



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Heitor Furlan Trevizan

Desenvolvimento de um Sensor Quimiocapacitor Baseado em Polímeros
Redox Molecularmente Impressos para Detecção e Quantificação de
Albumina Sérica Humana

São José do Rio Preto

2023

Heitor Furlan Trevizan

Desenvolvimento de um Sensor Quimicapacitor Baseado em Polímeros
Redox Molecularmente Impressos para Detecção e Quantificação de
Albumina Sérica Humana

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza
Teixeira

Coorientador: Prof^a. Dr^a.Patricia Monteiro
Seraphim

São José do Rio Preto

2023

T814d	<p>Trevizan, Helton Furlan</p> <p>Desenvolvimento de um Sensor Quimio-capacitor Baseado em Polímeros Redox Molecularmente Impressos para Detecção e Quantificação de Albumina Sérica Humana / Helton Furlan Trevizan. – São José do Rio Preto, 2023</p> <p>105 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientadora: Marcos Fernando de Souza Teixeira</p> <p>Coorientadora: Patrícia Monteiro Seraphim</p> <p>1. Eletroquímica. 2. Química Analítica. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(s).

Essa ficha não pode ser modificada.

Heitor Furlan Trevizan

Desenvolvimento de um Sensor Quimiocapacitor Baseado em
Polímeros Redox Molecularmente Impressos para Detecção e
Quantificação de Albumina Sérica Humana

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Orientador

Prof^ª. Dr^ª. Elen Julciléia Romão Sartori

UEL- Londrina

Prof. Dr. Celso Xavier Cardoso

UNESP – Câmpus de Presidente Prudente

São José do Rio Preto
25 de janeiro de 2023

Dedico esse trabalho minha família,
em especial minha avó
E a todos meus amigos

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus primeiramente e a minha família, especialmente a minha mãe, ao meu pai e a minha avó que me ajudaram desde a graduação até a pós-graduação.

Gostaria de agradecer aos meus irmãos que sempre me apoiaram quando escolhi cursar o mestrado.

Gostaria de agradecer ao Grupo de Pesquisa em Eletroanalítica e Sensores (GPES) pelo acolhimento e ensinamento. Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira a todos esses anos me incentivando e me auxiliando no laboratório de pesquisa.

Gostaria de agradecer a Prof. Dr. Patrícia Monteiro Seraphim pela coorientação e disponibilidade em sempre auxiliar no trabalho.

Gostaria de agradecer ao meu colega de laboratório André Olean que me auxiliou nesses anos todos, desde a minha IC até a pós-graduação.

Queria agradecer a todos meus colegas de laboratório e de departamento (Taina, Miqueias, Amanda, Natália, Jaqueline, Pedro, Gabriel Zaia, Gabriel Masieiro, Camila, Vinicius, Angélica, Paulo) pelos cafés tomados em todos esses anos e por todas as conversas que tivemos.

Queria agradecer ao meu namorado Henrique por todo companheirismo e otimismo nesses anos juntos.

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

RESUMO

A albumina sérica humana (ASH) é uma proteína globular encontrada em maior concentração no plasma sanguíneo. Valores subnormais de albumina no organismo podem indicar distúrbios metabólicos, como desnutrição, biomarcador de câncer e de doença cardiovascular, renal e hepática. Os polímeros molecularmente impressos (PMI) apresentam diversas vantagens para uma plataforma eletroquímica no sensoriamento de biomoléculas como baixo custo, seletividade e simplicidade. Por esse motivo, foi desenvolvido e caracterizado um sensor impedimétrico/ capacitivo baseado em polímero molecularmente impresso, utilizando o Bismarck Brown Y como monômero redox para detecção e quantificação de albumina sérica. O filme PMI foi eletrodepositado na superfície do eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor por eletropolimerização do monômero Bismarck Brown Y na presença de albumina como molécula molde. A morfologia dos filmes formado foi analisada por microscopia eletrônica de varredura, revelando filmes homogêneos com pequenos aglomerados. A caracterização eletroquímica da plataforma sensorial foi realizada por técnica de espectroscopia de impedância/ capacitância eletroquímica (EIE), onde foram investigados os fenômenos interfaciais. Através de EIE e ECE foi verificado um aumento do valor de resistência de transferência de carga do sistema ($\Delta R = 76,8 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$) e uma diminuição da capacitância redox em $0,90 \mu\text{F cm}^{-2}$ quando testado na presença de albumina. Foi realizada a otimização de parâmetros como velocidade de varredura, número de ciclos e pH na etapa de eletropolimerização. O sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) respondeu a uma faixa linear de concentração de $0,25 - 1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ com limite detecção de $0,24 \text{ ng mL}^{-1}$ para capacitância real e $0,22 \text{ ng mL}^{-1}$ capacitância imaginária em pH 7,3. A reprodutibilidade foi estudada usando sete sensores PMI-poli(azo-Bismarck Y) preparados independentemente para a detecção de albumina ($0,5 \text{ ng mL}^{-1}$). Como resultado, o desvio padrão relativo (DPR) da resposta de impedância/capacitância foi de 8,98%. Portanto, os sensores exibem boa reprodutibilidade. Após 14 dias, o DPR do sensor foi de 9,81%, indicando excelente estabilidade. O desempenho de reconhecimento seletivo do sensor foi investigado com espécies concomitantes que possivelmente atuam como interferentes no fluido biológico. O sensor MIP apresentou alta seletividade para adsorção de ASH em comparação com outras proteínas e aminoácidos.

Palavras-chave: Albumina Sérica Humana. Polímero Molecularmente Impresso. Molde Molecular. Espectroscopia Impedância/ Capacitância Eletroquímica.

ABSTRACT

The human serum albumin (HSA) is a globular protein found in highest concentration in blood plasma. Subnormal values of albumin in the body can indicate metabolic disorders, such as malnutrition, a biomarker of cancer and cardiovascular, renal and hepatic diseases. Molecularly imprinted polymers (MIP) have several advantages for an electrochemical platform for sensing biomolecules such as low cost, selectivity and simplicity. For this reason, develop and characterize an impedimetric/capacitive sensor based on molecularly imprinted polymers, using Bismarck Brown Y as a redox monomer for detection and quantification of serum albumin. The PMI film was electrodeposited on the surface of the fluorine-doped tin oxide electrode by electropolymerization of Bismarck Brown Y monomer in the presence of albumin as a template molecule. The morphology of the formed films was analyzed by scanning electron microscopy, revealing homogeneous films with small clusters. The electrochemical characterization of the sensory platform was performed by electrochemical impedance/capacitance (EIE) spectroscopy technique, where the interfacial phenomena were investigated. Through EIE and ECE, an increase in the load transfer resistance value of the system ($\Delta R = 76.8 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$) and a decrease in redox capacitance by $0.90 \text{ }\mu\text{F cm}^{-2}$ when in the presence of albumin was verified. The optimization of parameters such as scan rate, number of cycles and pH was performed in the electropolymerization step of the molecularly printed film. The PMI-poly(azoBBY)-ASH sensor responded to a linear concentration range of $0.50 - 1.5 \text{ ng mL}^{-1}$ with detection limit of 0.26 ng mL^{-1} for true capacitance and 0.24 ng mL^{-1} imaginary capacitance at pH 7.3. Reproducibility was studied using seven independently prepared poly(azo-BBY)-MIP sensors for the detection of albumin (0.5 ng mL^{-1}). As a result, the RSD relative standard deviation of the impedance/capacitance response was less than 8,98%. Therefore, poly(azo-BBY)-MIP sensors exhibit good reproducibility. After 14 days, the RSD of the poly(azo-BBY)-MIP sensor was 9.81%, indicating excellent stability. The selective recognition performance of the sensor was investigated with concomitant species that possibly act as interferents in biological fluid. The MIP sensor showed high selectivity for ASH adsorption compared to other proteins and aminoacids.

Keywords: Human Serum Albumin. Molecularly Imprinted Polymer. Molecular Template. Electrode.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação da estrutura tridimensional da ASH e sua fração da sequência de aminoácidos. Os códigos de aminoácidos da ASH são representados por uma única letra, incluindo os resíduos de cisteína (C-vermelho).----- 19
- Figura 2.** Esquema da relação da Albumina Sérica Humana com diferentes doenças e distúrbios metabólicos quando encontrada em baixas concentrações. -----20
- Figura 3.** Representação esquemática do processo de síntese do polímero com impressão molecular (A) e do polímero não impresso (B). -----24
- Figura 4.** Estrutura molecular do azo corante Bismark Brown Y. -----27
- Figura 5.** Ciclo de eletropolimerização para formação do polímero molecularmente impresso (A) e do polímero não impresso (B). Magnificação do voltamograma cíclico de eletrodeposição destacando o primeiro (curva vermelha) e vigésimo (curva azul) ciclo de potencial aplicado para a formação do PMI (C) e do PNI (D). -----38
- Figura 6.** Representação esquemática do mecanismo de eletropolimerização do complexo poli(azo-Bismarck Y)-ASH em meio ácido. -----40
- Figura 7.** Voltamograma cíclico do eletrodo de FTO, PNI-poli(azo Bismarck Y) e PNI-poli(azo Bismarck Y) E m solução TF 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,3) v = 50 mV s⁻¹ saturada com N₂. -----41
- Figura 8.** Gráficos de impedância complexa (Z' vs. Z'') para o PNI-poli(azo-Bismarck Y) (quadrado azul), PMI-poli(azo-Bismarck Y) (triângulo verde) e FTO (círculo rosa) em 0,10 mol L⁻¹ solução TF (pH 7,3) no potencial aplicado de +0,05 V (vs ECS). Inset: magnificação dos espectros de Nyquist.-----43
- Figura 9.** Modelo de circuito equivalente para o ajuste matemático do espectro de Nyquist dos filmes de (A) FTO, (B) PMI-poli(azo-Bismarck Y) e (C) PNI-poli(azo-Bismarck Y) em potencial aplicado de +0,05 V (vs. ECS). -----45
- Figura 10.** Espectros de Nyquist em +0,05 V (vs ECS) para dispositivos PMI-poli(azo-Bismarck Y) (A) e PNI-poli(azo-Bismarck Y) (B) na presença (círculo vermelho) e ausência (círculo preto) de 0,5 ng mL⁻¹ de ASH em 0,10 mol L⁻¹ solução TF (pH 7,3). As linhas mostram o ajuste obtido por modelos de circuito de impedância na Figura 9. Inset: magnificação dos espectros de Nyquist. -----47
- Figura 11.** Diagrama capacitivo de Nyquist, registrados para os eletrodos de PMI-poli(azo Bismarck Y) (A) e PNI-poli(azo Bismarck Y) (B) em solução TF 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,3). Potencial fixo de 0,05 V vs ECS na ausência e na presença de ASH. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. -----50
- Figura 12.** Representação dos centros redox e da dupla camada elétrica formada no filme de poli(azo-Bismarck Y) para o eletrodo de PMI indicando a formação das cavidades/ sítio de ligação e de PNI sem impressão molecular. -----51
- Figura 13.** Os diagramas de Bode para capacitância complexa nas componentes real do filme PMI (A) e PNI (B) e imaginária do filme PMI (C) e PNI (D) em função da frequência em solução TF 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,3) na ausência e na presença de Albumina Sérica Humana (ASH) em atmosfera de N₂. Potencial fixo de 0,05 V vs ECS. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. O destaque em verde mostra a variação da capacitância em baixa frequências.-----52
- Figura 14.** Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferentes velocidades de varredura em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) com potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS. Atmosfera de N₂. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. -----57
- Figura 15.** Dependência da resistência de transferência de carga em potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS (eixo Y esquerdo - preta) e concentração de espécies ativas (eixo Y direito

