

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
(POSMAT)

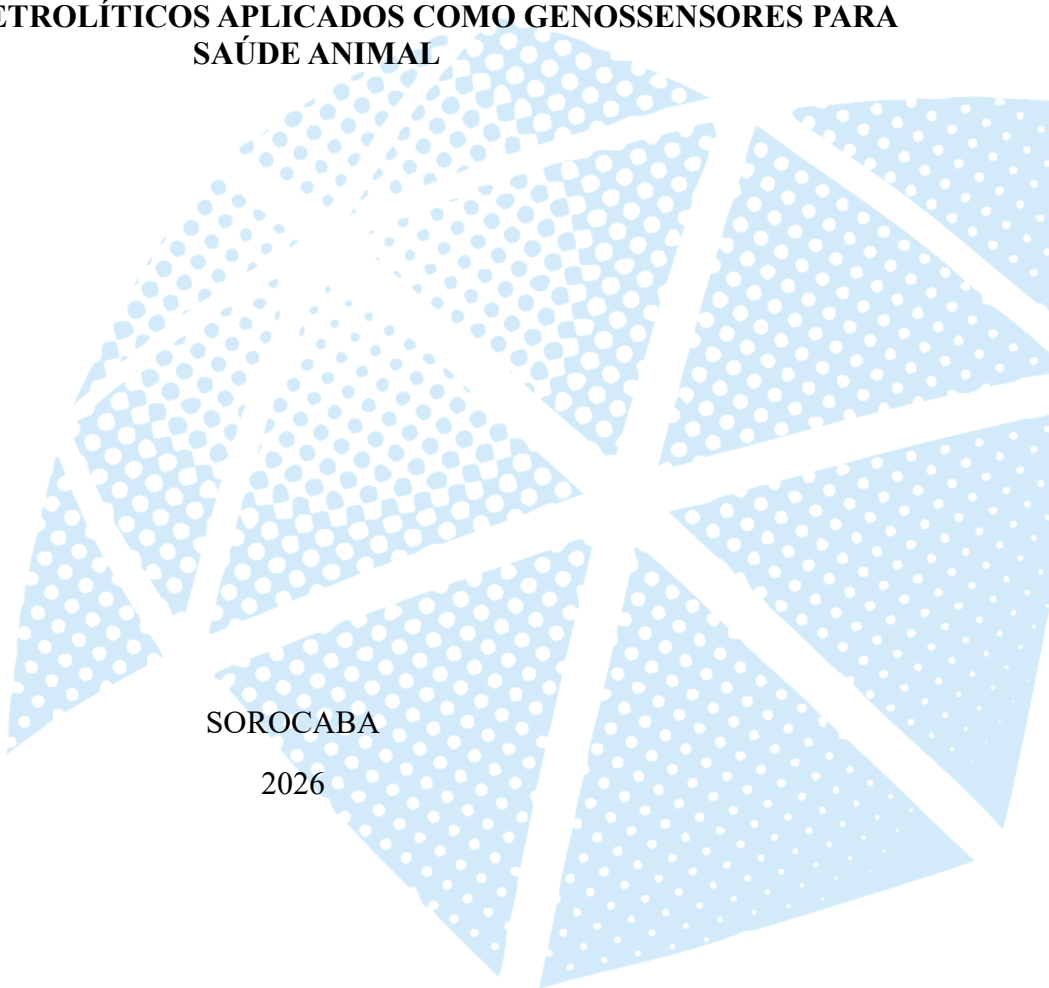
Instituto de Ciência e Tecnologia - Câmpus de Sorocaba

ANA VITÓRIA FERREIRA DELEIGO

**TRANSISTORES ELETROLÍTICOS APLICADOS COMO GENOSENSORES PARA
SAÚDE ANIMAL**

SOROCABA

2026



ANA VITÓRIA FERREIRA DELEIGO

**TRANSISTORES ELETROLÍTICOS APLICADOS COMO GENOSENSORES PARA
SAÚDE ANIMAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba, para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Materiais.

Área de Concentração: Ciência de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Rafael Furlan de Oliveira

Co-orientador: Dr. Wilson Tiago da Fonseca

SOROCABA

2026

D346t

Deleigo, Ana Vitória Ferreira

Transistores eletrolíticos aplicados como genossensores para saúde animal / Ana Vitória Ferreira Deleigo. -- Sorocaba, 2026

72 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba

Orientador: Rafael Furlan de Oliveira

Coorientador: Wilson Tiago da Fonseca

1. Medidas elétricas. 2. MicroRNAs. 3. Transistores. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Transistores Eletrolíticos Aplicados como Genossensores para Saúde Animal

AUTORA: ANA VITÓRIA FERREIRA DELEIGO

ORIENTADOR: RAFAEL FURLAN DE OLIVEIRA **COORIENTADOR:** WILSON TIAGO DA FONSECA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Materiais, área: Ciência de Materiais pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RAFAEL FURLAN DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Laboratório Nacional de Nanotecnologia / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Prof. Dr. MARCELO MULATO (Participação Virtual)
Departamento de Física / Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Câmpus Ribeirão Preto

Prof. Dr. PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Assis - FCLAs

Sorocaba, 12 de março de 2026.

*Aos meus pais, que sempre me lembram que não há vitória
sem sacrifício.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar expressando minha gratidão aos meus pais, Plínia Gleibe Ferreira e Adriano Marcelo Deleigo, que sempre se esforçaram ao máximo para garantir minha sólida base acadêmica desde a infância. Seus investimentos e sacrifícios valeram a pena, e é com alegria que compartilho a conclusão do meu mestrado. Agradeço ao meu irmão, João Henrique Ferreira Deleigo, por todos os momentos de vida compartilhados, pelas risadas, tristezas e desafios que enfrentamos juntos. Agradeço também à minha avó, Regina Gonçalves de Jesus Ferreira, e aos meus tios, Claudinei Ferreira e Claudia Fuginami Gotto, que desde a infância sempre me apoiaram nos campos da matemática, física e pesquisa. Agradeço ao meu companheiro, Otávio Berenguel, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis e por me mostrar, todos os dias, que a vida é incrível quando se caminha com quem se ama. Agradeço às minhas amigas de longa data, Melina da Cruz Antunes de Miranda, Yukari Teodoro Costa Fukuti, Laura Ferreira Mendes, Maria Gabriela Geroldo, Maria Júlia Merlin, Paula Yhorrana Viana Telles e Alana Lago por compartilharem comigo tantos anos de amizade, companheirismo e momentos felizes. A vida é leve e alegre na presença de vocês.

Expresso meus agradecimentos aos colegas, amigos e funcionários do laboratório pelas conversas, apoio diário, auxílio e pelas trocas de experiências que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Em particular, agradeço a Dr. Maria Luisa Braunger Fier, Gabrielle Coelho Lelis, Nicolli de Freitas e Me. Mariane Peres Pereira. Um agradecimento especial ao Professor Dr. Rafael Furlan de Oliveira pela orientação, ensinamentos e confiança em meu trabalho, além da oportunidade de ter realizado o mestrado em seu grupo de pesquisa. Também não posso deixar de mencionar o Dr. Wilson Tiago da Fonseca, que sempre demonstrou paciência ao dividir seu conhecimento e por todas as contribuições que enriqueceram este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/01961–9 e Processo nº 2021/06238–5.

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são biomarcadores promissores para o diagnóstico de doenças, fato evidenciado pelo Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2024 concedido a Ambros e Ruvkun pela revelação de seu papel na regulação gênica. Métodos convencionais de detecção de miRNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa, requerem instrumentação e reagentes complexos, o que limita sua integração em dispositivos diagnósticos portáteis e rápidos. Neste trabalho, reportamos um biossensor ultrasensível e seletivo que combina óxido de grafeno reduzido funcionalizado com ssDNAcp, transistores eletrolíticos e aprendizado de máquina para a detecção ultrasensível e seletiva de miRNAs. Nossa estratégia foca na família miR-34, especificamente miR-34a, miR-34b e miR-34c, associadas a distúrbios neurológicos e com potencial aplicação no diagnóstico em saúde animal. O biossensor foi capaz de discriminar de forma confiável sequências perfeitamente complementares de sequências com incompatibilidades em uma ampla faixa dinâmica (de 0,1 a 1.000 amol L⁻¹) e com um limite de detecção ultrabaixo (0,098 amol L⁻¹). O aprendizado de máquina possibilitou a análise multidimensional dos sinais das curvas de transferência dos EGTs e a extração de relações fisicamente significativas a partir de dados de alta dimensionalidade. Este trabalho representa um avanço significativo em dispositivos portáteis de diagnóstico para o biossensoriamento de miRNAs de forma ultrasensível e altamente seletiva.

Palavras-chaves: Transistores eletrolíticos; Óxido de grafeno reduzido; Química de superfície; Medidas elétricas.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are promising biomarkers for disease diagnosis, a significance underscored by the 2024 Nobel Prize in Physiology or Medicine awarded to Ambros and Ruvkun for revealing their role in gene regulation. Conventional miRNA detection methods, such as Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), require complex instrumentation and reagents, limiting their integration as portable and fast diagnostic devices. We report an ultrasensitive and selective biosensor that combines DNA-functionalized reduced graphene oxide (rGO), electrolyte-gated transistors (EGTs), and machine learning (ML) for ultrasensitive and selective miRNA detection. Our strategy focuses on the miR34 family, namely miR-34a, miR-34b, and miR-34c, which are associated with neurological disorders and present potential for animal health diagnostics. The biosensor reliably discriminated perfectly matched from mismatched sequences in a wide dynamic range (from 0.1 to 1,000 amol L⁻¹) and with an ultralow limit of detection (0.098 amol L⁻¹). ML provided multidimensional signal analysis of the EGT transfer curve and the extraction of physically meaningful relationships from high-dimensional data. This work represents a significant advance in portable diagnostic devices for the ultrasensitive and highly selective biosensing of miRNAs.

Keywords: Electrolyte-gated transistors; Reduced graphene oxide; Surface chemistry; Electrical measurements.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração conceitual de dispositivos portáteis de diagnóstico aplicado a saúde de animais de companhia.	17
Figura 2 - Dispositivos de diagnóstico POC comercialmente disponíveis. a) teste de fluxo lateral (ou imunocromatografia), b) dispositivos eletroquímicos.....	20
Figura 3 – (A) Ilustração da arquitetura do dispositivo e (B) modelo de Stern da camada dupla elétrica (EDL).	22
Figura 4 – Representação do (A) diagrama de bandas e (B) curva de transferência de EGTs utilizando rGO como camada ativa.	24
Figura 5 – Representação do modelo de Lerf e Klinowski para (A) o GO e (B) o rGO.	25
Figura 6 - Estrutura atual do GO.	26
Figura 7 – Estrutura do GO considerando (a) modelo de componente único, sem ODs, e (b) modelo de dois componentes, com resíduos oxidativos (ODs) separados da folha.	27
Figura 8 – Ilustração da (A) seção transversal do dispositivo após funcionalização e hibridização da molécula alvo e seu (B) deslocamento para a esquerda ou direita em resposta.	29
Figura 9 – Comprimento de Debye na interface sólido-líquido em comparação com os biorreceptores moleculares.	30
Figura 10 – Procedimento de deposição do GO.	32
Figura 11 – Forno de ultra-alto vácuo (A) e redução eletroquímica in situ por voltametria cíclica, utilizando os eletrodos interdigitados como eletrodo de trabalho e fio de Au como pseudo-referência/contra eletrodo (B).	33
Figura 12 - (A) Probe Station. (B) Dispositivo conectado com os micromanipuladores.	34
Figura 13 – Procedimento de funcionalização não-covalente do rGO com PBASE para a imobilização do DNA de captura.....	35
Figura 14 – Procedimento de funcionalização covalente do rGO utilizando a reação com EDC/NHS para a imobilização do DNA de captura.	36
Figura 15 - (A) Dispositivo após revelação com MIF726. (B) Wafer com dispositivos microfabricados. (C) IDEs sem revestimento. (D–F) IDEs revestidos com rGO _{Gra} /PDDA, rGO _L /PDDA e rGO _{LB} /PDDA, respectivamente.	41
Figura 16 - Voltamograma obtido durante a redução eletroquímica do GO _{Gra}	41
Figura 17 - IDEs revestidos com rGO _{Gra} /PDDA (A), rGO _L /PDDA (B) e rGO _{LB} /PDDA (C), respectivamente.	42

Figura 18 - Imagens de AFM dos filmes de GO _{Gra} (A, B), rGO _L (C, D) e GO _{LB} (E, F) após redução térmica e eletroquímica, respectivamente.	43
Figura 19 - Curvas de transferência normalizadas (A, B) e valores de V _{CNP} e I _{DS,mínimo} (C, D) para rGO _{Gra} , rGO _L e rGO _{LB} após redução térmica e eletroquímica.	44
Figura 20 – Módulo das Curvas I _{DS} /V _{DS} (A), valores de resistência, (B) e mobilidades efetivas para buracos (C) e elétrons (D).....	46
Figura 21 — Curvas de transferência dos materiais rGO _{Gra} (A, B), rGO _L (C, D) e rGO _{LB} (E, F) nas etapas de funcionalização pelas rotas PBASE (A, C, E) e EDC/NHS (B, D, F) após redução térmica.	48
Figura 22 - Variação de V _{CNP} para rGO _{Gra} , rGO _L e rGO _{LB} durante a funcionalização pelas rotas PBASE (A) e EDC/NHS (B). Cada etapa representa a média de cinco dispositivos.....	49
Figura 23 - ΔI _{DS,mínimo} em rGO _{Gra} (A, B), rGO _L (C, D) e rGO _{LB} (E, F) funcionalizados por PBASE (A, C, E) e EDC/NHS (B, D, F) após incubação com alvo-a e controle.	51
Figura 24 - Espectros de XPS do canal do Bio-EGT: (A–B) picos de C1s e (C–D) picos de N1s para diferentes superfícies, incluindo rGO e rGO–DNAcp.	53
Figura 25 - (A) Força iônica em função da concentração dos reagentes da solução PB. (B) Comprimento de Debye calculado para cada força iônica. (C) Esquema do processo de hibridização entre a sonda de captura e o alvo-a.	54
Figura 26 - Curvas de transferência dos EGTs de rGO em (a) janela de V _{GS} de +0,3 a –0,1 V e (b) janela de V _{GS} de +0,6 a –0,6 V. As medidas foram realizadas variando V _{DS}	55
Figura 27 - Caracterização elétrica dos EGTs sob diferentes condições experimentais. (A) Variação do I _{DS,min} ao longo de múltiplos ciclos experimentais para diferentes valores de V _{DS} , utilizando uma faixa de tensão de porta de +0,3 a –0,1 V. (B) Valores de V _{CNP} sob as mesmas condições experimentais do item (A). (C) I _{DS,min} para uma faixa de tensão de porta de +0,6 a –0,6 V, utilizando dispositivos diferentes. (D) Variações de V _{CNP} sob as mesmas condições experimentais do item (C). As barras de erro representam o desvio padrão de medições repetidas (n = 3).....	55
Figura 28 - (A) Curvas de transferência a V _{DS} = 100 mV após cada etapa da funcionalização do Bio-EGT: eletrodo gate nu (linha preta), passivação do eletrodo gate com solução de DDT (linha vermelha), imobilização de DNAcp após ativação dos grupos carboxílicos no rGO usando solução de EDC/NHS (linha verde) e bloqueio com solução de etanolamina (linha azul). (B) Valores de V _{CNP} obtidos para três dispositivos Bio-EGT em cada etapa da fabricação do biossensor (n = 3).	57

Figura 29 - (A) Curvas de transferência após incubação com o alvo em diferentes concentrações. (B) Valores de $\Delta I_{DS,min}$ para o Bio-EGT na presença do controle negativo e do alvo-a em diferentes concentrações (n = 3).	58
Figura 30 - (A) Curvas de transferência dos EGTs após incubação com o alvo-a em diferentes concentrações em urina artificial. (B) Valores correspondentes de $\Delta I_{DS,min}$ em função da concentração do alvo-a, obtidos a partir de três medições independentes.	61
Figura 31 - (A) Curvas analíticas para os alvos-a, alvo-b e alvo-c em diferentes concentrações, obtidas utilizando a plataforma Bio-rGO EGT. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições e são menores que os próprios pontos de dados. (B) Representação esquemática das sequências nucleotídicas do receptor ssDNAcp e dos alvos, ilustrando um pareamento perfeito (com o alvo-a) e pareamentos não perfeitos (com os alvos-b e alvo-c).	62
Figura 32 - Análise por aprendizado de máquina: (A) Gráfico de paridade mostrando a comparação entre as concentrações logarítmicas reais dos analitos e os valores preditos utilizando o descritor de melhor ranking selecionado na tarefa de regressão multitarefa. (B) Curvas de calibração para os quatro analitos, usando o descritor de melhor ranking como preditor de sinal. (C) Resultados do modelo de Classificação por Vetores de Suporte utilizando como características de entrada o descritor bidimensional identificado na tarefa de classificação, delimitando quatro regiões distintas correspondentes aos diferentes alvos. (D) Análise da importância das características para os descritores obtidos para o alvo-a, ilustrando a contribuição relativa das 17 variáveis I_{DS} da curva de transferência do EGT de rGO.	64
Figura 33 - Curvas de calibração reconstruídas com os descritores individuais de melhor ranqueamento (isto é, específicos do alvo) obtidos por SISSO, em que “a” representa o coeficiente angular da curva e “b” o intercepto.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de ssDNA utilizadas como sondas de captura, alvo e controle negativo, juntamente com as sequências de miR-34a, miR-34b e miR-34c.	31
Tabela 2 - Tensões associadas aos descritores utilizados nos modelos SISSO.	39
Tabela 3 - Valores de V_{CNP} e $I_{DS,minimo}$ para EGTs baseados em filmes de rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica. DP é o desvio-padrão.	44
Tabela 4 - Valores de resistência para filmes de rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica. DP é o desvio padrão.	46
Tabela 5 - Valores de mobilidade efetiva para elétrons (μ^e_{eff}) e buracos (μ^b_{eff}) a partir da resposta de EGTs baseados em filmes de rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica. DP é o desvio padrão.	47
Tabela 6 - Valores médios de V_{CNP} para 5 dispositivos em cada etapa da funcionalização na rota PBASE dos rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} . DP é o desvio padrão.	49
Tabela 7 - Valores médios de V_{CNP} para 5 dispositivos em cada etapa da funcionalização na rota EDC/NHS dos rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} . DP é o desvio padrão.	49
Tabela 8 - Biossensores reportados na literatura para detecção de miRNA.	60
Tabela 9 - Os 10 descritores mais bem ranqueados obtidos por regressão multitarefa SISSO. Métricas de avaliação para os testes de validação cruzada (CV) e para o ajuste utilizando o conjunto completo de dados (FIT).	63
Tabela 10 - Os 10 descritores bidimensionais mais bem ranqueados obtidos pela tarefa de classificação SISSO para todos os alvos miR-34a, miR-34b, miR-34c e NC.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFM — Microscopia de força atômica (do inglês *atomic force microscopy*)
- DDT — 1-dodecanotiol
- D — Dreno (do inglês *drain*)
- EDC — 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto
- EDL — Dupla camada elétrica (do inglês *electric double layer*)
- ETA — Etanolamina
- G — Gate (do inglês *gate*)
- GO — Óxido de grafeno (do inglês *graphene oxide*)
- GO_{Gra} — Óxido de grafeno obtido da empresa Graphenea
- GO_L — Óxido de grafeno lavado
- GO_{LB} — Óxido de grafeno lavado com base
- HB — Tampão de hibridização (do inglês *hybridization buffer*)
- IHP — Camada interna de Helmholtz (do inglês *inner Helmholtz plane*)
- I_{DS} — Corrente dreno-fonte (do inglês *drain-source current*)
- I_{DS,mínimo} — Corrente mínima dreno-fonte
- MAE — Erro absoluto médio (do inglês *mean absolute error*)
- MES — ácido 4-morfolinoetanosulfônico
- M2Ds — Materiais bidimensionais
- NHS — N-hidroxisuccinimida
- ODs — Resíduo oxidativo (do inglês *oxidative debris*)
- OHP — Camada externa de Helmholtz (do inglês *outer Helmholtz plane*)
- PB — Tampão de fosfato (do inglês *phosphate buffer*)
- PBASE — 1-pirenobutirato N-hidroxisuccinimida
- PDDA — poli(dialildimetilamônio cloreto)
- PDMS — Dimetil polissiloxano
- POC — *Point-of-care*
- RMS — *root mean square*
- RMSE — Raiz do erro quadrático médio (do inglês *root mean square error*)
- rGO — Óxido de grafeno reduzido (do inglês *reduced graphene oxide*)
- S — Fonte (do inglês *source*)
- SISSO — *Sure Independence Screening and Sparsifying Operator*
- ssDNAcp — DNA de fita simples de captura (do inglês *single-stranded capture DNA*)

V_{CNP} — Tensão no ponto de neutralidade de carga (do inglês *charge neutrality point voltage*)

V_{DS} — Tensão dreno–fonte (do inglês *drain–source voltage*)

V_{GS} — Tensão gate–fonte (do inglês *gate–source voltage*)

XPS — Espectroscopia de fotoelétrons de raios X (do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1. Dispositivos de Diagnóstico <i>Point of Care</i>	19
3.2. Bioreceptores e Biomarcadores	20
3.3. Microfabricação	21
3.4. Transistores Eletrolíticos.....	22
3.5. Óxido de Grafeno (GO) e Métodos de Redução.....	24
3.6. Funcionalização da Superfície do rGO	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Materiais	30
4.2. Fabricação do Dispositivo e Ajustes de Performance.....	31
4.3. Deposição e redução de GO para a produção de filmes de rGO	32
4.4. Caracterizações do Dispositivo com Filme de rGO.....	33
4.5. Funcionalização dos Filmes de rGO para aplicações em genossensores.....	35
4.6. Caracterização dos Dispositivos Pós-Funcionalização	36
4.7. Otimização dos Parâmetros Elétricos de Operação e Funcionalização	37
4.8. Influência da Força Iônica e do Comprimento de Debye	37
4.9. Testes de Sensoriamento	38
4.10. Aprendizado de máquina	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Fabricação e Caracterização do Dispositivo a partir de diferentes amostras de rGO	40
5.2. Funcionalização dos filmes de rGO	47
5.3. Influência da Força Iônica e do Comprimento de Debye	53
5.4. Otimização dos Parâmetros Elétricos de Operação e nova funcionalização	54
5.5. Testes de Sensoriamento com Alvo Específico.....	58
5.6. Seletividade do miRNA-34: análises analíticas e de aprendizado de máquina ...	61
6. CONCLUSÃO.....	67
7. OUTRAS ATIVIDADES RELACIONADAS	67
REFERÊNCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

A relação entre os seres humanos e os animais é tão antiga quanto a própria sociedade humana. Desde os primórdios, a humanidade sempre dependeu dessas interações para sobreviver (Galibert et al., 2011). As relações iniciais eram predominantemente predatórias, onde a caça fornecia alimento e a matéria prima para a confecção de vestuários e ferramentas. O processo de domesticação de animais aconteceu de maneira gradativa e foi impulsionado pela necessidade das novas civilizações de garantir reservas alimentares e maior capacidade de transporte de carga durante o advento da agricultura. Entretanto, estudos apontam que a domesticação do cão antecede o período de fixação dos povos nômades. Lobos em busca por comida eram atraídos para os acampamentos humanos e se acostumavam com a presença deles. Gradualmente, os predecessores dos cães auxiliavam na caça, protegiam territórios e faziam companhia aos humanos, estabelecendo o surgimento de laços próximos e iniciando vínculos sentimentais (Galibert et al., 2011).

Com o tempo, além dos cães, outros animais começaram a desenvolver laços afetivos com os seres humanos. Em quase todas as culturas, os humanos mantiveram animais por perto, não apenas por utilidade prática, mas também por entretenimento ou companhia (Pongrácz; Dobos, 2023). Portanto, os animais de companhia ocupam um lugar especial nas sociedades há muitos anos. Eles têm sido importantes para o bem-estar emocional das pessoas, contribuindo com a saúde mental e proporcionando apoio emocional significativo. Estudos mostram que o convívio com esses animais ativa a liberação de ocitocina, promovendo bem-estar, compaixão e ligação social (O'Haire, 2010). Crianças que crescem com animais de estimação tendem a desenvolver maior afetividade, sensibilidade e responsabilidade.

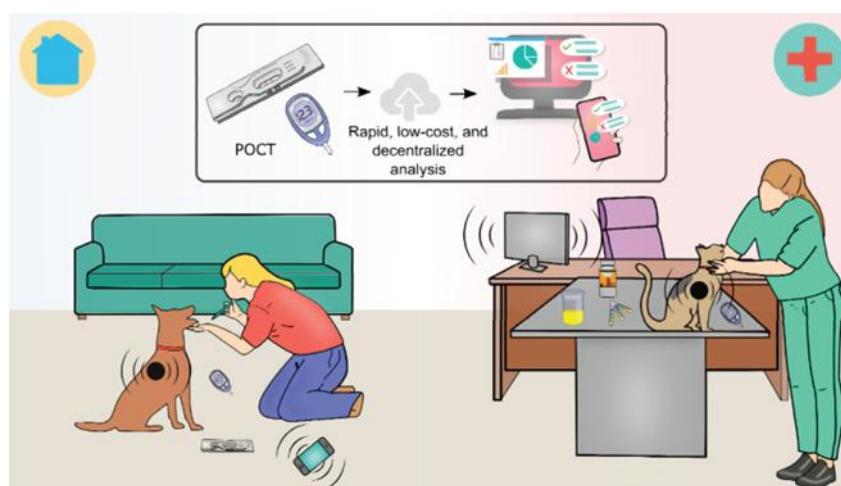
Os animais de companhia estão sujeitos a uma variedade de doenças, que incluem desde infecções virais e bacterianas até condições crônicas como diabetes e doenças cardíacas (Cito et al., 2016). Além disso, como os seres humanos, esses animais podem ser vulneráveis ao estresse, desencadeado por mudanças ambientais, separação dos donos e interações sociais negativas. O estresse em animais de companhia pode manifestar sintomas semelhantes aos observados em humanos, afetando tanto seu bem-estar físico quanto emocional (Vanegas-Farfano; González-Ramírez, 2016).

