods based on simple screen-printing technology. As proof-of-concept, the devices were applied to produce a biosensor for glucose, in response to the current expansion of diabetic society, using a molecularly imprinted polymer as a biorecognition element with an embedded redox probe. The technique was applied on a PVC substrate producing homemade screen-printed electrodes with carbon ink, offering capacity for upscale manufacturing. The reproducibility of the construction process was assessed by following the electron transfer properties of a standard redox probe ($K_3[Fe(CN)_6]$)/ ($K_4[Fe(CN)_6]$). This used cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy, confirming the excellent properties of the homemade electrodes for analytical applications.

The molecularly imprinted polymer was generated *in-situ*, in bulk, by electropolymerization of pyrrole in the presence of the template (glucose) and a reversible redox probe; this probe would stay included in the electrode matrix, signalling redox currents. In analysing the natural processes of metabolism, FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) was selected for being a co-factor in the enzymatic metabolism of glucose. To ensure a suitable polymerization, the peak potentials of all components involved were first assessed by two techniques, chronoamperometry and cyclic voltammetry. The analytical performance of the biosensor was assessed upon consecutive incubations in glucose standard solutions of increasing concentrations, reading the analytical output by differential pulse voltammetry (DPV). The data obtained confirmed to good analytical features of the (bio)sensing device, in terms of reproducibility, sensitivity, and selectivity.

Keywords: Pyrrole, Flavin Adenine Dinucleotide, Molecularly Imprinted Polymer, Electrochemical Biosensor, *Diabetes Mellitus*.

Acrónimos e Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácido Glucónico
ALH	Antigénio leucocitário humano
ARN	Ácido ribonucleico
CAF	Ácido cafeico
CE	Contra elétrodo
Cdl	Condensador de dupla camada
CV	<i>Cyclic voltammetry</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 1
DMT2	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2
DPV	<i>Differential pulse voltammetry</i> (voltametria de impulso diferencial)
EHA	Etilhexilacrilato
EIS	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i> (espectroscopia de impedância eletroquímica)
EPC	Eletrólise de potencial controlado
ER	Elétrodo de referência
ET	Elétrodo de trabalho
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i> (dinucleótido de flavina e adenina)
GCE	Elétrodo de carbono em vidro
GOx	Glucose oxidase
HbAc1	Hemoglobina glicosilada
HDL	<i>High density lipoproteíns</i>
LD	Limite de detecção
PIM	Polímero de impressão molecular
PNI	Polímero não-impresso
POC	<i>Point-of-care</i>
PVC	Poli (cloreto de vinilo) (poly(vynil chloride))
Rct	Resistência à transferência de carga
Rs	Resistência da solução
SPE	<i>Screen-printed electrodes</i>
TOTG	Teste oral de tolerância a glucose
SWV	<i>Squared wave voltammetry</i> (voltametria de onda quadrada)
W	Impedância de Warburg

Índice de Figuras

Figura 1: Destruição das células β (adaptado de [5])	5
Figura 2: Esquema de um biossensor (adaptado de [11]).....	7
Figura 3: Esquema de um biossensor baseado num PIM.....	9
Figura 4: Esquema de um biossensor (adaptado de [18])	10
Figura 5: Esquema dos constituintes de SPE comercial (adaptada da MetroOhm dropSens)	12
Figura 6: Técnica de fabrico <i>SPE</i> (adaptado de artigo screen [23]).....	13
Figura 7: Componentes da Impedância [32]	15
Figura 8: Circuito equivalente de Randle [32].....	15
Figura 9: Descrição das componentes da impedância [32]	16
Figura 10: Classificação dos biossensores da glucose (adaptado de [11]).....	17
Figura 11: Esquema das fases de atuação do FAD com a glucose (adaptado de [35])	17
Figura 12: A) Potencióstato / galvanóstato PalmSense; B) Software eletroquímico PSTrace 5.9; C) Caixa de leitura dos elétrodos; D) SPE produzido no laboratório	23
Figura 13: Remoção das máscaras	25
Figura 14: Remoção dos resíduos	25
Figura 15: Superfície do elétrodo limpo com KCl.....	27
Figura 16: Polimerização em <i>Bulk</i>	27
Figura 17: Estrutura molecular do monómero Pirrol [46].....	27
Figura 18: Polimerização do Pirrol (adaptado de [46])	28
Figura 19: Incubação na câmara húmida	29
Figura 20: Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 15 ciclos.	30

Figura 21: Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 20 ciclos.	31
Figura 22: Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 30 ciclos.	31
Figura 23: Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 40 ciclos	32
Figura 24: Verificação dos picos de oxidação da glucose (A), FAD (B) e pirrol (C) usando a técnica CV	33
Figura 25: Medições em SWV após polimerização do PNI, com diferentes tempos de polimerização (A) 50s, (B) 200s e (C) 500s.....	33
Figura 26: Medições em VID após polimerização do PNI, utilizando diferentes concentrações de FAD, 10mM (A), 25 mM (B) e 50mM (C).....	34
Figura 27: Medições em DPV em KCl, após atingir as melhores condições de polimerização no PNI. (A) Estabilização do sensor após a polimerização e (B) após a 30ciclos em KCl.....	34
Figura 28: Avaliação da estabilidade por DPV após a polimerização do PIM (A) e PNI (B)	35
Figura 29: Avaliação da estabilidade por DPV após a remoção da glucose durante 30 minutos.....	36
Figura 30: Comparação do PIM e após a remoção (A) e a estabilidade após a remoção (B) por DPV	37
Figura 31: Comparação entre o PIM (A) e após a remoção da glucose (B).	37
Figura 32: Comparação entre o MIP (A) e do PNI (B), após a polimerização	38
Figura 33: Comparação entre o PNI após a polimerização e após a remoção	38
Figura 34: Desempenho analítico em PBS pela técnica de DPV do PIM (A) e a respetiva curva de calibração (B) e do PNI (C) e a respetiva curva de calibração (D)	40

Índice

1.	Introdução	1
1.1	Estrutura da Dissertação	2
2.	Revisão da literatura	3
2.1	Diabetes <i>Mellitus</i>	3
2.2	Epidemiologia.....	4
2.3	Diagnóstico.....	5
2.4	Abordagem para a monitorização da glucose sanguínea.....	6
2.5	Biossensores	6
2.6	Biossensores de glucose.....	18
2.8	Mediador Redox	19
2.9	Biossensores eletroquímicos com impressão molecular para a glucose.....	20
3.	Materiais e Métodos	22
3.1	Equipamento.....	22
3.2	Reagentes.....	23
3.3	Soluções.....	23
3.4	Homemade SPE's	24
3.5	Procedimentos Eletroquímicos	24
3.6	Pré-tratamento dos elétrodos	25
3.7	Construção do PIM.....	26
3.8	Remoção da molécula-alvo	27
3.9	Performance analítica	27
4.	Resultados e Discussão	29
4.1	Métodos Eletroquímicos de Limpeza	29
4.2	Determinação dos picos para polimerização do Pirrol	31
4.3	Otimização da construção PNI	32
4.4	Avaliação do desempenho analítico do PIM Vs. PNI	39
5.	Conclusões e perspetivas futuras.....	41
6.	Referências	43

1. Introdução

— Contextualização e Motivação —

O aumento da Diabetes *Mellitus* (DM) tem sido preocupante para os sistemas de saúde, estimando-se que cerca de 537 milhões de pessoas apresentem esta disfunção, o que implica que cerca de 8,8% da população global necessita de cuidados especiais. [1] No ano de 2019, a DM do tipo dois foi responsável por 4,2 milhões óbitos. [2] O controlo da doença implica uma monitorização regular da condição fisiológica, em especial do valor de glucose no sangue.

As previsões apontam para um aumento desta patologia nos próximos anos, portanto, não só é importante ter um controlo da doença, mas também atenção aos sinais e sintomas que aparecem antes, pois em muitos casos quando a glicemia está alta, a doença já se encontra ativa. Por este motivo, são essenciais a prevenção e o controlo dos níveis da glucose em pacientes com essa predisposição. [2]

O desenvolvimento de novas técnicas menos invasivas, com menor erro associado, maior exatidão e maior reprodutibilidade, tem sido uma constante no universo científico. Atualmente existem inúmeras técnicas e dispositivos para efetuar a monitorização da glicemia, das quais se destacam novos biossensores para a deteção da glucose. [3]

O mercado dos biossensores da glucose excedeu os 15 bilhões de dólares em 2021, com inúmeras descobertas e avanços significativos, que prometem melhorar as condições de vida da população. [4]

— Objetivo —

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em polímeros de impressão molecular (PIM), de leitura direta, a fim de detetar a glucose em amostras de soro. Este biossensor tem como objetivo mimetizar a atividade da enzima, glucose oxidase, presente nos biossensores comerciais.

1.1 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está dividida em 5 capítulos.

O **capítulo 1** encontra-se descrita a contextualização do trabalho, bem como a sua motivação. Além disso, é descrito o principal objetivo deste trabalho, bem como a divisão/organização e os temas abordados ao longo da dissertação.

No **capítulo 2** são abordados conceitos relativos à revisão da literatura. Primeiramente, sobre os conceitos relacionados com a *Diabetes Mellitus*, epidemiologia, diagnóstico, monitorização da glucose. Este capítulo foca nos possíveis biomarcadores, elementos de reconhecimento biológico e tipo de biossensores adequados para o desenvolvimento de um novo biossensor eletroquímico para a glucose, baseado nos PIMs como elementos de reconhecimento biológico.

O **capítulo 3** são descritos os métodos e procedimentos ao longo deste plano.

No **capítulo 4** é apresentada os resultados obtidos usando as técnicas descritas no **capítulo 3** bem como a sua discussão.

Por último, no **capítulo 5**, serão apresentadas as conclusões tiradas dos resultados do capítulo anterior e as perspetivas futuras.

2. Revisão da literatura

2.1 Diabetes Mellitus

A *DM* é considerada uma patologia composta por um conjunto de disfunções fisiológicas, na qual a hiperglicemia é a principal característica, proveniente da resistência à insulina, e do descontrole na secreção da insulina e do glucagon. [5] Existem dois tipos de DM, a do tipo 1 e a do tipo 2, descritas de seguida. [5]

2.1.1 DM Tipo 1

Associada a origens hereditárias, onde as células pancreáticas betas são completamente destruídas, a DM tipo 1 (DMT1) é caracterizada por ser autoimune. Comumente, os sintomas aparecem durante a infância e na adolescência, porém, existem alguns casos, que se podem manifestar mais tarde, embora a sua causa não seja totalmente esclarecida. As células T do indivíduo portador da doença são responsáveis por mediar a destruição das células Q. [5] Os autoanticorpos das células das ilhotas pancreáticas têm como alvo a insulina, a descarboxilase do ácido glutâmico, a proteína 2 associada ao insulinoma e o transportador 8 de zinco. Estas proteínas são biomarcadores associados à DMT1, uma vez que estão relacionados com as glândulas segregadoras das células Q. Além disso, são indicativos da autoimunidade, que podem ser observados meses antes do início dos primeiros sintomas. [5]

Geralmente, o tipo de anticorpo que surge tem origem genética. O DMT1 é geralmente dividido em duas fases, conforme os sintomas (sede e a consequente poliúria) associados à hiperglicemia. [5][1] Os portadores desta patologia estão sujeitos ao tratamento baseado na administração de insulina até ao fim da vida, pois, não há cura até ao momento atual desta dissertação.

Portanto, o controlo contínuo e eficiente da glicemia sanguínea é crucial neste processo e, como tal, estão a ser desenvolvidas novas formas de monitorização da insulina e de outros biomarcadores relevantes. Apesar de existirem estes progressos, alguns pacientes têm complicações macrovasculares e microvasculares. [5] [2].

2.1.2 DM Tipo 2

Os indivíduos com pré-disposição genética e com alguns fatores de risco são os mais propensos para desenvolver a patologia DM tipo 2 (DMT2). Atualmente, a principal causa é a obesidade, associada ao perímetro abdominal resultante de uma dieta rica em gorduras e carboidratos, e o déficit de atividade física. [6] [2][7]

Fatores como o baixo nível de HDL (*High Density lipoproteins*), doença do ovário policístico, ou até o sedentarismo podem estar inter-relacionados com a DMT2. Existem, ainda, inúmeros estudos que indicam que a depressão possa estar também envolvida. [6] Recentemente, a taxa incidência em crianças é elevada, pois a obesidade infantil tem sido uma realidade, o que conseqüentemente conduz à resistência à insulina.

Os sintomas (sede e poliúria) em DMT2 são mais acentuados do que no DMT1, como por exemplo, a fadiga, aumento da massa corporal, infecções frequentes, feridas e dificuldades no processo de cicatrização. [6]

Além disso, outras patologias são associadas a DMT2, como doenças cardiovasculares (infarto do miocárdio, doença arterial periférica, arritmia cardíaca entre outras complicações), défices funcionais no rim e doenças do fígado (cirrose não alcoólica, carcinoma hepatocelular, entre outros). [2]

Além disso, de acordo com a literatura, vários trabalhos relacionam a DMT2 ao aparecimento de várias células cancerígenas em diferentes cancros como, cancro pancreático e cancro da mama. [2] Esta patologia também não possui cura, porém o tratamento com a insulina mantém os níveis de glucose controlados e melhora a qualidade de vida do paciente. [2]

2.2 Epidemiologia

De acordo com os dados da federação internacional da diabetes, estima-se que cerca de 8,8 % da população mundial adulta sofre de DM.[6] Destes, apenas 10-15% são DMT1, sendo a DMT2 a mais predominante, estando intimamente relacionada com a obesidade. No entanto, na faixa etária infantil a DMT1 possui maior taxa de incidência, estimando-se que mais de 500.000 crianças sejam portadoras desta patologia. [5]

Apesar de ser considerada uma doença rara, a taxa de crescimento da DMT1 tem vindo a aumentar, predominantemente em países desenvolvidos, porém, a ausência de casos em

países com menor poder económico deve-se à falta de condições de diagnóstico e tratamento desta doença. [5]

Além disso, a prevalência de possíveis défices no sistema de antígenos leucocitários humanos (ALH) varia entre países, sendo atualmente predominante em países escandinavos, a América do Norte e a Austrália; nos países asiáticos é mais rara a sua prevalência. Apesar do diagnóstico ser mais prevalente no intervalo 12-14 anos, dados mais recentes indicam que a DMT1 pode ser diagnosticada até aos 50 anos de idade. Existem alguns casos em que o diagnóstico da DMT2 em jovens adultos pode ser confundido com a DMT1, devido à presença de anticorpos das células β alvo nestes indivíduos (**Figura 1**). [5]

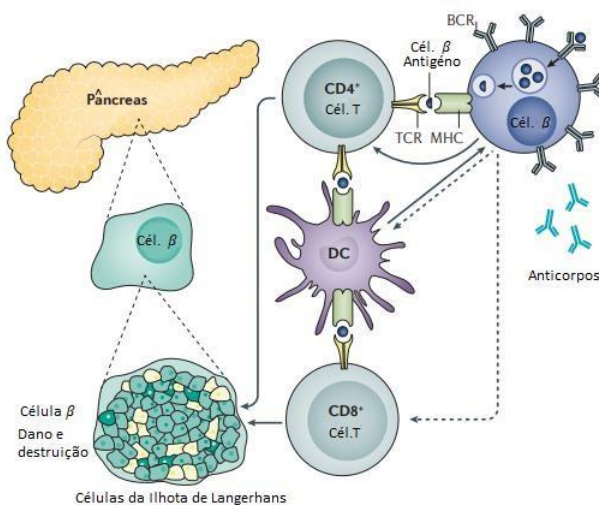


Fig. 1. Destruição das células β (adaptado de [5]).