- vermelha) em função da velocidade de varredura na formação do filme PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH.-----	59
Figura 16. Espectros de impedância do plano complexo de Nyquist registrados para os eletrodos de FTO/PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,3) formados com 10 ciclos de potenciais em velocidades de 10 (A), 20 (B), 30 (C), 40 (D), 60 (E) e 100 mV s ⁻¹ (F). Potencial fixo de 0,05 V vs ECS na ausência e na presença de 0,5ng mL ⁻¹ de ASH em atmosfera de N ₂ . Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.-----	61
Figura 17. Dependência da Rfilme (eixo Y esquerdo - preto) e da R _{cav} (eixo Y direito – vermelho) em potencial aplicado de 0,05 (V vs ECS) em função da velocidade de varredura na formação do filme molecularmente impresso de poli(azo-Bismarck Y)-ASH. -----	64
Figura 18. Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferente número de ciclos de potenciais aplicado em solução TF 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 7,3) com potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS. Atmosfera de N ₂ . Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. Inset: magnificação dos espectros de Nyquist. -----	66
Figura 19. Espectros de impedância do plano complexo de Nyquist registrados para os eletrodos de FTO/PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,3), filmes formados em 10 (A), 20 (B), 30 (C), 40 (D) e 50(E) ciclos. Potencial fixo de 0,05 V vs ECS na ausência e na presença de 0,5ng mL ⁻¹ de ASH em atmosfera e N ₂ . Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. -----	68
Figura 20. Dependência da Rfilme (eixo Y esquerdo - preto) e da R _{cav} (eixo Y direito – vermelho) em potencial aplicado de 0,05 (V vs ECS) em função do número de ciclos de potenciais aplicado na eletropolimerização do filme molecularmente impresso de poli(azo-Bismarck Y)-ASH.-----	71
Figura 21. Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferentes pH e testados em solução TF 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 7,3) com potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS. Atmosfera de N ₂ . Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. Inset: magnificação dos espectros de Nyquist. -----	73
Figura 22. Dependência da resistência de transferência de carga (Rfilme) em potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS (eixo Y esquerdo - preta) e concentração de espécies ativas (eixo Y direito - vermelha) em função do pH na formação do filme PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH.-----	75
Figura 23. Espectros de impedância do plano complexo de Nyquist registrados para os eletrodos de FTO/PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,3), filmes formados em diferentes pH 2,0 (A); 3,0 (B); 4,0 (C); 5,0 (D); 7,0(E) e 9,0(F). Potencial fixo de 0,05 V vs ECS na ausência e na presença de 0,5ng mL ⁻¹ de ASH em atmosfera e N ₂ . Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.-----	76
Figura 24. Dependência da Rfilme (eixo Y esquerdo - preto) e da R _{cav} (eixo Y direito – vermelho) em potencial aplicado de 0,05 (V vs ECS) do pH na solução de eletropolimerização do filme molecularmente impresso de poli(azo-Bismarck Y)-ASH. ---	79
Figura 25. Espectros de Nyquist da resposta eletroquímica do filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF 0,10 mol L ⁻¹ (N ₂) em um intervalo de potencial aplicado de - 0,05 V to +0,45 V vs. ECS.....	81
Figura 26. Valores de R _{filme} do eletrodo de PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH em função do potencial aplicado em solução aquosa de TF 0,10 mol L ⁻¹	82
Figura 27. Gráfico da dependência do ΔR _{filme} (eixo Y esquerdo - preto) e da ΔR _{cav} (eixo Y direito – vermelho) em função do potencial aplicado do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução de STF 0,10 mol L ⁻¹	83
Figura 28. Gráfico da dependência da ΔC _{redox} em função do potencial aplicado do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução de STF 0,10 mol L ⁻¹	84

Figura 29. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do eletrodo de FTO sem modificação (A), dos eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) (B) e PNI-poli(azo-Bismarck Y).....	87
Figura 30. Espectros de absorção no UV-Vis para os filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e PNI-poli(azo Bismarck Y) sobre eletrodo de FTO.....	88
Figura 31. Espectros de espalhamento Raman dos filmes PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH (verde) PMI-poli(azo-Bismarck Y) (vermelho), PNI-poli(azo-Bismarck Y) (preto) e do pó de BBY(azul) Intervalo espectral de 300 a 1700 cm^{-1} . Laser de excitação 514 nm.....	90
Figura 32. Espectros da impedância de Bode para capacitância real (A) e imaginária (B) em diferentes concentrações de ASH. Curvas analíticas para diferentes concentrações de ASH obtidas em 0,10 Hz para capacitância real imaginária (C) e (D). $N=3$	93
Figura 33. Relação Linear de $[\text{ASH}] \times C_r$ versus $[\text{ASH}]$. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo poli(azo Bismarck Y)-ASH.....	95
Figura 34. Resposta relativa (S_i/S_{ASH}) do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em função de diferentes analitos. As medidas foram conduzidas em solução TF (pH=7,3) em meio desareado.....	96

Lista de Tabela

Tabela 1. Descrição/características dos reagentes.....	31
Tabela 2. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist do eletrodo de FTO sem modificação, eletrodo modificado de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e de PNI-poli(azo-Bismarck Y) baseados nos modelos da Figura 9. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.....	45
Tabela 3. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist do eletrodo modificado de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e de PNI-poli(azo-Bismarck Y) na ausência e na presença de ASH. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.....	48
Tabela 4. Parâmetros obtidos através dos espectros de capacitivos de Nyquist e Bode para o eletrodo modificado de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e de PNI-poli(azo-Bismarck Y) na ausência e na presença de ASH. Frequência de 0,1 Hz para os valores de C' e C''.....	54
Tabela 5. Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo impedimétrico em solução aquosa de solução TF 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 7,3) para os diferentes filmes sintetizados com 20 ciclos de potenciais em diferentes velocidades de varredura aplicadas.	58
Tabela 6. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes velocidades de varredura baseados nos modelos da Figura 9B. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.....	63
Tabela 7. Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo impedimétrico em solução aquosa de solução TF 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 7,3) para os filmes sintetizados em 20 mV ⁻¹ aplicando diferentes ciclos de potenciais.	67
Tabela 8. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes números de ciclos baseados no modelo de circuito equivalente proposto na Figura 9B. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.....	70
Tabela 9. Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo impedimétrico em solução aquosa de solução TF 0,10 mol L ⁻¹ (pH = 7,3) para os filmes sintetizados em 20 mV ⁻¹ aplicando diferentes ciclos de potenciais.	74
Tabela 10. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes pH baseados nos modelos da Figura 9B. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.	78
Tabela 11. Parâmetros analíticos de diferentes plataformas sensoriais para albumina sérica humana.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASH- Albumina Sérica Humana

BBY- Bismarck Brown Y

DPR- Desvio Padrão Relativo

EIE- Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

ECE- Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica

FCT- Faculdade de Ciências e Tecnologia

PMI- Polímero Molecularmente Impresso

PNI- Polímero Não Impresso

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

TF- Tampão Fosfato

VC Voltametria cíclica

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Albumina Sérica Humana.....	18
2.2	Polímero Molecularmente Impresso.....	22
2.3	Azopolímero.....	26
2.4	Sensores Impedimétricos.....	28
3.	OBJETIVOS.....	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1.	Reagentes	31
4.1.1.	Reagentes utilizados durante os estudos de formação do filme e desenvolvimento do sensor molecularmente impresso	31
4.2.	Soluções	32
4.2.1	Limpeza dos eletrodos	32
4.2.2.	Solução de Eletropolimerização do Filme Molecularmente Impresso de poli(azoBismarck Y)	32
4.2.3.	Solução Tampão Fosfato.	32
4.2.4	Solução Padrão de Albumina Sérica Humana.....	33
4.3.	Caracterização Morfológica	33
4.3.1.	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
4.3.2.	Caracterização por Espectroscopia de Ultravioleta na Região do Visível.....	33
4.3.3.	Caracterização por Espectroscopia de Raman.....	34
4.4.	Medidas Eletroquímica.....	34
4.4.1.	Construção do Polímero Molecularmente Impresso a partir do monômero de Bismarck Brown Y.....	34
4.4.2	Estudo eletroquímico do eletrodo modificado	35
4.4.3.	Voltametria Cíclica	35