As condições psiquiátricas vinculadas ao estresse são enfermidades complexas que decorrem da interação de fatores genéticos e ambientais, nos quais os eventos do ambiente podem influenciar a expressão dos genes (Andolina; Segni Matteo; Ventura, 2017). miRNAs são pequenos RNAs não codificadores que têm a função de regular centenas de alvos,

desempenhando um papel importante em diversos processos biológicos. Graças à sua capacidade de ajustar precisamente a expressão gênica, os miRNAs regulam padrões genéticos para facilitar a adaptação do organismo a fatores internos e externos, como eventos estressantes (Andolina et al., 2016). A literatura apresenta estudos em modelos animais que evidenciam os membros da família de microRNAs-34 como moduladores críticos da resposta ao estresse no sistema nervoso central (Andolina et al., 2016; Andolina; Segni Matteo; Ventura, 2017). Embora o miRNA-34a seja um biomarcador promissor de estresse, ainda não existe um valor de concentração quantitativo definido pela comunidade científica. Os estudos reportam principalmente variações de expressão, sem um limiar padronizado para diagnóstico.

Ao longo dos anos, o aumento da preocupação com infecções em animais de companhia tem impulsionado a otimização dos diagnósticos veterinários. Exames complementares, como hemogramas completos, urinálises e exames coproparasitológicos são realizados em laboratório a partir de amostras biológicas, proporcionando resultados altamente precisos para confirmar diagnósticos animais. Contudo, os diagnósticos laboratoriais exigem mais tempo e equipamentos complexos, o que pode resultar em custos mais elevados e dificultar o diagnóstico imediato durante consultas veterinárias. O desenvolvimento de técnicas portáteis, de baixo custo, de resposta rápida e alta sensibilidade surge como uma alternativa para facilitar diagnósticos rápidos de animais de companhia (Fonseca et al., 2025b) (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração conceitual de dispositivos portáteis de diagnóstico aplicado a saúde de animais de companhia.



Fonte: ref (Fonseca et al., 2025b)

Materiais bidimensionais (M2Ds) desempenham papéis fundamentais na pesquisa científica devido às suas propriedades únicas para o desenvolvimento de novas tecnologias (Ferrari et al., 2015; Novoselov, 2011). O grafeno se destaca como um dos materiais bidimensionais mais notáveis e estudados devido à combinação singular de propriedades que

incluem alta condutividade elétrica, flexibilidade, resistência mecânica e transparência (Ferrari et al., 2015; Novoselov, 2011). Entretanto, o óxido de grafeno (GO, do inglês *graphene oxide*) tem sido preferido em diversas aplicações devido o grafeno ser de difícil obtenção em larga escala e a baixos custos. O GO apresenta diversos grupos oxigenados funcionalizáveis, o que lhe confere diversas oportunidades em sensores e biossensores (Georgakilas et al., 2012). A presença abundante desses grupos limita as aplicações do GO em dispositivos elétricos devido à sua natureza isolante. No entanto, o GO é suscetível à redução (rGO, do inglês *reduced graphene oxide*), transformando-se em um material condutivo por meio de métodos químicos, térmicos e eletroquímicos (Pei; Cheng, 2012). Esse procedimento não remove integralmente os grupos oxigenados, o que também torna o rGO apropriado à funcionalização. A incorporação de funcionalidades no rGO pode ser alcançada pela imobilização de moléculas e biomoléculas através de ligações covalentes ou não covalentes, proporcionando a esses materiais novas características (Dimiev; Eigler, 2016).

A aplicação de funcionalizações é eficaz para o desenvolvimento de sensores e biossensores devido à possibilidade de fixação dos receptores químicos ou biológicos no rGO, conferindo-lhes alta seletividade em relação a um determinado analito (Dimiev; Eigler, 2016). A detecção de eventos de biossensoriamento pode ser conduzida usando sinais elétricos mensurados por um dispositivo chamado transistor eletrolítico (EGT, do inglês *electrolyte-gated transistor*). EGT são comumente constituídos por filmes finos, nos quais o dielétrico tradicional do *gate* é substituído por uma solução eletrolítica (De Oliveira et al., 2016). A utilização de eletrólitos aquosos propicia um ambiente adequado para biomoléculas, o que favorece a aplicação dos EGT no biossensoriamento. Esses dispositivos possuem características como baixa tensão de operação (<1 V), alta capacitância ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$), amplificação de sinais, sensibilidade potenciométrica e capacidade de medição multiparamétrica (Furlan de Oliveira et al., 2019). Os sinais são obtidos por meio de medidas de corrente-tensão em configurações específicas de tensão nos terminais gate-fonte (V_{GS} , do inglês *gate-source voltage*) e fonte-dreno (V_{DS} , do inglês *drain-source voltage*).

Técnicas de aprendizado de máquina podem ser empregadas para auxiliar o biossensoriamento ao extrair informações relevantes a partir de múltiplos sinais elétricos, aumentando simultaneamente a sensibilidade e a seletividade do dispositivo. Abordagens multivariadas aplicadas a EGTs permitem identificar padrões nas curvas de transferência que não são facilmente detectáveis por análises convencionais. Assim, a integração entre genossensores baseados em rGO-EGT e ferramentas de aprendizado de máquina constitui uma

estratégia promissora para aprimorar a detecção de marcadores de estresse da família miR-34, viabilizando análises mais robustas, precisas e biologicamente relevantes.

Portanto, esse projeto visa desenvolver metodologias para identificar o marcador de estresse da família microRNAs-34 em animais de companhia a partir do desenvolvimento de genossensores, i.e. biossensores que empregam ETGs como transdutores eletrônicos e sondas de captura como receptores biológicos, integrados a técnicas de aprendizado de máquina para análise avançada dos sinais obtidos. Desenvolver genossensores acessíveis e de fácil utilização não apenas promoveria cuidados aprimorados para os animais, mas também permitiria que proprietários e veterinários compreendessem e gerenciassem de maneira mais eficaz o bem-estar emocional dos animais de companhia.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver genossensores utilizando transdutores do tipo transistores eletrolíticos. Os objetivos específicos incluem detectar microRNAs relevantes para a saúde animal via a funcionalização de materiais bidimensionais com bioreceptores apropriados. Em particular, visa-se explorar o óxido de grafeno reduzido como material ativo nesses dispositivos, devido a sua condutividade ambipolar e seus grupos oxigenados funcionais.

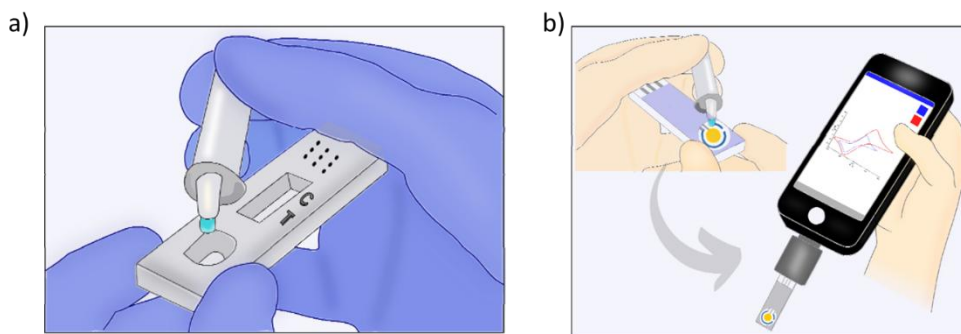
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Dispositivos de Diagnóstico *Point of Care*

Garantir o amplo acesso a métodos diagnósticos é fundamental para o tratamento precoce e o controle eficaz de doenças, promovendo a qualidade de vida da população. Os métodos diagnósticos laboratoriais convencionais apresentam limitações significativas, como longos tempos de processamento e a dependência de equipamentos complexos, o que pode aumentar os custos e dificultar o diagnóstico imediato. Dessa forma, o desenvolvimento de tecnologias portáteis, de baixo custo, resposta rápida e alta sensibilidade representa uma alternativa promissora para viabilizar diagnósticos acessíveis e em tempo hábil (Dincer et al., 2019). Dispositivos *point-of-care* (POC) se destacam nesse contexto por permitirem a detecção seletiva e sensível de marcadores bioquímicos tanto por especialistas quanto por não especialistas (como pacientes, consumidores, médicos e enfermeiros) (Gubala et al., 2012). O principal objetivo desses testes é fornecer resultados rápidos, permitindo a implementação imediata do tratamento adequado e, consequentemente, melhores desfechos clínicos ou econômicos. As tiras de fluxo lateral (Kakkar et al., 2024) e os biossensores eletroquímicos

(Bahadır; Sezgintürk, 2015) são as plataformas mais utilizadas para testes POC, devido à sua facilidade de uso e rapidez (Figura 2). Os EGT representam uma tecnologia emergente para aplicações em POC (Liu; Chen; Wan, 2019).

Figura 2 - Dispositivos de diagnóstico POC comercialmente disponíveis. a) teste de fluxo lateral (ou imunocromatografia), b) dispositivos eletroquímicos.



Fonte: ref (Fonseca et al., 2025a).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os POC devem seguir os critérios REASSURED (acrônimo em inglês), ou seja: conectividade em tempo real, facilidade na coleta da amostra, acessibilidade, alta sensibilidade, especificidade, facilidade de uso, rapidez e robustez, isenção de equipamentos e capacidade de serem entregues ao usuário final. Esses requisitos visam garantir que as tecnologias diagnósticas sejam eficazes, acessíveis e adequadas a diferentes contextos de uso, especialmente em ambientes com recursos limitados (Land et al., 2018). Os dispositivos POC também são importantes na medicina veterinária, já que a dificuldade dos animais em comunicar sintomas torna a detecção precoce das doenças mais desafiadora. Esses dispositivos permitem diagnósticos rápidos e cuidados personalizados, reduzindo os custos veterinários. Além disso, o mercado de POC para pets tem grande potencial econômico, com crescimento previsto de USD 4,1 bilhões até 2032, embora ainda seja bem menor e menos desenvolvido que o mercado humano (Fonseca et al., 2025a).

3.2. Bioreceptores e Biomarcadores

Bioreceptores são moléculas de origem biológica ou sintética responsáveis pela interação específica com o analito de interesse em biossensores (Wang, 2024). A escolha do bioreceptor é um fator crítico para o desempenho do dispositivo, devendo considerar aspectos relacionados às estratégias de ancoragem na superfície do transdutor e sua estabilidade química e biológica. Bioreceptores que podem ser empregados incluem enzimas, proteínas, precursores proteicos, hormônios, anticorpos, aptâmeros e polímeros molecularmente impressos.

Biomarcadores são moléculas que indicam processos biológicos normais ou anormais, doenças e respostas a tratamentos. Eles se classificam em sete categorias: (i) biomarcadores de

suscetibilidade, que indicam risco de desenvolver doenças; (ii) diagnósticos, para identificar pacientes com uma doença; (iii) de monitoramento, para acompanhar a evolução da doença; (iv) preditivos, que indicam predisposição genética; (v) prognósticos, para avaliar risco de recorrência ou progressão; (vi) farmacodinâmicos, para confirmar resposta a medicamentos ou vacinas; e (vii) de segurança, que identificam exposição a ambientes nocivos (FDA-NIH Biomarker Working Group and others, 2016). Biomoléculas como proteínas, anticorpos e ácidos nucleicos podem ser utilizados como biomarcadores para detectar e monitorar doenças. Entre elas, os microRNAs, pequenos RNAs estáveis que regulam a expressão gênica, são promissores como indicadores sensíveis e específicos para diagnóstico precoce, tendo sua importância recentemente reconhecida com o Prêmio Nobel de Medicina de 2024 pela descoberta de sua função na regulação pós-transcricional (Ambros et al., 2003).

3.3. Microfabricação

A microfabricação consiste em um conjunto de técnicas que permitem a definição precisa dos elementos estruturais do dispositivo, possibilitando a fabricação de sensores altamente miniaturizados, reproduzíveis e integráveis a plataformas analíticas avançadas (Hierlemann et al., 2003). A combinação dessas técnicas possibilita a construção controlada, camada a camada, de dispositivos complexos. Esse conjunto de métodos constitui a base da fabricação de sensores, microssistemas e transistores aplicados ao biossensoriamento, permitindo desde arquiteturas simples até plataformas multiplexadas integradas em substratos rígidos ou flexíveis (Hierlemann et al., 2003).

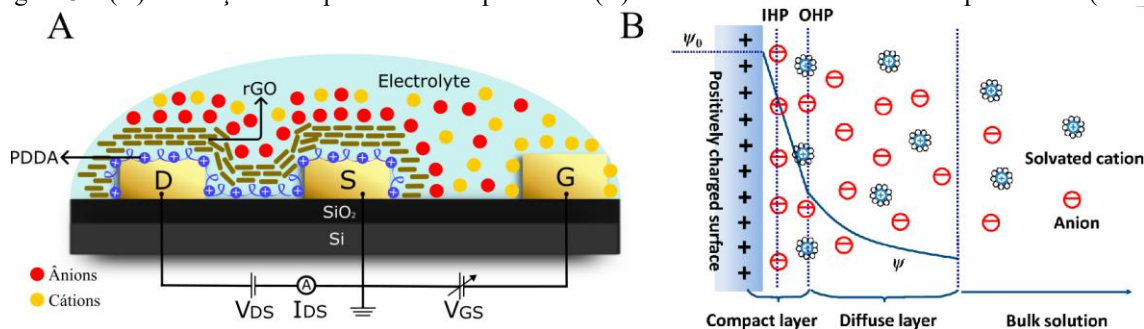
Os quatro procedimentos básicos que estruturam a microfabricação são deposição, definição de padrões, corrosão e dopagem (Franssila, 2004). A deposição de filmes finos permite a construção controlada de camadas com espessuras que variam de nanômetros a micrômetros e pode ser realizada por métodos físico-químicos, eletrodeposição ou spin-coating (Franssila, 2004). A definição de padrões é realizada principalmente por fotolitografia, processo no qual um fotorresiste é depositado sobre o substrato e exposto à radiação UV através de uma máscara (Mack, 2007). Essa exposição modifica localmente o fotorresiste, criando regiões protegidas que direcionam as etapas subsequentes de fabricação. A litografia pode ser direta, inversa ou realizada por técnicas alternativas como *soft lithography* e *microcontact printing* (Mack, 2007). A etapa de *etching* remove seletivamente material das áreas expostas (Hierlemann et al., 2003). Já a dopagem é empregada para ajustar as propriedades elétricas de materiais semicondutores por meio de difusão térmica ou implantação iônica, permitindo o

controle preciso da condutividade e a formação de regiões ativas em dispositivos eletrônicos (Franssila, 2004).

3.4. Transistores Eletrolíticos

Transistores Eletrolíticos são dispositivos constituídos por filmes finos, nos quais o dielétrico tradicional do *gate* é substituído por uma solução eletrolítica. A utilização de eletrólitos aquosos proporciona um ambiente adequado para biomoléculas, favorecendo a aplicação dos EGTs no biossensoriamento (De Oliveira et al., 2016). Esses dispositivos apresentam três terminais denominados fonte (S, do inglês *source*), dreno (D do inglês *drain*) e *gate* (G), com o material semiconductor presente entre os terminais S e D. A Figura 3A ilustra a arquitetura típica do dispositivo e seus respectivos eletrodos de *gate* (coplanar), fonte e dreno (interdigitados).

Figura 3 – (A) Ilustração da arquitetura do dispositivo e (B) modelo de Stern da camada dupla elétrica (EDL).



Fonte: (A) Autor; (B) Adaptado da ref (Liu; Chen; Wan, 2019).

Quando uma tensão é aplicada entre o *gate* e a fonte, o campo elétrico gerado afeta a distribuição de íons no eletrólito. O campo elétrico faz com que íons positivos sejam atraídos em direção ao eletrodo negativo, enquanto íons negativos são atraídos em direção ao eletrodo positivo (Figura 3A). Essa movimentação de íons leva à formação da dupla camada elétrica (EDL, do inglês *electric double layer*) em cada uma das interfaces do dispositivo. A EDL é composta por duas regiões principais: a camada de Helmholtz, também conhecida como camada compacta, e a camada de difusão. A camada de Helmholtz é dividida em duas subcamadas: a camada interna de Helmholtz (IHP, do inglês *inner Helmholtz plane*), onde os íons são completamente adsorvidos eletrostaticamente na superfície, e a camada externa de Helmholtz (OHP, do inglês *outer Helmholtz plane*), onde os íons estão próximos à superfície, porém não completamente adsorvidos (Figura 3B). Já na camada de difusão, os íons são distribuídos de forma mais difusa e menos ordenada (Du; Lin; Xu, 2015).

Nos EGTs, devido à formação da dupla camada elétrica, elétrons livres no filme semiconductor são atraídos para a superfície da interface onde há cátions, enquanto lacunas

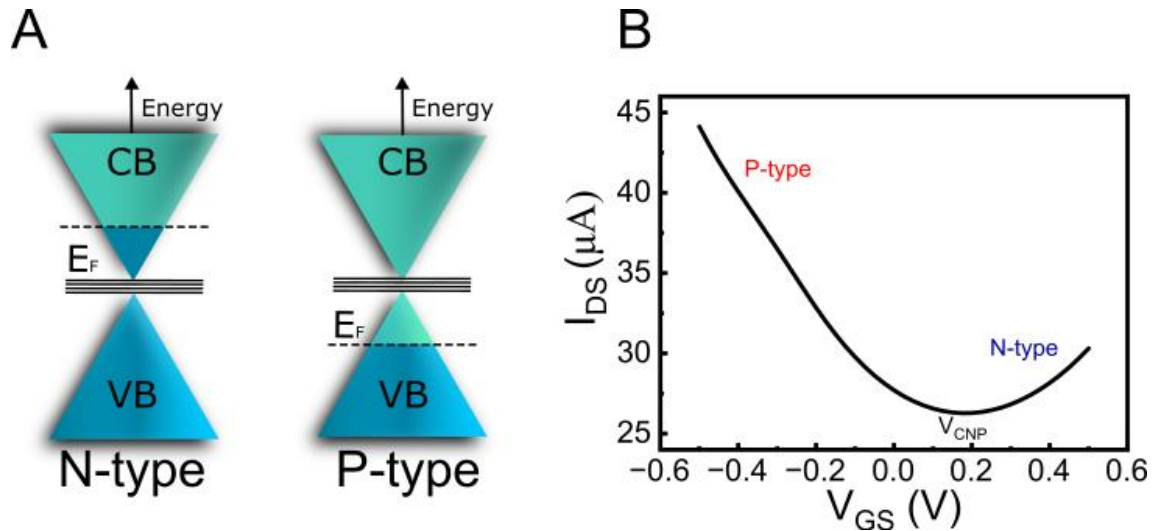
(buracos) são atraídas para a superfície onde há ânions. A capacitância das interfaces pode ser representada como dois capacitores em série devido à capacitância da camada compacta e da camada difusa (Liu; Chen; Wan, 2019). A camada de íons no eletrólito e a interface pode ser considerada como capacitores de placas paralelas. Portanto, existem dois capacitores envolvidos no dispositivo: na interface do *gate* com o eletrólito e entre canal e eletrólito. A contribuição capacitiva no dispositivo pode ser simplificada assumindo a capacitância geométrica de um capacitor de placas paralelas, como descrito pela equação 1:

$$C = \frac{\varepsilon A}{d} \quad (1)$$

Onde C é a capacitância, ε a permissividade elétrica do meio, A a área das placas do capacitor e d a distância entre placas. Devido à pequena distância entre os íons e a superfície, a camada compacta contribui significativamente para essa capacitância. Quando a capacitância da dupla camada varia devido à alteração do V_{GS} , a capacidade de armazenar carga também se modifica. Portanto, a variação da capacitância regula a quantidade de carga que pode ser armazenada no canal do transistor, o que determina a densidade de portadores de carga no material semiconductor e, consequentemente, influencia sua condutividade (Du; Lin; Xu, 2015). Os valores típicos de capacitância nesses dispositivos são da ordem de 1-10 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Além disso, a alta capacitância resultante da EDL permite que o dispositivo opere em baixas tensões (normalmente abaixo de 1.23 V, ou seja, o potencial da eletrólise da água), o que é vantajoso para os EGT serem empregados como sensores e biossensores POC.

A caracterização elétrica do dispositivo é normalmente realizada medindo-se a corrente fonte-dreno I_{DS} que flui pelo canal do transistor enquanto a tensão de gate é variada, resultando no que é conhecido como curva de transferência. EGTs com materiais relacionados ao grafeno, como o rGO, na camada ativa apresentam comportamento ambipolar, em decorrência de sua estrutura de banda característica (Figura 4A). Portanto, tensões negativas de V_{GS} induzem condução do tipo p no filme semiconductor por meio do acúmulo e transporte de lacunas (buracos), enquanto tensões positivas de V_{GS} resultam em condução do tipo n por meio do transporte de elétrons. A tensão na qual o filme apresenta a condutividade mínima é chamada de tensão de Dirac ou ponto de neutralidade de carga (V_{CNP} , do inglês *charge neutrality point*) (Figura 4B). Mudanças na curva de transferência de EGTs de rGO podem ser utilizadas como sinal (output) em aplicações em sensoriamento e biossensoriamento (Furlan de Oliveira et al., 2022; Lelis et al., 2025a).

Figura 4 – Representação do (A) diagrama de bandas e (B) curva de transferência de EGTs utilizando rGO como camada ativa.

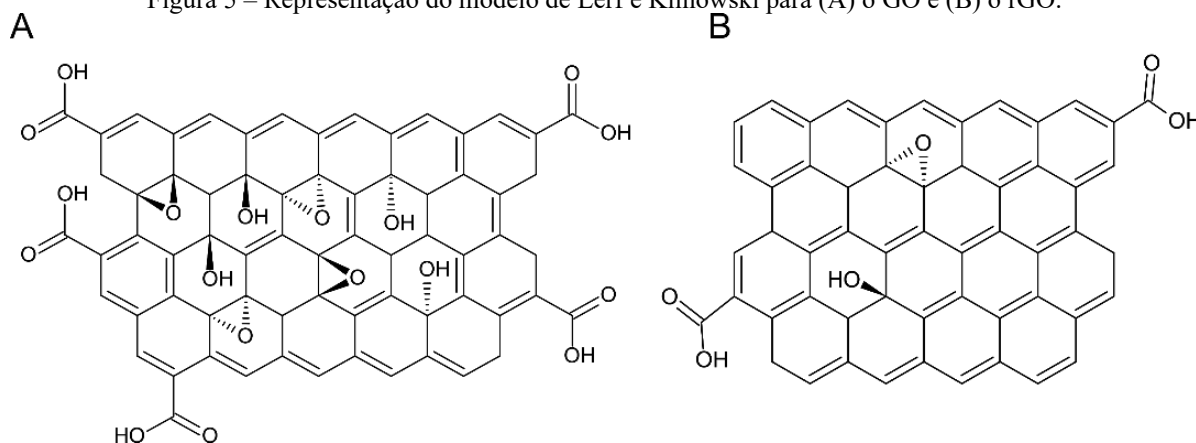


Fonte: Autor.

3.5. Óxido de Grafeno (GO) e Métodos de Redução

O óxido de grafite, resultante da oxidação do grafite, é um excelente precursor para a produção de GO, o qual é composto por folhas únicas (Cai et al., 2012). Suas propriedades hidrofílicas permitem que seja facilmente disperso em uma variedade de solventes polares, tornando-o fácil de processar em solução, sobretudo em água. As folhas de GO apresentam átomos de carbono dispostos planarmente em ligações sp^2 , além de alguns átomos com ligações sp^3 , os quais se encontram deslocados para cima ou para baixo do plano atômico. O GO pode ser descrito como uma monocamada de átomos de carbono contendo grupos funcionais oxigenados e regiões não oxidadas, onde a maioria dos átomos de carbono mantém a hibridização sp^2 (Brisebois; Siaj, 2020). A composição química do GO é fortemente influenciada pela rota de oxidação do grafite utilizada na sua síntese, o que afeta diretamente a natureza e a distribuição dos grupos oxigenados incorporados à estrutura. Entretanto, a estrutura química do GO ainda não é completamente clara. Embora vários estudos tenham sugerido diversos modelos estruturais, foi o modelo proposto por Lerf e Klinowski (LK) que obteve ampla aceitação (Figura 5).

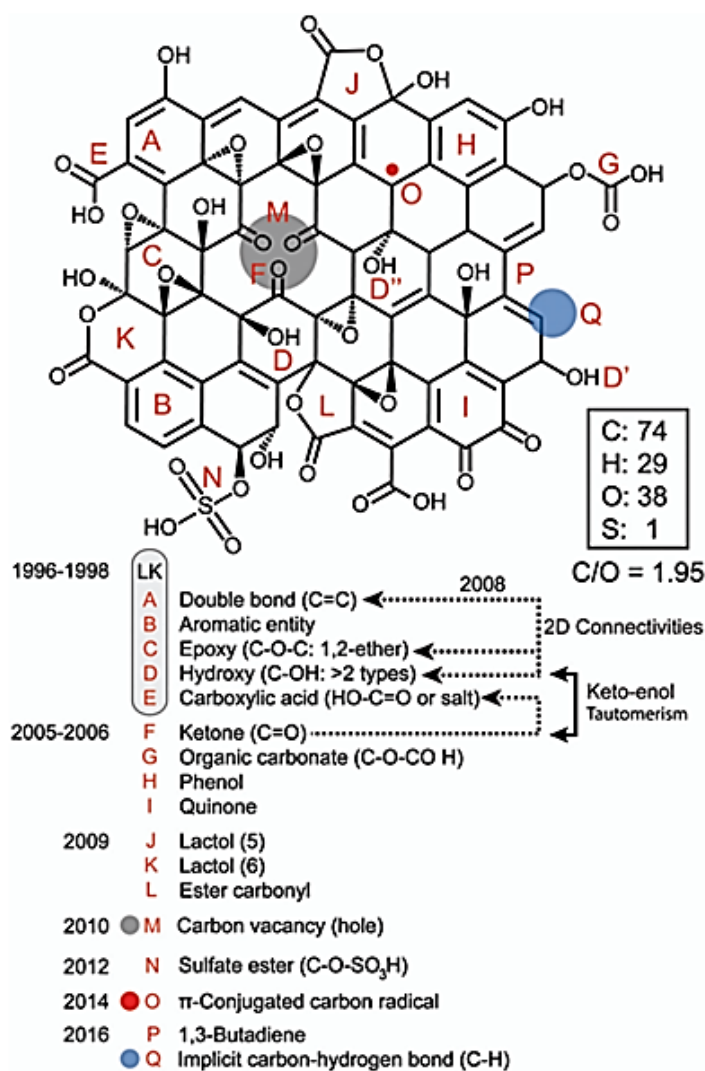
Figura 5 – Representação do modelo de Lerf e Klinowski para (A) o GO e (B) o rGO.