2.3 Diagnóstico

Geralmente, o despiste da DMT2 é precedido de várias medições de níveis da glucose, com diferentes testes, como o teste oral de tolerância a glucose (TOTG). Outra medição que se pode fazer a nível laboratorial é a medição dos valores da glucose no sangue, que pode também ser útil para casos em que há predominância dos sintomas. A medição a longo termo pode ser combinada com a deteção da hemoglobina AC1, que é responsável por determinar a quantidade de hemoglobina glicosilada. Todavia, estes métodos de despiste necessitam de repetição (um segundo teste), de modo a confirmar os resultados. [5].

Os sintomas de hiperglicemia, como poliúria e polidipsia, perda de peso, sintomas abdominais, geralmente em crianças, são associados a DMT1. A grande parte dos

diagnósticos só acontece aquando do aparecimento dos primeiros sintomas, enquanto a minoria acontece a partir da monitorização dos níveis da glucose, e pela análise da presença ou não de anticorpos das células β alvo. [5]

2.4 Abordagem para a monitorização da glucose sanguínea

Nos pacientes diabéticos é crucial a monitorização da glucose. Esta monitorização pode ser efetuada em vários momentos do dia, como antes das refeições principais, depois de cada refeição, ou ainda antes da hora de dormir, ou até mesmo depois da prática de atividade física. [6] [2]

Geralmente, os pacientes com DMT2 realizam testes duas horas após o almoço, sendo que durante este período temporal é possível avaliar ao detalhe o efeito dos hidratos de carbono envolvidos no metabolismo da glucose, o que permite aos pacientes ter controlo sobre a própria dieta. Por outro lado, os pacientes com DMT1 tendem a realizar medições antes das refeições, pelo que o tempo mais adequado para esta medição gera alguma controvérsia. [6] No entanto, a medição dos níveis de glucose duas horas após as refeições revela que existe um maior controlo ao nível de complicações cardiovasculares. [6]

2.5 Biossensores

A necessidade de monitorizar a glucose em elevada frequência em pacientes com DM e a grande incidência da doença geraram a necessidade de introduzir dispositivos POC para a glucose no mercado. Com os primeiros dispositivos a emergirem na literatura na década de 60, desde então houve uma evolução tecnológica incomensurável. Atualmente existe um vasto mercado na fabricação e desenvolvimentos de biossensores para a deteção da glucose, de forma a minimizar o erro associado, melhorar a exatidão e a repetibilidade [3] [4]. De acordo com a literatura, o desenvolvimento de dispositivos, como os biossensores com elevada eficiência e minimamente invasivos para monitorizar os níveis de glucose no sangue está em expansão. [3]

Os biossensores são dispositivos que tem inúmeras vantagens, como a rápida resposta e a leitura direta, sem a necessidade de transportar as amostras para um laboratório. [3]. Além disso, estes dispositivos analíticos utilizam biomoléculas imobilizadas em transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta da glucose. [8] [9]

Estes dispositivos combinam a seletividade de interação com o analito de interesse de um componente biológico/químico ativo, denominado por elemento de (bio)reconhecimento, com a sensibilidade de um transdutor para converter essa interação num sinal proporcional à concentração do analito. [10]

Um biossensor baseia-se na seletividade e na alta sensibilidade do componente biológico/químico para o composto alvo. A interação entre o elemento de reconhecimento e o composto alvo origina a variação de um ou mais parâmetros físico-químicos, convertidos num sinal quantitativo através de um transdutor adequado (**Figura 2**). [11]

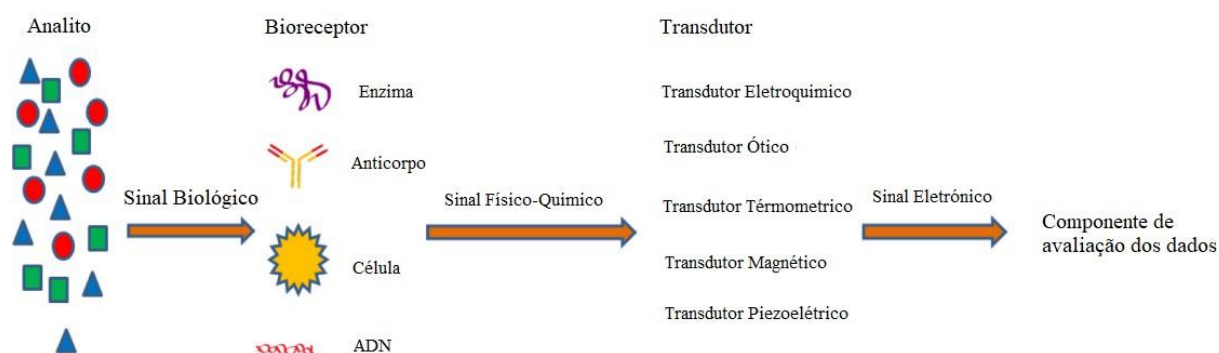


Fig. 2. Constituição de um biossensor (adaptado de [11]).

O biossensor também pode ser usado como um instrumento de análise, mas para tal deve apresentar as características específicas. Incluem-se aqui uma elevada seletividade, uma resposta para uma gama alargada de concentrações, com alta sensibilidade, exatidão e precisão, num curto tempo de resposta, permitindo uma elevada frequência de amostragem, uma estabilidade operacional e uma elevada reprodutibilidade dos resultados. [12]

A construção do biossensor depende, sobretudo, da aplicação para a qual é desenvolvido. Incluem-se aqui vários aspetos analíticos relevantes como sensibilidade, características da amostra (composição, estabilidade, volume disponível), custo, tempo de vida útil e uso específico. Geralmente, o elemento mais importante de um biossensor é o elemento de reconhecimento, uma vez que este determina o grau de seletividade ou especificidade do dispositivo. [11]. A gama de concentrações de analito para o qual o dispositivo é sensível encontra-se muitas vezes associada ao sistema de transdução utilizado, destacando-se aqui os dispositivos eletroquímicos face ao seu elevado sucesso comercial. [12]

Num contexto onde a aplicação de um dispositivo pressupõe a análise de amostras complexas, como o sangue, a seleção do material biológico/químico e do transdutor apropriados é, por isso, muito relevante. [\[11\]](#) [\[12\]](#)

2.5.1 Elemento de (Bio)reconhecimento

O elemento de reconhecimento é um componente crítico do biossensor. Atualmente, um biossensor contém um elemento de reconhecimento de origem biológica, como biomoléculas, organelos ou células, de origem sintética, como materiais (bio)miméticos que, sendo preparados em laboratório, mimetizam algumas propriedades dos materiais biológicos, a fim de permitir uma maior estabilidade e reprodutibilidade na função do biossensor. [\[13\]](#)

Cada elemento de reconhecimento deve conter um local de ligação para interagir com o analito, apresentar estabilidade face ao meio e as condições de medição e permitir a sua ligação a um suporte físico por métodos apropriados sem afetar o seu desempenho. O modo de atuação do elemento de reconhecimento perante o analito alvo varia de acordo com a natureza do próprio elemento de reconhecimento. O elemento de reconhecimento pode interagir com o analito por processos de afinidade, como é o caso da interação entre um com anticorpo e o seu antígeno, ou por ação catalítica, como é o caso da atuação de uma enzima sobre o seu substrato. As enzimas e os anticorpos são efetivamente os elementos de reconhecimento mais utilizados em biossensores. [\[11\]](#)

Existem vários tipos de elementos de reconhecimento, nomeadamente, as proteínas recetoras, anticorpos, antígenos, enzimas, polímeros de impressão molecular e os ácidos nucleicos. [\[11\]](#)

Quando o elemento de reconhecimento do biossensor é uma enzima, o biossensor toma a denominação de enzimático. Estes biossensores foram os primeiros a aparecer e têm como vantagem, o fato das enzimas serem catalisadores biológicos, altamente seletivos. Existem, porém, algumas desvantagens associadas a estes dispositivos, nomeadamente a reduzida estabilidade destes materiais de origem biológica, alterando a sua atuação mediante a variação de pH, de temperatura e de pressão associadas ao meio de medida. [\[13\]](#)

Os biossensores que utilizam anticorpos como elementos de reconhecimento são denominados imunossensores. Tipicamente, os anticorpos encontram-se ligados ao

transdutor, sendo a ligação anticorpo/antigénio passível de ser detetada por vários transdutores. A grande vantagem da utilização de anticorpos prende-se com a elevada afinidade e seletividade que estes materiais apresentam para com o antigénio alvo, permitindo o contacto direto do biossensor com amostras de grande complexidade. Porém, tal como as enzimas, a sua atuação varia com as condições externas do meio. [13] Neste contexto, os recetores de origem sintética que tentam mimetizar as propriedades de materiais biológicos têm vindo a assumir um papel crescente no domínio dos biossensores. [11] [13]

Uma abordagem alternativa aos elementos de reconhecimento biológico natural é o uso de sistemas (bio)miméticos, que são capazes de se ligar às moléculas alvo com afinidade e seletividade aproximando-se dos sistemas anticorpo-antigénio. Os PIMs têm várias vantagens quando comparados aos anticorpos naturais como por exemplo, maior estabilidade, robustez, excelente estabilidade química e térmica, apresentam custo-benefício na fabricação e podem ser armazenados em estado seco à temperatura ambiente por um longo tempo. Além disso, oferecem uma alternativa de baixo custo, sensível e altamente seletiva como recetores, normalmente, para biossensores eletroquímicos. [14] [15]

Portanto, os materiais de impressão molecular fornecem uma abordagem interessante para a deteção da glucose em detrimento dos biossensores comerciais que usam a enzima. Este processo consiste num processo de copolimerização entre monómeros funcionais e *cross-linkers* (agentes reticulantes) na presença do analito alvo que deve, após a remoção, reconhecer seletivamente a molécula. [16]

O polímero é, genericamente, sintetizado por impressão molecular, criando cavidades na matriz polimérica com afinidade para molécula modelo escolhida. Após a sua remoção, ficam os locais de ligação que são complementares à molécula e capazes de reconhecer essas moléculas, conforme representado na **Figura 3**. O tamanho e a estrutura das cavidades determinam a seletividade que o PIM apresenta parece reconhecer a molécula modelo. Em processos de impressão covalente, o PIM estabelece ligações covalente com a molécula alvo; em processos de impressão não covalente, há interações electrostáticas (iónicas, polares e pontes de hidrogénio) entre os grupos funcionais nos monómeros utilizados e a molécula alvo. [18]

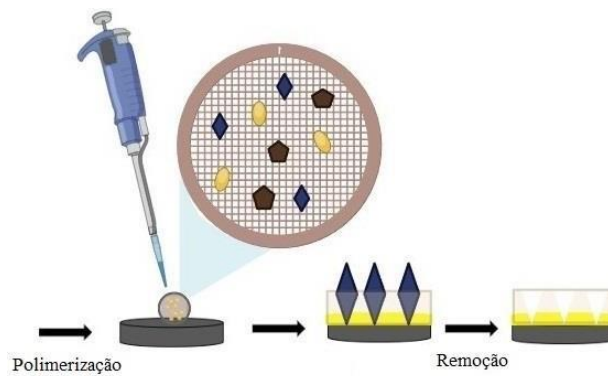


Fig. 3. Esquema de um biossensor baseado num PIM.

O processo de preparação do PIM tem como base, geralmente, três passos essenciais: 1) a incubação do monómero e da molécula alvo, de forma que haja interações e ligações entre ambos; 2) o uso de *cross-linkers* (agentes reticulantes) e iniciadores que sob condições elétricas/térmicas adequadas conduzem à formação de um polímero reticulado à volta da molécula alvo; 3) e a remoção da molécula alvo, que revela as cavidades complementares à molécula alvo, do ponto de vista da sua dimensão e das suas características eletrostáticas (**Figura 4**), para as quais a molécula alvo apresenta elevada afinidade. [18]



Fig. 4. Esquema dos vários passos para formação do PIM (adaptado de [18]).

A polimerização com radicais livres é a forma mais tradicional para a produção de um PIM. Quando realizada em grande escala, esta técnica revela-se pouco eficiente, pois leva a perdas substanciais de polímero e da molécula alvo [18]. É neste contexto que a eletropolimerização surgiu na literatura como alternativa à polimerização impressa. O PIM é produzido diretamente na superfície do transdutor, num filme fino, que proporciona muitas vantagens, como o controlo eficaz da espessura do polímero, a preparação rápida e a ligação mais firme e robusta à superfície do transdutor.

A eletropolimerização baseia-se na oxidação e redução do monómeros funcionais, a partir de potenciais aplicados. O processo inicia-se com a oxidação do monómero, que gera um crescimento da estrutura polimérica, na superfície do transdutor (que pode ser constituído por um vidro condutor, carbono ou metais) [19]. As interações entre catiões e monómeros neutros, catalisam o crescimento e formação do polímero [19]. Os radicais catiões surgem quando há oxidação dos átomos na superfície do eléctrodo. A espessura da matriz do PIM é controlada a partir do número de ciclos ou até do método/potencial aplicado no eléctrodo de trabalho. [20]

Quando a eletropolimerização se encontra concluída, há a formação de uma matriz polimérica com a molécula alvo inserida na matriz reticulada, que se encontra no eléctrodo de trabalho. Depois da remoção molécula alvo, surgem pequenas cavidades com elevada afinidade para a molécula alvo. Se o analito de interesse coincidir com o modelo, acontece a ligação exatamente nas cavidades, que gera mudanças nas propriedades eletroquímicas do sistema que podem ser detetadas e medidas. [18]

Há uma diversidade de técnicas de impressão polimérica: impressão em superfície, polimerização em *bulk* e impressão em epítipo. Para moléculas de tamanho reduzido (como é o caso da glucose), a técnica de eleição é a polimerização em *bulk*. Esta polimerização consiste numa mistura de todos as componentes (molécula modelo, monómeros etc.), que é depositada na superfície do eléctrodo, sendo depois aplicada uma condição eletroquímica adequada à formação *in-situ* do polímero [21].