4.4.4. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	35
4.4.5 Construção da Curva Analítica	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Eletrossíntese do Filme Polimérico Molecularmente Impresso e Caracterização por Voltametria Cíclica	37
5.2. Caracterização dos Eletrodos Modificados por Espectroscopia de Impedância/ Capacitância Eletroquímica.....	43
5.3. Otimização do Filme Polimérico Molecularmente Impresso	56
5.3.1. Efeito da Velocidade de Varredura na Construção do Filme de poli(azo-Bismarck Y) Frente ao Molde de Albumina Sérica Humana.....	56
5.3.2. Efeito da Número de Ciclos na Construção do Filme de poli(azo-Bismarck Y) Frente ao Molde de Albumina Sérica Humana	65
5.3.3 Efeito do Potencial Hidrogeniônico (pH) na Construção do Filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) Frente ao Molde de Albumina Sérica Humana	72
5.3.4. Influência do Potencial Aplicado.....	80
5.4. Caracterização Espectroscópica e Morfológica	86
5.4.1. Caracterização Morfológica por Microscopia de Eletrônica de Varredura.....	86
5.4.2. Caracterização por Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	88
5.4.3. Caracterização por Espectroscopia de Espalhamento Raman.....	89
5.5. Estudos dos parâmetros em solução aquosa.....	92
5.5.1. Curva Analítica.....	94
5.5.2. Afinidade de ligação entre Albumina Sérica Humana e cavidade.....	95
5.5.3. Estudo de Interferentes.....	96
5.5.4. Estudo de Reprodutibilidade e Estabilidade.....	98
6. CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

A análise de biomarcadores de origem proteica tem desempenhado um papel indispensável na determinação de várias doenças por décadas (JIN et al., 2010; KIM et al., 2021). A Albumina se destaca como um biomarcador promissor, uma vez que encontrada no organismo humano em concentrações subnormais indicam distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares, desnutrição, carcinoma renal e infecção viral como o SARS-CoV-2 e vírus da imunodeficiência humana (HIV).

A Albumina Sérica Humana (ASH) é uma proteína globular sintetizada no fígado pelos hepatócitos, sendo a proteína solúvel mais abundante no sistema circulatório, exercendo importantes funções biológicas, químicas e farmacocinéticas. Nesse sentido, a albumina tem como função primordial o transporte de nutrientes, hormônios, vitaminas, aminoácidos, sais minerais e fármacos para as células e os tecidos através da corrente sanguínea. Portanto, para o monitoramento de distúrbios metabólicos se utiliza um biomarcador de proteína chave que requer sua determinação para um tratamento clínico ideal: albumina sérica humana.

Nesse sentido, a tecnologia de impressão molecular vem atraindo muita atenção na determinação de biomarcadores, uma vez que, permite a construção de sensores com cavidades e sítios de ligação específicos para molécula de interesse, conferindo características como seletividade e robustez a plataforma sensorial. Desta forma, os PMI são polímeros sintéticos que podem mimetizar receptores biológicos, resultando em sua especificidade, sensibilidade e reconhecimento molecular da molécula de interesse, denominada molde molecular.

Atualmente, métodos analíticos como a quimioluminescência (SUN et al., 2014), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BOIERO et al., 2015), eletroforese capilar (CE) (DUAN et al., 2016), e ensaios imunológico (SAEED et al., 2022) permanecem a abordagem principal para a detecção da ASH como biomarcador por apresentar características como sensibilidade e seletividade. No entanto se trata de métodos que requer um longo prazo e alto custo de

equipamentos e reagentes (SAEED et al., 2022). Portanto, uma plataforma de detecção com alta sensibilidade, rápida e de baixo custo para identificação de ASH é extremamente desejável.

Os sensores eletroquímicos baseados na impressão molecular têm sido amplamente utilizados para análise de diferentes analitos na área de análises clínicas. A tecnologia de sensores eletroquímicos baseados em PMI apresenta diversas vantagens, já que são uma combinação que visam a seletividade de biomoléculas, baixo custo e alta afinidade (TREVIZAN et al., 2019).

Além disso, as técnicas eletroquímicas, como a espectroscopia de impedância eletroquímica/capacitância eletroquímica vem recebendo grande atenção por ser uma plataforma sensível no desenvolvimento e caracterização de sensores eletroquímicos biomiméticos. A EIE apresenta grande utilidade em mensurar analitos em baixas concentrações, caracterizar interfaces entre solução/eletrodo e estudar cinética da superfície do eletrodo (ONUR; ERTU, 2014).

No atual grupo de pesquisa, tem sido estudado sensores impedimétricos a partir de azo polímero (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2018; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2019; TREVIZAN et al., 2019; OLEAN-OLIVEIRA; BRITO; TEIXEIRA, 2020). Recentemente, foi desenvolvido um sensor quimicapacitor baseado em um azo polímero eletropolimerizado na detecção e quantificação do ácido úrico. O grupo azo contribuiu para a capacitância redox quantificável da superfície do eletrodo, que pode ser sondada por espectroscopia de impedância/capacitância. Assim, a vantagem desses sensores baseados em azo polímero é a capacidade de realizar medições diretas sem uma sonda redox solúvel.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Albumina Sérica Humana

Nas últimas décadas o número de pessoas afetadas com distúrbios metabólicos e carcinomas tem aumentado consideravelmente (KIM et al., 2021). O câncer representa mais de 100 doenças, as quais são provocadas pelo crescimento desordenado das células, a partir de uma mutação genética, ocasionando o surgimento de tumores (RANJAN et al., 2020; SIEGEL.; MILLER.; JEMAL, 2020). As células cancerígenas são evidenciadas por anomalias no ciclo de divisão celular, tornando-as agressivas ao organismo vivo e espalhando-as em diversos tecidos e regiões do corpo. Assim, fatores como tabagismo, hereditariedade, obesidade e exposição a componentes radioativos são as principais causas dos carcinomas existentes (CHUNG et al., 2021; TAO et al., 2021).

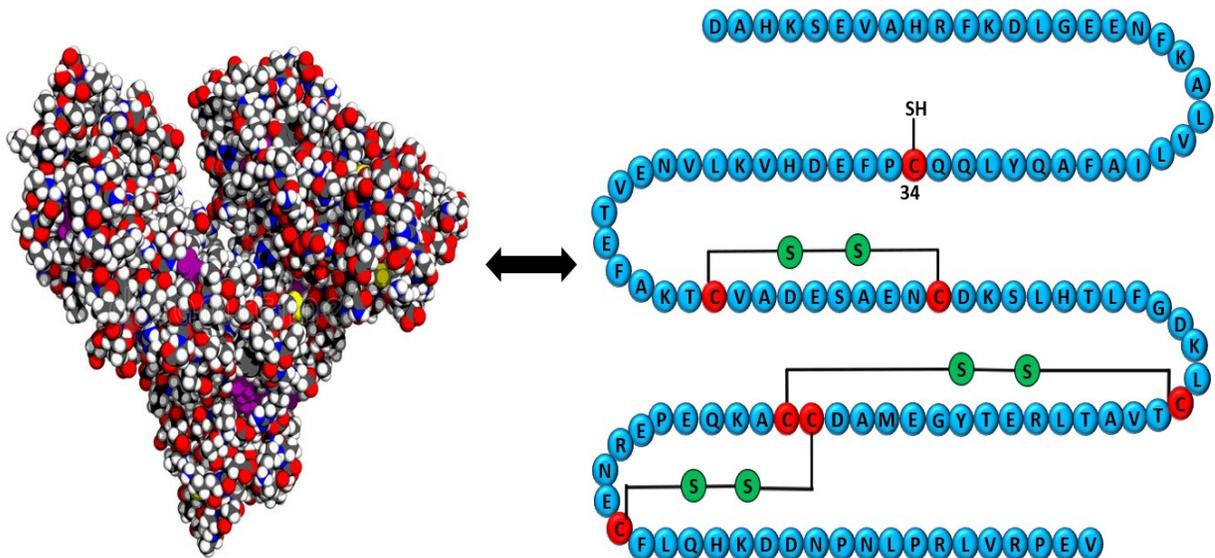
A presença destas doenças no organismo humano ocasiona alteração nas concentrações de proteínas no organismo, servindo este como um biomarcador molecular, o qual tem como função indicar a presença ou o estágio de uma patologia. Nesta perspectiva, um biomarcador é utilizado tanto para diagnosticar e monitorar a atividade patológica, quanto para avaliar tratamentos e compreender as respostas terapêuticas (RIFAI.; GILLETTE.; CARR, 2006).

Dentre os biomarcadores proteômicos presente na literatura, destaca a Albumina Sérica Humana (ASH), que em concentrações anormais em fluidos biológicos como plasma sanguíneo e urina caracteriza possíveis situações de patologia e de desnutrição. Sendo assim, a ASH é um biomarcador promissor no estudo qualitativo e quantitativo dos processos biológicos e patológicos para finalidade de monitoração da terapêutica.

A albumina é a proteína mais abundante no soro sendo sintetizada primordialmente no fígado e posteriormente secretada para corrente sanguínea, representando cerca de 60% do plasma com uma concentração entre 35 - 45 g L⁻¹ (aproximadamente 0,6 mM) (SAEED et al., 2021). Além disso, a ASH é uma proteína globular constituída por alfa-hélice e com o peso molecular de aproximadamente 66,5kDa, sendo composta por 585 aminoácidos organizados em 3 domínios

homólogos (I, II e III), o que favorece o rearranjo espacial (HE; CARTER, 1992). Ainda nisso, a albumina apresenta 35 resíduos de cisteína, sendo 34 envolvidos em pontes dissulfeto internas, estabilizando a conformação terciária da proteína, enquanto o aminoácido de cisteína na posição 34 (Cis-34) está livre e representa um sítio redox ativo (HE; CARTER, 1992) (Figura 1).

Figura 1. Representação da estrutura tridimensional da ASH e sua fração da sequência de aminoácidos. Os códigos de aminoácidos da ASH são representados por uma única letra, incluindo os resíduos de cisteína (C-vermelho).



Fonte: Adaptado (TABATA et al., 2021).