Fonte: Autor.

O modelo de Lerf-Klinowski (LK) indica que a estrutura do GO apresenta tanto regiões com anéis alifáticos de seis membros quanto regiões aromáticas com anéis de benzeno não oxidados, distribuídas de maneira aleatória e com dimensões determinadas pelo nível de oxidação do composto. As ligações presentes na superfície da monocamada, e que contribuem com as estruturas de carbono quase planar, são compostas por ligações duplas, estruturas aromáticas e grupos epóxidos. A acidez do composto é atribuída à presença de grupos hidroxila e carboxila. Apenas átomos de carbono ligados aos grupos hidroxila possuem uma configuração tetraédrica ligeiramente distorcida, o que resulta em rugas na folha. Anos mais tarde, novas pesquisas realizadas por Dékány e colaboradores identificaram a presença de cetona, carbonato orgânico, fenol e quinona. Posteriormente, Cai e colaboradores alcançaram resultados que sugeriam que os grupos ácido carboxílicos e cetona estão localizados na periferia do GO. Outro estudo realizado por Gao e colaboradores identificaram a presença de lactonas de 5 e 6 membros e carbonilas de éster nas bordas das folhas de óxido de grafeno. Também foram encontradas na estrutura do GO lacunas de carbono, éster sulfato, radicais de carbono p-conjugados, ligações C-H implícitas e sistemas 1,3 butadieno (Brisebois; Siaj, 2020). A figura 6 apresenta a estrutura do GO com os grupos funcionais mencionados.

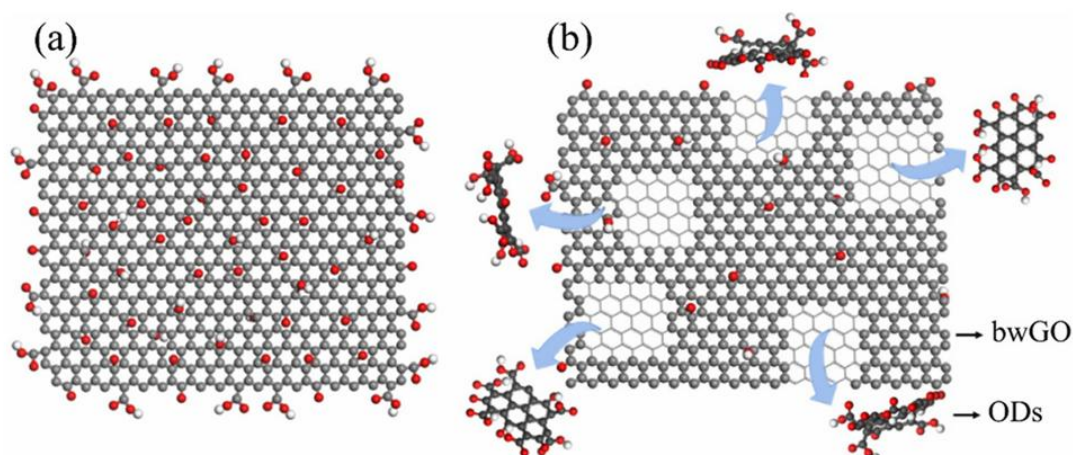
Figura 6 - Estrutura atual do GO.



Fonte: ref (Brisebois; Siaj, 2020)

Além de apresentar variabilidade de grupos oxigenados e tamanhos de flake, o GO pode apresentar impurezas. Um tipo de impureza particularmente relevante e frequentemente negligenciado é chamado de resíduo oxidativo (ODs, do inglês *oxidative debris*) (Faria et al., 2012). Esses ODs são fragmentos de carbono ricos em oxigênio de tamanho nanométrico encontrados nas folhas de GO. Assim, a estrutura do GO pode ser descrita em um modelo estrutural de dois componentes, onde várias funcionalidades de oxigênio pertencem aos ODs localizados no plano basal, enquanto menos grupos oxigenados estão covalentemente ligados à folha 2D do GO (De Lima et al., 2023). A presença e ausência de ODs pode resultar em propriedades distintas do material, embora sua influência sobre o desempenho elétrico e aplicações em dispositivos ainda seja pouco compreendida. A Figura 7A e 7B apresenta, respectivamente, a estrutura do GO segundo o modelo de componente único e com ODs separados da folha.

Figura 7 – Estrutura do GO considerando (a) modelo de componente único, sem ODs, e (b) modelo de dois componentes, com resíduos oxidativos (ODs) separados da folha.



Fonte: ref (Faria et al., 2012)

As propriedades mecânica e de condutividade térmica e elétrica do GO são inferiores às do grafeno (Brisebois; Siaj, 2020). Isso ocorre devido à presença de defeitos no plano basal. Esses defeitos quebram a estrutura conjugada e localiza os elétrons π , o que resulta na diminuição tanto da mobilidade quanto da concentração de portadores de carga (Brisebois; Siaj, 2020). Apesar da presença de regiões conjugadas, a condutividade de longo alcance é restrita, o que confere às folhas de GO sua característica isolante. Essa limitação restringe as aplicações do GO em dispositivos eletrônico, sendo sua forma reduzida mais utilizada.

A redução do óxido de grafeno pode restaurar sua condutividade por meio da remoção de grupos oxigenados. No entanto, a remoção completa desses grupos não é possível, e, portanto, o rGO é caracterizado como um material condutor com defeitos estruturais resultantes da remoção de uma grande quantidade de grupos oxigenados da estrutura do GO. O objetivo de qualquer metodologia de redução do GO é produzir materiais semelhantes ao grafeno puro tanto em estrutura quanto em propriedades. Diferentes processos de redução influenciam nas propriedades finais do rGO (Lavin-Lopez et al., 2017).

Durante o processo de redução térmica, o aumento da temperatura leva à decomposição dos grupos funcionais contendo oxigênio. Devido a significativa remoção de oxigênio a altas temperaturas, é necessário excluir esse gás durante o processo. Portanto, a redução térmica deve ser conduzida em condições de vácuo, atmosfera inerte ou redutora. É essencial controlar o aquecimento durante o processo de redução para evitar a expansão descontrolada da estrutura. No entanto, o aquecimento mais lento torna o processo de redução térmica do GO demorado. Estudos apontam que a condutividade elétrica dos filmes de rGO tende a aumentar à medida que a temperatura aumenta (Ray, 2015).

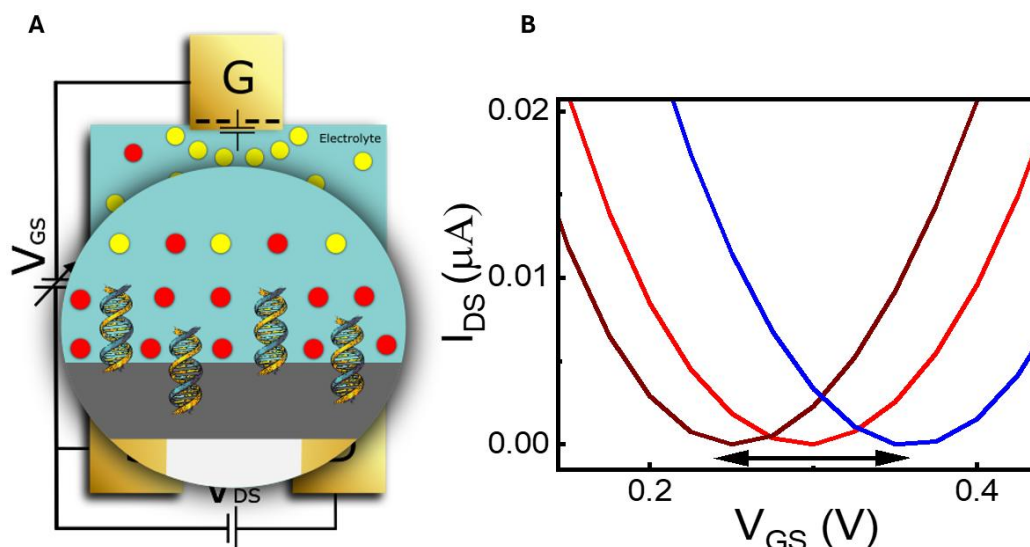
A redução eletroquímica de folhas ou filmes de GO pode ser conduzida em uma célula eletroquímica padrão utilizando uma solução eletrolítica aquosa à temperatura ambiente. Nesse processo, a redução ocorre principalmente devido à troca de elétrons entre o GO e os eletrodos, eliminando a necessidade de agentes químicos especiais (Pei; Cheng, 2012). Essa metodologia tem a vantagem de evitar o uso de redutores perigosos e a formação de subprodutos.

3.6. Funcionalização da Superfície do rGO

Como a redução do GO não remove integralmente os grupos oxigenados, é possível empregar de forma inteligente os defeitos do rGO através de sua funcionalização. A incorporação de funcionalidades no rGO pode ser alcançada pela imobilização de receptores moleculares e bioreceptores através de ligações covalentes ou não covalentes, proporcionando a esses materiais novas características, como alta seletividade para com um determinado analito (Ray, 2015). Interações não covalentes são possíveis devido ao rGO oferecer um grande sistema de elétrons π em seu plano basal. Já a imobilização de moléculas e biomoléculas por ligações covalentes podem ser exploradas a partir dos diversos grupos oxigenados do rGO em suas bordas (ex. carboxílicos, hidroxila, carbonial) e plano basal (hidroxila e epóxido). Um dos maiores desafios da funcionalização do rGO é o seu controle seletivo, pois o tipo de densidade de grupos oxigenados funcionais varia a depender do processo de redução do GO.

Devido à ancoragem de biomoléculas na superfície do rGO, ocorre um acúmulo de cargas próximas ao canal do transistor. Essas cargas imobilizadas geram um campo elétrico local que afeta a distribuição de portadores de carga no rGO, modificando o valor de V_{CNP} durante a operação do EGT. Quando o V_{CNP} se desloca para valores mais positivos de V_{GS} , diz-se que há um doping do tipo p, devido à maior concentração de lacunas. Por outro lado, quando o V_{CNP} se desloca para valores mais negativos de V_{GS} , ocorre um doping do tipo n. Esses deslocamentos de V_{CNP} são uma assinatura elétrica para monitorar processos de funcionalização do rGO com receptores químicos e biorreceptores para aplicações em biossensoriamento (Figura 8).

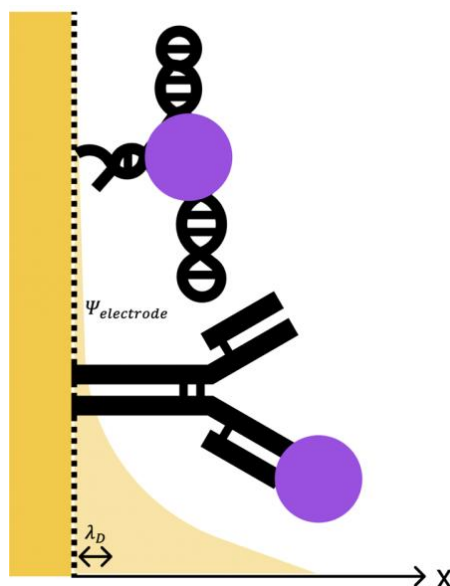
Figura 8 – Ilustração da (A) seção transversal do dispositivo após funcionalização e hibridização da molécula alvo e seu (B) deslocamento para a esquerda ou direita em resposta.



Fonte do autor.

EGTs aplicados como sensores e biossensores detectam interações químicas e bioquímicas entre espécies em sua superfície desde que ocorram dentro do limite da camada de Debye (Kesler; Murmann; Soh, 2020). A camada de Debye é definida como a distância em que a concentração de cargas em um meio neutraliza o campo elétrico de uma superfície carregada (Zheng et al., 2021). Portanto, é fundamental avaliar a força iônica do meio nos experimentos de sensoriamento para otimizar os testes de detecção. Altas forças iônicas promovem melhores hibridizações, pois neutralizam uma quantidade maior da carga negativa do DNA. Por outro lado, baixas forças iônicas resultam na expansão da dupla camada elétrica, ampliando a faixa de detecção e aumentando a sensibilidade do dispositivo. A Figura 9 ilustra uma comparação do comprimento de Debye na interface sólido-líquido com as dimensões dos biorreceptores moleculares.

Figura 9 – Comprimento de Debye na interface sólido-líquido em comparação com os biorreceptores moleculares.



Fonte: ref (Kesler; Murmann; Soh, 2020)

4. MATERIAIS E MÉTODOS¹

4.1. Materiais

Substratos de silício dopado tipo-p/dióxido de silício (Si/SiO₂), com camada de óxido crescido termicamente com 2 µm de espessura, fotorresiste AZ5214 e o revelador MIF726 foram adquiridos, respectivamente, da Siegert Wafer, Microchemicals e Merck. As soluções de poli(dialildimetilamônio cloreto) (PDDA), 1-pirenobutirato N-hidroxissuccinimida (PBASE), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), etanolamina (ETA), NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, MgCl₂·6H₂O e 1-dodecanotiol (DDT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A base do elastômero de silicone e o agente de cura do elastômero de silicone foram adquiridos da Dow Chemical Company. Foram utilizados acetona e isopropanol (VLSI, *Very Large System Integration*). A dispersão aquosa de óxido de grafeno (0,4% em peso, conteúdo de monocamada > 95%) foi adquirida da Graphenea. As sequências de DNA fita simples de captura (ssDNAcp), alvo-a e Controle Negativo foram sintetizadas pela Integrated DNA Technologies. Suas sequências estão presentes na Tabela 1.

¹ Excertos desta seção estão em processo de publicação no artigo **Ultrasensitive microRNA detection combining reduced graphene oxide electrolyte-gated transistors and machine learning** da revista **Small**.

DELEIGO, A. V. F.; LELIS, G. C.; BRAUNGER, M. L.; CASALINI, S.; WATANABE, Y.; SCHLEDER, G. R.; FONSECA, W. T.; OLIVEIRA, R. F. de. Ultrasensitive microRNA detection combining reduced graphene oxide electrolyte-gated transistors and machine learning. *Small*, [Weinheim], [2026?]. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.202512199>. No prelo.

Tabela 1 - Sequências de ssDNAcp utilizadas como sondas de captura, alvo e controle negativo, juntamente com as sequências de miR-34a, miR-34b e miR-34c. Fonte: Autor.

Nome	Sequência	Função
ssDNAcp	5'-/AmMC6/GAC CGA CAA CCA GCT AAG ACA CTG CCA	Sonda de captura
Target-a	5'-TGG CAG TGT CTT AGC TGG TTG T	DNA alvo sintético
Target-b	5'-AGG CAG TGT AAT TAG CTG ATT G	DNA alvo sintético
Target-c	5'-AGG CAG TGT AGT TAG CTG ATT GC	DNA alvo sintético
NC	5'-GTT ATC CAA TGA GAT CCA AGT A	Controle Negativo
miR-34a	5'-UGG CAG UGU CUU AGC UGG UUG U	—
miR-34b	5'-AGG CAG UGU AAU UAG CUG AUU G	—
miR-34c	5'-AGG CAG UGU AGU UAG CUG AUU GC	—

4.2. Fabricação do Dispositivo e Ajustes de Desempenho

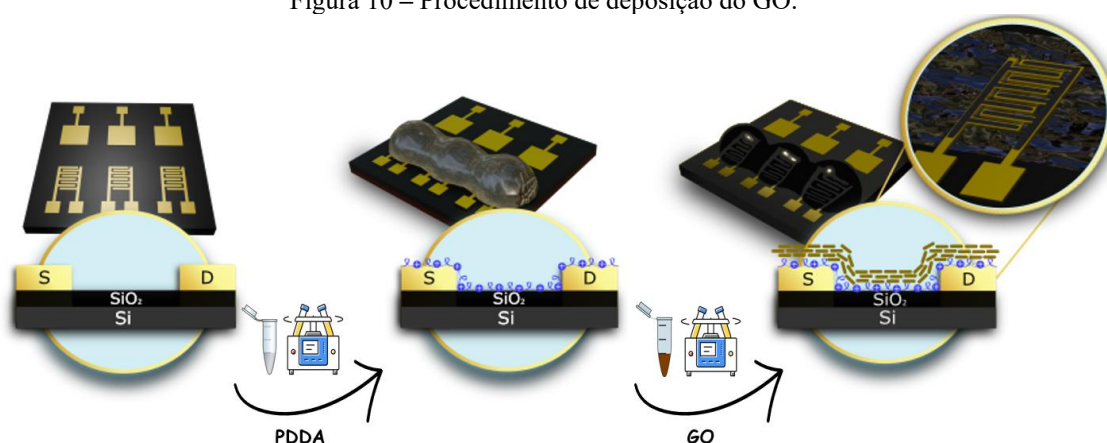
Substratos contendo 3 conjuntos de eletrodos para EGTs independentes foram fabricados utilizando técnicas de microfabricação em ambiente de sala limpa (LNNano/CNPQM). A fabricação dos eletrodos foi realizada sobre wafers de Si/SiO₂ com dimensões de 100 mm. Os eletrodos de fonte e dreno foram projetados de maneira interdigitada (IDE), consistindo em 24 *fingers*. As dimensões do canal do transistor foram definidas como 30 µm de comprimento e 2 cm de largura. O eletrodo de *gate* coplanar foi posicionado a 2 mm da região IDE e possui área de 4 mm². A técnica de fotolitografia sem máscara (i.e. escrita direta) foi empregada para confeccionar o layout dos eletrodos. O wafer de Si/SiO₂ foi submetido a um aquecimento a 120 °C por 3 minutos. Em seguida, 4 mL do fotorresiste AZ5214 foram distribuídos sobre sua superfície. Seu espalhamento foi realizado por spincoating em duas etapas sequenciais: 4000 rpm por 40 segundos e 6000 rpm por 5 segundos. Após essa etapa, foi realizado o *soft bake* a 100 °C por 2 minutos. O wafer foi exposto à radiação UV no equipamento ML3 (Durham MagnetoOptics) com dose de exposição a 65 mJ (cm²)⁻¹. A revelação foi conduzida com MIF726 por 60 segundos, seguida de enxágue com água DI e secagem com fluxo de nitrogênio (N₂). Por fim, a qualidade dos padrões obtidos foi avaliada por um microscópio óptico. Após a litografia, foram depositados 5 nm de Cr, seguidos de 40 nm de Au, por meio de evaporação térmica por feixe de elétrons com taxas aproximadas de 0,5 Å s⁻¹ para o Cr e 1 Å s⁻¹ para o Au. Após a deposição, o processo de *lift-off* foi realizado utilizando acetona PA, acetona VLSI, isopropanol VLSI e água DI, seguido de secagem com N₂. Posteriormente, o wafer foi submetido ao processo de corte.

4.3. Deposição e redução de GO para a produção de filmes de rGO

Após a fabricação dos eletrodos, foram utilizadas três amostras distintas de GO para deposição na forma de filme fino. A primeira amostra foi adquirida da empresa Graphenea (GO_{Gra}) e utilizada como filme fino na concentração de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. A segunda amostra foi submetida a um processo de lavagem com água DI (GO_{L}). Para isso, uma solução de $25 \mu\text{L}$ de GO_{Gra} com $75 \mu\text{L}$ de água DI foi centrifugada por 1 hora. Em seguida, o sobrenadante foi removido. Esse processo foi repetido cinco vezes. A concentração utilizada para filme fino foi de 1 mg mL^{-1} . A terceira amostra foi submetida a metodologia de remoção dos ODs a partir da lavagem de uma solução de GO_{Gra} com NaOH (GO_{LB}) (De Lima et al., 2023). A concentração utilizada para depositar o filme fino foi de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os eletrodos microfabricados foram inicialmente lavados com acetona, isopropanol e água DI para a remoção de qualquer partícula residual do processo de microfabricação. Posteriormente, uma solução aquosa com $50 \mu\text{L}$ de PDDA contendo $0,03\text{g}$ de NaCl foi agitada em banho ultrassônico (15 minutos) e empregada nos interdigitados dos EGT durante 15 minutos com o objetivo de promover uma camada de aderência para garantir a deposição eletrostática do GO à superfície. As 3 amostras distintas de GO também foram previamente agitadas em banho ultrassônico (15 minutos) para assegurar uma dispersão homogênea na solução. Os filmes de GO foram depositados sobre a superfície dos substratos por adsorção eletrostática por 30 minutos, e então enxaguados com água DI, e secos com N_2 . A Figura 10 ilustra o processo de deposição dos flakes de GO sobre os IDEs.

Figura 10 – Procedimento de deposição do GO.

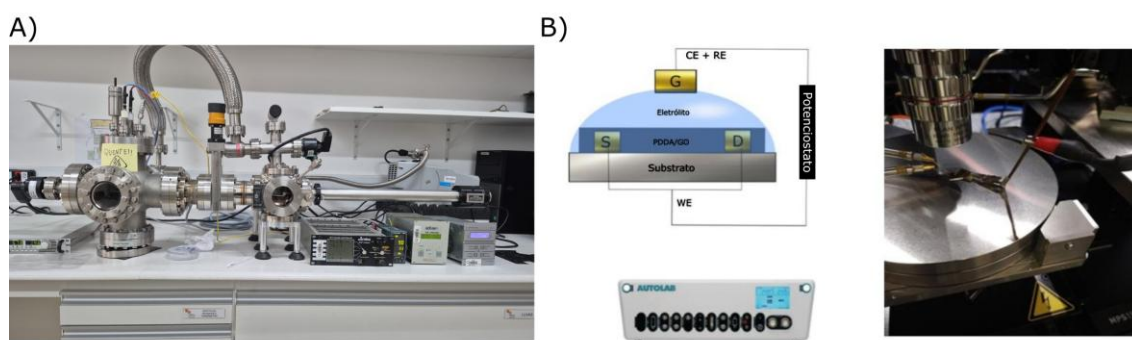


Fonte do autor.

Dois métodos de redução foram empregados para a produção de rGO: Redução térmica e eletroquímica (Figura 11). A redução térmica foi realizada em um forno de ultra-alto vácuo

(10^{-10} mbar) (Figura 11A) a 350°C por 10 minutos empregando uma rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}(\text{min})^{-1}$, enquanto a redução eletroquímica foi conduzida por meio da técnica de Voltametria Cíclica (VC) seguindo o protocolo da literatura (Furlan de Oliveira et al., 2019). Nesse caso, a VC foi feita diretamente sobre a superfície do dispositivo (i.e. *in situ*), utilizando os eletrodos interdigitados como eletrodo de trabalho e um fio de Au como pseudoeletrodo de referência e contra eletrodo (Figura 11B). 5 ciclos de VC foram feitos, variando potencial elétrico de 0V à $-1,6\text{ V}$, a uma taxa 100 mV s^{-1} .

Figura 11 – Forno de ultra-alto vácuo (A) e redução eletroquímica *in situ* por voltametria cíclica, utilizando os eletrodos interdigitados como eletrodo de trabalho e fio de Au como pseudo-referência/contra eletrodo (B).



Fonte do autor.

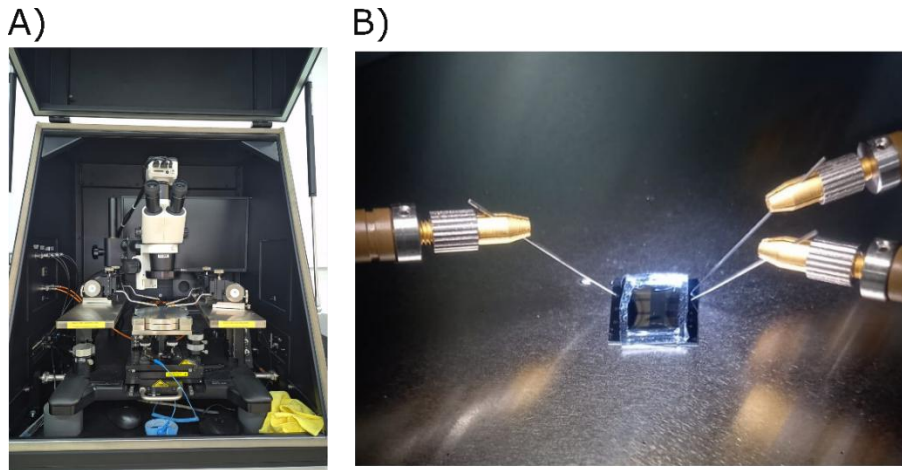
4.4. Caracterizações do Dispositivo com Filme de rGO

Imagens de topografia das três amostras de rGO, submetidas às reduções térmica e eletroquímica, foram obtidas em um microscópio de força atômica ParkSystems® NX10, operando no modo Tapping®. Para as varreduras, foi utilizada uma sonda Nanosensors® PPP-EFM-W, com constante de mola de $2,8\text{ N/m}$, frequência de ressonância de 75 kHz e raio de ponta de $7,0\text{ nm}$. A plataforma de AFM foi montada em uma câmara ambiental, que permite o controle da umidade relativa (10%) e da temperatura (25°C). O software *Gwyddion* (versão 2.66) foi utilizado para tratamento das imagens e a extração da rugosidade RMS (do inglês, *root mean square*)

A caracterização da reposta dos rGO EGTs – i.e curvas de corrente-tensão – foram realizadas em uma estação de medidas elétricas (*probe station*), equipada com quatro micromanipuladores que estabelecem o contato elétrico entre o dispositivo e os instrumentos de medição. Três micromanipuladores foram utilizados para as conexões de fonte, dreno e *gate*. Para a realização das medidas elétricas, uma solução tampão fosfato (PBS) de 10 mmol L^{-1} com pH 7,4 foi adicionada sobre o dispositivo. Para evitar o contato do eletrólito com as pontas,

utilizou-se uma barreira de PDMS (Dimetil polissiloxano). Após posicionar o dispositivo na *probe station*, os micromanipuladores foram conectados à fonte de corrente e tensão Keithley 2636, que por sua vez estava conectada a um computador para comunicação com o software de controle. A Figura 12A exibe a *Probe Station* utilizada para as medidas elétricas, enquanto a Figura 12B apresenta o dispositivo conectado aos micromanipuladores e contendo uma barreira de PDMS para confinar o eletrólito.

Figura 12 - (A) Probe Station. (B) Dispositivo conectado com os micromanipuladores.