2.5.2 Transdução do sinal

Um elemento de reconhecimento molecular pode ser interligado a um número diferente de transdutores de sinal. O transdutor converte o sinal molecular num sinal eléctrico ou digital, que pode ser quantificado, exibido e analisado. Os transdutores encaixam em quatro categorias gerais: eletroquímicos (ou seja, amperimétricos e potenciométricos), óticos (ou seja, colorimétricos, fluorescentes), com base em massa (ou seja, piezoeléctricos e de ondas acústicas) e calorimétricos (com base temperatura). [13]

O transdutor de um biossensor deve permitir a adaptação do elemento de reconhecimento, tendo como objetivo oferecer selectividade para a monitorização da propriedade medida e sensibilidade para a variação em curso na gama de concentrações de interesse [13].

2.5.3 Biossensores Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos são atualmente o tipo mais comum de biossensor devido à sua portabilidade, simplicidade, sensibilidade, custo, tamanho, reposta rápida facilidade de uso, não necessitando de um pré-tratamento da amostra e permitindo efetuar determinações num intervalo alargado de concentrações. Os biossensores eletroquímicos podem ser usados em casa ou no consultório do médico como dispositivos POC. [13]

As componentes principais de um biossensor, são o recetor e o transdutor. A classificação dos biossensores, é muitas vezes baseada no elemento transdutor. Nos biossensores eletroquímicos, os transdutores são elétrodos. [13] Atualmente, estes elétrodos tendem a assumir dimensões cada vez mais reduzidas, requerendo quantidades cada vez mais reduzidas de material condutor. Foi com esta visão que o aparecimento de elétrodos impressos (*Screen Printed Electrodes*, SPEs) se tornou um sucesso científico e de mercado. Os SPEs possuem três elétrodos essenciais: um elétrodo de trabalho (ET), um contra elétrodo (CE) e um elétrodo de referência (ER) (**Figura 5**).

O ET é o local onde ocorrem as modificações na superfície, com proteínas, biomoléculas, que contêm afinidade para com a molécula alvo, tendo em vista a sua deteção. [22] As modificações na superfície variam de acordo com o crescimento do filme polimérico, a taxa de polimerização e a oxidação do monómero. [19] A constituição e o comportamento eletroquímico desta superfície podem variar, de acordo com o material que é utilizado, como materiais condutores (metais) e nano materiais de carbono.



Fig. 5. Esquema dos constituintes de SPE comercial (adaptada da Metrohm DropSens).

A técnica para a produção dos SPEs é chamada de *screen printing*, encontrando-se descrita na Figura 6. Esta técnica envolve a deposição e dispersão de uma, ou várias, camadas de um elemento condutor (carbono, prata, ouro), em fase líquida, sobre um

molde presente na superfície de um substrato (PVC, do inglês, *poly(vinyl chloride)*, cerâmica, cortiça). Após a deposição do material condutor líquido segue-se um tratamento térmico, geralmente em estufa, para favorecer a cura do material e melhorar as propriedades elétricas do material obtido [23]. É uma técnica que apresenta robustez, reprodutibilidade, baixo custo e excelentes resultados. representado na **Figura 6**.

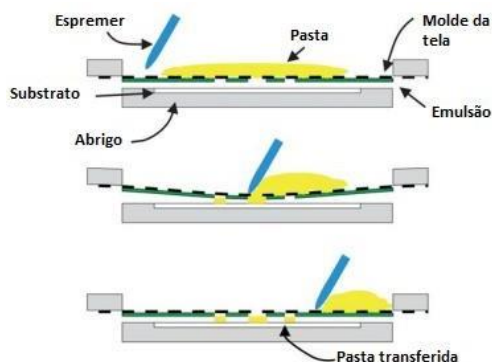


Fig. 6. Técnica de fabricação de SPE (adaptado de [23]).

As reações eletroquímicas que acontecem na superfície do eletrodo são detetadas, interpretadas e analisadas pelos biossensores eletroquímicos, ou seja, há um sinal que se baseia no aumento e/ou no decréscimo da resposta eletroquímica do eletrodo, que tem variações consoante a concentração do analito de interesse. [24]

Os elementos de reconhecimento (antígenos/anticorpos, ácidos nucleicos, proteínas recetoras) são responsáveis por reconhecer com afinidade a molécula alvo, gerando interações que são detetadas e medidas em forma de correntes, potenciais, mudanças na impedância ou na concentração de iões do sistema. [25]

Esta medição eletroquímica pode ser realizada a partir de várias técnicas, entre elas a amperometria, voltametria cíclica (CV, do inglês, *cyclic voltammetry*), voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, *squared wave voltammetry*), técnicas potenciométricas e impedimétricas, tal como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*). [22]

2.5.3.1 Amperometria

É uma técnica eletroanalítica, que se baseia na aplicação de um potencial fixo, na superfície de um eletrodo de trabalho, no qual é gerada uma corrente farádica passível de ser medida e quantificada. Esta corrente, resulta na troca de eletrões a partir da oxidação e redução dos compostos envolvidos, e é proporcional a concentração do analito. [26]

A ausência de potencial de varrimento é o que difere a amperometria da voltametria, uma técnica explicada mais adiante nesta dissertação. A grande vantagem desta técnica é o baixo limite de deteção (LD) associado, uma vez que a fixação do potencial resulta numa corrente insignificante necessária para a aplicação do potencial no sistema, diminuindo o sinal de ruído de fundo que afeta o LD negativamente. [27]

2.5.3.2 Cronoamperometria

É um método em que a corrente no estado estacionário é medida em função do tempo, sendo aplicada um potencial de onda quadrada na superfície do ET, suficiente para que aconteça uma reação química, a partir do qual a corrente é analisada em relação a sua resposta temporal. Há transformações permanentes que ocorrem na interface entre a solução e o eletrodo (ex. formação do PIM). [26]

2.5.3.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A medida de Impedância pode ser extremamente útil em sistemas eletroquímicos. São métodos que funcionam a partir de pequenas perturbações de baixa amplitude aplicadas no eletrodo, sendo esta a diferença em relação a outras técnicas que envolvem varrimentos lineares ou degrau de potencial. [28]

A impedância tem duas componentes, a resistência e a reactância, [29] e o que se avalia são as mudanças que acontecem na resistência e na reactância, após esta perturbação. A resistência deriva das colisões entre partículas carregadas condutoras e a reactância é a oposição ao movimento de partículas carregadas. A impedância é medida consoante a resposta da corrente gerada pela voltagem de baixa amplitude aplicada. [29] [28] O rácio do pico do valor da voltagem (V) máxima presente no circuito e a corrente máxima é a impedância. [29]

$$Z(t) = \frac{V(t)}{I(t)}$$

A corrente I é medida no ET. O ER é a referência para conhecer-se o valor do potencial elétrico entre a solução e contacto metálico. O CE mantém a voltagem desejada no elétrodo e fornece corrente para a solução, sendo esta voltagem monitorizada pelo ER. [30]

As mudanças nas propriedades elétricas na superfície do elétrodo são detetadas pelos eventos de (bio)reconhecimento e monitorizadas por técnicas de impedância. [31] A impedância é um valor complexo, sendo composta por uma parte real Z_R e uma parte imaginária Z_I , composta por uma fase Φ e um módulo $|Z|$ (Figura 7), podendo ser descrita de ambas as formas (Figura 7). [32] [28]

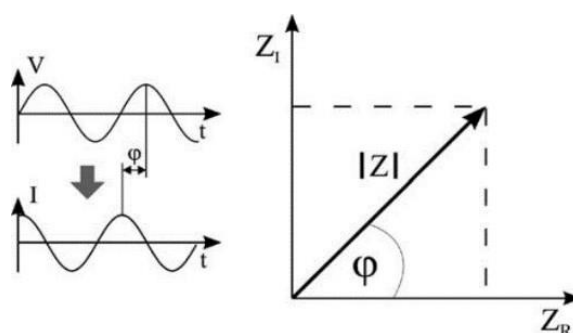


Fig. 7. Componentes da Impedância [32].

A impedância é determinada em diferentes frequências, obtendo um espectro de impedância. [32] O EIS é essencialmente a aplicação de uma corrente alternada sinusoidal de baixa amplitude, gerada a partir de uma voltagem de 2-10 mV, que permite testar e medir as propriedades resistivas e capacitivas dos materiais. [33]

Um circuito equivalente é geralmente usado para analisar o espectro obtido. Tipicamente usa-se o circuito de *Randles*, quando existe contacto entre o eletrólito e o elétrodo. Este circuito baseia-se numa aproximação experimental com elementos de um circuito adaptados ao processo eletroquímico, nomeadamente resistência (R), capacitância (C), impedância de Warburg, e um elemento de constante fase (CPE), em conformações paralelas ou em série (Figura 8). [33] [28] A componente R_s descrita no circuito corresponde à resistência da solução; R_{ct} à resistência da transferência de carga; C_{dl} a um

condensador de camada dupla e W à impedância de Warburg. [32] O fluxo da corrente produzido pelas reações redox na interface corresponde ao R_{ct} ; o R_s corresponde à resistência da solução; o C_{dl} é resultado do armazenamento de carga na interface das duas camadas; e W é a impedância da corrente resultante da difusão da solução para a interface. [32] Os valores de R_s e de R_{ct} podem ser determinados através da representação gráfica de *Nyquist*, conforme detalhado na **Figura 9**. [33]

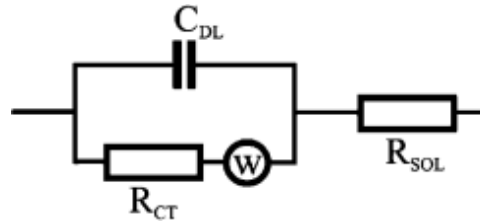


Fig. 8. Circuito equivalente de Randles. [32]

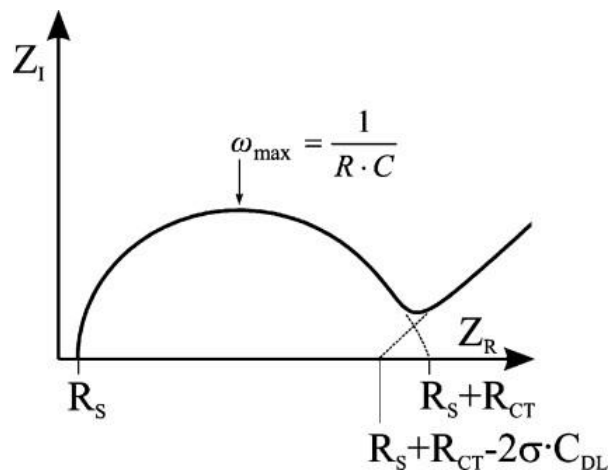


Fig. 9. Descrição das componentes da impedância. [32]

De uma forma geral, a grande vantagem da EIS, quando comparada com outras técnicas eletroquímicas, decorre do facto de não alterar a superfície por ação potenciais aplicados, já que os valores de potencial aplicados são muito baixos.

2.5.3.4 Voltametria

A voltametria é uma técnica amperimétrica na qual é efetuado o varrimento dos valores de potencial numa determinada gama de valores. [31] Existem várias formas de aplicar este varrimento de potencial [31], entre as quais a voltametria cíclica (CV, do inglês, *cyclic voltammetry*), sendo esta possivelmente a mais utilizada. Na CV existe uma

alternância entre dois valores da voltagem, V1 e V2, a uma determinada taxa. Quando o potencial atinge V2 regressa novamente para V1. [31] A taxa de varrimento é o rácio entre as diferenças dos potenciais e dos intervalos temporais. [31]

$$\text{Taxa de varrimento} = (V2 - V1)/(t2 - t1)$$

A voltagem é medida entre o ET e o ER, enquanto a corrente é entre o ET e o CE. Sendo a corrente inversamente proporcional à voltagem, a corrente diminui quando há um aumento da voltagem, em prol do V2, e quando passa o potencial de redução eletroquímico do analito, um pico é formado devido ao potencial de oxidação que foi ultrapassado. Quando a voltagem é invertida e aumenta em prol de V1, existe uma reoxidação que produz um aumento na corrente. Então a corrente diminui e o segundo pico é formado. [31][26] Outra técnica voltamétrica bastante utilizada é a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, *squared wave voltammetry*), na qual o sinal de excitação é composto por um pulso simétrico de onda quadrada de amplitude, realizado com uma forma de onda em escada, com uma altura em degrau. A corrente líquida é determinada medindo a diferença entre as correntes diretas e reversas. A SWV é considerada uma ferramenta essencial para a deteção de biomoléculas relevantes, como proteínas, ácidos nucleicos, etc., apresentando como vantagens a elevada taxa de varrimento durante a análise para um baixo consumo de espécies eletroativas. [26] A voltametria de impulso diferencial (DPV, do inglês, *differential pulse voltammetry*) é também uma técnica voltamétrica relevante. Nesta técnica são efetuados impulsos de pequena amplitude que promovem a sensibilidade e a precisão do método. A DPV permite a aplicação do potencial com uma série de impulsos sequenciais com amplitudes fixas e contínuas. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do impulso e após o término do impulso, sendo determinada a diferença entre ambos os valores atuais. A representação do pico traça a diferença atual para cada ponto de impulso em função do potencial [26].

No seu conjunto, as técnicas eletroquímicas permitem uma análise versátil do desempenho analítico dos biossensores eletroquímicos, fornecendo informação muito relevante sobre os fenómenos de interface entre o eléctrodo e a solução, que conduz a aplicações analíticas sensíveis, com capacidade para detetar baixos níveis de concentração de analito.

2.6 Biossensores de glucose

O aparecimento dos biossensores permitiu que o processo de medição de glucose fosse bastante facilitado, ultrapassando os inúmeros inconvenientes decorrentes da necessidade de deslocação de um paciente a um laboratório de análises, várias vezes ao dia. Além disso, o processo de medição em si é fácil e rápido, como a facilidade e a rapidez da medição. Embora os eletroquímicos sejam os mais comuns, existem hoje vários dispositivos para a monitorização da glucose, recorrendo a elementos de bio(reconhecimento) e de transdução diferentes. Essa diversidade está patente na **Figura 10**. [11]

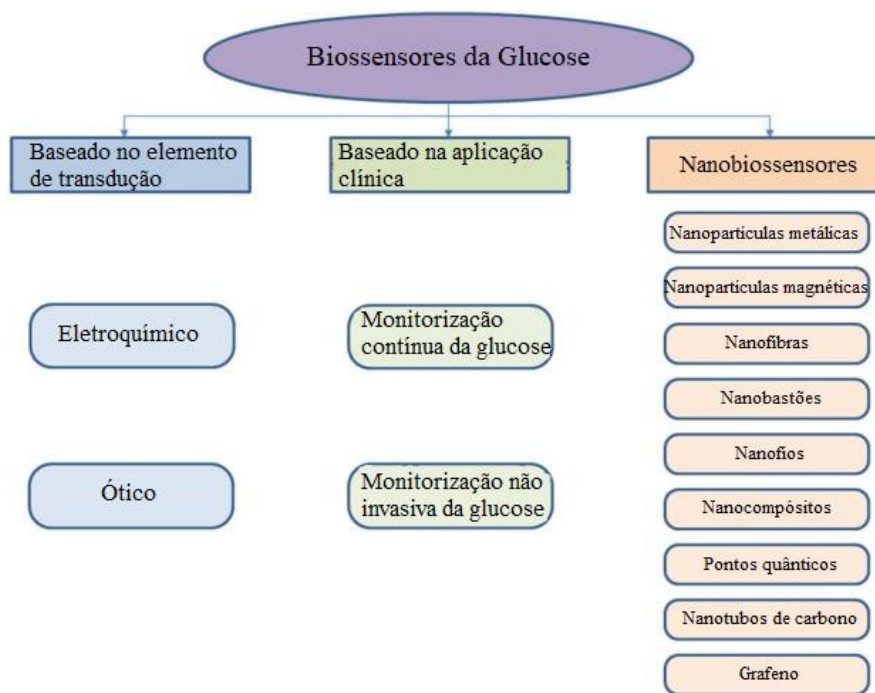


Fig. 10. Classificação dos biossensores da glucose (adaptado de [11]).