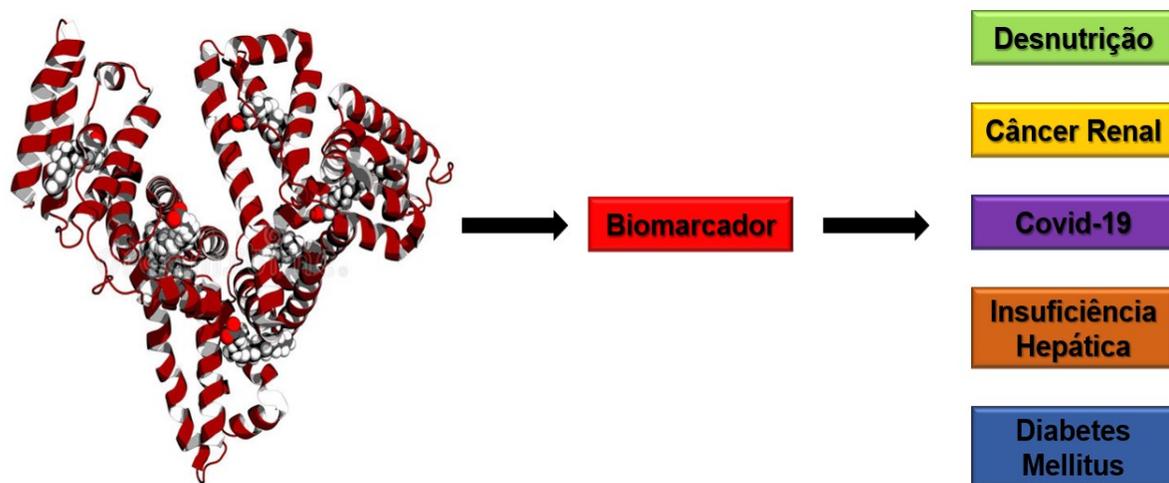
A principal função da ASH na circulação é promover a pressão osmótica coloidal, uma vez que possui um baixo peso molecular e é a proteína mais abundante no soro, contribuindo para 80% da pressão osmótica coloidal e, conseqüentemente, mantendo a homeostase celular. Outro papel fundamental da ASH no sistema circulatório é o transporte de ligantes endógenos e exógenos, como também de nutrientes para as células. Dentre os ligantes se destaca os compostos endógenos como os ácidos graxos de cadeia longa, bilirrubina, íons metálicos (zinco, cálcio, magnésio e cobre), hormônios e neurotransmissores.

Além dessas propriedades, o tiol presente na albumina é encontrado primordialmente nos aminoácidos cisteína e glutatona, o qual fornece características antioxidantes para as células, contribuindo na homeostase redox

intracelular. O tiol é um composto organossulfurado, responsável por ligações de dissulfeto, que tem como função sinalizar e regular a estrutura macromolecular das proteínas nas células, tornando a albumina uma proteína estável e de alto valor biológico. Ainda nisso, a maior concentração do tiol no plasma sanguíneo é proveniente do resíduo de Cis-34, o qual diminui o estresse oxidativo, eliminando, portanto, espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), superóxido (O_2^-) e ácido hipocloroso ($HOCl$).

Portanto, o nível sérico da albumina tem sido investigado e associado com diversas doenças. Assim, uma concentração de albumina no organismo inferior a 35g/L foi evidenciada em pacientes com desnutrição, com a síndrome do vírus imunodeficiência humana (HIV), doenças cardiovasculares, insuficiência hepáticas, carcinoma renal e diabetes mellitus, sendo um biomarcador conveniente na investigação do estado nutricional proteico.

Figura 2. Esquema da relação da Albumina Sérica Humana com diferentes doenças e distúrbios metabólicos quando encontrada em baixas concentrações.



Fonte: O autor.

Dentre os métodos comumente utilizados para detecção da albumina como biomarcador se destaca os imunoensaios, eletroforese capilar, colorimetria e fluorescência. No entanto, são métodos de alto custo, tediosos e que necessita de um técnico e equipamentos complexos para realizar as análises (AYDIN; AYDIN;

SEZGINTÜRK, 2020). Em contrapartida, os métodos eletroquímicos são altamente confiáveis, sensíveis, apresentam boa estabilidade, fácil miniaturização e baixo custo (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2020). Além disso, os métodos eletroquímicos constituem-se uma poderosa ferramenta na determinação de biomoléculas, especialmente por causa da versatilidade, portabilidade e a alta sensibilidade no monitoramento de biomarcadores (AYDIN; AYDIN; SEZGINTÜRK, 2020).

Em 2022, Saha e colaboradores desenvolveram um sensor fotoquímico eletroquímico baseado em uma sonda molecular de FRET para detecção de albumina sérica humana em células patológicas. Foi relatado o desenvolvimento de uma sonda de ativação fluorescente simples baseada em rodamina e naftalimida, o que permitia interação químicas específicas da sonda com a albumina. O mecanismo de resposta foi baseado em uma sonda redox de hexacianoferrato de potássio em função da variação da densidade de corrente. Na medida em que aumentava a concentração da albumina, havia uma redução da quantidade de sondas eletroativas difundidas na superfície do eletrodo, causando uma diminuição da resposta de corrente de pico. O sensor apresentou um limite de detecção de 1,86 μM e uma correlação de Person de 0,995.

Ainda nisso, Stankovic e colaboradores (2022), desenvolveram um imunossensor eletroquímico descartável para detecção de albumina sérica humana em fluidos biológicos. Para construção da plataforma sensorial foi utilizado o anticorpo anti-albumina humano que foi ligado covalentemente aos grupos carboxil presentes na superfície eletrodos de carbono serigrafados enriquecidos com nanopartículas de grafeno/ouro. O desempenho analítico do sensor foi investigado pela utilização de uma sonda redox de hexacianoferrato de potássio e a técnica de amperimetria de multietapa para detecção da ASH. O sensor apresentou uma faixa de trabalho linear de 2,5–500 $\mu\text{g/mL}$ e um limite de detecção de 1,55 $\mu\text{g/mL}$.

Gandhi e colaboradores (2022), relataram o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche baseado em Thionine(Th)-redox imobilizado *f*-MWCNT(*f*-carboxylic funcionalizado) + PEDOT.PSS carbono vítreo modificado/eletrodo serigrafado (GCE/*f*-WCNT+PEDOT @Th) para detecção de

albumina sérica humana na urina de gestantes. O sensoriamento eletroquímico do sensor se baseou através de uma sonda redox de hexacianoferrato de potássio e na variação de corrente de pico. Sob condições ideais de trabalho, o bioeletrodo preparado apresentou uma ampla faixa linear de 10^{-9} - 10^{-4} g/mL.

Portanto, não foram encontrados na literatura até o presente momento, trabalhos que relatam o desenvolvimento de sensores eletroquímicos no monitoramento da albumina sérica humana, sem a utilização de sonda redox e de antígenos.

2.2 Polímero Molecularmente Impresso

As interações biomoleculares, como antígeno-anticorpo, enzima-substrato e fármaco-receptor, tem sido alvo de diversos pesquisadores em razão a sua seletividade. Desde 1940, houve uma grande demanda do uso materiais sintéticos com reconhecimento molecular seletivo, visando contornar as dificuldades encontradas nos estudos de biomoléculas. Desta forma, surgiu a Tecnologia de Impressão Molecular com respaldos na teoria das enzimas de Berzelius (1835), na teoria dos receptores de Ehrlich, e na teoria de formação dos anticorpos de Pauling (1940).

Dentre todas, se destaca a teoria de Pauling, o qual se baseou na formação de anticorpos ao redor do antígeno no processo defesa do sistema imunológico. Nesse sentido, os anticorpos eram formados com o intuito de moldar o antígeno (molécula molde) a partir de uma cadeia polipeptídica, formando as cavidades e os sítios de ligação específico dos antígenos (PAULING, 1940).

Nesta perspectiva, surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (polímero) ao redor de uma molécula molde que permitisse o seu reconhecimento molecular (KUTNER, 2019; TANCHAROEN et al., 2021; PARLAPIANO et al., 2021). O interesse da tecnologia no Polímero Molecularmente Impresso cresceu rapidamente devido à possibilidade em aplicação em várias áreas científicas, incluindo o campo de sensores químicos e das técnicas de extração (KUTNER, 2019; PARLAPIANO et al., 2021). A técnica de impressão molecular é uma ferramenta promissora no desenvolvimento de sistemas biomiméticos que

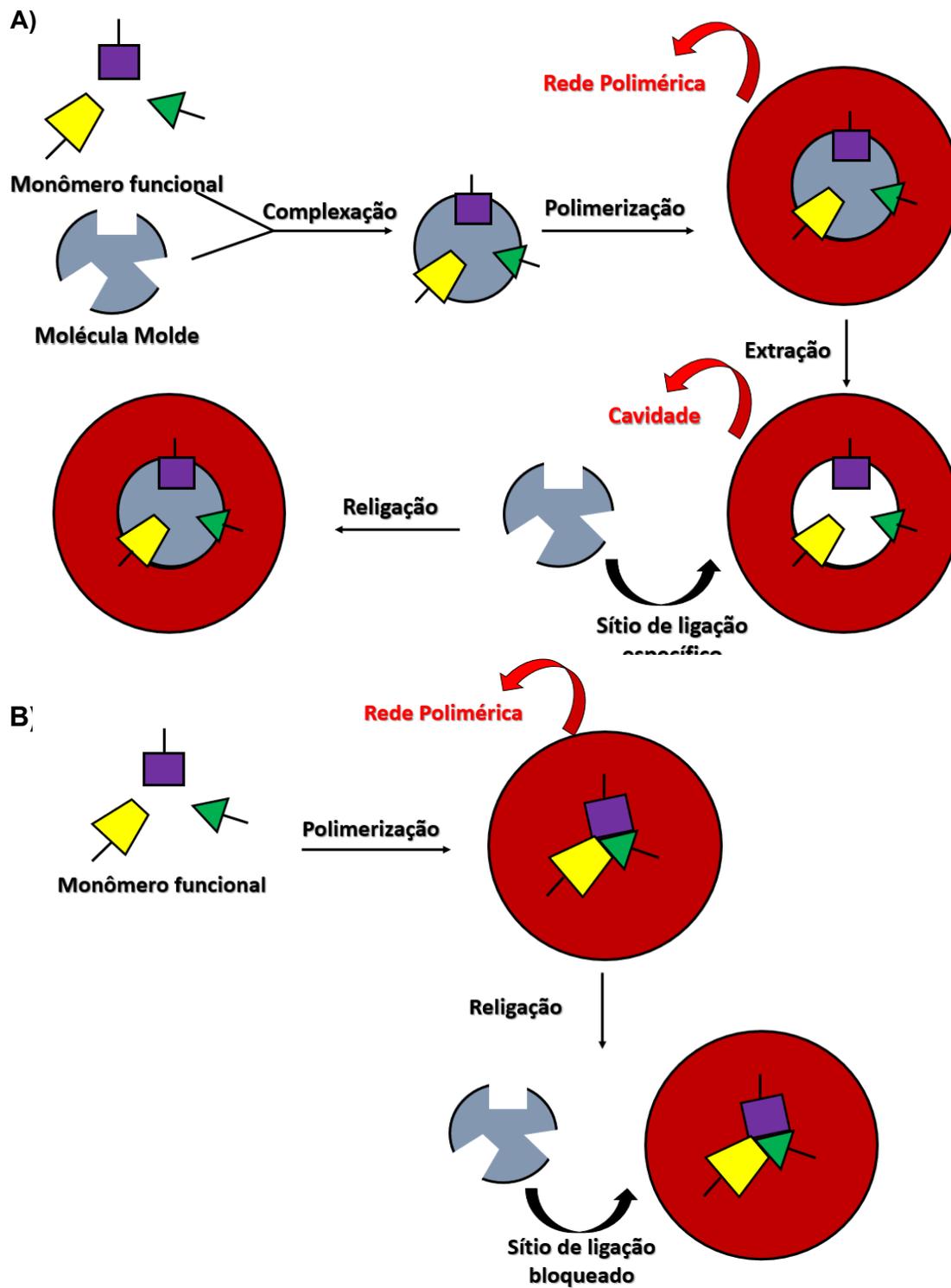
tendem a imitar a especificidade de sistemas biológicos (LI et al., 2021; ZHANG et al., 2019).