Fonte: Autor.

Para cada uma das três amostras de rGO obtidas a partir dos diferentes GO utilizados (GO_{Gra} , GO_L e GO_{LB}), e empregando tanto a redução térmica quanto a eletroquímica, foram obtidas curvas de transferência em triplicata para 10 dispositivos (totalizando 30 dispositivos), registrando I_{DS} em função da variação do V_{GS} de + 0,5 a – 0,5 V, com V_{DS} constante de 0,2 V. A análise das curvas de transferência permitiu extrair os parâmetros característicos V_{CNP} e $I_{DS,minimo}$ e realizar a estimativa das mobilidades efetivas seguindo a Equação 2, segundo a literatura (Reiner-Rozman et al., 2015).

$$\mu_{eff} = m_{lin} \frac{L}{W V_{DS} C_i} \quad (2)$$

onde m_{lin} é o coeficiente angular obtido a partir dos ajustes lineares no gráfico $I_{DS} V_{GS}$, W é a largura do canal do EGT, L o comprimento do canal, V_{DS} a tensão aplicada entre fonte e dreno, e C_i a capacitância do isolante de *gate* por unidade de área, onde para um EGT utiliza-se a capacitância da interface eletrólito/semicondutor. Outra medida elétrica realizada foram as curvas I_{DS}/V_{DS} nos interdigitados para 5 dispositivos com ausência de eletrólito, registrando a

I_{DS} em função da variação do V_{DS} de + 0,5 a – 0,5 V. A partir da região linear dessas curvas, foi possível extrair a resistência do filme, utilizando a equação 3.

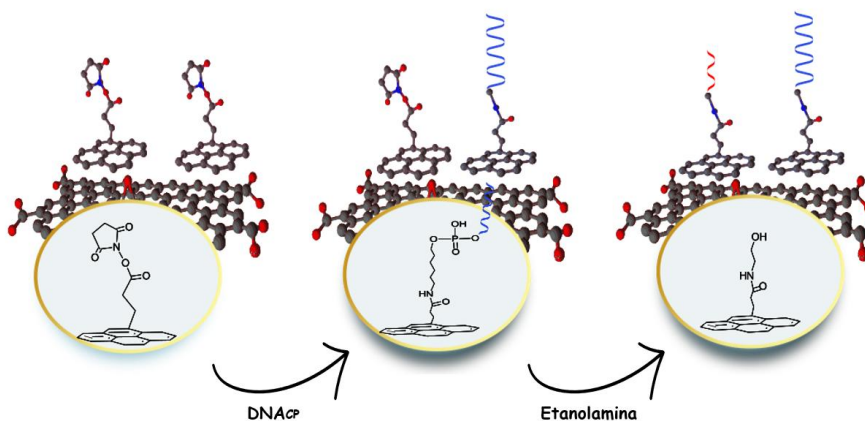
$$R = \left(\frac{dI_{DS}}{dV_{DS}} \right)^{-1} \quad (3)$$

onde R é a resistência, calculada como o inverso do coeficiente angular obtido a partir da curva I_{DS}/V_{DS} no regime linear.

4.5. Funcionalização dos Filmes de rGO para aplicações em genossensores

Foram exploradas duas abordagens de funcionalização do rGO para ancorar receptores de DNA de captura de fita simples (ssDNA_{CP}), a dizer: rotas não covalente e covalente. Foram funcionalizados 5 dispositivos por rota. Para a rota não covalente, utilizou-se éster N-hidroxissuccinimida do ácido 1-pirenobutírico (PBASE) como ligante. Uma solução de 50 mmolL⁻¹ de PBASE diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionada sobre o canal dos EGT durante 2 horas. Em seguida, os dispositivos foram lavados com DMSO puro, etanol e água deionizada. O grupo pireno em uma extremidade do PBASE foi adsorvido na superfície do rGO através de interações de empilhamento π . Uma solução de 5 μ molL⁻¹ de ssDNA_{CP} em PBS foi incubada por 2 horas nos canais de rGO modificados com PBASE. O grupo éster succinimidil na outra extremidade do PBASE reage com o grupo amina do ssDNA_{CP}. Posteriormente, uma solução de 100 mmolL⁻¹ de etanolamina em PBS foi incubada por 1 hora como agente bloqueador para evitar adsorção não específica do analito alvo (miR-34) sobre a superfície. A Figura 13 ilustra o procedimento de funcionalização (não-covalente) do rGO utilizando o *linker* PBASE.

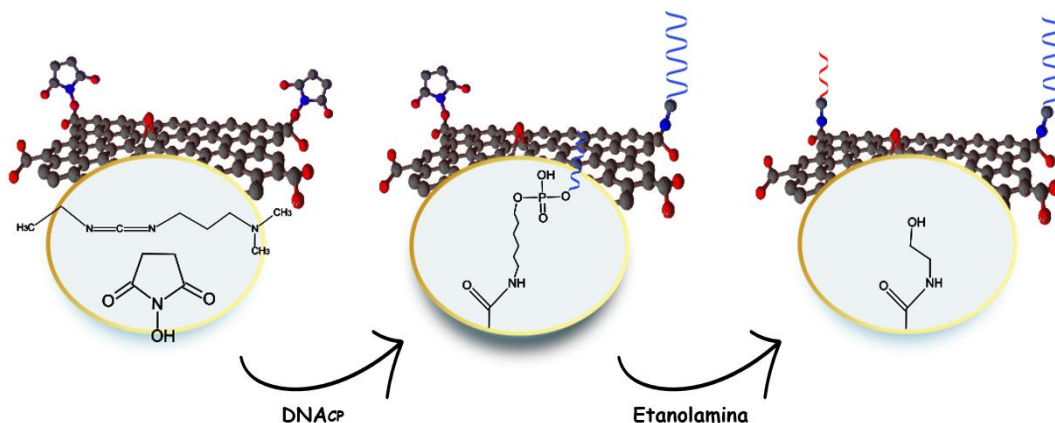
Figura 13 – Procedimento de funcionalização não-covalente do rGO com PBASE para a imobilização do DNA de captura.



Fonte: Autor.

Já na estratégia covalente, empregou-se a reação entre o cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). 0,0767g de EDC e 0,1151g de NHS foram dissolvidos em água DI com 0,4265g de ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES) em pH 4,8. Esta solução foi adicionada sobre o canal dos EGTs durante 2 horas. Em seguida, os dispositivos foram lavados três vezes com PBS para a remoção das espécies em excesso. Uma solução de $5 \mu\text{molL}^{-1}$ de ssDNA_{CP} em PBS foi incubada por 2 horas nos canais de rGO modificados com EDC/NHS. Posteriormente, uma solução de 100 mmolL^{-1} de etanolamina em PBS foi incubada por 1 hora como agente bloqueador para evitar adsorção não específica. A Figura 14 ilustra o procedimento de funcionalização (covalente) do rGO com EDC/NHS.

Figura 14 – Procedimento de funcionalização covalente do rGO utilizando a reação com EDC/NHS para a imobilização do DNA de captura.



Fonte: Autor

4.6. Caracterização dos Dispositivos Pós-Funcionalização

Em cada etapa da funcionalização e para cada uma das três amostras de rGO utilizando a redução térmica, foram obtidas curvas de transferência do dispositivo (I_{DS} em função da variação do V_{GS} de +0,5 a -0,5 V, com V_{DS} constante de 0,2). Entretanto, devido à instabilidade da reação EDC/NHS, essa etapa não foi monitorada por curvas de transferência. A análise das curvas de transferência das demais etapas de funcionalização permitiu extrair o V_{CNP} para cada fase do processo. Com o objetivo de avaliar a eficiência das diferentes rotas de funcionalização, foi realizado um teste de incubação com o alvo-a e o controle negativo. Durante esse processo, curvas de transferência foram registradas (I_{DS} em função da variação do V_{GS} de +0,5 a -0,5 V, com V_{DS} constante de 0,2) a cada 5 minutos, ao longo de 60 minutos.

A funcionalização do rGO também foi acompanhada por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS, do inglês *X-ray photoelectron spectroscopy*). A análise por XPS foi realizada utilizando um espectrômetro Thermo Scientific K-Alpha, equipado com um monocromador de Al K α microfocalizado (energia = 1486,6 eV). O diâmetro do feixe de raios X foi ajustado para 400 μm , e as medições foram realizadas à temperatura ambiente. Espectros de varredura de alta resolução para C1s e N1s foram adquiridos utilizando uma energia de passagem de 200 eV (20 varreduras) para os espectros de varredura ampla e 50 eV (10 varreduras) para os espectros de alta resolução. As varreduras elementares de ampla faixa e os espectros de alta resolução para C e N foram obtidos sob uma pressão de 10^{-7} mbar.

4.7. Otimização dos Parâmetros Elétricos de Operação e Funcionalização

Curvas de transferência em triplicada foram realizadas no dispositivo contendo apenas o filme fino de rGO_{Gra} reduzido termicamente para dois intervalos de V_{GS} (+0,3 a -0,1 V e +0,6 a -0,6 V), com o V_{DS} variando quatro vezes (50, 100, 150 e 200 mV) em tampão de fosfato (PB, do inglês *phosphate buffer*) 1 mmol L⁻¹. O objetivo foi avaliar o impacto do estresse elétrico na resposta do dispositivo e determinar os parâmetros elétricos ideais para os experimentos de detecção. Utilizando os parâmetros otimizados, a metodologia de funcionalização covalente foi repetida para 3 dispositivos com rGO_{Gra} reduzido termicamente. Neste experimento, foi adicionado um passo extra ao protocolo: antes da funcionalização com a rota EDC/NHS, o eletrodo *gate* de Au foi passivado *overnight* em uma solução de 2 mmol L⁻¹ de DDT em etanol, sendo lavado posteriormente com etanol e água DI.

4.8. Influência da Força Iônica e do Comprimento de Debye

A força iônica e o comprimento de Debye foram calculados para diferentes concentrações do tampão fosfato, com o objetivo de identificar as condições em que o sinal elétrico é mais eficientemente modulado durante o evento de hibridização. Para isso, foi utilizada a equação do comprimento de Debye (Zheng et al., 2021), dada pela Equação 4.

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2 N_A e^2 I}} \quad (4)$$

sendo ϵ_0 a permissividade do vácuo, ϵ_r a permissividade relativa do meio, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura, N_A o número de Avogadro, e carga elementar do elétron e I a força iônica.

4.9. Testes de Sensoriamento

O alvo-a, alvo-b, alvo-c e controle negativo foram preparados em diferentes concentrações (de $0,1 \text{ amol L}^{-1}$ a 100 fmol L^{-1}) em tampão de hibridização (HB, do inglês *hybridization buffer*), contendo 10 mmol L^{-1} de PB, 150 mmol L^{-1} de NaCl e 50 mmol L^{-1} de MgCl_2 . Para cada concentração do alvo, $40 \text{ }\mu\text{L}$ foram depositados no reservatório de eletrólito do EGT e incubados por 40 minutos. As curvas de transferência foram obtidas em tampão PB 1 mmol L^{-1} , registrando a corrente de dreno-fonte em função da variação V_{GS} , de $+300$ a -100 mV , com V_{DS} constante de 100 mV . As curvas analíticas foram construídas considerando a média dos valores de $I_{DS,\text{mínimo}}$ de três medições consecutivas de transferência ($n=3$).

A aplicação de sensores POC requer que estes operem em meios biológicos complexos. Para avaliar a resposta e a robustez do sensor, foram conduzidos experimentos de detecção utilizando urina artificial. A urina artificial foi obtida utilizando $11,965 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, $1,487 \text{ mmol L}^{-1} \text{ C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$, $2,450 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $7,791 \text{ mmol L}^{-1} \text{ C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$, $249,750 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CH}_4\text{N}_2\text{O}$, $30,953 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$, $30,053 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$, $1,663 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $23,667 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $0,19 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $4,389 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $18,667 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e $4,667 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A solução estoque do analito-alvo ($0,1 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) foi obtida em urina artificial e, em seguida, diluída em solução HB. Foram realizadas diluições seriadas em solução HB, obtendo-se concentrações finais do analito-alvo na faixa de $0,1 \text{ amol L}^{-1}$ a 100 fmol L^{-1} . As amostras obtidas foram depositadas na superfície do biossensor, e os experimentos de biossensoriamento foram realizados de acordo com o mesmo protocolo empregado para a obtenção da curva de calibração analítica em PB.

4.10. Aprendizado de máquina

As análises apresentadas neste tópico foram realizadas em parceria com a Dra. Yasmin Watanabe (LNNano) e Dr. Gabriel Ravanhani Schleder (LNNano), que contribuíram para a execução e discussão dos resultados. Foi realizada uma análise multivariada dos dados experimentais utilizando o algoritmo SISSO (do inglês, *Sure Independence Screening and Sparsifying Operator*) (Ouyang et al., 2018). O SISSO é um método de machine learning baseado em regressão simbólica, utilizado para obter equações simples e interpretáveis que predizem propriedades físicas e químicas a partir de dados de entrada. O método opera em três etapas: gera combinações matemáticas das variáveis iniciais, formando um conjunto de descritores candidatos; seleciona e ranqueia os descritores mais correlacionados com a

propriedade alvo; e identifica a combinação esparsa, ou seja, o menor número possível de descritores capaz de prever a propriedade com boa precisão. Dessa forma, o SISSO produz modelos compactos e interpretáveis para sistemas complexos.

Para o treinamento do modelo, foram empregadas curvas de transferência obtidas para quatro analitos: alvo-a, alvo-b, alvo-c e o controle negativo. Para cada analito, foram avaliadas cinco concentrações (de 10 amol L⁻¹ a 1 fmol L⁻¹). Para cada concentração, três curvas de transferência consecutivas foram adquiridas, totalizando 15 medições por alvo. Como características de entrada, foram considerados todos os valores de I_{DS} correspondentes a cada V_{GS} (de 0,3 V até -0,1 V, em incrementos de 25 mV), totalizando 17 características (V_1 a V_{17}), como apresentado na tabela 2. Uma característica adicional (V_{CNP}), representando o valor de I_{DS} no mínimo da curva, também foi incluída, resultando em um total de 18 características por amostra. Todos os sinais foram pré-processados por meio da subtração do valor mínimo da curva de transferência do respectivo branco, seguida da normalização dos valores de corrente para a faixa entre 0 e 1.

Tabela 2 - Tensões associadas aos descritores utilizados nos modelos SISSO. Fonte: Autor.

Atributo	Tensão	Atributo	Tensão
v1	0.300 V	v10	0.075 V
v2	0.275 V	v11	0.050 V
v3	0.250 V	v12	0.025 V
v4	0.225 V	v13	0.000 V
v5	0.200 V	v14	- 0.025 V
v6	0.175 V	v15	- 0.050 V
v7	0.150 V	v16	- 0.075 V
v8	0.125 V	v17	- 1.000 V
v9	0.100 V	$V_{\text{mínimo}}$	V_{CNP}

Duas tarefas principais foram abordadas utilizando o algoritmo SISSO, sendo classificação e regressão multitarefa. Na classificação, foram buscados modelos bidimensionais capazes de discriminar com precisão os quatro alvos. Na regressão multitarefa, foram buscados modelos unidimensionais para a predição do logaritmo da concentração do analito, com o objetivo de identificar uma expressão comum válida para os quatro alvos, utilizando apenas um número reduzido de características selecionadas. Como análise complementar, foi realizada

regressão de tarefa única de forma independente para cada alvo. Em todos os casos, foi empregada validação cruzada em 10 dobras, a fim de assegurar a capacidade de generalização dos modelos desenvolvidos para dados não vistos e mitigar o risco de *overfitting*. Os descritores foram selecionados com base em sua presença consistente ao longo das dobras de validação e em sua capacidade de minimizar os erros de predição. Após a seleção dos descritores, os modelos foram retreinados utilizando o conjunto completo de dados. O desempenho dos modelos foi avaliado em termos de acurácia de classificação e, para as tarefas de regressão, por meio do coeficiente de determinação (R^2), do erro absoluto médio (MAE, do inglês *mean absolute error*) e da raiz do erro quadrático médio (RMSE, do inglês *root mean square error*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO²

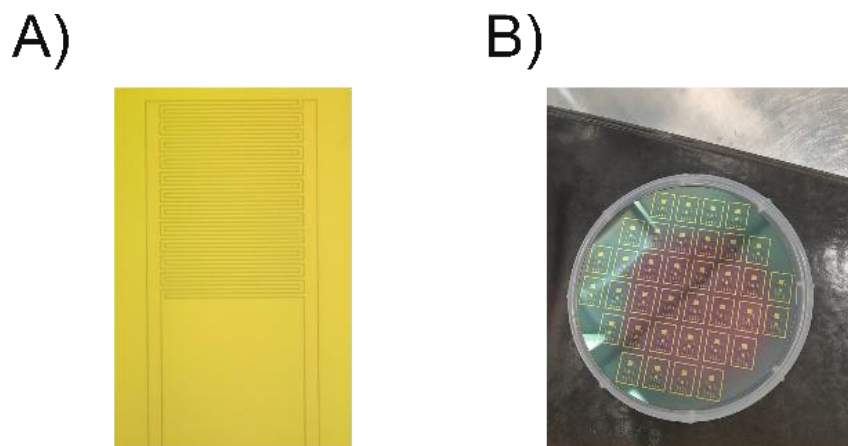
5.1. Fabricação e Caracterização do Dispositivo a partir de diferentes amostras de rGO

Como etapa inicial, o desenvolvimento de EGT baseado em óxido de grafeno reduzido para detecção de miRNA requer a otimização do próprio dispositivo. Antes da funcionalização e das etapas de *sensing*, é essencial estabelecer uma plataforma com comportamento elétrico estável, parâmetros bem definidos e baixa dispersão entre dispositivos, de modo que as variações observadas estejam associadas ao reconhecimento do alvo e não a incertezas do processo de fabricação. Isso envolve a escolha do tipo de GO e do método de redução que resultem em um canal com resposta elétrica adequada e alta reprodutibilidade. A Figura 15A apresenta o dispositivo após a revelação com MIF726, sendo possível observar o padrão dos eletrodos definido pela litografia. Na Figura 15B, visualiza-se o *wafer* contendo os dispositivos microfabricados após a conclusão de todas as etapas realizadas em sala limpa. A Figura 16 apresenta o voltamograma correspondente ao processo de redução eletroquímica do GO_{Gra}. A varredura catódica injeta elétrons no GO, promovendo a redução dos grupos oxigenados. Esse processo é observado como picos catódicos característicos no voltamograma, associados às reações de redução desses grupos funcionais.

² Excertos desta seção estão em processo de publicação no artigo **Ultrasensitive microRNA detection combining reduced graphene oxide electrolyte-gated transistors and machine learning** da revista **Small**.

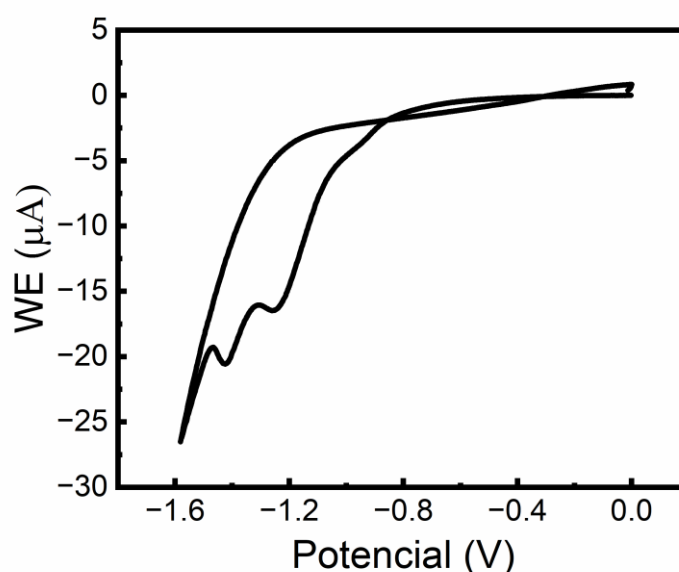
DELEIGO, A. V. F.; LELIS, G. C.; BRAUNGER, M. L.; CASALINI, S.; WATANABE, Y.; SCHLEDER, G. R.; FONSECA, W. T.; OLIVEIRA, R. F. de. Ultrasensitive microRNA detection combining reduced graphene oxide electrolyte-gated transistors and machine learning. *Small*, [Weinheim], [2026?]. DOI: <https://doi.org/10.1002/sml.202512199>. No prelo.

Figura 15 - (A) Dispositivo após revelação com MIF726. (B) Wafer com dispositivos microfabricados. (C) IDEs sem revestimento. (D–F) IDEs revestidos com $rGO_{Gra}/PDDA$, $rGO_L/PDDA$ e $rGO_{LB}/PDDA$, respectivamente.



Fonte: Autor.

Figura 16 - Voltamograma obtido durante a redução eletroquímica do GO_{Gra} .

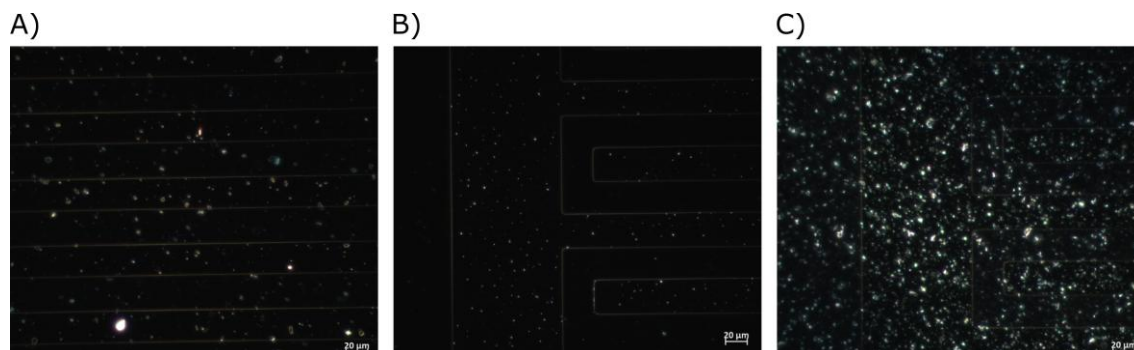


Fonte: Autor.

Após o processo de deposição e redução dos GOs, a uniformidade do filme fino de PDDA/GO reduzido termicamente sobre os IDEs foi avaliada por meio de imagens obtidas por microscopia óptica. As Figuras 17A, 17B e 17C mostram as imagens ópticas dos IDEs revestidos com PDDA/ rGO_{Gra} , PDDA/ rGO_L e PDDA/ rGO_{LB} , respectivamente. Essas imagens foram capturadas utilizando aumento de 50x em microscópio óptico no modo *dark field*. Observa-se que os filmes apresentam boa uniformidade ao longo de distâncias consideráveis (centenas de micrômetros). Além disso, nota-se uma diferença visual dos filmes dos três tipos

de rGO depositados, o que pode estar relacionado às distintas condições de tratamento aplicadas a cada material.

Figura 17 - IDEs revestidos com rGO_{Gra}/PDDA (A), rGO_L/PDDA (B) e rGO_{LB}/PDDA (C), respectivamente.

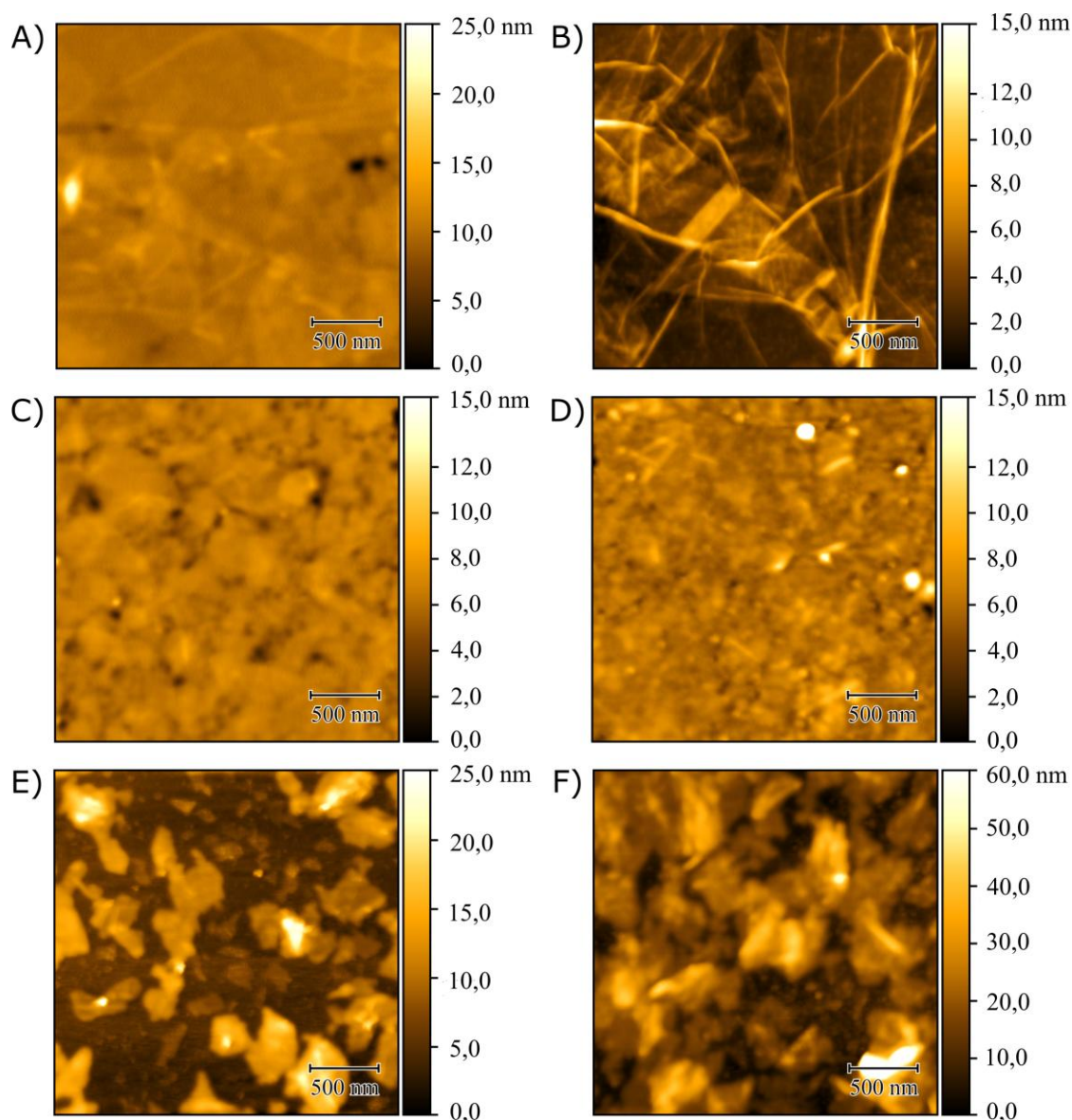


Fonte: Autor.