Nesta dissertação foram considerados, em particular, os biossensores eletroquímicos, uma vez que este é o tópico principal deste plano. Estes dispositivos são atualmente muito utilizados devido à sua versatilidade, elevada sensibilidade, seletividade, custo reduzido, resposta rápida em contexto POC, como referido anteriormente. Existem vários tipos de biossensores, mas os mais usados na deteção da glucose são os amperimétricos, que permitem a análise do fluxo de eletrões, gerando uma corrente entre as espécies químicas [11].

Os biossensores eletroquímicos são os dispositivos de eleição para a detecção da glucose, recorrendo a uma ou mais enzimas para catalisar e mediar a transferência de elétrons entre o analito e a elétrodo. Na detecção específica da glucose é frequente o uso da Glucose Oxidase (GOx), por ser estável, possuindo uma grande afinidade com o analito (glucose) e ter uma grande ação catalítica. [11] [34] A escolha de um mediador redox para avaliar as transferências eletrônicas e modificações na superfície deve ser feita mediante a apresentação de várias características que favoreçam a reação, tais como:

- ter uma boa mobilidade na matriz;
- ser estável e electroquimicamente reversível (estados de oxidação /redução);
- manter o pH do sistema;
- permitir uma similaridade entre o potencial redox e o cofator da enzima;
- não permitir reações que afetem a matriz;
- efetuar uma mediação rápida. [11]

2.8 Mediador Redox

O dinucleótido de flavina e adenina (FAD, do inglês *flavin adenine dinucleotide*), é uma coenzima que participa ativamente no metabolismo da glucose (**Figura 11**), capaz de sofrer oxidação e redução de modo reversível. Além disso, possui uma excelente afinidade com a glucose. [35] [36]

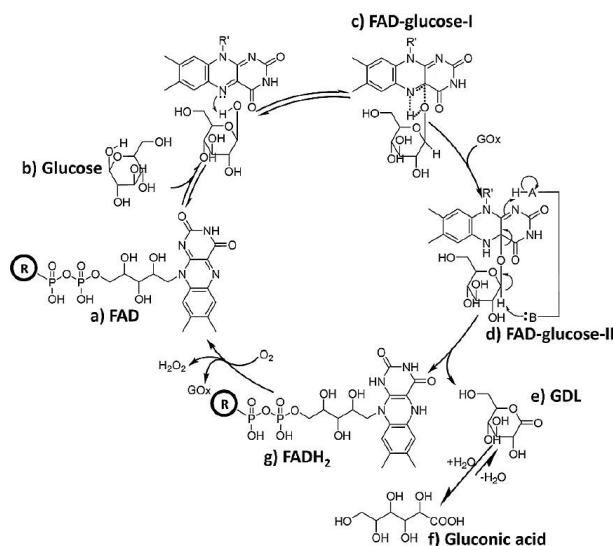


Fig. 11. Representação esquemática do papel possível do FAD para a oxidação catalítica da glucose (adaptado de [35]).

A reação consiste na transferência de hidretos (H-H) durante o contacto entre o FAD e a glucose, no esquema a). O FAD ao entrar em contacto com a glucose promove a oxidação da glucose, que perde dois eletrões. Neste caso, há transferência de hidretos, em b), formando-se um complexo FAD-glucose I, em c). [35] Na GOx existe um resíduo ácido enzimático, no grupo básico na GOx, que facilita a transferência de um par protão/eletrão entre as 3 moléculas de FAD, GOx, e Glucose em d). Isto inclui um ataque nucleofílico pelos eletrões no núcleo lumi-flavin do FAD, que é seguido de uma desprotonação da glucose e conseqüente rearranjo que é a troca de hidretos, da glucose para a flavina, que resulta na formação do intermediário FAD-Glucose II d). O FAD depois reduz-se para FADH₂ e outra espécie oxidada o AGL (Ácido Glucónico), que aparece como resultado da clivagem do complexo FAD-glucose II. [35] A hidrolisação do GDL (Glucona Delta Lactona) dá origem ao AGL f); depois o FAD é reduzido e a glucose oxidada. O FADH₂ pode ser reoxidado para FAD em conjunto com o O₂, com libertação do H₂O₂ g), finalizando o ciclo de novo para o FAD. [35]

2.9 Biossensores eletroquímicos com impressão molecular para a glucose

Atualmente, foram desenvolvidos vários biossensores eletroquímicos para a deteção da glucose baseados na técnica de impressão molecular, resumidos na **Tabela 1.**

Tabela 1- Biossensores eletroquímicos para a detecção da glucose.

Substrato	Técnica Eletroquímica	Matriz	LOD original	LOD [μM]	Gama Linear [μM]	Ref.
GCE	CV/EIS	Pirrol	$1,0 \times 10^{-6}$ M	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-8}$ a $5,0 \times 10^{-6}$	[37]
Au	EPC/DPV/CV	EHA	10 mM	10×10^{-3}	200 a 8×10^{-3}	[38]
C	EIS	CAF	$1,0 \times 10^{-10}$ g/L	$8,84 \times 10^{-7}$	$8,84 \times 10^{-6}$ a 8,84	[39]
Ni	CV	Quitosano	2,0 μM	2,0	10 a 200	[40]
C	CV	Quitosano	4,01 μM	4,01	12,2 a $2,3 \times 10^3$	[41]
NaOH	XPS	Nafion e poliuretano	0,65 μM	0,65	1,0 a 25×10^3	[23]

CAF: Ácido cafeico **CV:** Voltametria Cíclica, do inglês, *cyclic voltammetry*; **EIS:** Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*; **EPC:** Eletrólise de potencial controlado; **DPV:** baseado em *differential pulse voltammetry*; **EHA:** Etilhexilacrilato; **GCE:** Eléctrodo de carbono vítreo; **XPS:** Espectroscopia fotoeletrônica de raio-X.

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo será apresentada uma descrição pormenorizada do material, dos reagentes e dos equipamentos utilizados, bem como os procedimentos experimentais necessários para a construção do biossensor eletroquímico baseado na impressão molecular (PIM) para a deteção da glucose. Para além do PIM, é também usado um polímero não impresso molecularmente (PNI), como controlo, preparado na ausência da glucose.

3.1 Equipamento

As medidas eletroquímicas foram avaliadas com um potencióstato/galvanóstato da PalmSense (**Figura 12 A**), controlado pelo software PSTrace eletroquímico 5.9 (**Figura 12 B**). Os eléctrodos de carbono foram produzidos no laboratório, através da técnica *screen-printing*, utilizando uma tinta de carbono adequada (**Figura 12 C**). Estes foram interligados ao potencióstato/galvanóstato por uma caixa produzida no laboratório (**Figura 12 D**).

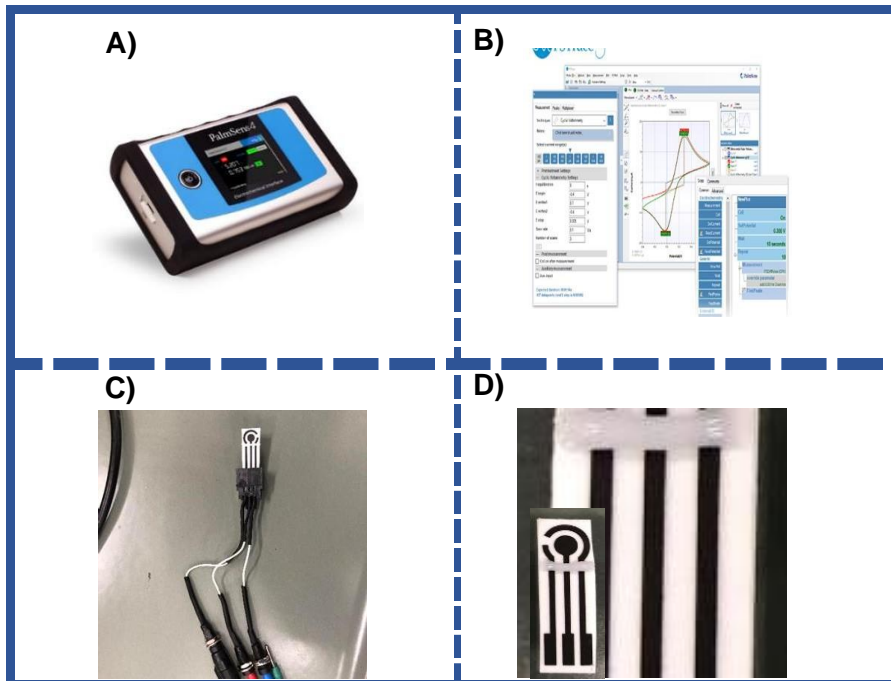


Fig. 12: A) Potencióstato / galvanóstato PalmSense; B) Software eletroquímico PSTrace 5.9; C) Caixa de leitura dos eléctrodos; D) SPE produzido no laboratório.

3.2 Reagentes

Ao longo deste plano, todos os reagentes foram utilizados conforme adquiridos. Hexacianoferrato de potássio (II) ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$) foi obtido na PanReac AppliChem; Hexacianoferrato de potássio (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) foi adquirido na Carlo Erba; Cloreto de Potássio (KCl) foi obtido na Honeywell Fluka; Tampão fosfato-salino (PBS) foi obtido na Sigma-Aldrich; Glucose Monohidratada ($C_6H_{12}O_6.H_2O$) foi obtido no Alfa Aesar; Pirrol (C_4H_5N) foi obtido pelo TCI (*Tokyo Chemical Industry*); FAD hidratada ($C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2$). $\times H_2O$ foi obtido na Thermoscientific e a Pasta de carbono foi obtido na Sun Chemical.

3.3 Soluções

Ao longo de todo este plano, foi utilizada Água Milli-Q ultrapura. A otimização da limpeza dos eletrodos foi avaliada com 0.1M KCl em Água Milli-Q ultrapura. Para avaliar as alterações eletroquímicas que decorreram na superfície do ET, durante o processo de limpeza, foi preparada uma solução de $5,0 \times 10^{-3} M [Fe(CN)_6]^{4-}$ e $[Fe(CN)_6]^{3-}$ em 0.1M PBS (pH = 7.4).

As soluções do PIM e do PNI foram otimizadas ao longo do plano, o que implica alterações nas concentrações do monómero e/ou proteína. As soluções do PNI foram preparadas em 0.1M de PBS, com uma concentração de Pirrol de $1,0 \times 10^{-3} M$, $1,0 \times 10^{-2} M$ e $1,0 \times 10^{-1} M$ e com uma concentração de FAD de $1,0 \times 10^{-3} M$, $10,0 \times 10^{-3} M$, $25,0 \times 10^{-3} M$, $50,0 \times 10^{-3} M$ e, por fim, $100,0 \times 10^{-3} M$.

As soluções do PIM foram preparadas com concentrações de glucose de $10,0 \times 10^{-3} M$ e $100,0 \times 10^{-3} M$, com uma concentração de Pirrol de $1,0 \times 10^{-3} M$, $1,0 \times 10^{-2} M$ e $1,0 \times 10^{-1} M$ e com uma concentração de FAD de $1,0 \times 10^{-3} M$, $10,0 \times 10^{-3} M$, $25,0 \times 10^{-3} M$, $50,0 \times 10^{-3} M$ e, por fim, $100,0 \times 10^{-3} M$.

Após a modificação da superfície do ET, foram realizadas várias leituras sucessivas com uma solução desarejada de 0,1 M KCl em Água Milli-Q ultrapura.

Para avaliar a performance analítica do biossensor, foram preparadas diferentes concentrações de glucose em 0,1 M de PBS.

3.4 Homemade SPE's

O *screen-printing* é uma técnica que consiste em espalhar uma tinta através de uma superfície, de forma a criar um design impresso. A grande vantagem desta técnica é a produção de uma vasta gama de substratos rígidos ou flexíveis, que incluem superfícies que podem esticar, usando diferentes materiais. [43] [23]

A produção destes sensores, que foram utilizados ao longo deste projeto, requerem tinta de carbono, que é aplicada camada por camada, sobre um substrato de PVC, que possui na sua estrutura o desenho de três elétrodos. Esta aplicação é feita pela técnica de *homemade screen-printed*. Entre cada deposição de tinta, os substratos vão à estufa durante 30 minutos, com temperatura de 60°C, para proceder à cura de cada camada. Uma vez que as camadas de tinta estão completas, as máscaras são removidas cuidadosamente, como é possível observar na **Figura 13**; posteriormente, é feita a limpeza dos resíduos de tinta, com azoto, como é possível observar na **Figura 14**.

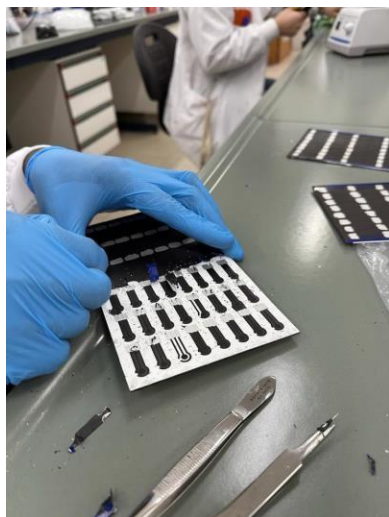


Fig. 13. Remoção das máscaras do substrato PVC.



Fig. 14. Remoção dos resíduos com azoto.

3.5 Procedimentos Eletroquímicos

As modificações na superfície do eléctrodo antes e após a limpeza eletroquímica foram seguidas pelas seguintes medidas eletroquímicas: CV, EIS, SWV. Estas medições foram realizadas com o mediador redox de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, preparado em 0.1M de PBS.

A CV utiliza potenciais de -0.3V a +0.7V, com uma velocidade de varrimento de 0.05 V/s. A EIS tem a perturbação de 0.01V de amplitude e frequência de 60, distribuídas numa escala logarítmica de 0.1 a 100000 Hz. Por fim, a SWV utiliza potenciais de -0.3V a +0.7V, com uma frequência de 2.0 Hz, e uma amplitude de 0.01V.