Um exemplo marcante disso, é a elaboração de plataformas sensoriais que possuem a seletividade das enzimas com seus devidos substratos e dos antígenos com os anticorpos (KHAN et al., 2019; AFZALI; MOSTAFAVI; SHAMSPUR, 2020). Esses sistemas biomiméticos apresentam vantagens como a simplicidade, baixo custo, resistividade ao pH da solução e a variação da temperatura quando comparados com os sistemas biológicos (LI et al., 2021; KHAN et al., 2019).

Os PMI são materiais sintéticos que possuem sítios de ligação e cavidades específicas, a qual permite o reconhecimento da molécula de interesse em uma solução (BARROS; CUSTODIO; RATH, 2016; AFZALI; MOSTAFAVI; SHAMSPUR, 2020). Estes materiais com impressão molecular são obtidos a partir de um monômero e de uma molécula molde, necessitando de etapas de complexação, de polimerização e de extração para formação dos PMI (Figura 2A).

A etapa de complexação e de polimerização consiste na interação intermolecular entre a molécula molde e o monômero, que a partir de um estímulo físico ou químico, tem formação do filme polimérico. A interação do monômero funcional e da molécula molde deve ser forte o suficiente para formação de um complexo estável (AFZALI; MOSTAFAVI; SHAMSPUR, 2020; DEHGHANI; NASIRIZADEH; YAZDANSHENAS, 2019). Na etapa de extração, as interações formadas entre o polímero e a molécula molde são clivadas, permitindo a retirada da molécula alvo, formando, em seguida, suas devidas cavidade e sítios de ligação para o reconhecimento molecular. A fim de comprovar a seletividade e o fator de impressão dos PMI, são utilizados como contraprova os PNI (Polímero Não Impresso). O PNI funciona como um branco, pois, na etapa de síntese ocorre na ausência da molécula molde (Figura 2B).

Figura 3. Representação esquemática do processo de síntese do polímero com impressão molecular (A) e do polímero não impresso (B).



Fonte: Adaptado (DEGHANI; NASIRIZADEH; YAZDANSHENAS, 2019).

Os grupos funcionais constituintes na estrutura molecular do monômero é essencial na determinação do tipo de interação intermolecular presente nos sítios impressos do polímero (KHAN et al., 2019). O monômero e a molécula molde devem interagir com força o suficiente para possibilitar a formação das cavidades e bem como permitir a retirada da mesma, preservando os sítios de ligação (DEHGHANI; NASIRIZADEH; YAZDANSHENAS, 2019; KHAN et al., 2019; PARLAPIANO et al., 2021). Quando se trabalha com a impressão molecular de proteínas, fatores como o alto peso molecular, complexidade conformacional, aminoácidos carregados, regiões hidrofílicas e hidrofóbicas devem ser levadas em consideração.

Nesta perspectiva, foi descrito por Baldoneschi e colaboradores (2020) o desenvolvimento de um sensor molecularmente impresso para detecção de Troponina I como um biomarcador proteômico do infarto do miocárdio. Para a construção da plataforma biomimética, a norepinefrina foi utilizada como monômero funcional baseado na técnica de autopolimerização. A escolha do monômero está diretamente relacionada com as similaridades estruturais da dopamina, que por sua vez, também é um monômero muito utilizado na impressão molecular. A diferença nas estruturas dos dois neurotransmissores é a presença do grupo hidroxila na posição benzílica da norepinefrina. Portanto, os autores buscaram investigar o comportamento de PMI de poli(dopamina) e de poli(norepinefrina) na detecção Troponina I. Foi evidenciado que o grupo hidroxila presente no poli(norepinefrina) aumentou a hidrofiliabilidade do polímero e a mobilidade da molécula molde em se religar nas cavidades. Conseqüentemente, o biosensor apresentou uma redução nas interações hidrofóbicas não específicas e uma maior seletividade para a Troponina I.

Desta forma, Moreira e colaboradores (2018) relataram a eletrossíntese de um sensor baseado na tecnologia de impressão molecular para detecção e quantificação da proteína beta-amilóide (A β), como um biomarcador da morte neuronal aplicado em paciente com Alzheimer. Para construção do sensor foi realizado a eletropolimerização da anilina sob o eletrodo de carbono modificado com nanotubos de carbono dopado com nanopartículas de cobre (NPs Cu). A inovação aplicada a este método foi o uso de espécies de metais eletroativos

dopados no eletrodo de trabalho (NPs Cu), eliminando o uso de sondas redox e simplificando o método de operação. O filme molecularmente impresso apresentou um aumento na condutividade e na estabilidade química do sensor.

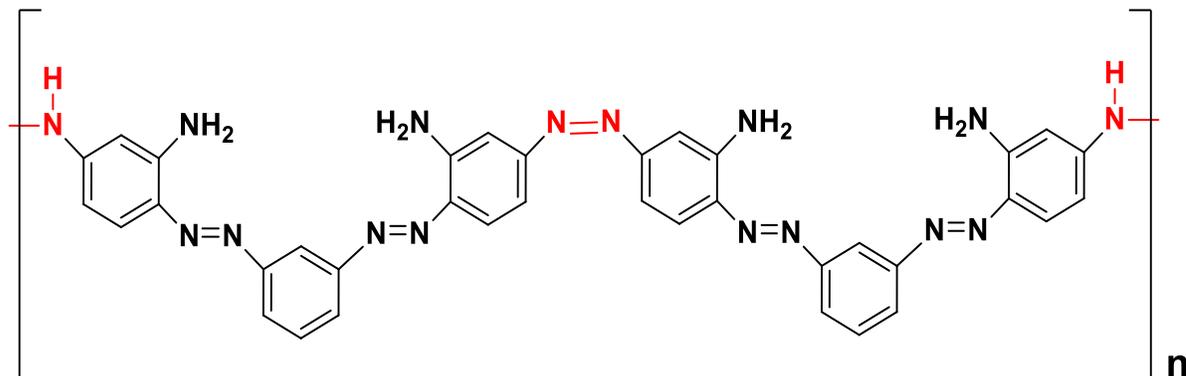
Portanto, para construção dos biossensores com impressão molecular é fundamental a utilização de monômeros funcionais que apresentam uma boa compatibilidade com as biomoléculas e uma alta condutividade, evitando, portanto, o uso de sondas redox. Ainda nisso, é fundamental a utilização de moldes estáveis para impressão molecular (CHEN et al., 2021). Sendo assim, a ASH é uma proteína promissora no desenvolvimento do sensor eletroquímico molecularmente impresso, uma vez que possui uma alta estabilidade química frente aos outros biomarcadores, baixo custo e boa biocompatibilidade com sistema de biomiméticos (LI et al., 2019).

2.3. Azopolímero

Nas últimas décadas, os polímeros baseados em monômeros de derivados de azobenzeno vêm sendo amplamente utilizados como corantes em células solares, dispositivos para armazenamento óptico reversível, ferramenta de memória e sensores químicos (WANG; WANG, 2013; LANGE; MIRSKY, 2011; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016). O esforço no emprego de azo polímero como sensores químicos se deve a suas propriedades fotossensíveis como também controle estrutural do polímero, na obtenção de materiais orgânicos semicondutores e flexíveis (MERINO; RIBAGORDA, 2012).

O azopolímero Bismark Brown Y (4,4'-[1,3-Fenilenobis(azo)]-bis[1,3-fenildiamina]) é corante sintetizado a partir da anilina, o qual sua primeira síntese foi descrita por Carl Alexander Von Martius em 1833 (BYERLY, 1953). O corante Bismark Brown Y foi aplicado em diversas áreas, especialmente na histologia na coloração de células e outros componentes teciduais. Este corante apresenta uma estrutura química simétrica com dois grupos azo (díazo) e duas aminas terminais (Figura 4), sendo fundamental na formação do filme polimérico do poli(azo-Bismark Brown Y) (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016a).

Figura 4. Estrutura molecular do azo corante Bismarck Brown Y.



Fonte: Autoria própria.