A Figura 18 apresenta as imagens de AFM de filme fino de GO_{Gra}, GO_L e GO_{LB} após o processo de redução térmica e eletroquímica. As imagens exibem uma topografia do tipo folhas multicamadas com rugosidade média quadrática (RMS) de 1,068 nm e 1,877 nm para GO_{Gra} reduzido termicamente (Figura 18A) e eletroquimicamente (Figura 18B), respectivamente; 0,707 nm e 1,247 nm para GO_L reduzido termicamente (Figura 18C) e eletroquimicamente (Figura 18D), respectivamente; 3,946 nm e 9,635 nm para GO_{LB} reduzido termicamente (Figura 18E) e eletroquimicamente (Figura 18F), respectivamente. As variações nos valores de RMS estão associadas ao grau de remoção dos grupos oxigenados dos GOs durante os processos de redução. O óxido de grafeno contém principalmente hidroxilas e epóxidos no plano basal, além de carbonilas e carboxilas nas bordas dos *flakes*. A redução térmica resulta em superfícies mais homogêneas, uma vez que é mais eficiente na eliminação desses grupos. Em contraste, a redução eletroquímica remove preferencialmente epóxidos e parte das hidroxilas, enquanto grupos carboxílicos tendem a permanecer. Como consequência, os filmes reduzidos eletroquimicamente apresentam maiores valores de RMS do que os reduzidos termicamente.

A dimensão lateral das lâminas de rGO foi afetada pelas etapas de lavagem, que impuseram esforços mecânicos capazes de fragmentar as folhas e reduzir seu tamanho lateral. Para o GO_{Gra}, a dimensão lateral das lâminas excede a escala das medidas realizadas, em concordância com os valores nominais (5 – 7 μm) fornecidos pelo fabricante. Em contraste, para os filmes submetidos aos processos de lavagem, a dimensão lateral é da ordem de 500 nm. Além disso, o rGO_L apresenta *flakes* mais unidos, enquanto os rGO_{LB} exibem *flakes* mais dispersos.

Figura 18 - Imagens de AFM dos filmes de GO_{Gra} (A, B), rGO_L (C, D) e GO_{LB} (E, F) após redução térmica e eletroquímica, respectivamente.

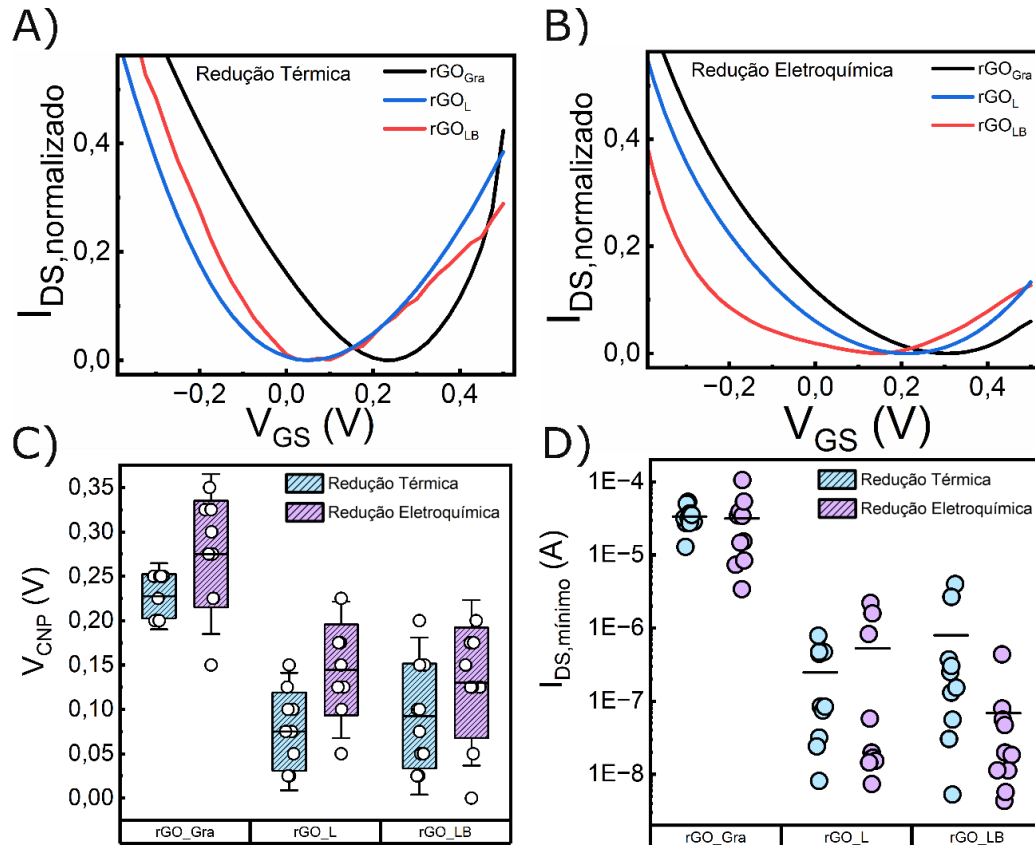


Fonte: Autor.

Com o objetivo de investigar como diferentes graus de redução e limpeza do GO influenciam o desempenho elétrico dos dispositivos, os rGO EGTs foram caracterizados por meio de curvas de transferência, obtidas registrando a I_{DS} em função da variação do V_{GS} de $+0,5$ a $-0,5$ V, com V_{DS} constante de $0,2$ V. Para a avaliação da resposta dos rGO EGTs, foram utilizadas uma solução PBS 10 mmol L^{-1} com pH 7,4. A partir das curvas de transferência, foram obtidos os valores de V_{CNP} e $I_{\text{DS,mínimo}}$. As Figuras 19A e 19B apresentam as curvas de transferência normalizadas dos rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica, respectivamente. As Figuras 19C e 19D apresentam os valores de V_{CNP} e $I_{\text{DS,mínimo}}$ de 10 dispositivos diferentes para cada método de redução e material. A Tabela 3 apresenta os valores

médios e os respectivos desvios padrão de V_{CNP} e $I_{\text{DS,mínimo}}$ para cada material, considerando os dois métodos de redução.

Figura 19 - Curvas de transferência normalizadas (A, B) e valores de V_{CNP} e $I_{\text{DS,mínimo}}$ (C, D) para rGO_{Gra} , rGO_{L} e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica.



Fonte: Autor.

Tabela 3 - Valores de V_{CNP} e $I_{\text{DS,mínimo}}$ para EGTs baseados em filmes de rGO_{Gra} , rGO_{L} e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica. DP é o desvio-padrão. Fonte: Autor.

Material	Redução Térmica				Redução Eletroquímica			
	V_{CNP} (V)		$I_{\text{DS,mínimo}}$ (μA)		V_{CNP} (V)		$I_{\text{DS,mínimo}}$ (μA)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
rGO_{Gra}	0,225	0,008	3,360E-5	3,900E-6	0,275	0,020	3,170E-5	1,030E-5
rGO_{L}	0,075	0,014	2,470E-7	9,050E-8	0,145	0,018	5,260E-7	2,930E-7
rGO_{LB}	0,090	0,018	7,880E-7	4,540E-8	0,130	0,020	6,840E-8	4,380E-8

É possível observar na Figura 19C que, para os três materiais, os valores de V_{CNP} obtidos após a redução eletroquímica são mais positivos do que aqueles verificados após a redução térmica. Esse deslocamento indica maior dopagem do tipo-p nos filmes reduzidos eletroquimicamente, associada à presença de grupos oxigenados remanescentes em comparação

aos filmes termicamente reduzidos. Esses grupos retiram densidade eletrônica do rGO e exigem V_{GS} mais positivo para atingir a neutralidade do canal. Além disso, a modulação da curva no regime n do transistor é pior para amostras reduzidas eletroquimicamente quando comparada à redução térmica, como indicado pela forma das curvas de transferência (Figura 19A e 19B). A presença residual desses grupos impede a completa restauração da conjugação π , prejudicando o transporte eletrônico e levando a menor mobilidade no regime n.

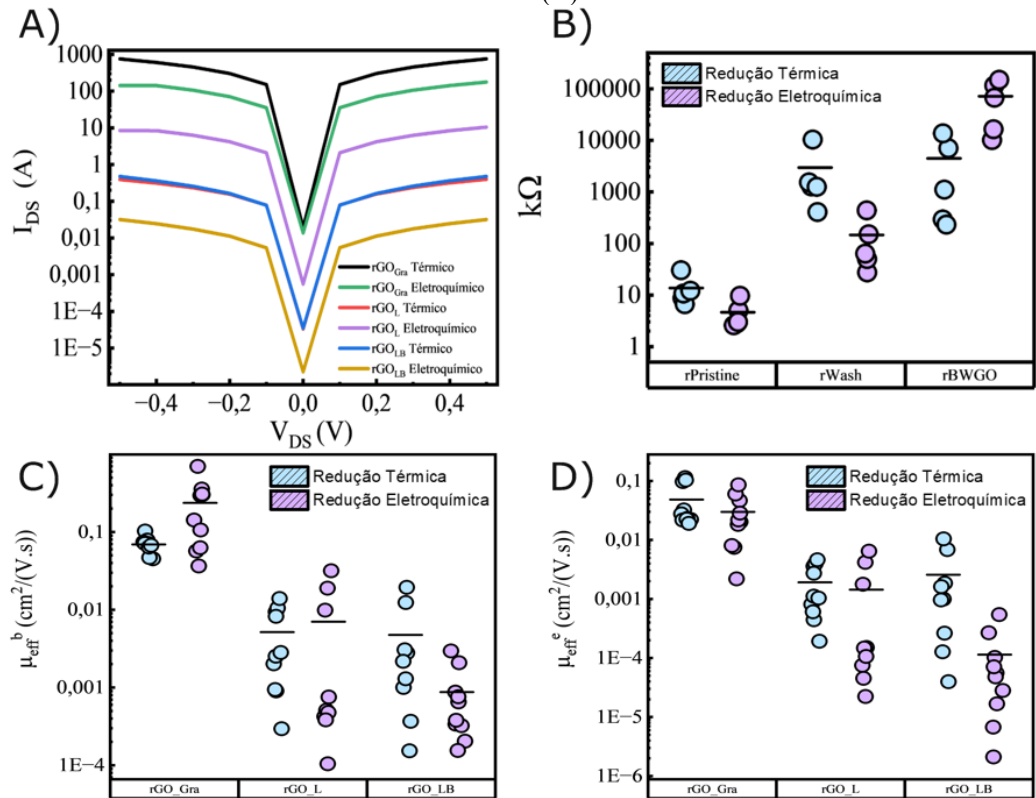
Tanto para as amostras reduzidas termicamente quanto eletroquimicamente, os valores de V_{CNP} após as duas lavagens dos rGOs são menores em comparação com o rGO_{Gra}. Esse resultado sugere que a lavagem contribuiu para remoção de contaminantes ou dopantes residuais, resultando em um canal com menor nível de doping. Os valores de V_{CNP} são semelhantes entre rGO_L e rGO_{LB}, tanto para a redução térmica quanto eletroquímica. Isso sugere que os ODs têm pouco impacto na resposta do dispositivo. O rGO_{Gra} reduzido termicamente apresentou menor dispersão nos valores de V_{CNP} , indicando reprodutibilidade superior.

A partir da Figura 19D, ao compararmos a amostra rGO_{Gra} com as amostras rGO_L e rGO_{LB}, observa-se uma diminuição significativa do $I_{DS,minimo}$, especialmente para o rGO_{LB} com redução eletroquímica. Isso evidencia potenciais degradações nas propriedades condutoras do canal. Além disso, os resultados exibem alta variabilidade nos valores de $I_{DS,minimo}$, independentemente do tipo de redução, indicando reprodutibilidade inferior. Esse efeito está diretamente relacionado à redução da dimensão lateral dos *flakes* causada pelas etapas de lavagem, que impõem esforços mecânicos e fragmentam as folhas. A diminuição do tamanho lateral reduz a conectividade entre folhas e aumenta o número de junções *flake-flake* no canal, elevando a resistência efetiva e degradando o caminho de percolação, o que impacta negativamente as características elétricas dos EGTs. Por fim, o rGO_{Gra} apresentou valores médios de $I_{DS,minimo}$ semelhantes entre as duas reduções, porém com menor dispersão na redução térmica.

Foram realizadas curvas I_{DS}/V_{DS} para 5 dispositivos com ausência de eletrólito, registrando a I_{DS} em função da variação do V_{DS} de + 0,5 a - 0,5 V. A partir da região linear dessas curvas, foi possível extrair a resistência do filme, utilizando a Equação 3. A Figura 20A e 20B apresenta o módulo da curva I_{DS}/V_{DS} e as resistências obtidas para cada método de redução e material, respectivamente. A Figura 20C e 20D apresenta os valores da mobilidade efetiva de buracos e elétrons, respectivamente, obtidos a partir da análise das curvas de transferência, que permitiu estimar as mobilidades seguindo a Equação 2. Para isso, foram

considerados m_{lin} sendo o coeficiente angular obtido a partir dos ajustes lineares no gráfico I_{DS}/V_{GS} , $W = 2 \text{ cm}$, $L = 30 \text{ }\mu\text{m}$, $V_D = 0,2 \text{ V}$, e $C_i = 8,58 \text{ }\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Os valores de capacitância foram obtidos da literatura (Selmi et al., 2025). As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores médios e os respectivos desvios padrão de resistência e mobilidade efetiva de elétrons e lacunas para cada material, considerando ambos os métodos de redução.

Figura 20 – Módulo das Curvas I_{DS}/V_{DS} (A), valores de resistência, (B) e mobilidades efetivas para buracos (C) e elétrons (D).



Fonte: Autor.

Tabela 4 - Valores de resistência para filmes de rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica. DP é o desvio padrão. Fonte: Autor.

Resistência ($k\Omega$)				
Material	Redução Térmica		Redução Eletroquímica	
	Média	DP	Média	DP
rGO_{Gra}	13,67	4,25	4,61	1,33
rGO_L	2957,70	1852,57	145,82	75,89
rGO_{LB}	4457,20	2621,06	71724,65	27249,99

Tabela 5 - Valores de mobilidade efetiva para elétrons (μ_{eff}^e) e buracos (μ_{eff}^b) a partir da resposta de EGTs baseados em filmes de rGO_{Gra}, rGO_L e rGO_{LB} após redução térmica e eletroquímica. DP é o desvio padrão.

Fonte: Autor.

Material	Redução Térmica				Redução Eletroquímica			
	$\mu_{\text{eff}}^e (\text{cm}^2(\text{V.s})^{-1})$		$\mu_{\text{eff}}^b (\text{cm}^2(\text{V.s})^{-1})$		$\mu_{\text{eff}}^e (\text{cm}^2(\text{V.s})^{-1})$		$\mu_{\text{eff}}^b (\text{cm}^2(\text{V.s})^{-1})$	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
rGO _{Gra}	4,83E-2	1,31E-2	6,91E-2	5,40E-3	2,99E-2	8,87E-3	2,36E-1	6,74E-2
rGO _L	1,91E-3	5,50E-4	5,16E-3	1,63E-3	1,44E-3	7,80E-4	7,02E-3	3,76E-3
rGO _{LB}	2,32E-3	1,17E-3	4,26E-3	2,15E-3	1,14E-4	5,65E-5	8,73E-4	3,08E-4

Na Figura 20A, o eixo logarítmico de $|I_{\text{DS}}|$ permite observar variações de corrente em ordens de grandeza para as diferentes amostras. O rGO_{Gra}, para ambas as reduções, apresentou valores mais elevados de I_{DS} , indicando boa capacidade de condução do canal. Por outro lado, as amostras rGO_L e rGO_{LB} apresentaram I_{DS} significativamente menores (até 2 ordens de grandeza), revelando pior condução elétrica. As resistências foram calculadas seguindo a Equação 3. A partir da Tabela 4 e Figura 20B, para rGO_{Gra} e rGO_L, observa-se que a redução eletroquímica resultou em uma média de resistência menor que a térmica. O comportamento inverso é observado para o rGO_{LB}. O rGO_{Gra}, para ambas as reduções, apresentou valores menores de média de resistência e mais reprodutíveis, sendo o eletroquímico o melhor.

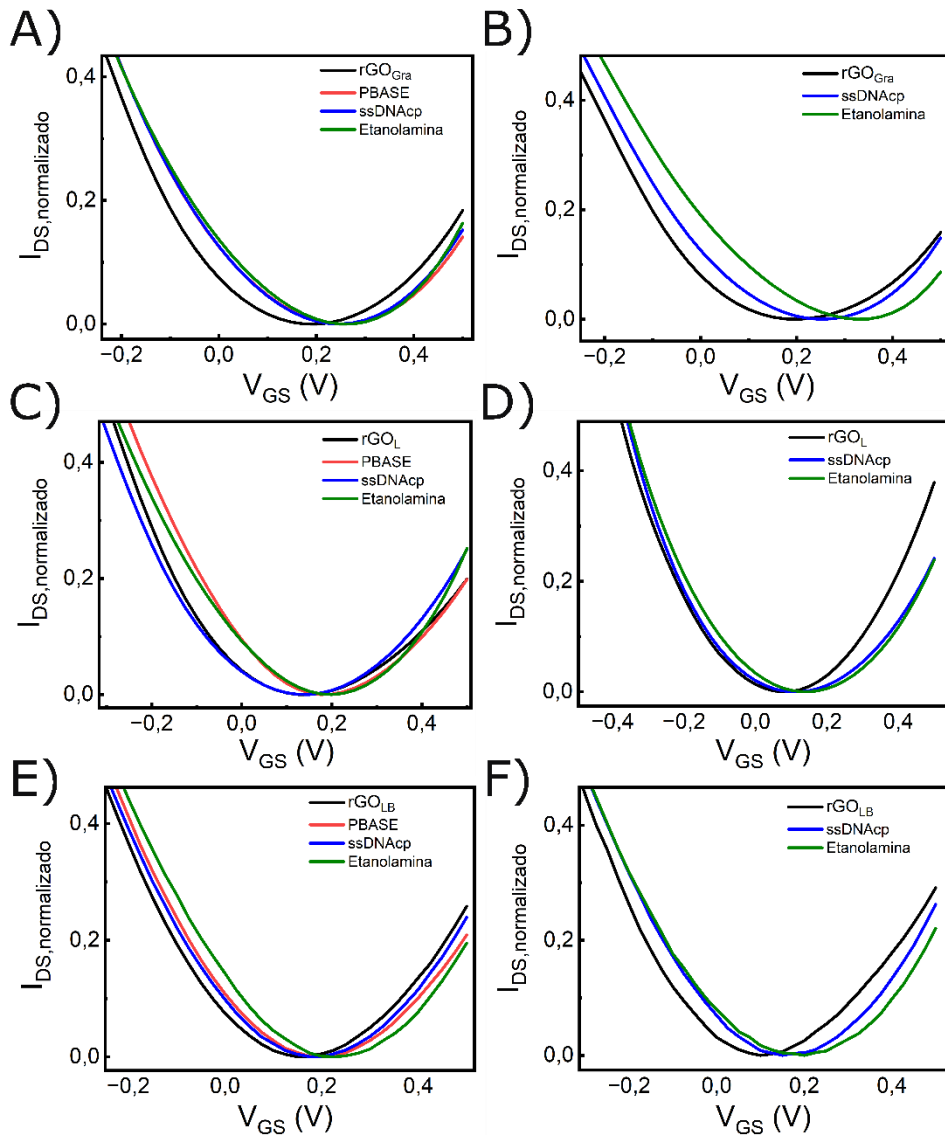
Avaliando a Tabela 5 e a Figura 20C, para rGO_{Gra} e rGO_L, a mobilidade média dos buracos foi maior para a redução eletroquímica. Por outro lado, o rGO_{LB} mostrou comportamento oposto. Em termos de reprodutibilidade, o rGO_{Gra} térmico se destacou com a distribuição mais estreita de valores, indicando maior uniformidade do canal para diferentes dispositivos. Avaliando a Tabela 5 e Figura 20D, para os três tipos de rGO, a redução térmica resultou em maior mobilidade efetiva de elétrons em comparação com a redução eletroquímica. Mais uma vez, o rGO_{Gra} térmico se sobressaiu, com média de mobilidade efetiva de elétrons elevada e alta reprodutibilidade. Os valores de mobilidade efetiva de elétrons e buracos obtidos para rGO_{Gra} estão em concordância com os encontrados na literatura (Lelis et al., 2025b; Selmi et al., 2025). É possível afirmar que o impacto da redução depende fortemente do material precursor. Devido à redução eletroquímica não apresentar boa reprodutibilidade, a redução térmica foi escolhida para continuar os estudos de funcionalização.

5.2. Funcionalização dos filmes de rGO

Após a definição do método de redução, investigou-se como o grau de limpeza do rGO influencia a etapa de biofuncionalização do canal. As rotas PBASE e EDC/NHS foram utilizadas para a funcionalização de 5 dispositivos baseados em rGO_{Gra}, rGO_L e rGO_{LB}

reduzidos termicamente. Os valores de V_{CNP} foram investigados para avaliar como os transistores respondem à imobilização de biomoléculas no filme de rGO. As Figuras 21A, 21C, e 21E apresentam as curvas de transferência obtidas registrando a I_{DS} em função da variação do V_{GS} de +0,5 a -0,5 V, com V_{DS} constante de 0,2 V, de cada etapa da funcionalização de rGO_{Gra}, rGO_L e rGO_{LB}, pela rota PBASE. As Figuras 21B, 21D e 21F apresentam a resposta do dispositivo pela rota EDC/NHS.

Figura 21 — Curvas de transferência dos materiais rGO_{Gra} (A, B), rGO_L (C, D) e rGO_{LB} (E, F) nas etapas de funcionalização pelas rotas PBASE (A, C, E) e EDC/NHS (B, D, F) após redução térmica.

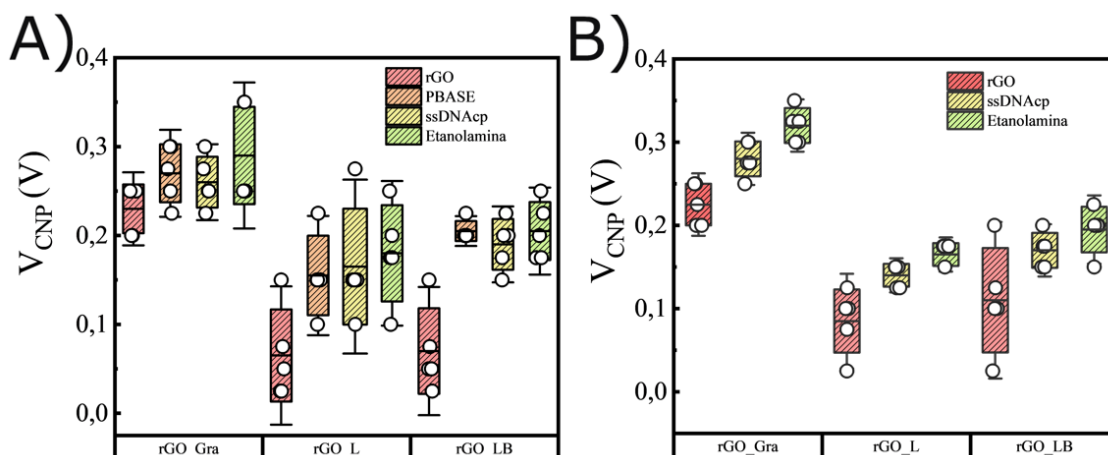


Fonte: Autor.

Observa-se que a incorporação de moléculas provoca alterações no V_{CNP} , com deslocamentos distintos a depender do material e da rota de funcionalização utilizada. As Figuras 22A e 22B apresentam os valores de V_{CNP} para cada dispositivo ao longo das etapas de funcionalização pelas rotas PBASE e EDC/NHS, respectivamente. Os valores médios e desvios

padrão de V_{CNP} para as etapas de modificação dos rGO_{Gra} , rGO_{L} e rGO_{LB} , obtidos por redução térmica, nas rotas PBASE e EDC/NHS estão ilustrados nas Tabelas 6 e 7.

Figura 22 - Variação de V_{CNP} para rGO_{Gra} , rGO_{L} e rGO_{LB} durante a funcionalização pelas rotas PBASE (A) e EDC/NHS (B). Cada etapa representa a média de cinco dispositivos.



Fonte: Autor.