Após a polimerização do PIM e do PNI, as modificações na superfície do eléctrodo foram seguidas, através de leituras diretas em 0.1M KCl sem mediador redox, por DPV que utiliza potenciais de -1.3V a -0.6V.

Os eléctrodos foram lavados com água Milli-Q ultrapura e secos com azoto, entre cada incubação ou medida.

3.6 Pré-tratamento dos eléctrodos

Os eléctrodos produzidos através da tecnologia de *homemade screen-printed*, precisam de um pré-tratamento adequado. De acordo com a literatura, o pré-tratamento dos eléctrodos é fundamental para remover algumas impurezas que possam estar na superfície e para aumentar a reprodutibilidade em diferentes eléctrodos, de forma a começarem com o mesmo comportamento electroquímico. [44] [45]

Antes e após o tratamento dos eléctrodos, as características electroquímicas são avaliadas com três técnicas electroquímicas, como a CV (1 e 3 ciclos), a EIS e o SWV utilizando a solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Durante este trabalho, o pré-tratamento dos eléctrodos foi efetuado com KCl, através de CV, aplicando potenciais de -1.0V a +1.0V, onde foram testados diferentes números de ciclos, nomeadamente 15, 20, 30 e 40 ciclos de forma a otimizar a melhor condição.

Na limpeza com KCl, espera-se observar um maior fluxo de electrões no eléctrodo de trabalho, ou seja, é expectável um aumento a corrente e uma diminuição da impedância. Além disso, com esta limpeza a superfície fica mais hidrofílica introduzindo iões de cloreto (**Figura 15**).



Fig.15. Superfície do eléctrodo limpo com KCl.

3.7 Construção do PIM

A construção do PIM para a detecção da glucose envolve dois passos: a polimerização em *bulk* com a glucose e remoção com água. Em paralelo, foi realizada a construção do PNI, que funciona como controlo, é similar à do PIM, com exceção da presença da molécula-alvo. (Figura 16)

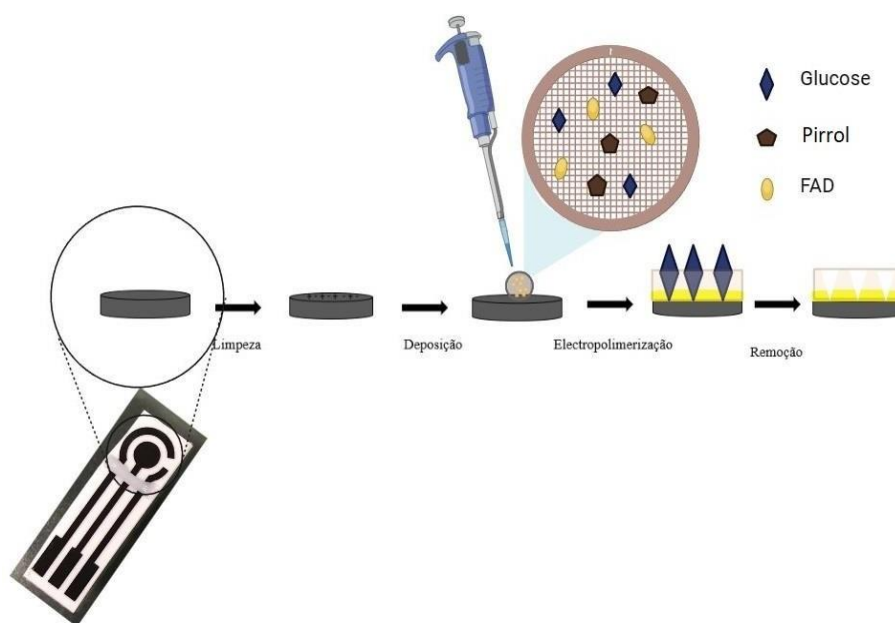


Fig. 16. Construção do PIM utilizando a polimerização em *Bulk* para a detecção da glucose.

O primeiro passo para a construção do biossensor foi a eletropolimerização do monómero em estudo, o pirrol (C_4H_5N), como é possível observar na Figura 17.

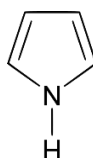


Fig. 17. Estrutura molecular do monómero Pirrol [46].

Devido à sua facilidade de oxidação, o pirrol é transformado em polipirrol, quando aplicado um potencial anódico na superfície do eletrodo, como é possível observar na Figura 18. [46]

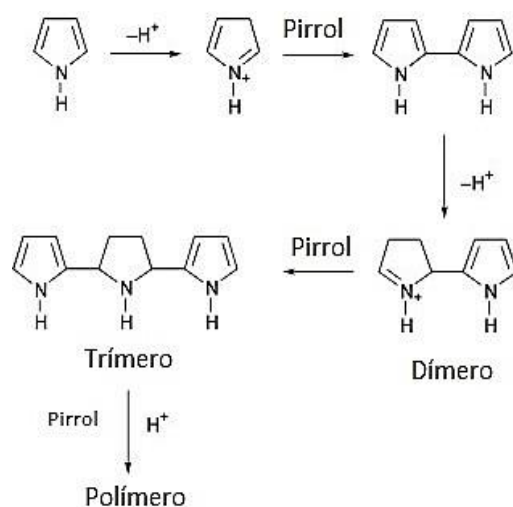


Fig.18 – Polimerização do Pirrol (adaptado de [46]).

3.8 Remoção da molécula-alvo

A remoção da molécula alvo, ou seja, da glucose, ocorre após a formação da matriz polimérica, que deixa cavidades que são complementares ao alvo. Este sensor PIM é criado após a remoção da glucose.

Para remover a glucose da matriz polimérica utilizou-se a água ultrapura. O ET foi incubado com a água, à temperatura ambiente e em câmara húmida. Foram testados diferentes tempos de incubação de forma a não danificar a estrutura polimérica e remover a molécula alvo. A remoção foi efetuada tanto no PIM como no PNI (controlo).

3.9 Performance analítica

O desempenho analítico do biossensor foi avaliado através da curva de calibração, recorrendo ao DPV. Para tal, foram usadas concentrações crescentes da glucose, incubadas no ET, durante 30 minutos. As incubações foram realizadas à temperatura ambiente, numa câmara húmida (**Figura 19**).

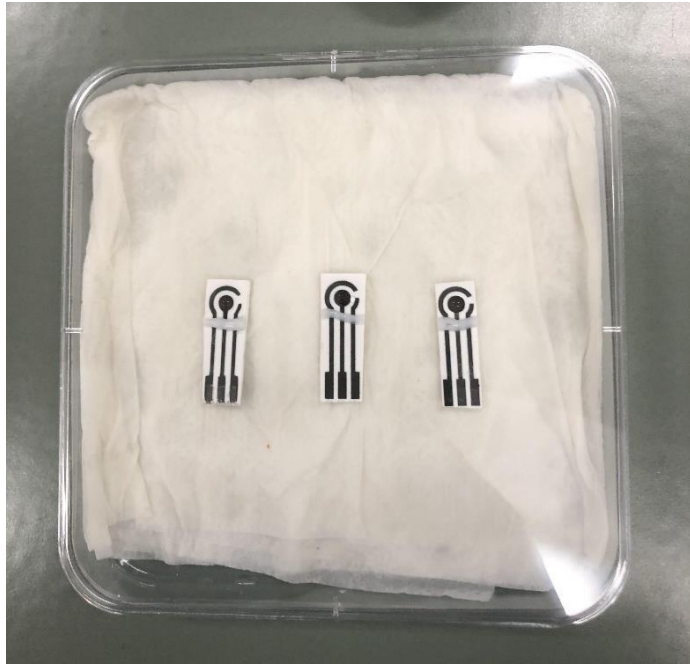


Fig. 19. Incubação das várias concentrações de glucose na câmara húmida.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos na construção do biossensor, bem como o seu desempenho analítico.

4.1 Métodos Eletroquímicos de Limpeza

As medidas eletroquímicas como CV, EIS e SWV foram utilizadas para avaliar as alterações eletroquímicas (valores de corrente e de impedância), antes e depois da limpeza usando a solução de ferro, como mediador redox.

Neste procedimento eletroquímico, foram avaliadas as alterações induzidas pela limpeza com KCl. A limpeza dos SPEs de Carbono com KCl foi realizada por CV de -1.0V a +1.0V. Foram testados diferentes números de ciclo, nomeadamente 15, 20, 30 e 40 ciclos, a fim de encontrar o melhor procedimento de pré-tratamento. O objetivo deste pré-tratamento é melhorar o desempenho eletroquímico do eléctrodo bem como, aumentar a reprodutibilidade entre diferentes eléctrodos. Os resultados com 15 ciclos (**Figura 20**) mostram um pequeno aumento na corrente no CV (**Figura 20A**), de 132 μA , para 141 μA , e no VOC (**Figura 20C**) de 61.27 μA para 73.31 μA , enquanto no EIS (**Figura 20B**) ocorreu uma diminuição da resistência-transferência de carga de 286.3 Ω , para 218.8 Ω .

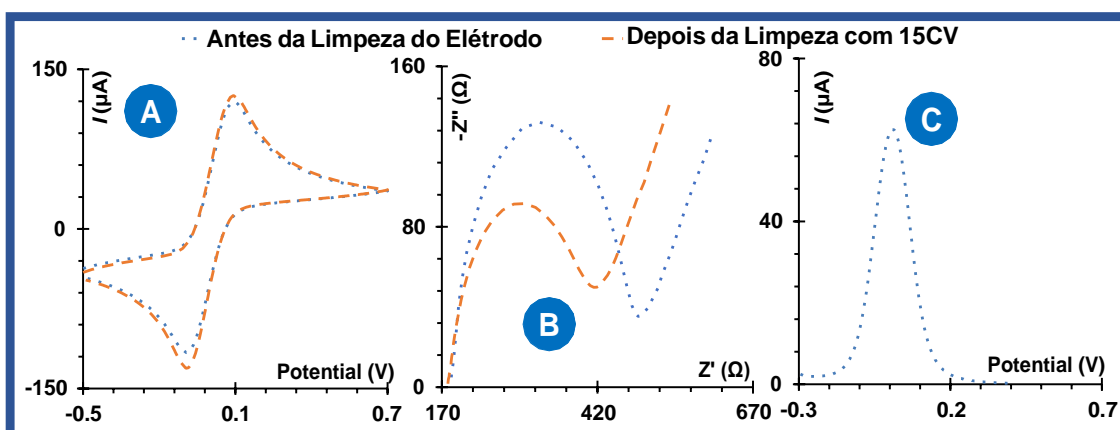


Fig. 20. Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 15 ciclos.

Seguidamente, foi testada a condição de 20 ciclos de limpeza. Após a limpeza é possível verificar também um pequeno aumento da corrente no CV (**Figura 21A**) de 137 μA para 147 μA e no SWV (**Figura 21C**) de 57.39 μA para 68 μA . No EIS (**Figura 21B**) é

possível observar uma diminuição da impedância, de 291.9 Ω para 234.2 Ω . Com esta limpeza, as alterações verificadas foram muito semelhantes com a limpeza com 15 ciclos.

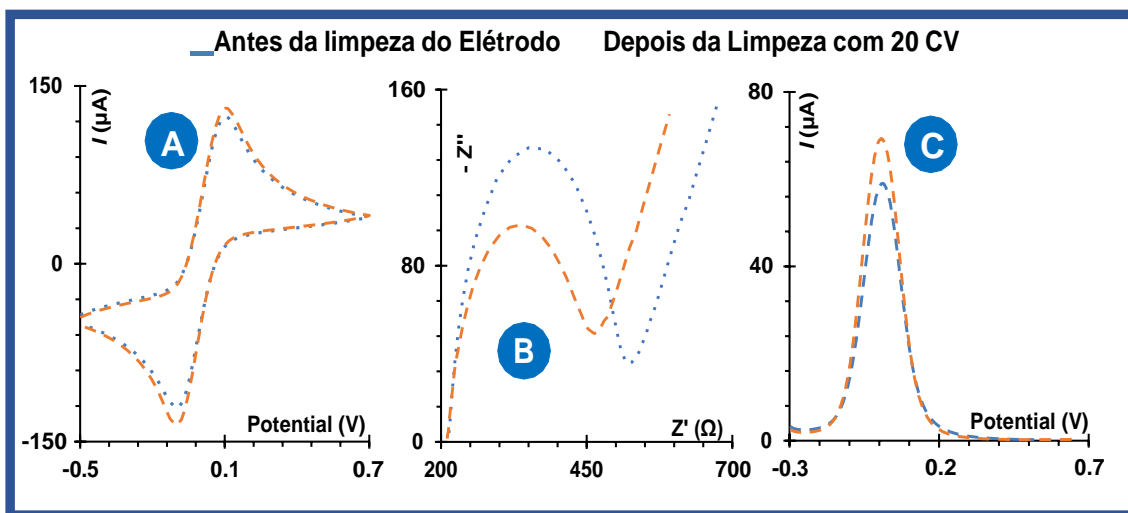


Fig. 21. Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 20 ciclos.

Como tal foi testada a limpeza com 30 ciclo, e os resultados mostram um aumento da corrente significativo na CV (**Figura 22A**) de 125 μA para 147 μA e no SWV (**Figura 22C**) de 58,40 μA para 79 μA . No EIS (**Figura 22B**) ocorre uma diminuição significativa do diâmetro do semicírculo, de 300,5 Ω para 191,1 Ω em comparação com os 15 e 20 ciclos, em que esse aumento da corrente e consequentemente, diminuição da impedância que foram mais ténues.

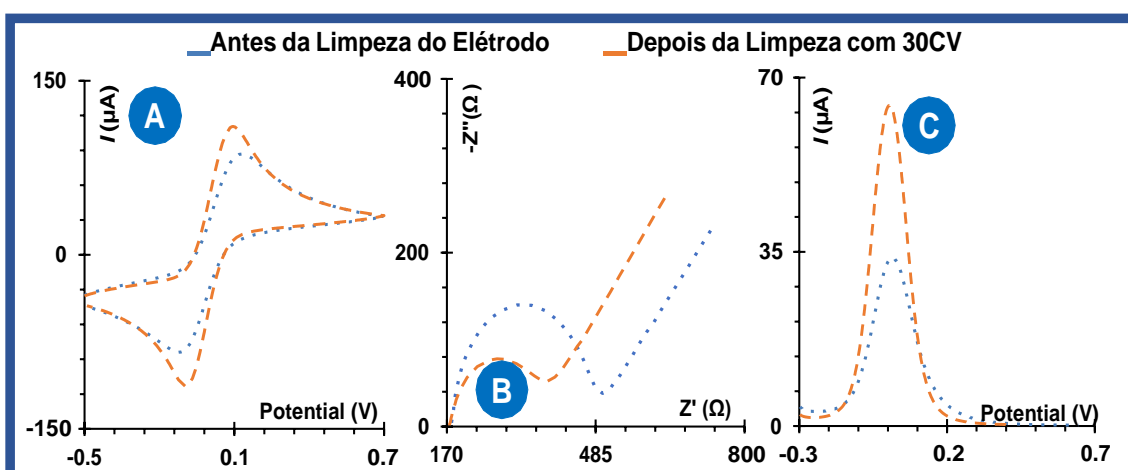


Fig. 22. Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 30 ciclos

Por fim, foi testado 40 ciclos de limpeza, para verificar se melhorava mais os sinais eletroquímicos depois do procedimento de limpeza. E verificou-se uma alteração pouco

significativa, relativamente ao procedimento que se efetuou com 30 ciclos. No entanto, na **Figura 23** é possível verificar um aumento da corrente no CV (**Figura 23A**) de 116 μA para 137 μA e no SWV (**Figura 23C**) de 49,39 μA para 72,74 μA . No EIS (**Figura 23B**) verificou-se uma diminuição também da impedância de 386,7 Ω para 206,9 Ω . Estas alterações são consistentes com os resultados apresentados anteriormente.