Foi desenvolvido por Olean-Oliveira e colaboradores (2019), um sensor quimiorresistor para detecção de radicais de ânion superóxido baseado em nanocompósito híbrido de poli(azo-Bismarck Brown Y) e óxido de grafeno reduzido. Durante o estudo, foi observado um efeito sinérgico entre o grafeno e o poli(azo-Bismarck Brown Y), o que, facilita a transferência eletrônica e aumenta a resposta eletroquímica do sensor. O mecanismo de sensoriamento proposto se baseia na variação da resistência do sistema, em que o íon superóxido interage com o polímero e reduz a conjugação do filme azo polímero. O sensor quimiorresistor apresentou um limite detecção de $8,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Em 2019, Trevizan e colaboradores, também relataram o desenvolvimento de um sensor voltamétrico baseado em polímero molecularmente impresso para detecção de ácido úrico a partir do poli(azo-Bismarck Brown Y). O sensor apresentou um potencial de oxidação específico para o ácido úrico sem necessitar do uso de uma sonda redox, uma vez que os grupos NH_2 do polímero facilitava as interações de hidrogênio com os grupos nitrogenados e oxigenados do ácido úrico, permitindo assim a formação das cavidades e a oxidação da molécula molde. Além disso, a superfície de compostos ricos em grupos $-\text{NH}_2$ permite a ancoragem de biomoléculas como enzimas, DNA, anticorpos e proteínas, apresentando, portanto, uma grande aplicabilidade no desenvolvimento de bioplataformas sensoriais (MERINO; RIBAGORDA, 2012; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016).

2.4 Sensores Impedimétricos

Sensores eletroquímicos baseados em polímeros molecularmente impressos tem sido amplamente utilizados para análise de diferente analitos na área da indústria farmacêutica (PILETSKY; TURNER, 2002), médica (PHAN et al., 2017), ambiental (DAI; CORTALEZZI, 2019) e alimentícia (LÜTFI; EREN; ATAR, 2015). A tecnologia de sensores eletroquímicos baseados em PMI apresentam diversas vantagens, já que são uma combinação que visam a seletividade de biomoléculas, baixo custo e alta afinidade (ONUR; ERTU, 2014).

Dentre as técnicas eletroquímicas, a espectroscopia de impedância/capacitância eletroquímica vem recebendo grande atenção no desenvolvimento de sensores. Essas técnicas são classificadas como não estacionárias e permitem análise interfacial de sistemas eletroquímicos complexos e biomimético, sendo amplamente utilizado nos polímeros molecularmente impressos (FERNANDES et al., 2013). Visto isso, a EIE/ ECE apresentam grande utilidade em mensurar analitos em baixas concentrações, caracterizar interfaces entre eletrodo/ solução e estudar parâmetros cinéticos que ocorrem na superfície do eletrodo (ONUR; ERTU, 2014).

Através das medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, parâmetros como resistência da solução, capacitância da dupla camada, resistência do filme polimérico, entre outros fenômenos interfaciais podem ser determinados e utilizados como parâmetros para construção de curvas analíticas (LEE et al., 2021).

Em 2017, Nguy e colaboradores, desenvolveram uma plataforma sensorial biomimética baseada em poli-aminotiofenol (*p*-ATP) para detecção de sarcosina em eletrodos de ouro impresso, como indicativo de câncer de próstata. Durante o estudo, os pesquisadores verificaram que a interação específica da sarcosina com as cavidades impressas provocam um bloqueio na sonda redox solúvel de hexacianoferrato de potássio. Desta forma, à medida que a concentração de sarcosina aumenta em solução, a resistência de transferência de elétrons do dispositivo aumenta proporcionalmente. O sensor apresentou um limite de quantificação de 1,0 ng mL⁻¹.

Karami e colaboradores (2019) relataram o desenvolvimento de um imunossensor impedimétrico com impressão molecular para detecção do antígeno específico de próstata e marcadores de mioglobina utilizando a impressão molecular. O polímero molecularmente impresso foi sintetizado na superfície de um eletrodo de ouro serigrafado usando como monômero funcional acrilamida, molécula molde o antígeno específico de próstata e a mioglobina. Foi utilizado a sonda redox de hexacianoferrato de potássio, a qual indicava que quanto maiores as concentrações do antígeno e da mioglobina, maior a alteração no valor da resistência de transferência de elétrons. O sensor proposto apresentou um limite de detecção de 830 pg mL^{-1} .

Apesar dos bons desempenhos apresentados, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura relatavam o desenvolvimento de sensores impedimétricos baseado em impressão molecular para detecção de biomarcadores apenas com a utilização de uma sonda redox em solução, não havendo métodos diretos de detecção da molécula molde. Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de uma plataforma sensorial que responde diretamente com a concentração da molécula molde, tornando o método mais seletivo e sem a interferência de outras moléculas que podem reagir com as sondas redox.

3. OBJETIVO

O principal objetivo do presente trabalho de pesquisa é o desenvolvimento de uma plataforma sensorial baseada em polímero molecularmente impresso a partir do monômero Bismark Brown Y para detecção e quantificação da albumina sérica humana a partir da técnica de espectroscopia de impedância/capacitância eletroquímica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

4.1.1. Reagentes utilizados durante os estudos de formação do filme e desenvolvimento do sensor molecularmente impresso

Os reagentes utilizados durante a formação, caracterização e estudos analíticos do filme polimérico molecularmente impresso são reagentes comerciais de alta pureza, discriminados através da Tabela 1.

Tabela 1. Descrição/características dos reagentes.

Nome	Fórmula/ Sigla	Fabricante	Grau de pureza (%)
4,4'-[1,3-Fenilenobis(azo)]-bis[1,3- fenildiamina] (Bismarck Brown Y)	BBY	Sigma-Aldrich	99,0
Cloreto de potássio	KCl	Synth	99,0
Ácido clorídrico	HCl	Vetec	P.A.
Hidróxido de Potássio	KOH	Vetec	98,0
Dihidrogenofosfato de Potássio	KH ₂ PO ₄	Merck	99,0
Hidrogenofosfato de Potássio Trihidratado	HK ₂ PO ₄ . 3 H ₂ O	Merck	99,0
Albumina Sérica Humana	ASH	Sigma-Aldrich	99,0
Gás Nitrogênio	N ₂	White Martins	99,8
Hemoglobina	Hb	Sigma-Aldrich	99,9
Glicose Oxidase	GOx	Sigma-Aldrich	99,9
Glicose	Glc	Vetec	99,9
Ureia	Ureia	Sigma-Aldrich	99,9
Albumina Sérica Bovina	BSA	Sigma-Aldrich	99,9
L-Histidina	His	Synth	99,0
L-Cisteína	Cys	Synth	99,0
L-Ornitina	Orn	Synth	99,0
L-Tirosina	Tyr	Merck	99,0
Triptofano	Trp	Sigma-Aldrich	99,9

Fonte: O autor.

4.2. Soluções

4.2.1 Limpeza dos eletrodos

Para a limpeza do substrato condutor de óxido de estanho modificado com flúor (FTO) utilizou uma solução de água, hidróxido de amônio e água oxigenada nas proporções de 5:1:1. A solução foi aquecida a 70° por 15 min. Posteriormente, os eletrodos de FTO foram adicionados e lavados com água destilada, imersos em acetona e colocados em banho ultrassônico por 3 minutos em um ultrassom ultraclean 700 Unique. Após isso, foram lavados novamente com água destilada e secados a temperatura ambiente, a qual tiveram sua área delimitada em 1,0 cm².

4.2.2. Solução de Eletropolimerização do Filme Molecularmente Impresso de poli(azoBismarck Y)

A solução para a formação do filme molecularmente impresso foi preparada baseada no trabalho de Trevizan e colaboradores (TREVIZAN, et al., 2021). Preparou-se uma solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ em pH 2,0 e uma solução aquosa de albumina 0,5 ng mL⁻¹. Pesou-se 0,1050 g do monômero BBY e transferiu para um balão volumétrico de 25 mL adicionando 25 uL da solução de ASH. O volume do balão volumétrico foi completado com a solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ (pH 2) e o mesmo foi levado a banho de ultrassom por 15 minutos.

4.2.3. Solução Tampão Fosfato.

Os estudos eletroquímicos foram conduzidos usando solução TF 0,10 mol L⁻¹ em pH 7,3. Esta solução apresenta o valor ideal de pH para mimetizar o meio celular e realizar os estudos em solução aquosa do sensor com impressão molecular. A solução TF 0,1 mol L⁻¹ foi preparada pela adição de 10 mmol L⁻¹ de K₂HPO₄, 40 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄ e 100 mmol L⁻¹ de KCl. O valor de pH da solução foi ajustado com adição de HCl e KOH concentrado e seu valor sendo monitorado com o auxílio de um pHmetro (781 pH/ion Meter – Metrohm). Antes de realizar as medidas eletroquímicas em solução aquosa foi borbulhado gás N₂ por um tempo mínimo de 15 minutos.

4.2.4 Solução Padrão de Albumina Sérica Humana

As proteínas comerciais de ASH da Sigma Aldrich (SigmaAldrich, St. Louis, Mo), foram dissolvidas em solução salina de tampão fosfato e utilizadas sem tratamento prévio de purificação.

4.3. Caracterização Morfológica

4.3.1. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

A caracterização morfológica dos eletrodos construídos foi obtida através de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Carl Zeiss modelo EVO LS15 equipado com detector de elétrons secundários (SE) em alto vácuo e temperatura constante.

4.3.2. Caracterização de Espectroscopia de Ultravioleta na Região do Visível

A caracterização via espectroscopia de ultravioleta na região do visível (UV-Vis) foi realizada em um espectrofotômetro Varian (modelo Cary 50) entre 300 e 1100 nm. Os espectros de absorção para medidas em solução foram obtidos a partir de uma concentração $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BBY e $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BBY-ASH. As medidas em solução foram realizadas utilizando cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico. Foi obtido também os espectros de absorção dos filmes eletropolimerizados com as soluções de BBY e BBY-ASH. O experimento foi realizado posicionando-se o eletrodo de FTO eletropolimerizado no equipamento e aplicando-se um intervalo espectral na amostra de 300 a 650 nm. Foi aplicado um limite de 300 nm devido a faixa de absorção do eletrodo de FTO.

4.3.2. Caracterização de Espectroscopia de Espalhamento Raman

As medidas de espalhamento Raman foram realizadas em um espectrógrafo microRaman Renishaw (modelo in-Via) acoplado a um microscópio óptico Leica com lente objetiva de 50X. A linha de excitação utilizada foi de 514,5 nm com rede de difração de 1800 linhas mm^{-1} e resolução espectral de cerca de 4 cm^{-1} . Os espectros de Raman foram obtidos para os filmes de PMI (antes e depois da extração) e PNI formados sobre o substrato de FTO, com o intuito de verificar possíveis interações da molécula de ASH sobre a rede polimérica/cavidade dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y).