Tabela 6 - Valores médios de V_{CNP} para 5 dispositivos em cada etapa da funcionalização na rota PBASE dos rGO_{Gra} , rGO_{L} e rGO_{LB} . DP é o desvio padrão. Fonte: Autor.

	rGO		PBASE		ssDNA_{CP}		Etanolamina	
Material	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
rGO_{Gra}	0,230	0,010	0,257	0,030	0,252	0,033	0,278	0,069
rGO_L	0,065	0,025	0,161	0,041	0,163	0,065	0,181	0,055
rGO_{LB}	0,070	0,024	0,211	0,020	0,188	0,034	0,208	0,036

Tabela 7 - Valores médios de V_{CNP} para 5 dispositivos em cada etapa da funcionalização na rota EDC/NHS dos rGO_{Gra} , rGO_{L} e rGO_{LB} . DP é o desvio padrão. Fonte: Autor.

	rGO		ssDNA_{CP}		Etanolamina	
Material	Média	DP	Média	DP	Média	DP
rGO_{Gra}	0,225	0,010	0,281	0,032	0,300	0,049
rGO_L	0,085	0,020	0,138	0,021	0,165	0,015
rGO_{LB}	0,110	0,030	0,185	0,022	0,215	0,035

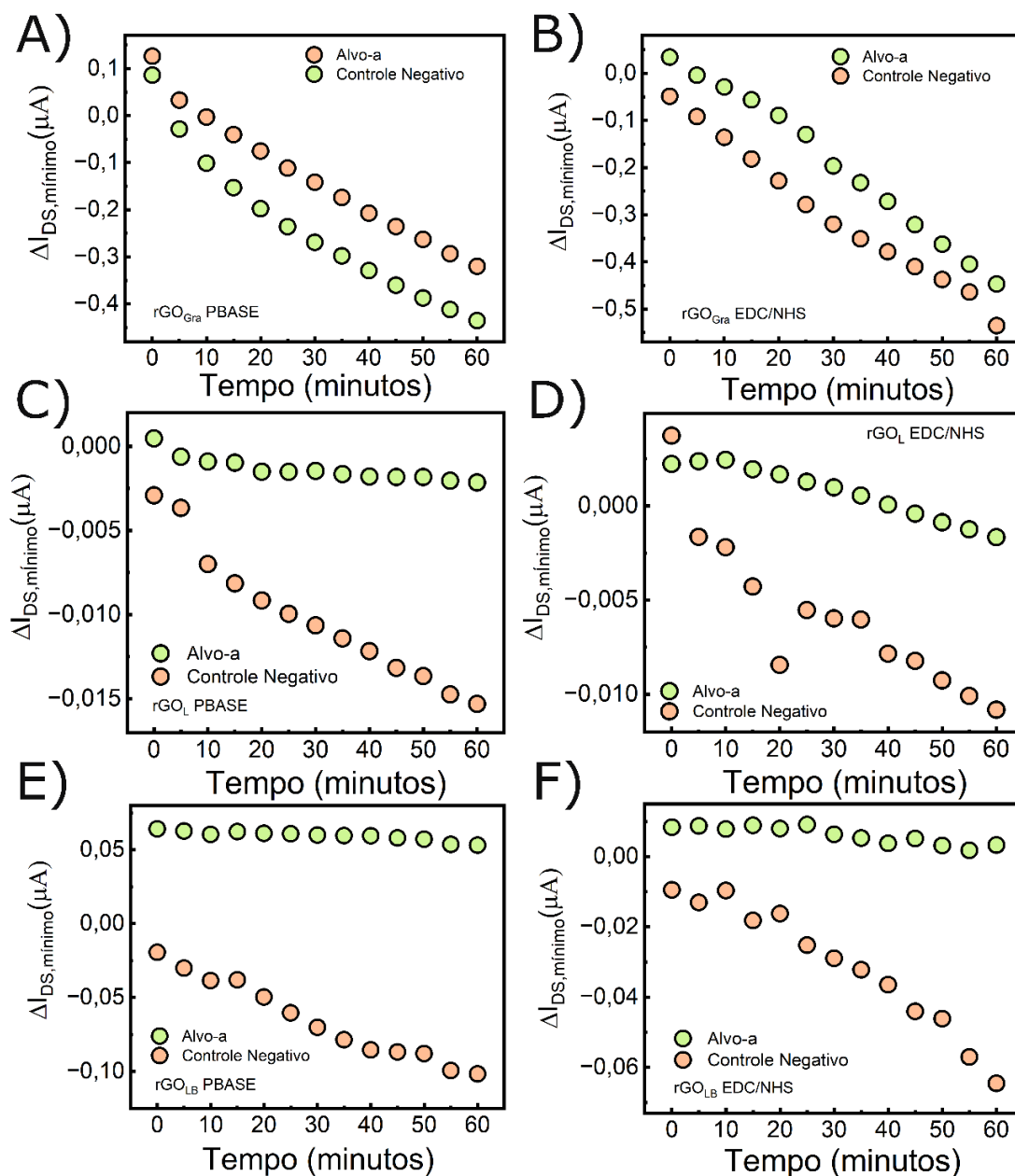
Avaliando a Figura 22A e a Tabela 6, observa-se na rota PBASE inicialmente um deslocamento de V_{CNP} para valores mais positivos após a adsorção do PBASE em todos os materiais, o que indica dopagem do tipo p. Esse comportamento é causado pelas interações π - π entre o PBASE e os planos de rGO (Xu et al., 2018). Após a imobilização das sondas ssDNA_{CP},

que apresentam carga líquida negativa em solução tampão PBS (Lopez; Liu, 2020), ocorre um deslocamento de V_{CNP} para valores mais negativos nos materiais rGO_{Gra} e rGO_{LB} em relação ao PBASE, caracterizando um efeito de dopagem do tipo n. No entanto, para o rGO_L , observa-se um deslocamento positivo, indicando dopagem do tipo p. Por fim, a adição de etanolamina provoca um novo deslocamento de V_{CNP} para valores mais positivos nos três materiais, evidenciando novamente um comportamento de dopagem p. Entretanto, os valores obtidos para os cinco dispositivos em cada etapa apresentam dispersão considerável, e os desvios padrão se sobrepõem, dificultando uma análise definitiva sobre a tendência do deslocamento.

A partir da Figura 22B e da Tabela 7, após a imobilização das sondas $ssDNA_{CP}$ na rota EDC/NHS, todos os materiais apresentam deslocamento de V_{CNP} para valores mais positivos em relação ao material reduzido, indicando uma tendência de dopagem do tipo p, similar ao comportamento observado na rota PBASE. A adição da etanolamina mantém o deslocamento para valores positivos, reforçando o perfil de dopagem p. Diferentemente do que se observa na rota PBASE, os dados obtidos para a funcionalização via EDC/NHS apresentam menor dispersão entre os dispositivos e uma tendência mais clara e reprodutível de deslocamento de V_{CNP} . Esses resultados provam por meio da resposta do dispositivo que a modificação de superfície de fato ocorre.

Para comparar a eficiência das diferentes rotas de funcionalização nas amostras de rGO , foi realizado um teste de incubação com o alvo-a e o controle negativo. O objetivo deste experimento foi determinar o tempo necessário para que ocorresse a hibridização entre o alvo-a e as sondas de captura imobilizadas nos dispositivos, a fim de estabelecer um tempo de incubação adequado para os testes de detecção. Além disso, buscou-se identificar qual combinação de rota de funcionalização e material (rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB}) resultaria em maior eficiência de interação com o alvo. O experimento também foi conduzido com o controle negativo (i.e. miRNA não complementar), a fim de verificar se os dispositivos apresentavam resposta elétrica para outras moléculas que não fossem o alvo específico. A Figura 23 apresenta os valores de $\Delta I_{DS, \text{mínimo}}$ extraídos das curvas de transferência (I_{DS} em função da variação do V_{GS} de + 0,5 a - 0,5 V, com V_{DS} constante de 0,2) obtidas a cada 5 minutos, ao longo de 60 minutos, mantendo-se os parâmetros de medição utilizados previamente. As análises foram realizadas para as amostras rGO_{Gra} , rGO_L e rGO_{LB} , funcionalizadas pelas rotas PBASE e EDC/NHS. Foi realizada uma medida em branco, sem analito, antes das análises. O $\Delta I_{DS, \text{mínimo}}$ representa a diferença entre a $I_{DS, \text{mínimo}}$ medida na amostra com analito e a $I_{DS, \text{mínimo}}$ da medida em branco.

Figura 23 - $\Delta I_{DS,minimo}$ em rGO_{Gra} (A, B), rGO_L (C, D) e rGO_{LB} (E, F) funcionalizados por PBASE (A, C, E) e EDC/NHS (B, D, F) após incubação com alvo-a e controle.



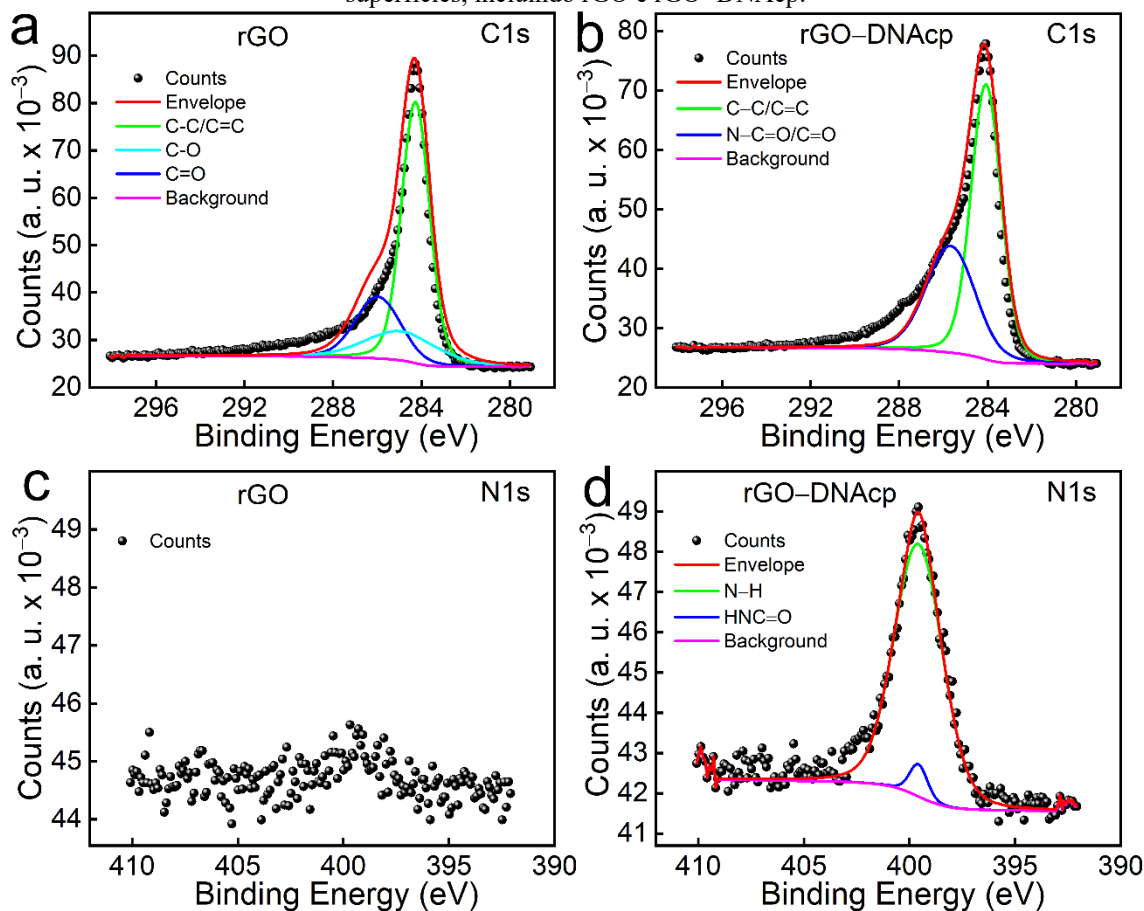
Fonte: Autor.

Para o rGO_{Gra} , funcionalizado via PBASE o sinal ($\Delta I_{DS,minimo}$) apresentou uma queda de aproximadamente $-0,32 \mu A$ na presença do alvo-a, enquanto o controle negativo também exibiu uma redução de $-0,43 \mu A$ (Figura 23A). Na rota EDC/NHS, esse comportamento se repetiu, com o alvo-a atingindo uma queda de $-0,44 \mu A$ e o controle negativo de $-0,53 \mu A$ (Figura 23B). No caso do rGO_L , a queda de sinal foi bem mais sutil. Pela rota PBASE, o $\Delta I_{DS,minimo}$ do alvo-a foi de cerca de $-0,002 \mu A$ (Figura 23C), enquanto o controle negativo cerca de $-0,015 \mu A$. Pela rota EDC/NHS, os valores foram $-0,001 \mu A$ para o alvo-a e $-0,01 \mu A$ para o controle (Figura 23D). Finalmente, para o rGO_{LB} , observou-se uma queda de $-0,053 \mu A$ para o alvo-a e $-0,1 \mu A$

para o controle negativo via PBASE (Figura 23E). Já com EDC/NHS, um aumento de 0,003 μA para o alvo-a e queda de $-0,064 \mu\text{A}$ para o controle negativo (Figura 23F). Nenhum dos casos foi possível identificar uma estabilização do sinal que indicasse a saturação do processo de hibridização. Como comportamentos semelhantes de queda linear foram observados para o controle negativo em algumas amostras, os dados foram considerados inconclusivos. A partir desses resultados, levantou-se a hipótese de que o dispositivo apresentava algum problema operacional. Análises posteriores revelaram que os parâmetros de medição utilizados durante as medidas estavam inadequados, gerando um efeito de estresse elétrico sobre os dispositivos. Esse estresse ocultava o verdadeiro sinal de hibridização e comprometia a confiabilidade dos dados obtidos. Esse assunto será abordado com mais detalhes posteriormente.

Considerando todos os resultados, o rGO_{Gra} reduzido termicamente e funcionalizado via EDC/NHS foi selecionado para a etapa de detecção do analito-alvo, devido a sua maior reprodutibilidade. A partir deste ponto, essa configuração será denominada Bio-EGT. O Bio-EGT foi caracterizado por XPS antes e após a imobilização do bioreceptor DNACp sobre o canal de rGO. A Figura 24 apresenta os espectros de alta resolução de XPS do canal do biossensor, destacando as regiões de C1s e N1s. Os espectros foram coletados antes e após a funcionalização com DNACp (rGO-DNACp). Os espectros de C1s e N1s deconvoluídos, ajustados utilizando funções Gaussiano-Lorentzianas, são apresentados na Figura 24. No espectro de C1s da camada de rGO (Figura 24A), foram observados picos característicos em 284.29 eV (C-C/C=C), 285.09 eV (C-O) e 286.01 eV (C=O) (Lelis et al., 2025b). Após a modificação com DNACp (Figura 24B), um novo pico surgiu em 285,73 eV, atribuído à ligação N-C=O formada por meio da interação covalente entre o rGO e o DNACp, bem como ao grupo C=O proveniente do próprio ssDNACp (Chung et al., 2018). Além disso, o pico correspondente a C-C/C=C sofreu um leve deslocamento para uma energia de ligação menor, de 284.09 eV, indicando alterações na estrutura da superfície do rGO.

Figura 24 - Espectros de XPS do canal do Bio-EGT: (A–B) picos de C1s e (C–D) picos de N1s para diferentes superfícies, incluindo rGO e rGO–DNAcp.



Fonte: Autor.

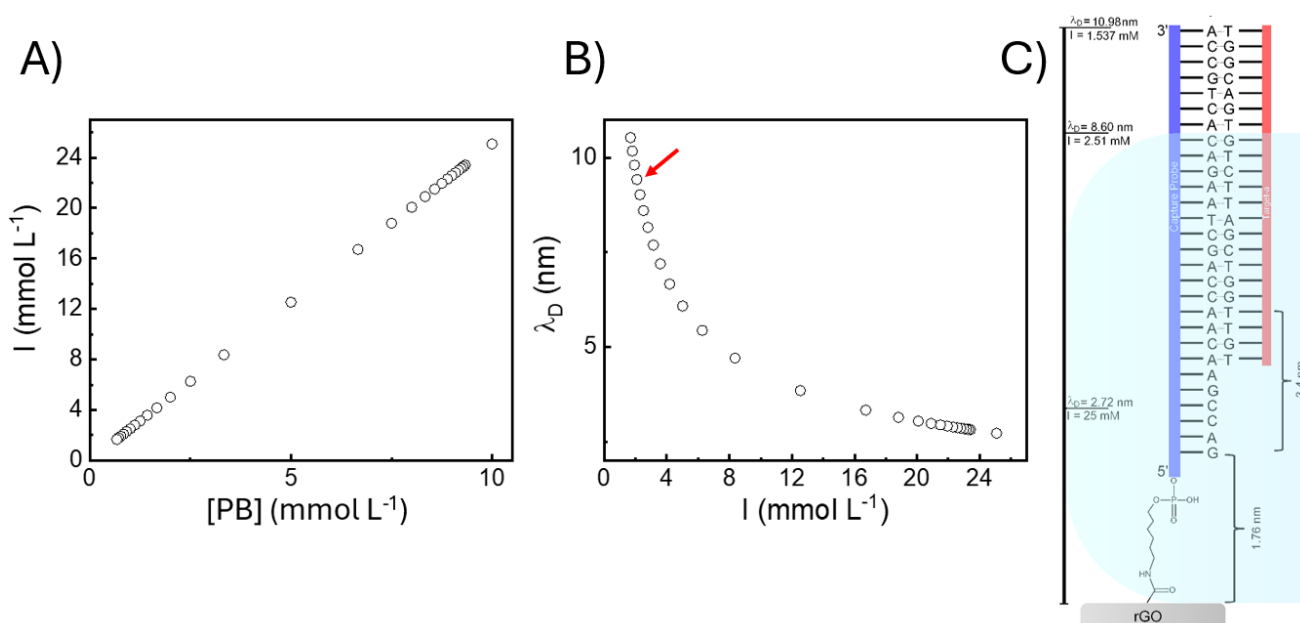
O espectro de N1s da camada de rGO (Figura 24C) apresenta um possível sinal, porém a baixa intensidade e a elevada razão sinal-ruído dificultam a identificação clara da presença de nitrogênio na amostra. Em contraste, o espectro de N1s da camada rGO–DNAcp (Figura 24D) exibiu dois novos picos em 399,66 eV (N-H) e 399,64 eV (HNC=O) (Chung et al., 2018), confirmando a formação de ligações amida covalentes entre os grupos COOH do rGO e os grupos NH₂ do ssDNA_{CP}. A análise de XPS desses espectros revelou variações significativas na composição química do Bio-EGT, evidenciando a funcionalização em etapas da superfície de rGO.

5.3. Influência da Força Iônica e do Comprimento de Debye

A Figura 25A exibe os valores de força iônica calculados em função da concentração dos reagentes utilizados na solução PB. Na Figura 25B, são apresentados os comprimentos de Debye correspondentes a cada uma dessas forças iônicas calculados a partir da equação 4. Já a Figura 25C traz uma representação esquemática do processo de hibridização entre a sonda de captura e o alvo-a. Com base em dados da literatura (Fonseca Guerra et al., 2000), estimou-se

que o comprimento total desde a ligação EDC/NHS até a extremidade da sonda de captura seria de aproximadamente 10,98 nm. Para que o comprimento de Debye fosse suficiente para englobar toda a estrutura da sonda, seria necessário utilizar uma força iônica de $I = 1,537 \text{ mmol L}^{-1}$. No entanto, forças iônicas muito baixas podem comprometer a estabilidade do dispositivo e afetar negativamente seu desempenho elétrico. Portanto, foi adotada uma força iônica de $2,51 \text{ mmol L}^{-1}$, correspondente a λ_D de 8,60 nm.

Figura 25 - (A) Força iônica em função da concentração dos reagentes da solução PB. (B) Comprimento de Debye calculado para cada força iônica. (C) Esquema do processo de hibridização entre a sonda de captura e o alvo-a.

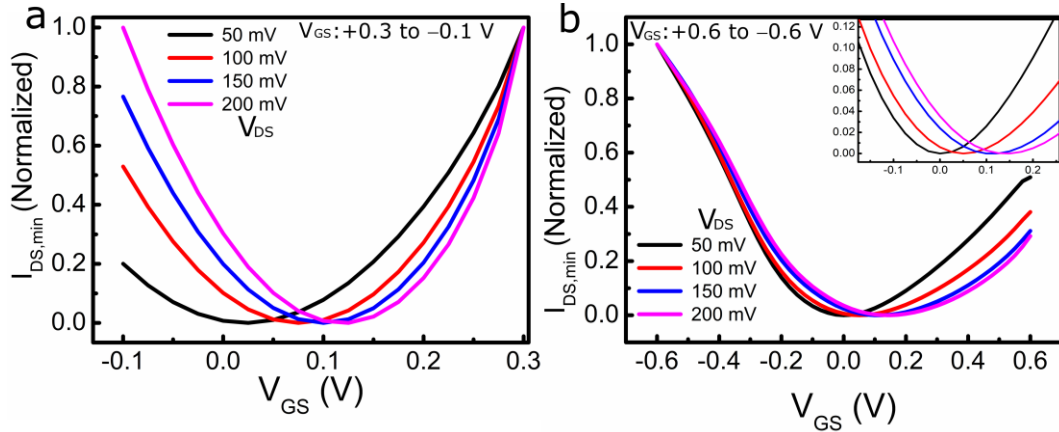


Fonte: Autor.

5.4. Otimização dos Parâmetros Elétricos de Operação e nova funcionalização

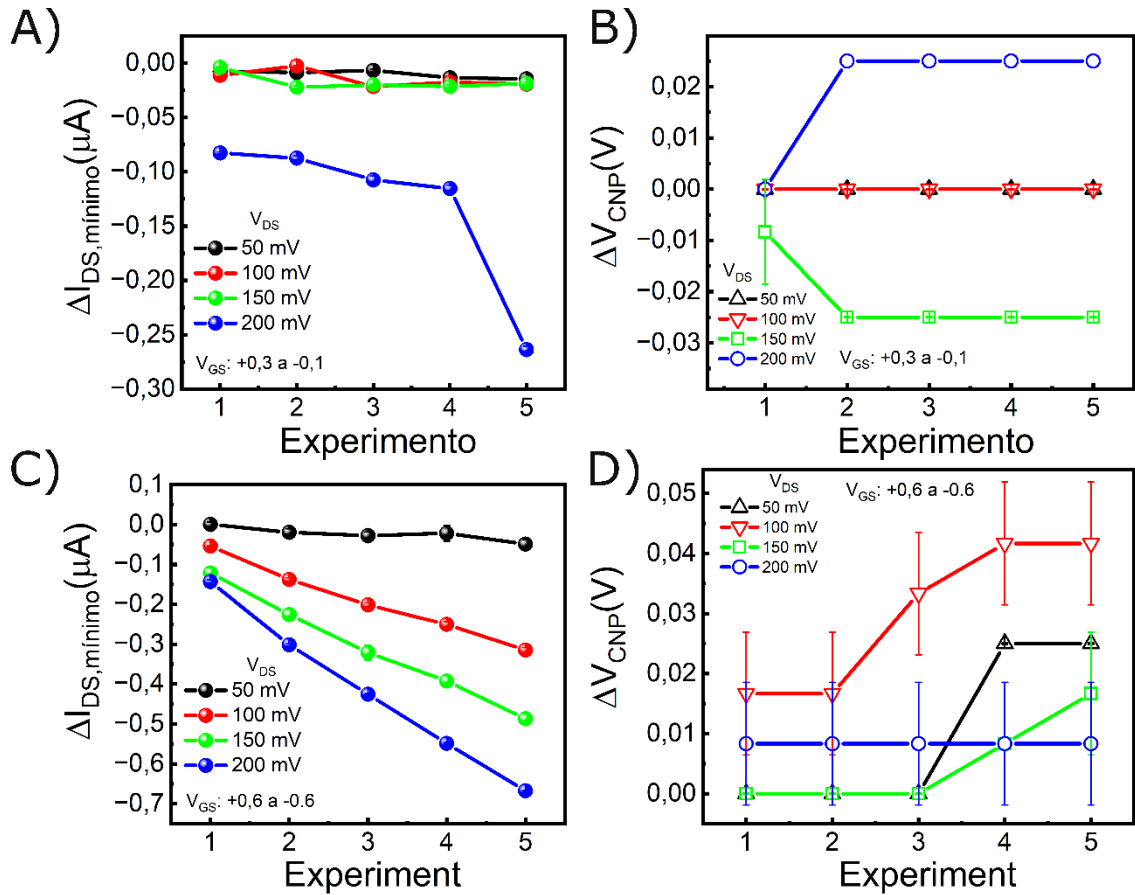
Os parâmetros elétricos do dispositivo foram avaliados para determinar as condições ideais nos experimentos de detecção, com o objetivo de minimizar o efeito do estresse elétrico. Esse estresse pode interferir no sinal de ligação do biomarcador e reduzir a sensibilidade do dispositivo a baixas concentrações do alvo. O valor de $I_{DS, \text{mínimo}}$ foi avaliado variando V_{DS} de 50 a 200 mV em quintuplicata, considerando dois intervalos de V_{GS} : +0,3 a -0,1 V e +0,6 a -0,6 V. Para cada experimento (total = 5), foram obtidas três curvas de transferência consecutivas em PB (Figura 26). O $\Delta I_{DS, \text{normalizado}}$ (Figura 27A) e o ΔV_{CNP} (Figura 27B) foram calculados pela diferença entre os valores da amostra medida e da medida em branco.

Figura 26 - Curvas de transferência dos EGTs de rGO em (a) janela de V_{GS} de +0,3 a -0,1 V e (b) janela de V_{GS} de +0,6 a -0,6 V. As medidas foram realizadas variando V_{DS} .



Fonte: Autor.

Figura 27 - Caracterização elétrica dos EGTs sob diferentes condições experimentais. (A) Variação do $I_{DS,min}$ ao longo de múltiplos ciclos experimentais para diferentes valores de V_{DS} , utilizando uma faixa de tensão de porta de +0,3 a -0,1 V. (B) Valores de V_{CNP} sob as mesmas condições experimentais do item (A). (C) $I_{DS,min}$ para uma faixa de tensão de porta de +0,6 a -0,6 V, utilizando dispositivos diferentes. (D) Variações de V_{CNP} sob as mesmas condições experimentais do item (C). As barras de erro representam o desvio padrão de medições repetidas ($n = 3$).



Fonte: Autor.