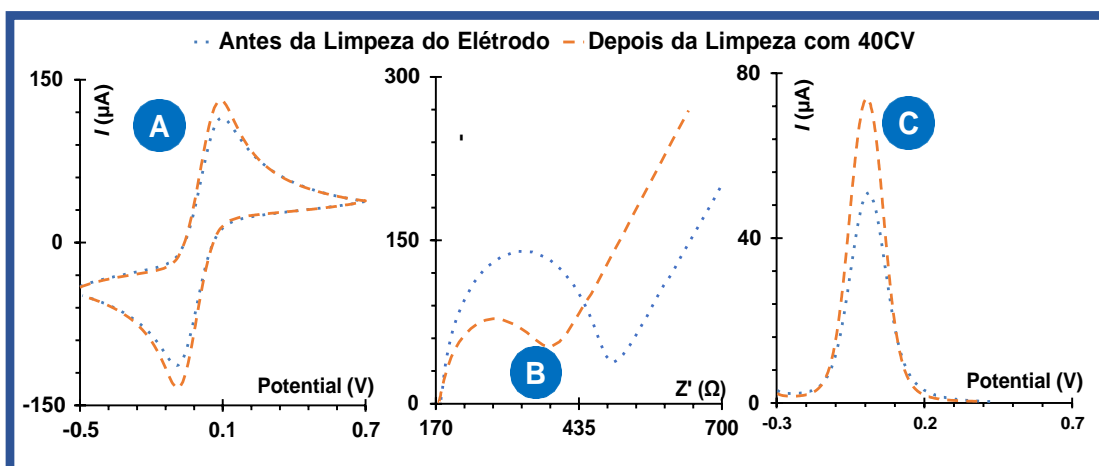


Fig. 23. Medidas Eletroquímicas, CV (A); EIS (B) e SWV (C) para avaliar as alterações eletroquímicas antes e depois da limpeza com 40 ciclos.

Analisando todos os procedimentos de limpeza, o método de limpeza que foi adotado ao longo deste projeto foi com 30 ciclos, uma vez que se verificou uma maior diferença nas três medidas eletroquímicas.

4.2 Determinação dos picos para polimerização do Pirrol

Para efetuar a polimerização é necessário saber os picos de oxidação do monómero. Inicialmente, os picos do Pirrol foram verificados pela técnica CV de -1.0V a +1.0V com uma velocidade de varrimento de 0.1V/s durante 1 ciclo (**Figura 24C**). O valor de potencial do pico de oxidação do pirrol é de +0,74V, todavia para garantir a polimerização foi usado +0,8V.

Além disso, foram verificados os picos de oxidação do FAD e da glucose (**Figura 24A**) utilizando a mesma técnica. No entanto, no caso FAD, a gama de potenciais foi alargada para -1,5V a +1,5 V com a mesma velocidade de varrimento 0,1V/s durante 1 ciclo (**Figura 24B**), uma vez que este apresenta potenciais mais negativos na superfície de carbono, verificando um pico de oxidação a -0,68V.

Esta verificação tem como objetivo, confirmar que a glucose não tem nenhum pico evitando assim, uma co-polimerização com a molécula. Relativamente, aos picos do FAD, servem para confirmar que pode ser usado como mediador redox, uma vez que é um sistema reversível nos potenciais negativos.

Após verificar o pico de oxidação a +0,8V, utilizou-se a técnica de cronoamperometria para fazer a polimerização em PIM e PNI.

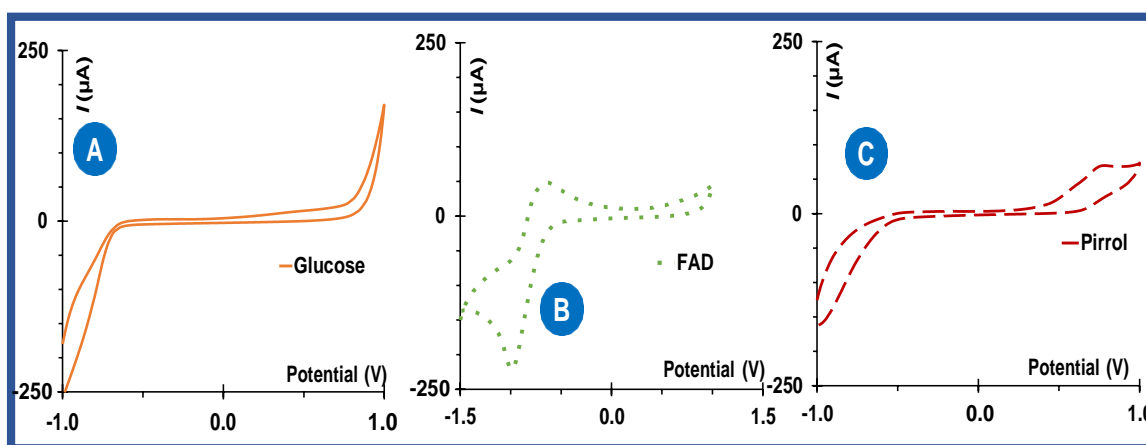


Fig. 24. Verificação dos picos de oxidação da glucose (A), FAD (B) e pirrol (C) usando a técnica CV.

4.3 Otimização da construção PNI

Na otimização da construção do PNI foram analisadas várias condições. Nessa otimização, foram testadas várias concentrações do Pirrol ($1,0 \times 10^{-3}$; $1,0 \times 10^{-2}$; $1,0 \times 10^{-1}$ M), do FAD (10 mM, 25 mM, 50 mM, 0,1 M) bem como diferentes tempos de polimerização por cronoamperometria, 50s (**Figura 25A**), 200s (**Figura 25B**) e 500s (**Figura 25C**). Cada modificação da superfície do eletrodo após a polimerização foi avaliada por DPV e SWV, testando primeiramente em PBS. Esta solução foi mudada posteriormente para KCl, uma vez que os resultados não estavam coerentes em diferentes condições de polimerização (**Figura 25**).

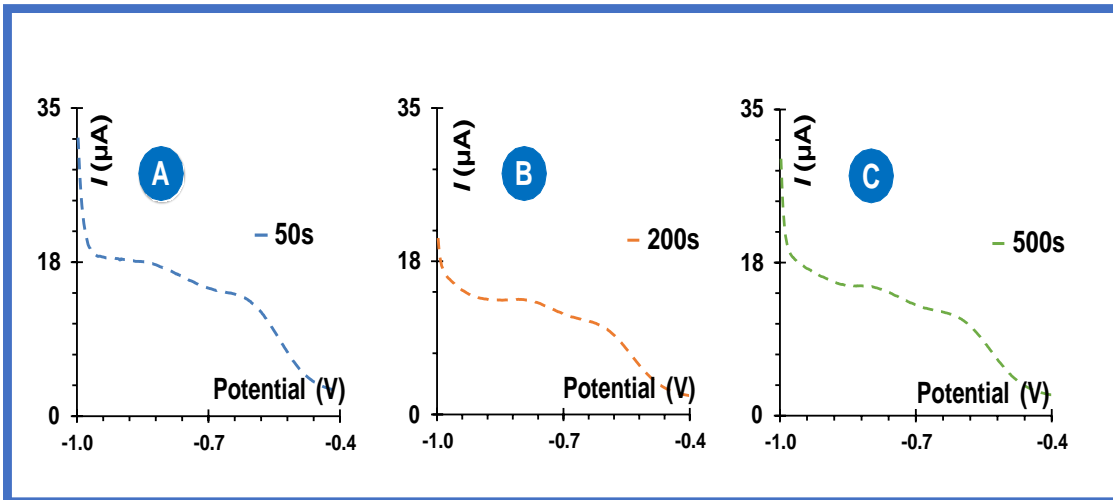


Fig. 25. Medições em SWV após polimerização do PNI, com diferentes tempos de polimerização (A) 50s, (B) 200s e (C) 500s.

Além disso, o SWV não foi considerado a melhor técnica para verificar as modificações no elétrodo (**Figura 26**), uma vez que ao aumentar a concentração de FAD com 10mM (**Figura 26A**), 25 mM (**Figura 26B**) e 50 mM (**Figura 26C**) não se observaram diferenças significativas. Apesar do SWV ser mais adequado para sistemas reversíveis em detrimento do DPV, procedeu-se à avaliação eletroquímica apenas com o DPV utilizando o KCl para fazer as medidas eletroquímicas.

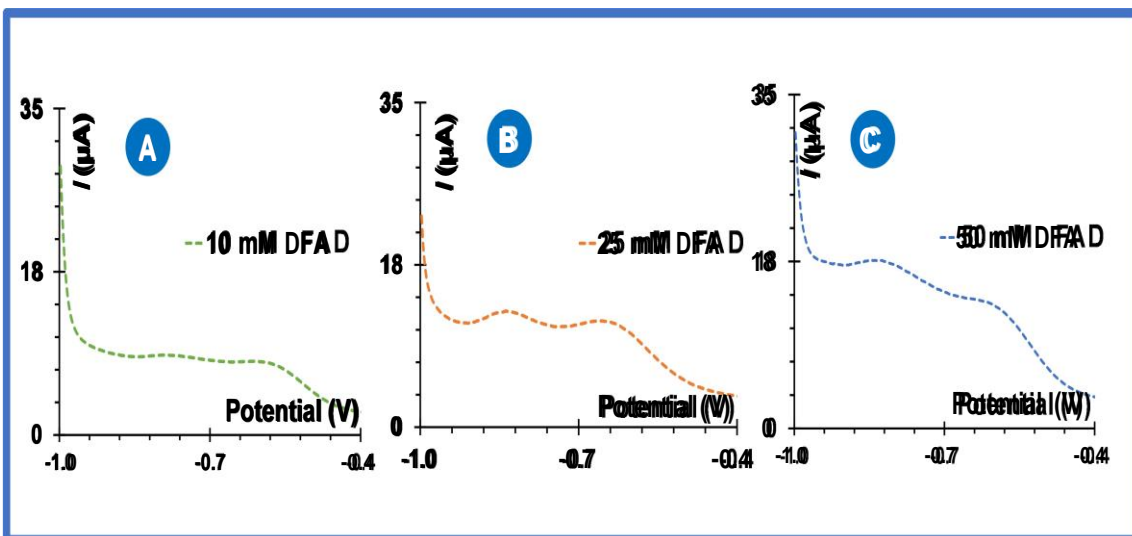


Fig. 26. Medições em DPV após polimerização do PNI, utilizando diferentes concentrações de FAD, 10 mM (A), 25 mM (B) e 50 mM (C).

Após fazer várias experiências e testando as várias condições, a melhor condição para se obter um pico estável e consistente correspondeu a um tempo de polimerização de 200s, 0,1 M de FAD e 0,1 M de pirrol (**Figura 27**).

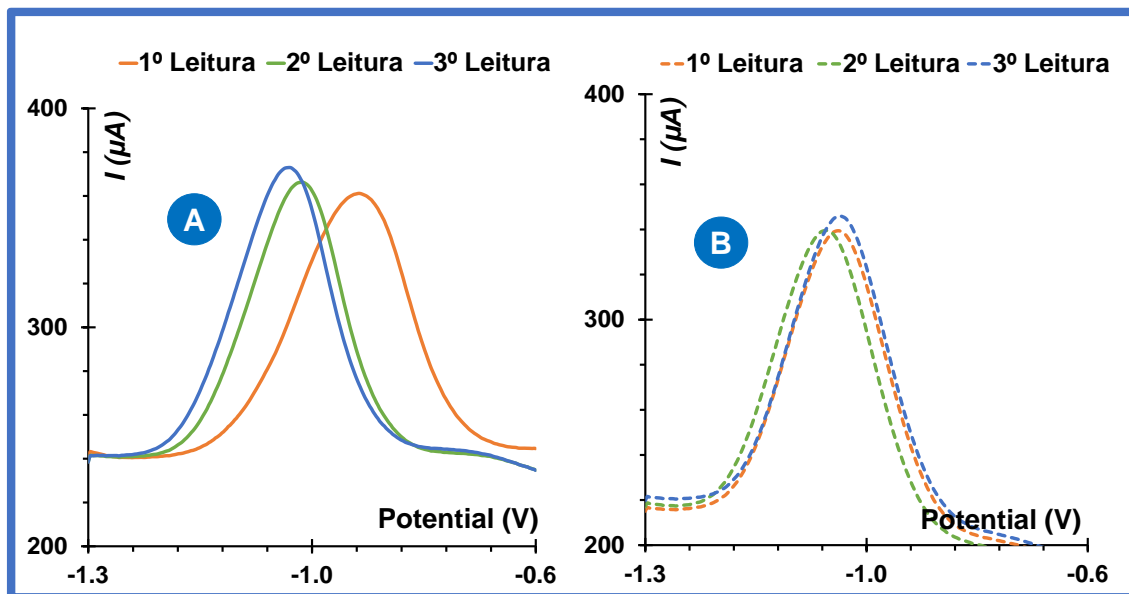


Fig. 27. Medições em DPV em KCl, após atingir as melhores condições de polimerização no PNI. (A) Estabilização do sensor após a polimerização e (B) após a 30 ciclos em KCl.

Como se pode verificar na **Figura 27A**, o pico nestas condições manteve-se estável com cerca de 25 $V\mu A$. O parâmetro que foi usado para verificar a estabilidade do sensor foi a área do pico, uma vez que os picos sofrem desvios (**Figura 27A**) com diferentes leituras. Além disso, para completar a polimerização foram efetuados 30 ciclos em KCl através da técnica de CV e, como é possível verificar na **Figura 27B**, houve um aumento do valor da área do pico, com cerca de 26.78 $V\mu A$.

4.3.1 Otimização do PIM

Seguidamente, os melhores parâmetros que foram encontrados no PNI, foram adotados para a construção do PIM. Para este efeito, adicionou-se a molécula alvo, a glucose, para criar as cavidades na estrutura polimérica e assim garantir seletividade para o analito. Nesta etapa foram analisadas diferentes concentrações de glucose (10mM e 100mM).