4.4. Medidas Eletroquímicas

4.4.1. Construção do Polímero Molecularmente Impresso a partir do monômero de Bismarck Brown Y

A construção do sensor PMI foi realizada por técnica de eletropolimerização utilizando uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho o FTO, o eletrodo de calomelano saturado, como eletrodo de referência e fio de platina como eletrodo auxiliar, respectivamente conectados a um potenciostato *μ -Autolab type III (Eco Chimie)*.

A eletrossíntese do filme polimérico impresso, denominado como PMI-poli(azo-Bismarck Y), foi realizada por técnica de voltametria cíclica em um intervalo de potencial de -0,30 a +1,0 V vs. ECS. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente sob atmosfera inerte de N_2 . Em seguida, para remoção da molécula molde o filme molecularmente impresso sintetizado foi imerso em solução TF por 30 minutos e em seguida foram aplicadas varreduras de potenciais em uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} no intervalo de potencial de -0,30 a +1,0 V vs ECS até a estabilização dos valores de magnitude de corrente. Para fins comparativos, o filme de polímero não impresso, denominado de NIP, foram sintetizados usando os mesmos parâmetros, mas sem a adição da molécula molde de albumina.

4.4.2 Estudo eletroquímico do eletrodo modificado

A análise do comportamento eletroquímico dos filmes PMI-poli(azo-Bismarck Y) foi realizada em solução aquosa de TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) na ausência e na presença de 0,5 ng mL⁻¹ de albumina sob atmosfera inerte de N₂, por técnica de Voltametria Cíclica (VC) e a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

4.4.3. Voltametria Cíclica

As caracterizações eletroquímicas por voltametria cíclica foram realizadas em solução TF 0,10 mol L⁻¹ aplicando uma janela de potencial de -0,30 a +1,0 V (vs. ECS), em uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹ e 5 ciclos de potenciais. Para verificar o desempenho eletroquímico, foi utilizado o apenas o último ciclo de varredura, após a sua estabilização.

4.4.4. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Todas as medidas de EIE foram realizadas em uma gaiola de Faraday devidamente aterrada. Os parâmetros experimentais aplicado na célula eletroquímica foram sinal perturbação senoidal de 10 mV de amplitude, com potencial aplicado de +0,05 V (vs. ECS) em uma janela de frequência de 50 kHz a 0,10 Hz, e anotando 10 passos por dec. Os ajustes matemáticos dos modelos de circuito equivalentes utilizados para análise dos espectros foram obtidos através do software ZPlot 2.4. e EIS Spectrum Analyser. O potencial aplicado foi de 0,05 V (vs. ECS) para verificar a resposta do polímero molecularmente impresso frente ao molde de albumina sérica humana em solução aquosa.

4.4.5 Construção da Curva Analítica

Para obtenção da curva analítica, foi realizada medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica em uma gaiola de Faraday devidamente aterrada através da incidência de um sinal de perturbação senoidal de 10 mV aplicando uma faixa de frequência de 50 kHz a 0,1 Hz com 10 step/dec em um potencial fixo de

+0,05 V vs. ECS, solução TF a 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Todos os espectros foram registrados a 25°C. A solução TF 0,1 mol L⁻¹ foi saturada com o gás N₂ e foi mantida sob atmosfera do mesmo. As adições de padrão foram então realizadas com o auxílio de micropipeta Digipet® e aguardava-se um tempo de incubação de 30 minutos. Ao final do tempo de incubação realizava-se a análise por espectroscopia de impedância eletroquímica. Para cada adição foram registrados três espectros. As demais considerações de impedância são apresentadas no texto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Eletrossíntese do Filme Polimérico Molecularmente Impresso e Caracterização por Voltametria Cíclica

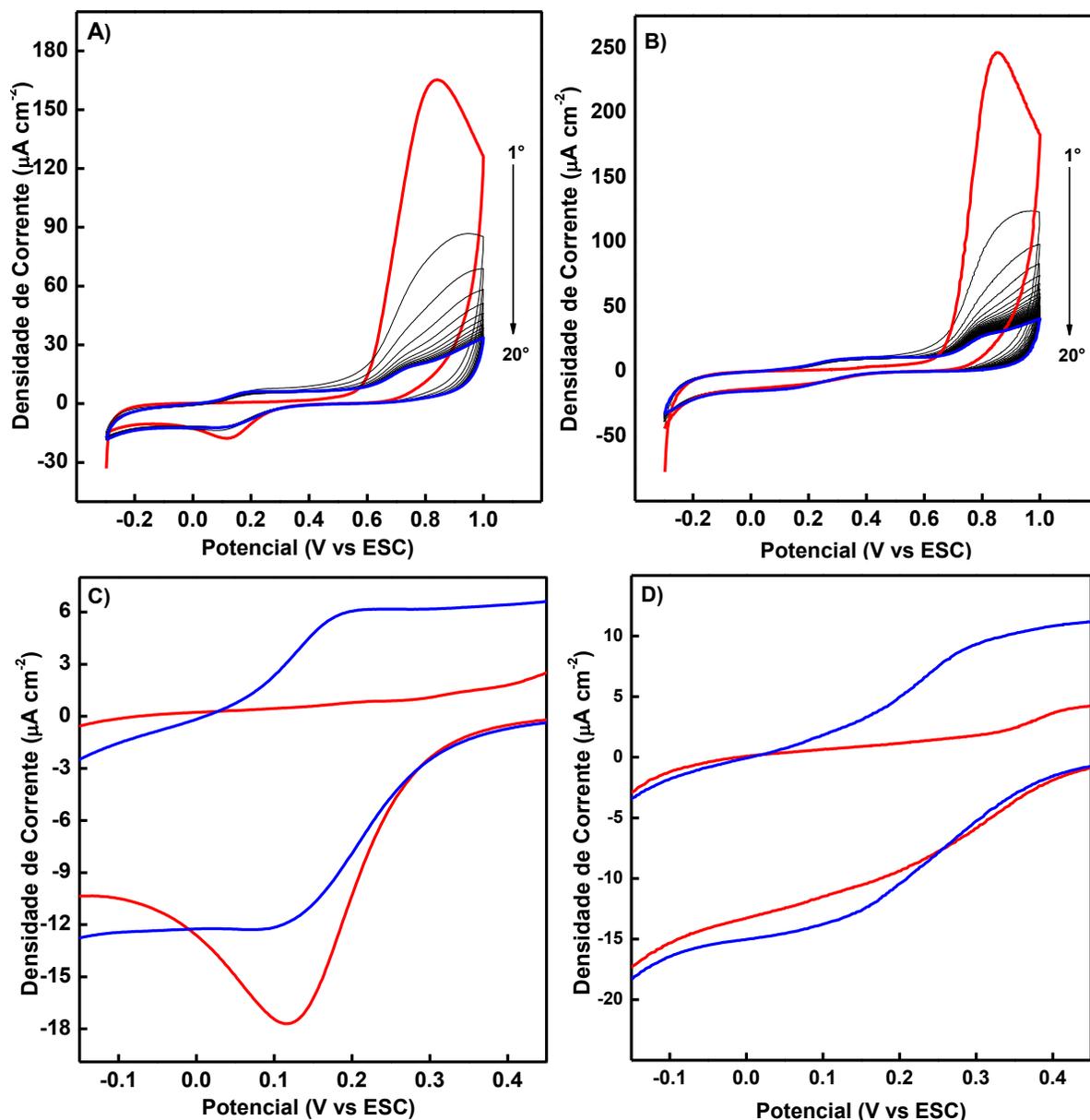
A eletropolimerização se tornou uma rota típica na síntese de filmes poliméricos molecularmente impressos, principalmente no recobrimento de substratos condutores (MAIA et al., 2000). Este método oferece diversas vantagens comparado outros métodos convencionais, como o controle da estrutura morfológica do filme a partir de parâmetros como a velocidade de varredura, número de ciclos e concentração do ácido na etapa de síntese (STANKOVLC et al., 1997).

Nesse sentido, foi realizada a eletropolimerização do monômero Bismarck Brown Y pela técnica de voltametria cíclica. O voltamograma cíclico da etapa de eletropolimerização do filme de poli(azo-Bismarck Y) contendo a molécula molde de albumina usando o eletrodo de FTO como material condutor está apresentada na Figura 5A. Para formação de filmes poliméricos baseados em derivados de azobenzênio é necessário um potencial limite superior a +1,0 V (vs. ECS) para a formação do cátion radical iniciador do processo de polimerização (EL-RAHMAN et al., 1991).

No primeiro ciclo de potencial aplicado, durante a varredura anódica, é verificado um pico de oxidação em +0,84 V (vs. ECS) referente a oxidação do monômero de Bismarck Brown Y, sendo típico da oxidação de aminas aromáticas primárias nesse intervalo de potencial (EL-RAHMAN et al., 1991; SEQUOIA; GENIES; TSINTAVIS, 1985). Após o primeiro ciclo de varredura, a corrente anódica relacionada a oxidação do monômero diminuí sequencialmente com número de ciclo de eletrodeposição.

Entretanto, no intervalo de potencial de 0,05 a 0,60 V se observa o incremento da corrente para o par redox do grupo azo ($-N = N -$) formado no polímero (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TREVIZAN et al., 2021). Na Figura 5C ilustra a diferenciação da corrente redox do grupo azo do primeiro e vigésimo ciclo de varredura aplicado, indicando a formação do filme polimérico (REHAN, 2000).

Figura 5. Ciclo de eletropolimerização para formação do polímero molecularmente impresso (A) e do polímero não impresso (B). Magnificação do voltamograma cíclico de eletrodeposição destacando o primeiro (curva vermelha) e vigésimo (curva azul) ciclo de potencial aplicado para a formação do PMI (C) e do PNI (D).