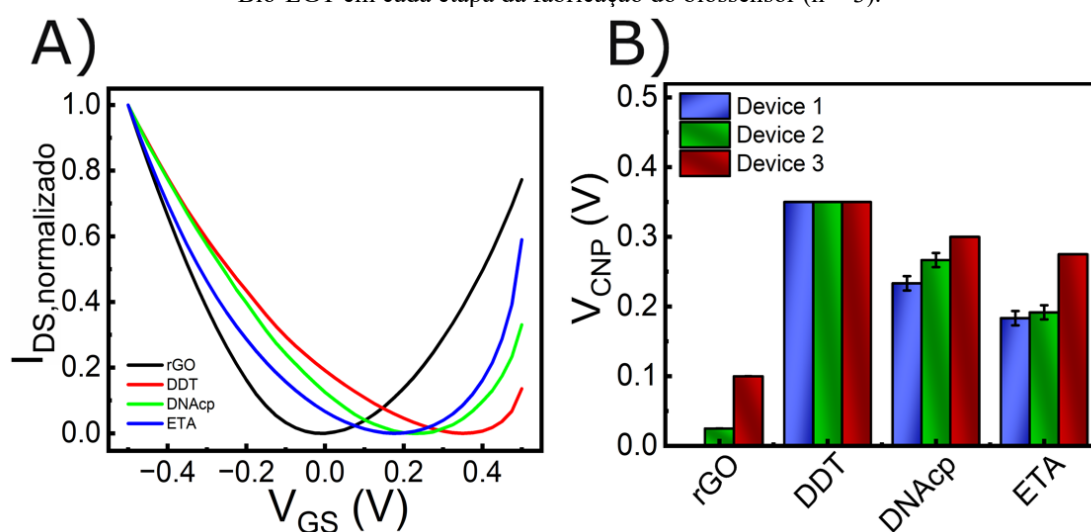
Para a variação de V_{GS} de +0,3 to -0,1 V (Figura 27A), embora os valores de $I_{DS,minimo}$ tenham sido semelhantes para 50, 100 e 150 mV, o sinal em 100 mV apresentou menor instabilidade na queda de corrente ao longo das réplicas experimentais. Observa-se que o V_{CNP} se mantém estável durante os experimentos para 50 e 100 mV, indicando maior estabilidade do dispositivo (Figura 27C). Em contraste, variações em ΔV_{CNP} ocorrem a 150 e 200 mV, sugerindo menor robustez do dispositivo nessas condições. Por outro lado, quando o V_{GS} variou de +0,6 to -0,6 V, tanto o $\Delta I_{DS,min}$ quanto o V_{CNP} apresentaram maiores impactos elétricos (Figuras 27B e 27D). A redução do $I_{DS,minimo}$ ao longo dos experimentos é menor para 50 mV em comparação com 100, 150 e 200 mV, que apresentam uma tendência de queda semelhante, porém com declínios mais acentuados em tensões V_{DS} maiores. Enquanto isso, o ΔV_{CNP} apresenta variações com baixa reprodutibilidade entre os experimentos. Os resultados indicam que o impacto elétrico é mais pronunciado quando a tensão V_{GS} aplicada varia em uma faixa maior, ocasionando uma redução mais acentuada em $I_{DS,minimo}$ e deslocamentos no V_{CNP} . Além disso, valores mais altos de V_{DS} amplificam esses efeitos nas réplicas experimentais. Consequentemente, a estabilidade do dispositivo é melhor quando operado em uma faixa mais restrita de V_{GS} e sob condições de V_{DS} mais baixas. Portanto, o intervalo de V_{GS} de +0,3 a -0,1 V e V_{DS} de 100 mV foram definidos como os parâmetros otimizados para os experimentos de biossensoriamento.

Quanto à estabilidade do dispositivo ao longo do tempo, foi avaliado sistematicamente a estabilidade operacional e a reprodutibilidade dos dispositivos de duas formas: no mesmo e em dias diferentes, sob condições otimizadas de V_{GS} e V_{DS} . A estabilidade foi analisada por meio do monitoramento dos valores de $I_{DS,min}$ extraídos das curvas de transferência. A repetibilidade intradia foi avaliada utilizando três dispositivos fabricados independentemente, resultando em um desvio padrão relativo (RSD) de 10,21%. A reprodutibilidade interdias foi avaliada ao longo de um período de 30 dias utilizando dez dispositivos independentes, com uma medida por dispositivo, resultando em um RSD de 3,93%. Durante os testes em diferentes dias, os dispositivos foram armazenados em condições ambientes à temperatura ambiente. Os resultados demonstraram boa reprodutibilidade entre dispositivos e desempenho elétrico estável em medições repetidas em diferentes escalas de tempo. Os baixos valores de RSD intradia e interdias observados indicam uma estabilidade operacional robusta.

Utilizando os parâmetros otimizados, a metodologia de funcionalização covalente foi repetida para 3 dispositivos com rGO_{Gra} reduzido termicamente. Para evitar interferências causadas pela adsorção das sequências-alvo de miRNA ou DNA na superfície do eletrodo *gate*, a passivação do *gate* de Au foi realizada conforme o procedimento desenvolvido pela

literatura(Campos et al., 2019). As curvas de transferência foram medidas antes (Figura 28A, linha preta) e após a passivação com DDT (Figura 28A, linha vermelha). Foi observado um deslocamento de $V_{CNP} = +0,31 \pm 0,05$ V (ver Figura 28B), atribuído à imobilização do DDT na superfície do gate por meio da ligação tio-ouro, formando uma monocamada auto-montada (SAM) no eletrodo gate de Au(Campos et al., 2019). Esses resultados confirmam que o processo de passivação do gate foi realizado com sucesso.

Figura 28 - (A) Curvas de transferência a $V_{DS} = 100$ mV após cada etapa da funcionalização do Bio-EGT: eletrodo gate nu (linha preta), passivação do eletrodo gate com solução de DDT (linha vermelha), imobilização de DNACp após ativação dos grupos carboxílicos no rGO usando solução de EDC/NHS (linha verde) e bloqueio com solução de etanolamina (linha azul). (B) Valores de V_{CNP} obtidos para três dispositivos Bio-EGT em cada etapa da fabricação do biossensor ($n = 3$).



Fonte: Autor.

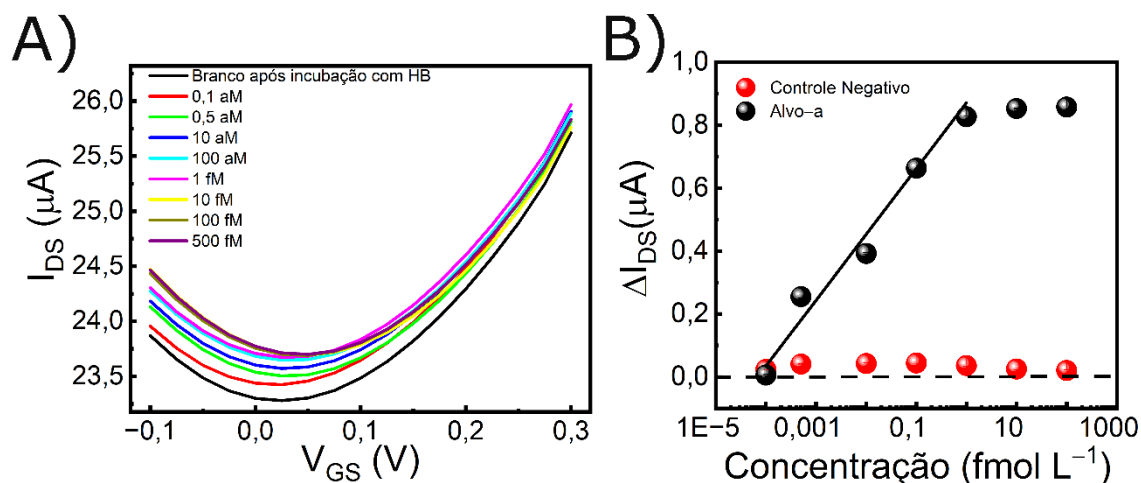
A imobilização do DNACp no canal de rGO foi realizada por meio da reação EDC/NHS, que envolve a ativação de ácidos carboxílicos seguida por um processo de amidização facilitado pelo grupo amino presente no DNACp(Sehgal; Vijay, 1994). A Figura 28A mostra as curvas de transferência obtidas após a imobilização do DNACp, indicando um efeito de dopagem do tipo n, com um deslocamento para a esquerda das curvas de transferência em $V_{CNP} = -0,083 \pm 0,03$ V (Figura 28A, linha verde). A imobilização bem-sucedida do DNACp na plataforma EGT foi confirmada. No entanto, uma etapa adicional de passivação foi necessária para evitar ligações não específicas na superfície do biossensor. Para isso, o ETA foi utilizado como agente bloqueador. As curvas de transferência obtidas após o bloqueio da superfície apresentaram um efeito de dopagem do tipo n, com um deslocamento para a esquerda das curvas de transferência em $V_{CNP} = -0,05 \pm 0,025$ V (Figura 28A, linha azul), confirmando que o bloqueio superficial foi realizado com sucesso. Todas as etapas de funcionalização foram repetidas em três dispositivos (Figura 28B). Os valores de V_{CNP} obtidos para cada biossensor foram semelhantes, exibindo a mesma tendência. A diferença nos valores de V_{CNP} entre os valores obtidos e

apresentados no relatório anterior pode ser atribuída ao estresse elétrico, já que as medições anteriores foram realizadas com $V_{DS} = 0,2$ V, enquanto nesta etapa $V_{DS} = 0,1$.

5.5. Testes de Sensoriamento com Alvo Específico

O Bio-EGT foi avaliado para a detecção do alvo-a em soluções padrão preparadas em HB com concentrações variando de $0,1$ a 100 fmol L^{-1} . As curvas de transferência do Bio-EGT em função da concentração do alvo-a após a incubação são apresentadas na Figura 29A. Uma sequência controle negativa foi avaliada nas mesmas condições (Figura 29B). Observou-se um aumento em $I_{DS,\text{mínimo}}$ com o aumento das concentrações do alvo-a, demonstrando a seletividade do Bio-EGT para o biossensoriamento de miR-34a. Além disso, a corrente do dispositivo aumenta em magnitude à medida que a concentração do analito aumenta, sem mudanças evidentes em V_{CNP} . Isso sugere que, à medida que o analito se liga ao receptor, ocorre um aumento na densidade de carga, ampliando a corrente total do EGT (para testes em tampão). Esse aumento de corrente, entretanto, não é uniforme, pois os níveis de corrente nos ramos do tipo p e n da curva aumentam de forma assimétrica.

Figura 29 - (A) Curvas de transferência após incubação com o alvo em diferentes concentrações. (B) Valores de $\Delta I_{DS,\text{min}}$ para o Bio-EGT na presença do controle negativo e do alvo-a em diferentes concentrações ($n = 3$).



Fonte: Autor.

Para a construção da curva analítica (Figura 29B), o sinal analítico referente ao alvo-a, extraído em $I_{DS,\text{mínimo}}$, foi subtraído do valor obtido para a amostra branco, resultando em ΔI_{DS} . O ΔI_{DS} apresentou uma resposta linear (coeficiente de determinação $R^2 = 0,983$) em relação à concentração logarítmica de alvo-a até 1 fmol L^{-1} , indicando que o equilíbrio da reação entre o alvo-a e o DNA_{CP} ancorado na superfície do Bio-EGT foi alcançado nessa concentração. A

partir desse ponto, foi observado um sinal constante (saturação da resposta), conforme mostrado na curva analítica da Figura 29B.

A partir da curva analítica, a resposta do dispositivo pode ser expressa como $\Delta_{IDS} = 0,244 + 0,209 \log(\text{Conc.alvo}-a)$. Para permitir uma comparação direta com outros sensores de miRNA que empregam diferentes tecnologias (Tabela 8), pode-se simplificar a extração da sensibilidade do biossensor como o coeficiente angular da curva analítica, resultando em $2,09 \times 10^{17} \mu\text{A/mol L}^{-1}$. O limite de detecção (LoD) do biossensor foi determinado conforme o método proposto por Kong et al. (Kong et al., 2021), utilizando a equação $\text{LoD} = 3,3\delta \times (\text{CA}/\text{SA})$, em que δ representa o desvio padrão de três medições da solução branco (1 mmol L^{-1} PB sem alvo-a), SA é a intensidade do sinal do analito e CA é a concentração do analito. O LoD obtido foi de $0,098 \text{ amol L}^{-1}$, valor condizente com o esperado, pois está ligeiramente abaixo do primeiro ponto experimental ($0,1 \text{ amol L}^{-1}$) da curva analítica obtida com o Bio-EGT.

Um experimento controlado foi realizado substituindo o alvo-a pôr um controle negativo. Conforme ilustrado na Figura 29B, não foi observado aumento na resposta após incubações sucessivas em diferentes concentrações. O Bio-EGT apresentou uma resposta claramente não linear, o que pode ser atribuído à natureza não complementar da sequência do controle negativo. Essa falta de complementaridade impede a ligação ao DNACp imobilizado na superfície do Bio-EGT. Consequentemente, esses resultados confirmam que o Bio-EGT demonstra alta sensibilidade e seletividade para a detecção do target-a, ressaltando sua confiabilidade para o biossensor de miR-34a.

Para avaliar a competitividade do dispositivo, os resultados obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura referentes a outros métodos de detecção de miRNA, incluindo biossensores do tipo POC e técnicas analíticas convencionais. Os métodos apresentados na Tabela 8 exibem uma ampla faixa de desempenho para a detecção de miRNA, diferindo quanto à capacidade sem marcação, faixa linear, sensibilidade e limite de detecção (LoD). Entre eles, os transistores orgânicos de efeito de campo com porta eletrolítica (EGOFETs) e o Bio-EGT se destacam como métodos de detecção sem marcação, enquanto os demais requerem a utilização de marcação. Em termos de faixa linear, a maioria dos métodos detecta miRNA na faixa picomolar, sendo que os microarranjos digitais (DM) e o Bio-rGO EGT apresentam as capacidades de detecção mais amplas, alcançando concentrações tão baixas quanto 100 e $0,1 \text{ amol L}^{-1}$, respectivamente. A partir da Tabela 8, observa-se que os valores de LoD variam significativamente, com o Bio-rGO EGT atingindo o menor LoD ($0,098 \text{ amol L}^{-1}$), tornando-se o biossensor mais sensível, seguido pelo DM ($6,2 \text{ amol L}^{-1}$) e pelo método

fotoeletroquímico ($2,04 \text{ fmol L}^{-1}$). Esses resultados indicam que, embora diferentes biossensores ofereçam vantagens distintas, o nosso dispositivo apresenta a maior sensibilidade, detecção sem marcação e o menor limite de detecção, configurando-se como uma abordagem promissora para a detecção altamente sensível de miRNA.

Tabela 8 - Biossensores reportados na literatura para detecção de miRNA.

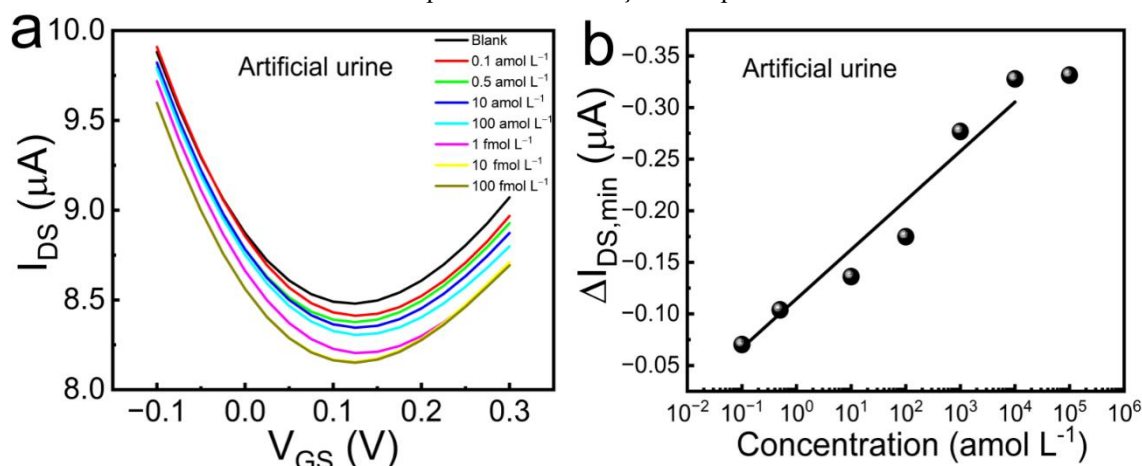
Biosensor	Livre de Marcação	Faixa Linear	Sensibilidade* (a. u.)	LoD	Ref.
FSA	Não	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$	$2,750 \times 10^{13}$	20 fmol L^{-1}	(Liang et al., 2022)
DFI	Não	$2,500 \times 10^4 - 2,500 \times 10^5$	—	25 pmol L^{-1}	(Kim et al., 2024)
PEC	Não	$1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$	$2,904 \times 10^8$	$2,040 \text{ fmol L}^{-1}$	(Wang et al., 2022)
EFCA	Não	$5 \times 10^1 - 1 \times 10^3$	—	$1,300 \text{ fmol L}^{-1}$	(Huang; Wang; Wang, 2024)
ELE	Não	$1 \times 10^0 - 1 \times 10^6$	$3,550 \times 10^{12}$	$0,040 \text{ fmol L}^{-1}$	(Pothipor et al., 2021)
DM	Não	$1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^3$	$6,700 \times 10^{14}$	$6,200 \text{ amol L}^{-1}$	(Ekiz Kanik et al., 2022)
EGOFET	Sim	$1 \times 10^4 - 3 \times 10^5$	—	35 fmol L^{-1}	(Selvaraj et al., 2021)
Bio-EGT	Sim	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^0$	$2,090 \times 10^{17}$	$0,098 \text{ amol L}^{-1}$	Esse trabalho

*Coeficiente angular da curva analítica considerando a concentração do alvo expressa em mol L^{-1} . FSA e DFI referem-se à amplificação do sinal fluorescente e à imagem em campo escuro, respectivamente. PEC é fotoeletroquímico, EFCA é amplificação em cascata sem enzimas, ELE é eletroquímico, DM são microarranjos digitais e EGOFET são transistores orgânicos com gate eletrolítico. A sensibilidade é expressa em unidades arbitrárias (u.a.) para permitir a comparação entre as diferentes tecnologias de detecção.

O limite de detecção em nível attomolar obtido em tampão proporciona uma vantagem analítica significativa para a operação em amostras biológicas (por exemplo, sangue, soro e urina), ao assegurar a obtenção de respostas detectáveis e quantificáveis mesmo após diluições. A diluição de amostras biológicas minimiza interferências relacionadas à matriz e assegura que o ambiente analítico final seja predominantemente constituído por tampão. A título de exemplificação, a Figura 30 apresenta a resposta do sensor em urina artificial. A Figura 30A ilustra as curvas de transferência do biossensor em diferentes concentrações do alvo—a. Neste caso, em razão da diluição da urina artificial, a curva de transferência apresenta um comportamento distinto quando comparada às medições realizadas em tampão. A Figura 30B apresenta a curva de calibração correspondente ao alvo—a. A curva analítica foi obtida seguindo o mesmo procedimento empregado na Figura 29B. A resposta de ΔI_{DS} apresentou uma faixa

linear de $0,1 \text{ amol L}^{-1}$ a 10 fmol L^{-1} , com coeficiente de determinação R^2 de 0,948. Nessa região linear, a relação analítica é descrita por $\Delta I_{DS} = -0.115 - 0.048 \log(\text{Conc.alvo-a})$. O limite de detecção (LoD), calculado utilizando a mesma abordagem empregada na Figura 29B, foi de $0,098 \text{ amol L}^{-1}$. Dessa forma, o biossensor proposto mostra-se promissor para aplicações futuras envolvendo amostras biológicas ou de pacientes.

Figura 30 - (A) Curvas de transferência dos EGTs após incubação com o alvo-a em diferentes concentrações em urina artificial. (B) Valores correspondentes de $\Delta I_{DS,\min}$ em função da concentração do alvo-a, obtidos a partir de três medições independentes.



Fonte: Autor.

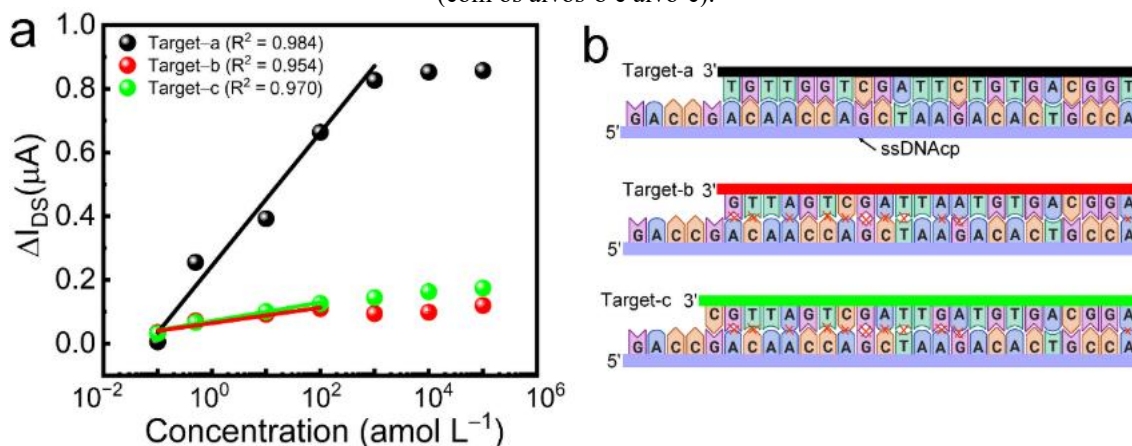
5.6. Seletividade do miRNA-34: análises analíticas e de aprendizado de máquina

Os miRNAs são agrupados em famílias de acordo com a similaridade de suas sequências *seed* (nucleotídeos 2–8) e pelo compartilhamento de um conjunto comum de alvos biológicos, embora possam diferir quanto à localização genômica, aos padrões de expressão e às suas funções (Kamanu et al., 2013). As sequências de miRNAs podem variar inclusive por um único nucleotídeo, o que pode afetar sua biogênese e/ou especificidade de alvo, estando tais variações associadas ao desenvolvimento de doenças (Ha; Kim, 2014). Considerando que a seletividade é um fator crucial no biossensoriamento, investigou-se neste trabalho a capacidade do dispositivo em discriminar moléculas pertencentes à família miR-34.

A Figura 31A apresenta as curvas analíticas referentes aos alvos a, b e c (sequenciamento e hibridização apresentados na Figura 31B), obtidas utilizando a plataforma Bio-rGO EGT. As curvas evidenciam a resposta do biossensor frente ao aumento da concentração de cada alvo, confirmando a capacidade do dispositivo em discriminar entre sequências totalmente complementares (alvo a) e parcialmente complementares (alvos b e c). Para os alvos b e c, observou-se uma faixa linear distinta ($0,1$ a 100 amol L^{-1}) e uma inclinação inferior, o que pode ser atribuído à presença de mismatches na região de hibridização. Os mismatches reduzem a

eficiência de hibridização, resultando, conseqüentemente, em respostas de sinal atenuadas, conforme ilustrado na Figura 31A.

Figura 31 - (A) Curvas analíticas para os alvos-a, alvo-b e alvo-c em diferentes concentrações, obtidas utilizando a plataforma Bio-rGO EGT. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de três medições e são menores que os próprios pontos de dados. (B) Representação esquemática das sequências nucleotídicas do receptor ssDNAcp e dos alvos, ilustrando um pareamento perfeito (com o alvo-a) e pareamentos não perfeitos (com os alvos-b e alvo-c).



Fonte: Autor.

O Bio-rGO EGTs demonstrou capacidade de discriminar sequências perfeitamente complementares de sequências com *mismatches* em nível attomolar. Foi verificado na literatura que a discriminação entre alvos de miRNA semelhantes (isto é, os alvos b e c) não é trivial, exigindo estratégias analíticas complementares, tais como o uso de aprendizado de máquina para análise avançada de dados. Foi realizada uma análise multivariada dos dados experimentais por meio do algoritmo SISSO (do inglês *Sure Independence Screening and Sparsifying Operator*). O SISSO é uma estrutura de regressão simbólica que gera equações simples e interpretáveis a partir da combinação das características originais com um conjunto predefinido de operadores matemáticos, possibilitando a extração de relações fisicamente significativas a partir de dados de alta dimensionalidade.

A Figura 32 apresenta os resultados mais relevantes obtidos com o algoritmo SISSO. Na regressão simbólica multirefeta, o logaritmo da concentração do analito é expresso como $C_1 \times D_1 + C_0$, em que D_1 corresponde ao descritor selecionado e compartilhado entre todos os alvos (miR-34a, miR-34b, miR-34c e NC), enquanto C_1 e C_0 são constantes ajustadas de forma independente para cada alvo. O descritor mais bem classificado selecionado pelo algoritmo SISSO foi $D_1 = |(V_{10} + V_{14}) - (V_9 - V_{CNP})|$. Os dez descritores mais bem classificados, juntamente com suas respectivas métricas de desempenho, são apresentados na tabela 9. Destaca-se que o descritor selecionado incorpora o valor de corrente em V_{CNP} (isto é, o I_{DSmin}

utilizado na análise de dados humanos), valores de corrente em dois pontos de tensão situados ao redor da região de mínimo da curva de transferência (V_9 e V_{10}) e uma característica adicional correspondente ao valor de corrente no lado esquerdo da curva (V_{14}).

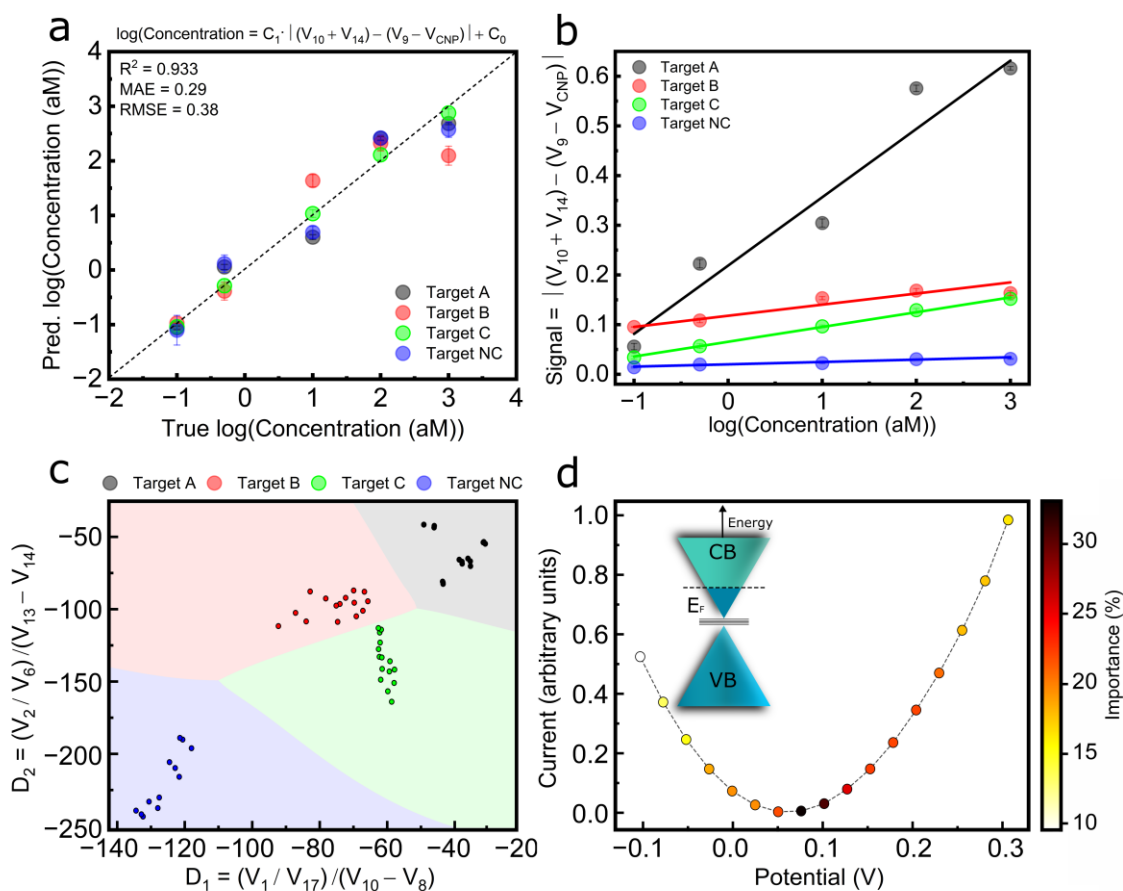
Tabela 9 - Os 10 descritores mais bem ranqueados obtidos por regressão multitarefa SISSO. Métricas de avaliação para os testes de validação cruzada (CV) e para o ajuste utilizando o conjunto completo de dados (FIT). Fonte: Autor.