4.3.1.1 Concentração de glucose 10mM

Após a polimerização do PIM com 10mM de glucose é possível verificar, na **Figura 28 A**, que a área do pico é estável, após 3 leituras, com cerca de 35 $V\mu A$. Em comparação com PNI (na **Figura 28B**), o valor da área da corrente é inferior (40.80 $V\mu A$), uma vez que o PIM tem a molécula da glucose que é passível de ser oxidada na presença do FAD, que desempenha uma dupla função, como mediador redox e mediador de transferência de eletrões.

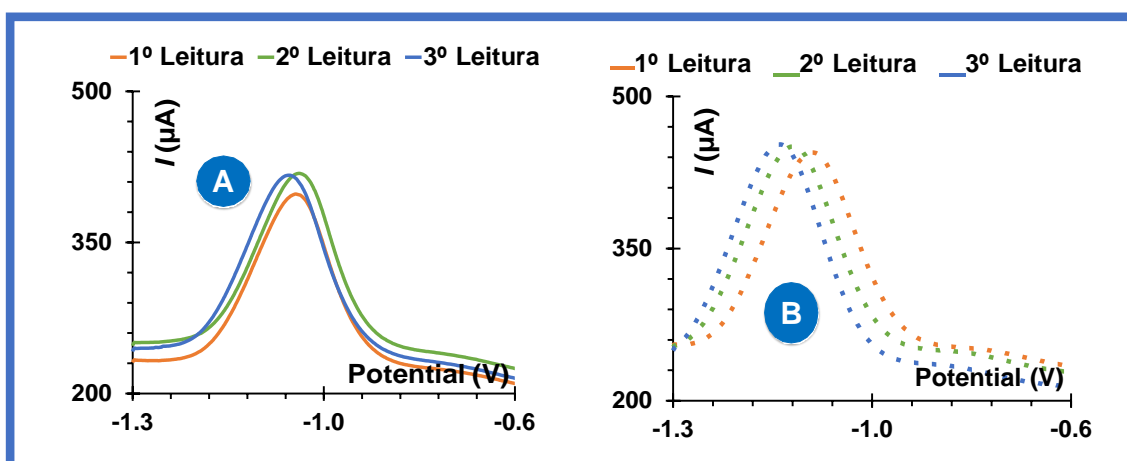


Fig. 28. Avaliação da estabilidade do sinal obtido por DPV após a polimerização do PIM (A) e PNI (B).

- **Remoção da glucose com 30 minutos**

Depois da polimerização, a molécula foi removida com água ultrapura durante 30 minutos, no elétrodo de trabalho. Na **Figura 29** é possível verificar que houve um aumento pouco significativo, de aproximadamente de 3 $V\mu A$, em relação à polimerização, o que indica que a glucose não foi removida. No entanto, pode também observar-se que após esta remoção o sinal da área da corrente continua estável após 3 leituras.

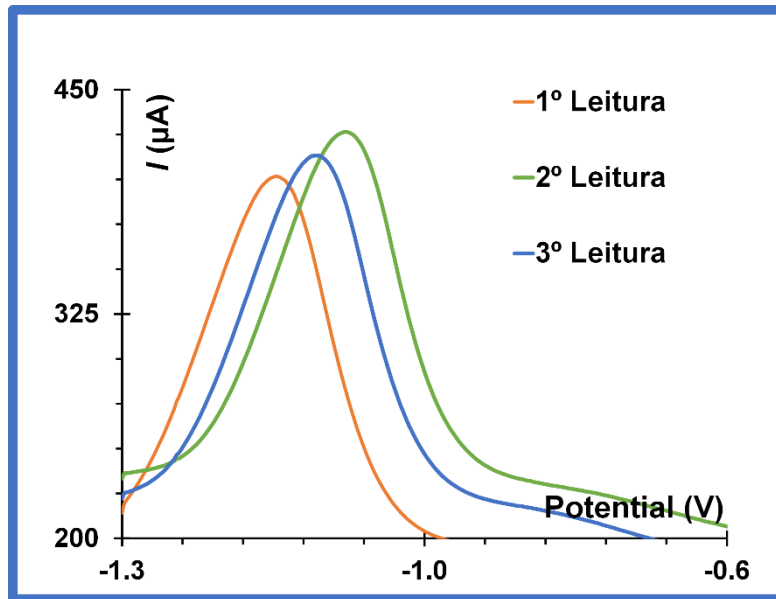


Fig. 29. Avaliação da estabilidade por DPV após a remoção da glucose durante 30 minutos.

- Remoção da glucose com 60 minutos

O próximo passo foi aumentar o tempo de remoção para 60 minutos, sendo possível verificar um aumento da área do pico de corrente em aproximadamente $11 \text{ V}\mu\text{A}$ (Figura 30B) em comparação com a corrente após polimerização ($37,42 \text{ V}\mu\text{A}$). Após a remoção, como é possível observar na Figura 30B, o sinal eletroquímico manteve-se estável após 3 leituras.

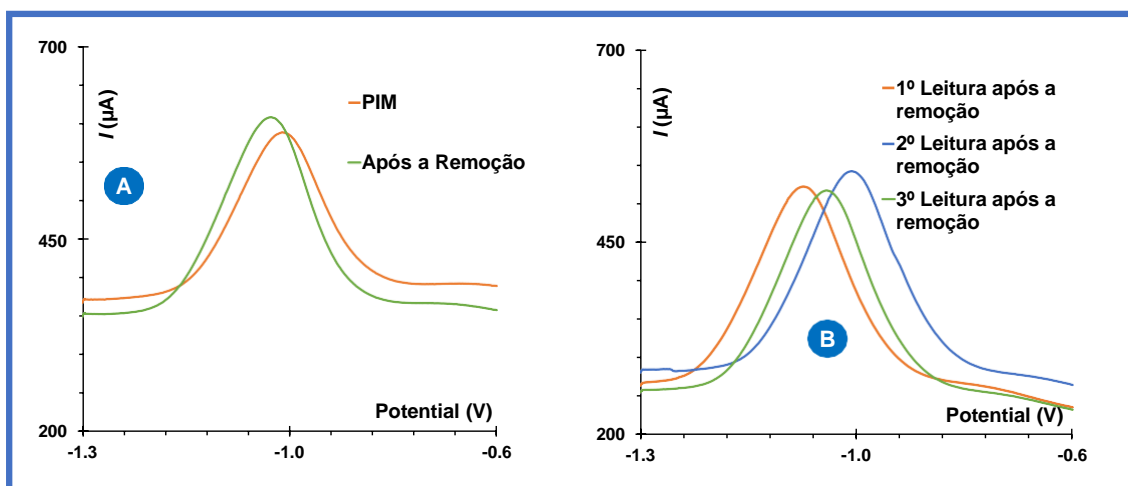


Fig. 30. Comparação do PIM após a remoção (A) e a estabilidade após a remoção (B) por DPV.

Por fim, foi avaliado o desempenho analítico do sensor, contudo, não se encontrou a estabilidade necessária após várias incubações do elétrodo de trabalho em PBS, tal como aconteceu no ensaio anterior.

4.3.1.1 Concentração de glucose, 100 mM

O próximo passo foi aumentar a concentração da glucose para 100mM mantendo o tempo de remoção. É possível observar na **Figura 31** que após a remoção houve um aumento da corrente ($\sim 56 \text{ V}\mu\text{A}$) comparando os valores da corrente relativamente à área do pico após a polimerização ($\sim 48 \text{ V}\mu\text{A}$).

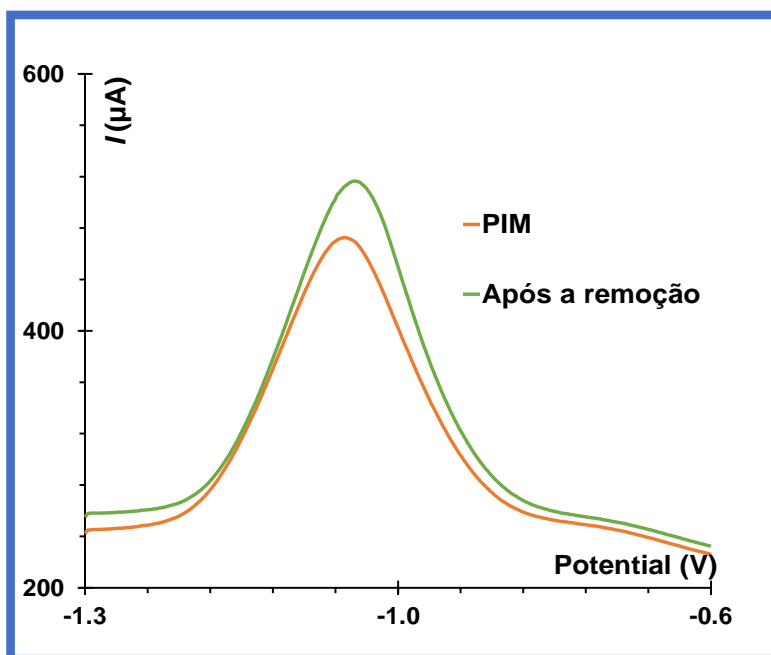


Fig.31. Comparação entre o PIM (A) e após a remoção da glucose (B).

Em paralelo, realizou-se a construção do PNI como controlo. Como se pode verificar na **Figura 32**, houve um aumento da corrente relativamente à área do pico ($\sim 69 \text{ V}\mu\text{A}$) em comparação com o PIM que tem ($\sim 48 \text{ V}\mu\text{A}$), devido à presença da glucose.

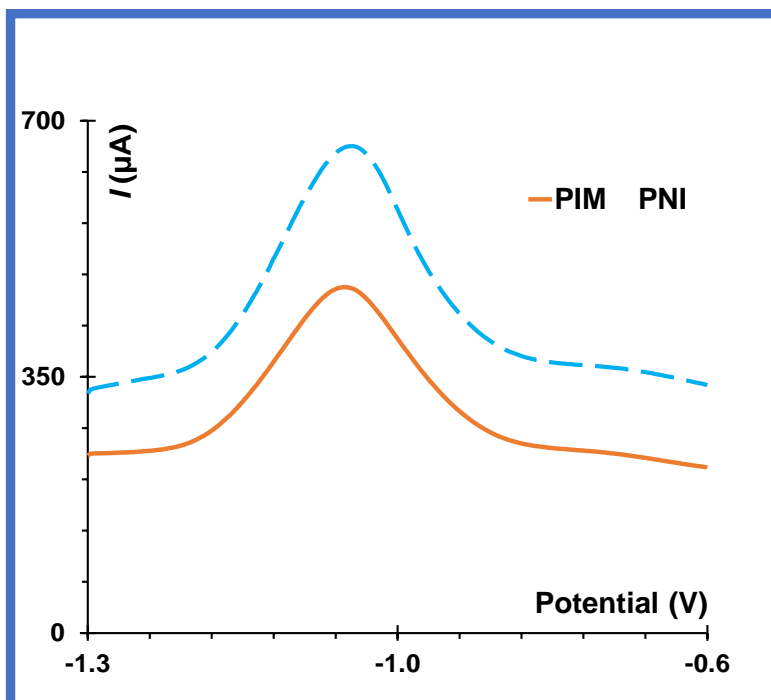


Fig.32. Comparação entre o PIM e do PNI, após a polimerização.

Após a remoção no PNI, pode-se verificar que ocorreu um pequeno aumento da corrente, cerca de ($\sim 3V\mu A$), comparando com os resultados após a polimerização (Figura 33).

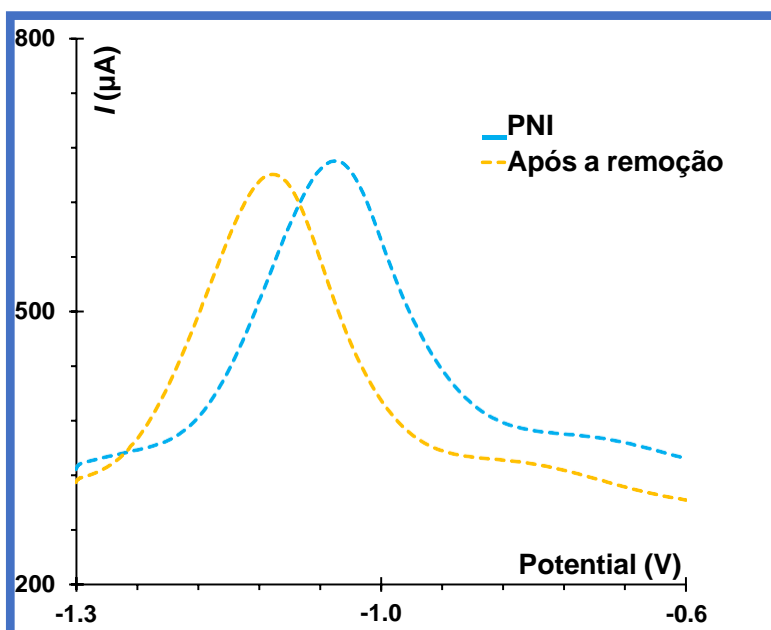


Fig.33. Comparação entre o PNI após a polimerização e após a remoção

Por fim, procedeu-se à avaliação do desempenho analítico com concentrações crescentes de glucose, tanto no PIM como no controlo (PNI).

4.4 Avaliação do desempenho analítico do PIM Vs. PNI

Para avaliar o desempenho analítico dos sensores (PIM e PNI) foram testadas concentrações crescentes de glucose (0,1 mM, 1 mM, 10 mM e 100 mM) preparadas em PBS. Cada concentração foi incubada no elétrodo de trabalho durante 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente húmido. Contudo, antes de iniciar a calibração com as várias concentrações de glucose, ambos os sensores foram submetidos a várias incubações em PBS, a fim de estabilizar o sinal eletroquímico, para começar a calibração.

Na **Figura 34B** é possível evidenciar que o PIM tem uma resposta linear entre 0,1 mM e 10 mM, saturando com a solução de 100 mM. Além disso, verifica-se um R^2 0,99, apesar de só ter três pontos de linearidade. Em contraste, o PNI tem um comportamento aleatório (**Figura 34D**), não se verificando linearidade para nenhuma concentração de glucose estudada.

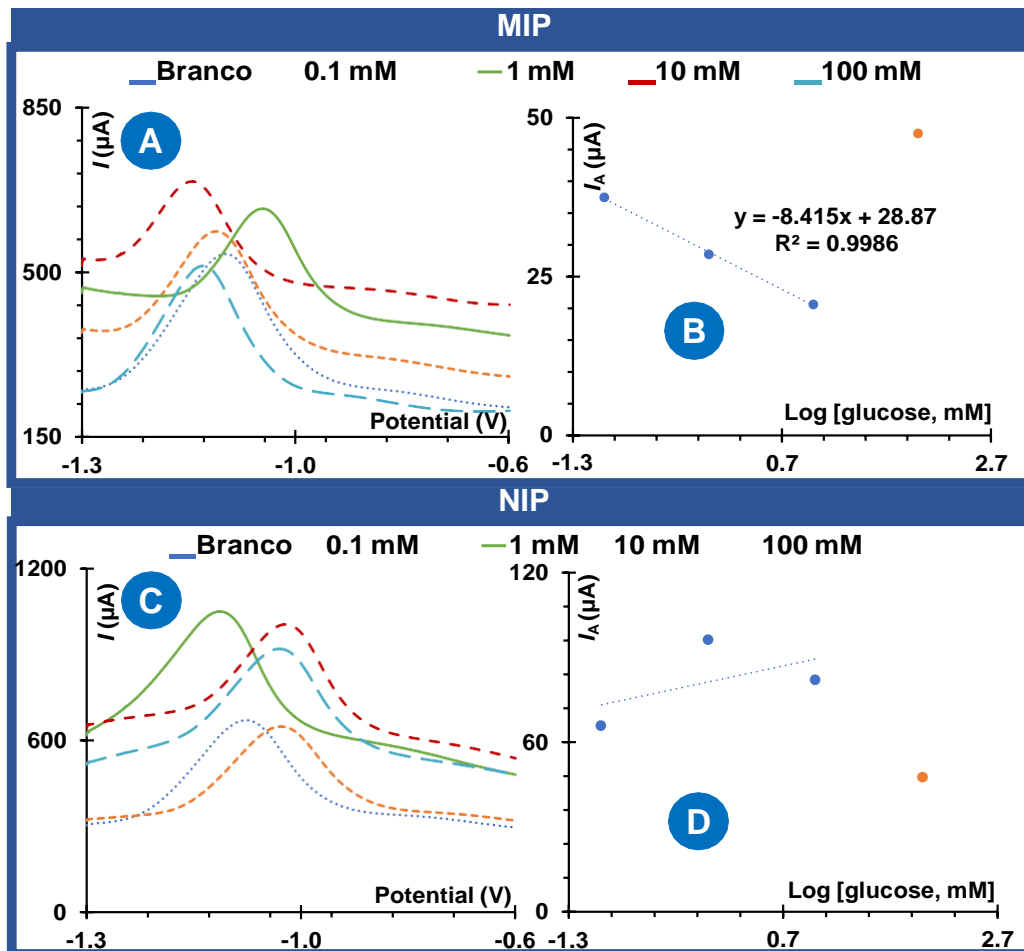


Fig. 34. Desempenho analítico em KCl pela técnica de DPV do PIM (A) e a respetiva curva de calibração (B) e do PNI (C) e a respetiva curva de calibração (D).

De acordo com estes resultados, o PIM tem uma melhor resposta do que PNI, no entanto é necessário repetir estes ensaios de forma a confirmar estes resultados e a sua boa reprodutibilidade. Além disso, é necessário fazer mais soluções padrão de concentrações intermédias, de forma a alargar a gama de concentrações em estudo neste sensor.

5. Conclusões e perspectivas futuras

O desenvolvimento dos biossensores com a utilização de novos designs, novos materiais e novas formas de deteção, tem vindo a aumentar, sendo cruciais para a deteção da glucose em diferentes fluídos biológicos, como sangue e urina.

O biossensor sem mediador redox baseado em polímeros de impressão molecular, tem inúmeras vantagens em relação aos biossensores comerciais, como a elevada seletividade, robustez e resistência a condições extremas. A produção de SPEs foi crucial, pois permitiu que houvesse um pré-tratamento controlado dos elétrodos, os quais apresentaram um desempenho analítico muito promissor em relação aos elérodos comerciais. O pirrol é um monómero versátil e que permite gerar polímeros condutores, mas exige cuidados experimentais muito exigentes, pois a interferência de pequenas variáveis é bastante crítica no processo de polimerização. O FAD, provavelmente o composto mais importante do projeto, apresenta uma redução numa gama onde decorre a redução de componentes gasoso, pelo que requer um manuseamento bastante controlado.

A técnica cronoamperometria escolhida para realizar polimerização foi a mais adequada, porque permitiu uma polimerização estável, robusta, que pode durar de um dia para o outro, sem haver alteração na matriz polimérica, tanto no PIM como no PNI, o que confirma também a estabilidade do polipirrol. Os pequenos detalhes fizeram a diferença na determinação das melhores condições para a construção do PIM; a polimerização em *bulk*, foi bem-sucedida pelo fato da glucose ser uma molécula pequena. Além disso, as estabilizações em PBS dão ao biossensor a estabilidade necessária para garantia de que as soluções da glucose, tenham uma boa interação com o transdutor e que a interação observada não decorra de outros componentes presentes nas soluções.

O facto de não ser necessário um mediador redox (por ex. hexacianoferrato) para avaliar o comportamento do biossensor após cada modificação é de extrema importância, pois de facilita a utilização do biossensor em contexto real.

Como estudos futuros, é necessário realizar estudos experimentais de reprodutibilidade, seletividade e a aplicação em amostras reais. Após o desenvolvimento da construção do sensor, ambiciona-se a incorporação de uma componente eletrónica, ou seja, um circuito

fechado, que possa ser controlado por microcontrolador tendo em vista a quantificação da glucose, com um menor erro associado menor.

O presente trabalho abre caminhos para novos desafios, novas descobertas, e o progresso científico tem como alicerce estes pequenos desenvolvimentos.

6. Referências

1. Chuter, V., Schaper, N., Mills, J., Hinchliffe, R., Russell, D., Azuma, N., Behrendt, C., Boyko, E. J., Conte, M. S., Humphries, M., Kirksey, L., McGinagle, K. C., Nikol, S., Nordanstig, J., Rowe, V., van den Berg, J. C., Venermo, M., & Fitridge, R. (2023). Effectiveness of bedside investigations to diagnose peripheral artery disease among people with diabetes mellitus: A systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3683>
2. Luís, C., Soares, R., Baylina, P., & Fernandes, R. (2022). Underestimated Prediabetic Biomarkers: Are We Blind to Their Strategy? In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.805837>
3. Johnston, L., Wang, G., Hu, K., Qian, C., & Liu, G. (2021). Advances in Biosensors for Continuous Glucose Monitoring Towards Wearables. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.733810>
4. Karyakin, A. A. (2021). Glucose biosensors for clinical and personal use. In *Electrochemistry Communications* (Vol. 125). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.106973>
5. Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
6. Blair, M. (2016). Diabetes Mellitus Review. In *Urologic nursing* (Vol. 36, Issue 1, pp. 27–36). <https://doi.org/10.7257/1053-816x.2016.36.1.27>
7. Luís, C., Fernandes, R., Soares, R., & von Hafe, P. (2020). A state of the art review on the novel mediator asprosin in the metabolic syndrome. *Porto Biomedical Journal*, 5(6), e108. <https://doi.org/10.1097/j.pbj.000000000000108>
8. Appl Biomed, J., Pohanka, M., & Skládal, P. (n.d.). *Journal of APPLIED BIOMEDICINE Electrochemical biosensors-principles and applications*.
9. Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., & Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 69–80. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>

10. Rogers, S. J., Bennetto, L., McEvoy, R., & Pennington, B. F. (1996). Imitation and Pantomime in High-Functioning Adolescents with Autism Spectrum Disorders. *Child Development*, 67(5), 2060–2073. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.1996.tb01843.x>
11. Sabu, C., Henna, T. K., Raphey, V. R., Nivitha, K. P., & Pramod, K. (2019). Advanced biosensors for glucose and insulin. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 141). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.034>
12. Rodriguez-Mozaz, S., López De Alda, M. J., & Barceló, D. (2004). Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045(1–2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.040>
13. Bohunicky, B., & Mousa, S. A. (2011). Biosensors: The new wave in cancer diagnosis. In *Nanotechnology, Science and Applications* (Vol. 4, Issue 1, pp. 1–10). <https://doi.org/10.2147/NSA.S13465>
14. Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews*, 100(7), 2495–2504. <https://doi.org/10.1021/cr990099w>
15. Cui, F., Zhou, Z., & Zhou, H. S. (2020). Molecularly imprinted polymers and surface imprinted polymers based electrochemical biosensor for infectious diseases. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 20, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s20040996>
16. Eddaoudi, M. (2005). Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density By S. Lowell (Quantachrome Instruments, Boynton Beach), J. E. Shields (C. W. Post Campus of Long Island University), M. A. Thomas, and M. Thommes (Quantachrome Instruments). Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. 2004. xiv + 348 pp. \$159.00. ISBN 1-4020-2302-2. *Journal of the American Chemical Society*, 127(40), 14117–14117. <https://doi.org/10.1021/ja041016i>
17. Lowdon, J. W., Diliën, H., Singla, P., Peeters, M., Cleij, T. J., van Grinsven, B., & Eersels, K. (2020). MIPs for commercial application in low-cost sensors and assays – An overview of the current status quo. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128973>
18. Crapnell, R. D., Hudson, A., Foster, C. W., Eersels, K., van Grinsven, B., Cleij, T. J., Banks, C. E., & Peeters, M. (2019). Recent advances in electrosynthesized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 19, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s19051204>

19. Fomo, G., Waryo, T., Feleni, U., Baker, P., Iwuoha, E. (2019). Electrochemical Polymerization.
20. Crapnell, R. D., Dempsey-Hibbert, N. C., Peeters, M., Tridente, A., & Banks, C. E. (2020). Molecularly imprinted polymer based electrochemical biosensors: Overcoming the challenges of detecting vital biomarkers and speeding up diagnosis. In *Talanta Open* (Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2020.100018>
21. Dong, C., Shi, H., Han, Y., Yang, Y., Wang, R., & Men, J. (2021). Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique. In *European Polymer Journal* (Vol. 145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110231>
22. Imran, S., Ahmadi, S., & Kerman, K. (2021). Electrochemical biosensors for the detection of sars-cov-2 and other viruses. In *Micromachines* (Vol. 12, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/mi12020174>
23. Metters, J. P., Kadara, R. O., & Banks, C. E. (2011). New directions in screen printed electroanalytical sensors: An overview of recent developments. In *Analyst* (Vol. 136, Issue 6, pp. 1067–1076). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c0an00894j>
24. Mahshid, S. S., Flynn, S. E., & Mahshid, S. (2021). The potential application of electrochemical biosensors in the COVID-19 pandemic: A perspective on the rapid diagnostics of SARS-CoV-2. *Biosensors and Bioelectronics*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112905>
25. Ji, T., Liu, Z., Wang, G. Q., Guo, X., Akbar khan, S., Lai, C., Chen, H., Huang, S., Xia, S., Chen, B., Jia, H., Chen, Y., & Zhou, Q. (2020). Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112455>
26. Labib, M., Sargent, E. H., & Kelley, S. O. (2016). Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. In *Chemical Reviews* (Vol. 116, Issue 16, pp. 9001–9090). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00220>
27. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/b714449k>
28. Macdonald, J. R. (1992). Impedance Spectroscopy. In *Annals of Biomedical Engineering* (Vol. 20).

29. Encyclopædia Britannica, inc. (n.d.). Electrical impedance. Encyclopædia Britannica. Retrieved February 8, 2022, from <https://www.britannica.com/science/electrical-impedance>
30. Daniels, J. S., & Pourmand, N. (2007). Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. In *Electroanalysis* (Vol. 19, Issue 12, pp. 1239–1257). Wiley-CVH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elan.200603855>
31. Grieshaber, D., Mackenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8, 1400–1458. www.mdpi.org/sensors
32. Lisdat, F., & Schäfer, D. (2008). The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 391, Issue 5, pp. 1555–1567). <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1970-7>
33. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/b714449k>
34. Sabu, C., Henna, T. K., Raphey, V. R., Nivitha, K. P., & Pramod, K. (2019). Advanced biosensors for glucose and insulin. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 141). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.034>
35. Wang, Y., Sun, M., Qiao, J., Ouyang, J., & Na, N. (2018). FAD roles in glucose catalytic oxidation studied by multiphase flow of extractive electrospray ionization (MF-EESI) mass spectrometry. *Chemical Science*, 9(3), 594–599. <https://doi.org/10.1039/c7sc04259k>
36. Antill, L. M., & Woodward, J. R. (2018). Flavin Adenine Dinucleotide Photochemistry Is Magnetic Field Sensitive at Physiological pH. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(10), 2691–2696. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b01088>
37. Karaman, C., Karaman, O., Atar, N., & Yola, M. L. (2022). A molecularly imprinted electrochemical biosensor based on hierarchical Ti2Nb10O29 (TNO) for glucose detection. *Microchimica Acta*, 189(1). <https://doi.org/10.1007/s00604-021-05128-x>
38. Yang, Y., Yi, C., Luo, J., Liu, R., Liu, J., Jiang, J., & Liu, X. (2011). Glucose sensors based on electrodeposition of molecularly imprinted polymeric micelles: A novel strategy for MIP sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2607–2612. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.015>
39. Rebelo, T. S. C. R., Miranda, I. M., Sousa, L., Ribeiro, J. A., Silva, A. F., & Pereira, C. M. (2020). Sensors & Transducers New MIP-based Electrochemical Device for On-

site Detection of Glucose Oxidase. In *Sensors & Transducers* (Vol. 246).
<http://www.sensorsportal.com>

40. Li, H. X., Yao, W., Wu, Q., & Xia, W. S. (2014). Glucose molecularly imprinted electrochemical sensor based on chitosan and nickel oxide electrode. *Advanced Materials Research*, 1052, 215–219.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1052.215>
41. Peng, C., Miao, L., Qiu, D., & Chen, S. (2022). Co₃O₄-chitosan/biomass-derived porous carbon molecularly imprinted polymer integrated electrode for selective detection of glucose. *Ceramics International*, 48(16), 23137–23144.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.04.294>
42. Cho, S. J., Noh, H. B., Won, M. S., Cho, C. H., Kim, K. B., & Shim, Y. B. (2018). A selective glucose sensor based on direct oxidation on a bimetal catalyst with a molecular imprinted polymer. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 471–478.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.022>
43. Wang, S., Liu, N., Yang, C., Liu, W., Su, J., Li, L., Yang, C., & Gao, Y. (2015). Fully screen printed highly conductive electrodes on various flexible substrates for asymmetric supercapacitors. *RSC Advances*, 5(104), 85799–85805.
<https://doi.org/10.1039/c5ra16724h>
44. Morrin, A., Killard, A. J., & Smyth, M. R. (2003). Electrochemical characterization of commercial and home-made screen-printed carbon electrodes. *Analytical Letters*, 36(9), 2021–2039. <https://doi.org/10.1081/AL-120023627>
45. Raymundo-Pereira, P. A., Gomes, N. O., Machado, S. A. S., & Oliveira, O. N. (2019). Simultaneous, ultrasensitive detection of hydroquinone, paracetamol and estradiol for quality control of tap water with a simple electrochemical method. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 848. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113319>
46. Sadki, S., Schottland, P., Brodie, N., & Sabouraud, G. (2000). The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chemical Society Reviews*, 29(5), 283–293.
<https://doi.org/10.1039/a807124a>