Ranking	D1	Ranking médio considerando todos os folds	R2 CV	MAE CV	RMSE CV	R2 FIT	MAE FIT	RMSE FIT
1	$ (v_{10}+v_{14})-(v_9-v_{min}) $	1,900	0,916	0,332	0,424	0,933	0,294	0,379
2	$ (v_9-v_{10})-(v_{12}+v_{14}) $	2,000	0,918	0,329	0,418	0,937	0,297	0,376
3	$ (v_3*v_{13})-(v_9*v_{16}) $	6,500	0,912	0,337	0,433	0,929	0,305	0,389
4	$ (v_{14}+v_{16})-(v_{17}-v_{14}) $	6,600	0,914	0,339	0,429	0,929	0,307	0,389
5	$ (v_5+v_{10})-abs(v_4-v_{16}) $	8,500	0,912	0,321	0,433	0,928	0,286	0,393
6	$ (v_8*v_9)-(v_2*v_{13}) $	9,500	0,904	0,350	0,452	0,927	0,307	0,396
7	$ (v_2*v_{13})-(v_6*v_{10}) $	9,700	0,906	0,372	0,447	0,927	0,329	0,394
8	$ (v_7-v_{15})-(v_8+v_{min}) $	10,000	0,911	0,344	0,436	0,927	0,310	0,392
9	$ (v_1*v_{14})-(v_5*v_{16}) $	14,900	0,905	0,354	0,450	0,925	0,316	0,400
10	$ (v_7*v_9)-(v_1*v_{13}) $	18,200	0,903	0,359	0,459	0,924	0,317	0,402

A Figura 32A compara o logaritmo da concentração do analito previsto pelo modelo com os valores de referência (reais), considerando o modelo treinado com o conjunto completo de dados. As previsões apresentam boa concordância com as concentrações reais, embora pequenas discrepâncias sejam observadas entre os diferentes alvos. O modelo selecionado apresenta R^2 de 0,933, MAE de 0,29 e de 0,38 (em logaritmo da concentração), métricas consideradas excelentes tendo em vista a utilização de um único descritor para diferentes alvos e faixas de concentração. A Figura 32B apresenta um análogo das curvas de calibração reconstruídas utilizando o descritor selecionado como preditor de sinal. Foram obtidas quatro curvas distintas, com sobreposição mínima, evidenciando a vantagem dessa abordagem multivariada em comparação à análise univariada convencional, a qual não permite discriminar facilmente entre todos os alvos. Entre as equações lineares obtidas para os analitos, o alvo-a apresentou a maior inclinação (0,136 u.a.), confirmando tanto sua maior sensibilidade às variações de concentração quanto a capacidade do biossensor em detectar de forma seletiva o principal miRNA de interesse. Em contraste, o controle negativo apresentou uma resposta praticamente plana ($slope \approx 0,005$ u.a.), indicando uma resposta desprezível, conforme esperado para um alvo não complementar. Curvas de calibração reconstruídas a partir dos descritores individuais melhor classificados (isto é, específicos para cada alvo) também foram obtidas (Figura 33). Esses resultados demonstram que a análise multivariada amplifica diferenças sutis

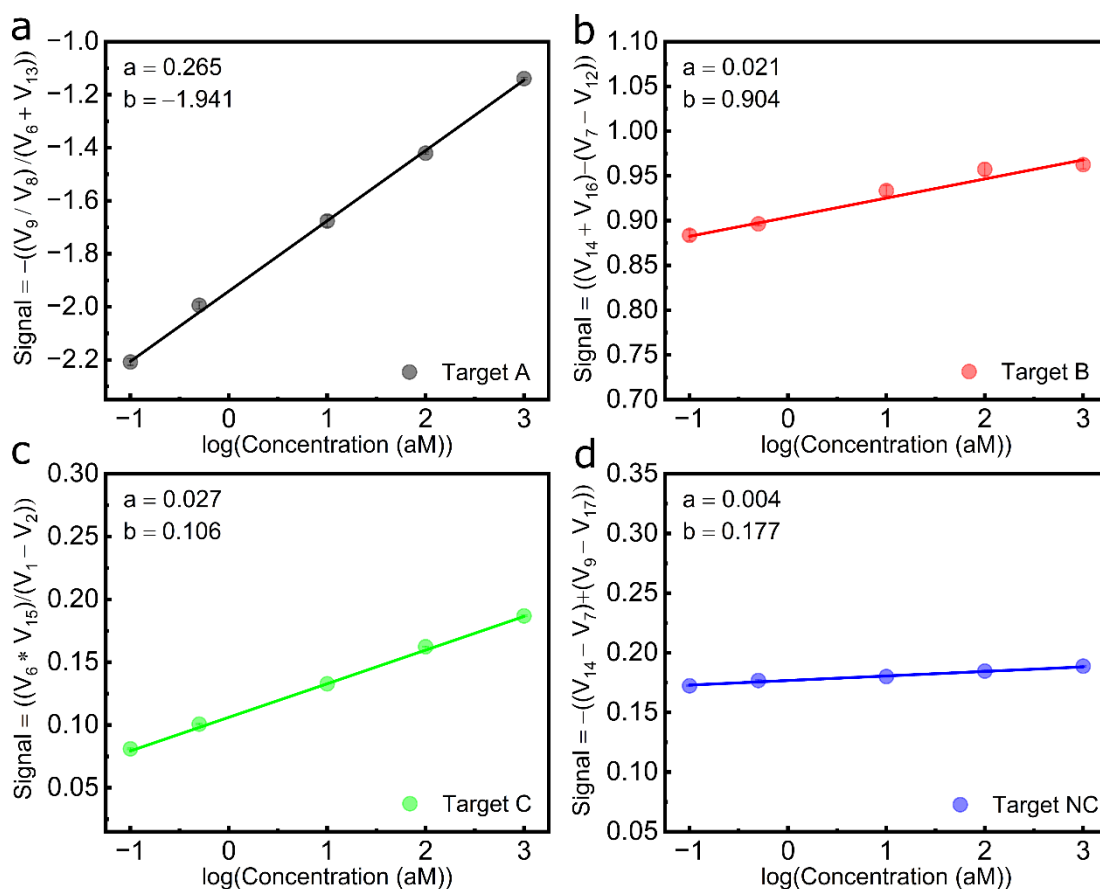
entre os analitos, permitindo a obtenção de curvas de calibração distintas mesmo para alvos muito semelhantes, como miR-34b e miR-34c, que diferem por um único nucleotídeo.

Figura 32 - Análise por aprendizado de máquina: (A) Gráfico de paridade mostrando a comparação entre as concentrações logarítmicas reais dos analitos e os valores preditos utilizando o descritor de melhor ranking selecionado na tarefa de regressão multitarefa. (B) Curvas de calibração para os quatro analitos, usando o descritor de melhor ranking como preditor de sinal. (C) Resultados do modelo de Classificação por Vetores de Suporte utilizando como características de entrada o descritor bidimensional identificado na tarefa de classificação, delimitando quatro regiões distintas correspondentes aos diferentes alvos. (D) Análise da importância das características para os descritores obtidos para o alvo-a, ilustrando a contribuição relativa das 17 variáveis I_{DS} da curva de transferência do EGT de rGO.



Fonte: Autor.

Figura 33 - Curvas de calibração reconstruídas com os descritores individuais de melhor ranqueamento (isto é, específicos do alvo) obtidos por SISSO, em que “a” representa o coeficiente angular da curva e “b” o intercepto.



Fonte: Autor.

Para corroborar os resultados da regressão, foi também realizada uma tarefa de classificação utilizando o algoritmo SISSO. Os dez melhores descritores bidimensionais foram selecionados e utilizados como características de entrada em um classificador de vetores de suporte treinado com o conjunto completo de dados. Todos os dez pares de descritores resultaram em uma acurácia de 100% (Tabela 10). A Figura 32C ilustra um par de descritores representativo, evidenciando uma separação visual clara entre os quatro alvos. Esses resultados confirmam que uma excelente discriminação entre os diferentes alvos pode ser alcançada independentemente da concentração do analito, reforçando a capacidade de modelos de aprendizado de máquina em capturar diferenças de sinal não acessíveis por meio de análises convencionais.

Tabela 10 - Os 10 descritores bidimensionais mais bem ranqueados obtidos pela tarefa de classificação SISSO para todos os alvos miR-34a, miR-34b, miR-34c e NC. Fonte: Autor.

Ranking	D1	D2	Ranking médio considerando todos os folds	Acurácia
1	$((v1/v5)/(v13-v14))$	$(v1/v13)$	7,5	100%
2	$((v1/v5)/(v13-v14))$	$(v2/v13)$	10,4	100%
3	$((v1/v17)/(v10-v8))$	$((v1/v6)/(v12-v14))$	10,7	100%
4	$((v1/v16)/(v14-v15))$	$((v1/v17)/(v10-v8))$	16,1	100%
5	$((v1/v16)/(v14-v15))$	$(v1/(v8-v9))$	19,0	100%
6	$((v1/v17)/(v10-v8))$	$((v2/v6)/(v13-v14))$	19,5	100%
7	$((v1/v16)/(v6-v7))$	$((v1/v5)/(v13-v14))$	23,6	100%
8	$((v1/v16)/(v14-v15))$	$((v1/v17)/(v11-v7))$	24,6	100%
9	$((v1/v16)/(v14-v15))$	$((v1/v17)/(v7-vmin))$	25,0	100%
10	$((v1/v16)/(v14-v15))$	$((v2/v17)/(v10-v8))$	25,9	100%

Por fim, foi realizada uma avaliação da importância das características utilizando os descritores obtidos nas tarefas de regressão. Apenas os descritores presentes de forma consistente em todas as dez dobras de validação cruzada foram considerados, e a frequência de ocorrência de cada característica foi calculada. A Figura 32D apresenta a importância das características mapeada sobre uma curva de transferência representativa para os descritores obtidos a partir dos dados do alvo de alta especificidade do biossensor. Observou-se que as características selecionadas com maior frequência estão localizadas na região próxima ao mínimo da curva de transferência. Os resultados também ressaltam a importância não apenas do I_{DS} no mínimo da curva, mas também dos pontos de tensão adjacentes. Uma vez que a curva de transferência está diretamente relacionada à densidade de estados do rGO, esse achado sugere que os estados eletrônicos próximos à região do nível de Fermi desempenham um papel crítico na resposta do biossensor. Em outras palavras, os resultados indicam que a natureza

defeituosa do rGO, isto é, a presença de desordem e de estados localizados, desempenha um papel importante na resposta de sensoriamento dos biossensores EGT baseados em rGO.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor compacto do tipo point-of-care capaz de detectar homólogos de miRNA da família miRNA-34, a qual está envolvida em processos biológicos como distúrbios neurológicos. O dispositivo integra uma sonda de DNA seletiva para o reconhecimento molecular preciso e um transistor com *gate* eletrolítico para a transdução eletrônica do sinal. Como etapa inicial, antes da funcionalização e dos experimentos de detecção, foi realizada a otimização do próprio dispositivo, avaliando três óxidos de grafeno e dois métodos de redução, a fim de estabelecer uma plataforma com comportamento elétrico estável, parâmetros bem definidos e alta reprodutibilidade. Essa abordagem permitiu investigar como o grau de limpeza do rGO influencia a resposta elétrica do EGT. O óxido de grafeno reduzido foi selecionado como material semicondutor do EGT e como camada funcional para a ancoragem covalente dos receptores de DNA. O biossensor apresentado foi capaz de discriminar sequências perfeitamente complementares (miR-34a) de sequências com mismatch (miR-34b e miR-34c) em nível de concentração attomolar. Entre os principais indicadores de desempenho destacam-se a ampla faixa dinâmica ($0,1$ a 1000 amol L^{-1}), as baixas tensões de operação ($< 0,5 \text{ V}$) e um limite de detecção excepcionalmente baixo ($0,098 \text{ amol L}^{-1}$), comparável aos ensaios analíticos tradicionais e aos poucos biossensores PoC reportados para esse fim. O uso de aprendizado de máquina (ML) para a análise multidimensional e avançada dos sinais permitiu (i) eliminar escolhas arbitrárias do sinal do sensor, (ii) obter um único descritor para todos os analitos de miRNA com discriminação completa, e (iii) fornecer insights sobre o papel do rGO na resposta do biossensor baseado em EGT. Essa estratégia e resultados apontam para um caminho promissor rumo a diagnósticos moleculares PoC de nova geração, possibilitando a detecção precisa e ultrasensível de miRNAs.

7. OUTRAS ATIVIDADES RELACIONADAS

A discente é estudante regular do curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais pela UNESP (POSMAT). No período a que esse texto se refere (17 meses de atividades), a aluna cursou e foi aprovada em 4 disciplinas: Ciência dos Materiais (18 créditos – Obrigatória), Materiais na Sociedade (6 créditos – Obrigatória), Eletroquímica de Materiais (12 créditos – Optativa) e Dupla camada elétrica e aplicações (6 créditos – Optativa). Além das disciplinas, realizou o exame de proficiência na língua inglesa, tendo sido considerada

aprovada. A discente apresentou trabalhos na modalidade pôster no B-MRS Meeting 2024, 21st Brazilian Workshop on Semiconductor Physics (BWSP-2024), Congresso de Estudantes do CNPEM 2024, no qual foi premiada pela melhor apresentação pôster na modalidade Mestrado, e no E-MRS Meeting 2025. Além disso, participou como avaliadora de pôsteres no Congresso de Física Aplicada à Medicina UNESP 2024 e realizou uma apresentação oral na Escola FAPESP São Paulo de Ciência Avançada em Saúde de Precisão 2025. Além disso, a discente foi co-autora do review “*Chemical Sensors and Biosensors for Point-of-Care Testing of Pets: Opportunities for Individualized Diagnostics of Companion Animals*” publicado na ACS Sensors em 2025 e autora principal do artigo “*Ultrasensitive MicroRNA Detection Combining Reduced Graphene Oxide Electrolyte-Gated Transistors and Machine Learning*” publicado no periódico Small (Wiley) em 2026.

REFERÊNCIAS

- AMBROS, Victor *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, v. 9, n. 3, p. 277–279, mar. 2003.
- ANDOLINA, Diego *et al.* Effects of lack of microRNA-34 on the neural circuitry underlying the stress response and anxiety. *Neuropharmacology*, v. 107, p. 305–316, ago. 2016.
- ANDOLINA, Diego; SEGNI MATTEO, Di; VENTURA, Rossella. MiRNA-34 and stress response. *Oncotarget*, v. 8, n. 4, p. 5658–5659, jan. 2017.
- BAHADIR, Elif Burcu; SEZGINTÜRK, Mustafa Kemal. Electrochemical biosensors for hormone analyses. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 68, p. 62–71, jun. 2015.
- BRISEBOIS, P. P.; SIAJ, M. Harvesting graphene oxide-years 1859 to 2019: A review of its structure, synthesis, properties and exfoliation. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 8, n. 5, p. 1517–1547, 2020.
- CAI, Minzhen *et al.* Methods of graphite exfoliation. *Journal of Materials Chemistry*, v. 22, n. 48, p. 24992–25002, dez. 2012.
- CAMPOS, Rui *et al.* Attomolar Label-Free Detection of DNA Hybridization with Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors. *ACS Sensors*, v. 4, n. 2, p. 286–293, 22 fev. 2019.
- CHUNG, Saeromi *et al.* Magnetic force assisted electrochemical sensor for the detection of thrombin with aptamer-antibody sandwich formation. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 117, p. 480–486, out. 2018.
- CITO, F. *et al.* Prioritization of Companion Animal Transmissible Diseases for Policy Intervention in Europe. *Journal of Comparative Pathology*, v. 155, n. 1, p. S18–S26, jul. 2016.
- DE LIMA, Alessandro Henrique *et al.* Oxidative debris in graphene oxide: a decade of research. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 11, n. 37, p. 12429–12452, 2023.
- DE OLIVEIRA, Rafael Furlan *et al.* Water-gated phthalocyanine transistors: Operation and transduction of the peptide-enzyme interaction. *Organic Electronics*, v. 31, p. 217–226, abr. 2016.
- DIMIEV, Ayrat M.; EIGLER, Siegfried. *Graphene oxide: fundamentals and applications*. Chichester: Wiley, 2016.
- DINCER, Can *et al.* Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. *Advanced Materials*, v. 31, n. 30, jul. 2019.
- DU, Haiwei; LIN, Xi; XU, Zhemi. Electric double-layer transistors: a review of recent progress. *Journal of Materials Science*, v. 50, n. 17, p. 5641–5673, set. 2015.
- EKIZ KANIK, Fulya *et al.* Attomolar sensitivity microRNA detection using real-time digital microarrays. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 16220, 28 set. 2022.
- FARIA, Andréia F. *et al.* Unveiling the Role of Oxidation Debris on the Surface Chemistry of Graphene through the Anchoring of Ag Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, v. 24, n. 21, p. 4080–4087, nov. 2012.
- FDA-NIH BIOMARKER WORKING GROUP AND OTHERS. BEST (biomarkers, EndpointS, and other tools) resource. 2016.

- FERRARI, Andrea C. *et al.* Science and technology roadmap for graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems. *Nanoscale*, v. 7, n. 11, p. 4598–4810, mar. 2015.
- FONSECA GUERRA, Célia *et al.* Hydrogen Bonding in DNA Base Pairs: Reconciliation of Theory and Experiment. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 17, p. 4117–4128, 1 maio 2000.
- FONSECA, Wilson Tiago *et al.* Chemical Sensors and Biosensors for Point-of-Care Testing of Pets: Opportunities for Individualized Diagnostics of Companion Animals. *ACS Sensors*, abr. 2025a.
- FONSECA, Wilson Tiago *et al.* Chemical Sensors and Biosensors for Point-of-Care Testing of Pets: Opportunities for Individualized Diagnostics of Companion Animals. *ACS Sensors*, v. 10, n. 5, p. 3222–3238, 23 maio 2025b.
- FRANSSILA, Sami. *Introduction to Microfabrication*. Chichester: Wiley, 2004.
- FURLAN DE OLIVEIRA, Rafael *et al.* Liquid-Gated Transistors Based on Reduced Graphene Oxide for Flexible and Wearable Electronics. *set.* 2019.
- FURLAN DE OLIVEIRA, Rafael *et al.* Selective Ion Sensing in Artificial Sweat Using Low-Cost Reduced Graphene Oxide Liquid-Gated Plastic Transistors. *Small*, v. 18, n. 27, jul. 2022.
- GALIBERT, Francis *et al.* Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Comptes Rendus - Biologies*, v. 334, n. 3, p. 190–196, 2011.
- GEORGAKILAS, Vasilios *et al.* Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. *Chemical Reviews*, v. 112, n. 11, p. 6156–6214, nov. 2012.
- GUBALA, Vladimir *et al.* Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 2, p. 487–515, 17 jan. 2012.
- HA, Minju; KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 509–524, ago. 2014.
- HIERLEMANN, A. *et al.* Microfabrication techniques for chemical/biosensors. *Proceedings of the IEEE*, v. 91, n. 6, p. 839–863, jun. 2003.
- HUANG, Qiuyan; WANG, Kun; WANG, Yuan. Highly sensitive miRNA-21 detection with enzyme-free cascade amplification biosensor. *Talanta*, v. 273, p. 125928, jun. 2024.
- KAKKAR, Saloni *et al.* Lateral flow assays: Progress and evolution of recent trends in point-of-care applications. *Materials Today Bio*, v. 28, p. 101188–101188, out. 2024.
- KAMANU, Timothy K. K. *et al.* Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Scientific Reports*, v. 3, n. 1, p. 2940, 15 out. 2013.
- KESLER, Vladimir; MURMANN, Boris; SOH, H. Tom. Going beyond the Debye Length: Overcoming Charge Screening Limitations in Next-Generation Bioelectronic Sensors. *ACS Nano*, v. 14, n. 12, p. 16194–16201, 22 dez. 2020.
- KIM, Jae-Jun *et al.* CRISPR/Cas13a-assisted amplification-free miRNA biosensor *via* dark-field imaging and magnetic gold nanoparticles. *Sensors & Diagnostics*, v. 3, n. 8, p. 1310–1318, 2024.

- KONG, Dezhaoh *et al.* Logarithmic Data Processing Can Be Used Justifiably in the Plotting of a Calibration Curve. *Analytical Chemistry*, v. 93, n. 36, p. 12156–12161, 14 set. 2021.
- LAND, Kevin J. *et al.* REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nature Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 46–54, dez. 2018.
- LAVIN-LOPEZ, M. P. *et al.* Influence of the reduction strategy in the synthesis of reduced graphene oxide. *Advanced Powder Technology*, v. 28, n. 12, p. 3195–3203, dez. 2017.
- LELIS, Gabrielle Coelho *et al.* Harnessing Small-Molecule Analyte Detection in Complex Media: Combining Molecularly Imprinted Polymers, Electrolytic Transistors, and Machine Learning. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 17, n. 9, p. 12990–13000, mar. 2025a.
- LELIS, Gabrielle Coelho *et al.* Harnessing Small-Molecule Analyte Detection in Complex Media: Combining Molecularly Imprinted Polymers, Electrolytic Transistors, and Machine Learning. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 17, n. 9, p. 12990–13000, 5 mar. 2025b.
- LIANG, Dong *et al.* Magnetic covalent organic framework nanospheres-based miRNA biosensor for sensitive glioma detection. *Bioactive Materials*, v. 14, p. 145–151, ago. 2022.
- LIU, Ning; CHEN, Ru; WAN, Qing. Recent Advances in Electric-Double-Layer Transistors for Bio-Chemical Sensing Applications. *Sensors*, v. 19, n. 15, p. 3425–3425, ago. 2019.
- LOPEZ, Anand; LIU, Juewen. Covalent and Noncovalent Functionalization of Graphene Oxide with DNA for Smart Sensing. *Advanced Intelligent Systems*, v. 2, n. 11, p. 2000123, nov. 2020.
- MACK, Chris. *Fundamental principles of optical lithography*. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
- NOVOSELOV, K. S. Nobel Lecture: Graphene: Materials in the Flatland. *Reviews of Modern Physics*, v. 83, n. 3, p. 837–849, ago. 2011.
- O’HAIRE, Marguerite. Companion animals and human health: Benefits, challenges, and the road ahead. *Journal of Veterinary Behavior*, v. 5, n. 5, p. 226–234, set. 2010.
- OUYANG, Runhai *et al.* SISSO: A compressed-sensing method for identifying the best low-dimensional descriptor in an immensity of offered candidates. *Physical Review Materials*, v. 2, n. 8, p. 083802, 7 ago. 2018.
- PEI, Songfeng; CHENG, Hui Ming. The reduction of graphene oxide. *Carbon*, v. 50, n. 9, p. 3210–3228, 2012.
- PONGRÁCZ, Péter; DOBOS, Petra. What is a companion animal? An ethological approach based on Tinbergen’s four questions. Critical review. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 267, out. 2023.
- POTHIPOR, Chammari *et al.* An electrochemical biosensor for simultaneous detection of breast cancer clinically related microRNAs based on a gold nanoparticles/graphene quantum dots/graphene oxide film. *The Analyst*, v. 146, n. 12, p. 4000–4009, 2021.
- RAY, Sekhar C. Application and Uses of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. *In: Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials*. Norwich: Elsevier, 2015. p. 39–55.
- REINER-ROZMAN, Ciril *et al.* Graphene-based liquid-gated field effect transistor for biosensing: Theory and experiments. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 70, p. 21–27, ago. 2015.

SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. *Analytical Biochemistry*, v. 218, n. 1, p. 87–91, abr. 1994.

SELMÍ, Guilherme Segolin *et al.* Pulse Dynamics in Reduced Graphene Oxide Electrolyte-Gated Transistors: Charge Memory Effects and Mechanisms Governing the Ion-To-Electron Transduction. *Advanced Electronic Materials*, v. 11, n. 8, p. 2400791, jun. 2025.

SELVARAJ, Meenu *et al.* Label free detection of miRNA-21 with electrolyte gated organic field effect transistors (EGOFETs). *Biosensors and Bioelectronics*, v. 182, p. 113144, jun. 2021.

VANEGAS-FARFANO, Minerva; GONZÁLEZ-RAMÍREZ, Mónica Teresa. Behaviors Indicative of Attachment with Pets Scale: An adaptation of the attachment during stress scale for companion animals. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, v. 15, p. 12–19, set. 2016.

WANG, Xuefeng *et al.* Catalytic hairpin assembly-assisted CRISPR/Cas12a mediated photoelectrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA-122. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 370, p. 132480, nov. 2022.

WANG, Xueqi. Bioreceptors as the key components for electrochemical biosensing in medicine. *Cell Reports Physical Science*, v. 5, n. 2, p. 101801, fev. 2024.

XU, Shicai *et al.* Ultrasensitive label-free detection of DNA hybridization by sapphire-based graphene field-effect transistor biosensor. *Applied Surface Science*, v. 427, p. 1114–1119, jan. 2018.

ZHENG, Zhi *et al.* Overcome Debye Length Limitations for Biomolecule Sensing Based on Field Effective Transistors[†]. *Chinese Journal of Chemistry*, v. 39, n. 4, p. 999–1008, abr. 2021.