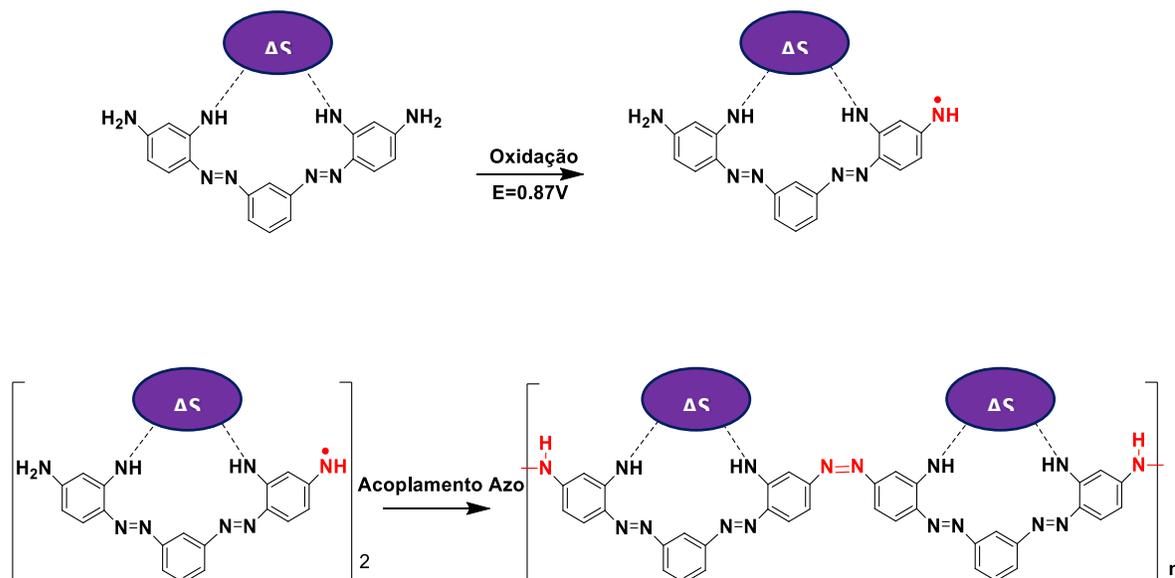
O mecanismo de polimerização é baseado no mecanismo nitrogênio-nitrogênio (acoplamento *head-to-head*), que tem em sua primeira etapa a oxidação do grupo amina, formando um cátion radical ($\text{BBY}^{\cdot+}$), ou em meio ácido um dicátion (BBY^{2+}), na presença de um potencial positivo elevado (HWANG; SANTHANAM;

LIN, 2001). A Figura 6 ilustra o mecanismo de formação de radical na primeira etapa, seguido do acoplamento *head-to-head*, que formará um hidrazobenzeno, podendo este ser oxidado novamente para a formação de cadeias azopoliméricas na superfície do eletrodo (HWANG; SANTHANAM; LIN, 2001; LI et al., 2002). No entanto, para a formação do filme baseado em PMI, é necessário considerar a formação do complexo ASH-BBY, no processo de pré-polimerização na etapa da eletropolimerização (Figura 5A). A Albumina por ser uma biomolécula da classe proteica, tem a presença de diversos aminoácidos em sua estrutura, havendo a influência de diversos grupos funcionais na etapa de pré-polimerização.

Nesse sentido, Linciano e colaboradores (2022) relata um estudo molecular e estrutural dos sítios de ligação livre dos aminoácidos presentes na albumina sérica humana encontradas em soro. A análise estrutural da natureza dos resíduos de aminoácidos revelou uma grande contribuição de aminoácidos apolares, especialmente a leucina, a valina e isoleucina, devido sua flexibilidade conformacional e sua boa adequação para diferentes ligantes. Além desses, os aminoácidos polares, ácidos e básicos tem uma influência significativa na estrutura da albumina sérica humana.

Como já foi mencionado anteriormente, a cistina é um aminoácido encontrado na albumina e que permite interações dipolo-dipolo. A variabilidade dos aminoácidos permite diferentes interações com os grupos funcionais do monômero BBY (-N=N-; NH₂) na formação de complexos. Desta forma, as interações de hidrogênio, dipolo-dipolo, forças de London e eletrostáticas são responsáveis pela arquitetura tridimensionalmente do polímero ao redor do molde molecular de ASH na formação dos sítios de ligação e das cavidades (Figura 6) (BOLAT; TUGCE; ABACI, 2019; QIU et al., 2014).

Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de eletropolimerização do complexo poli(azo-Bismarck Y)-ASH em meio ácido.



Fonte: O autor.

A comparação dos comportamentos de eletropolimerização de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e PNI-poli(azo-Bismarck Y) revela que a formação do complexo de pré-polimerização não interferiu no processo de crescimento do filme, uma vez que o comportamento eletroquímico do grupo azo no voltamograma cíclico foi mantido em ambos os eletrodos (Figura 5B e 5D).

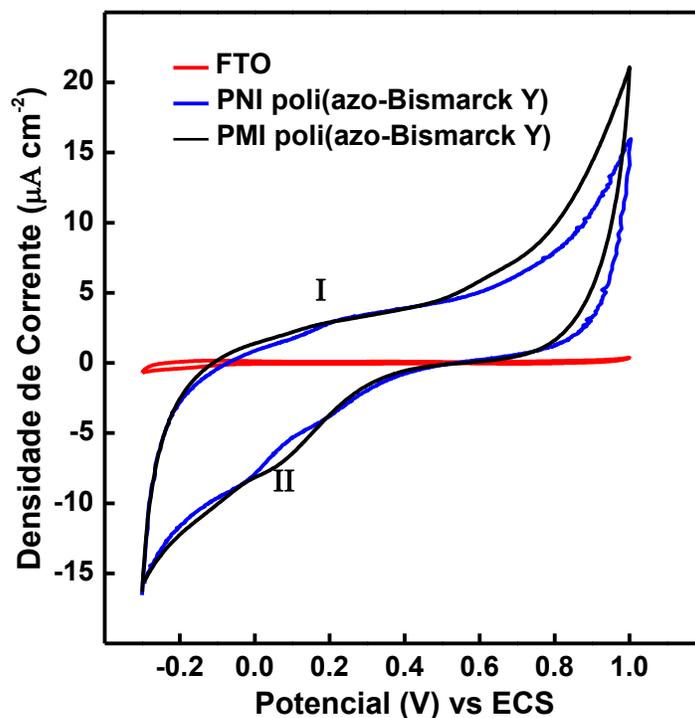
Entretanto, foi evidenciado uma diminuição na corrente catódica durante a etapa de eletropolimerização do filme PMI, o que possivelmente está relacionada com a eletrocatalise impulsionado por aminoácidos redutores presente na estrutura da proteína de ASH. Dessa forma, a formação da espécie reduzida do polímero foi facilitada e, conseqüentemente, aumentou a corrente catódica no primeiro ciclo de varredura. Nos ciclos subsequentes, houve uma diminuição da magnitude de corrente catódica, indicando a formação das cavidades dentro da rede polimérica.

Na eletropolimerização do PMI-poli(azo-Bismarck Y), a albumina sérica humana utilizado como molde foi removido da matriz polimérica através da imersão do eletrodo modificado em solução TF (pH=7,3) por 40 min e foram aplicadas varreduras de potenciais ($v = 20 \text{ mV s}^{-1}$) no intervalo de potencial de -0,3 a +1,0V

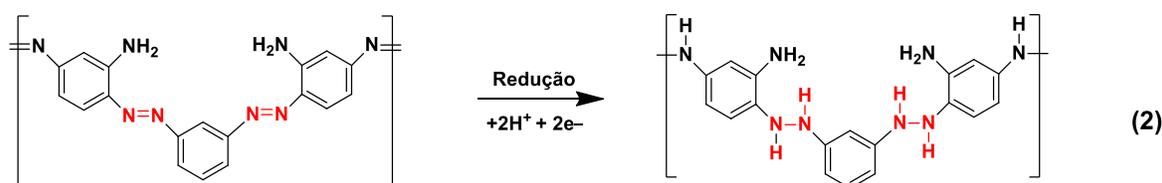
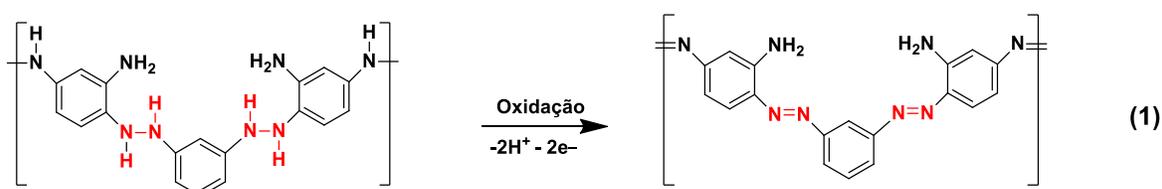
vs ECS até que os valores de corrente fossem completamente estabilizados. Além disso, quando as moléculas de ASH são removidas, os locais de impressão molecular são gerados para o reconhecimento específico da molécula molde na etapa de religação (Figura 3).

De acordo com o mecanismo proposto para eletrossíntese do filme impresso e do voltamograma obtido, foi possível observar que o filme polimérico foi sintetizado de forma eficaz na superfície do eletrodo e que possivelmente os sítios de ligação da proteína de ASH na rede polimérica foi obtido de forma efetiva. O comportamento eletroquímico dos eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y), PNI-poli(azo-Bismarck Y) e FTO, foi estudado por voltametria cíclica em solução TF 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,3.

Figura 7. Voltamograma cíclico do eletrodo de FTO, PNI-poli(azo Bismarck Y) e PMI-poli(azo Bismarck Y) E m solução TF 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,3) v = 50 mV s⁻¹ saturada com N₂.



Foi observado no voltamograma cíclico da Figura 7 a presença de um par redox no potencial de pico anódico ($E_{pa} \approx 0,25$ V vs ECS) e no potencial de pico catódico ($E_{pc} \approx 0,05$ V vs ESC) característico do poli(azo-Bismarck Y). Os potenciais de pico anódico (I) e o de pico catódico (II)) são atribuídos ao processo de oxidação do grupo azo (Equação 1 e 2) e são similares ao comportamento dos filmes baseados em azo-polímero descritos na literatura (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016; TREVIZAN et al., 2021). A Equação 1 representa o processo de oxidação do grupo hidrazobenzeno em azobenzeno (Pico I) e Equação 2 representa a redução do azobenzeno em hidrazobenzeno.

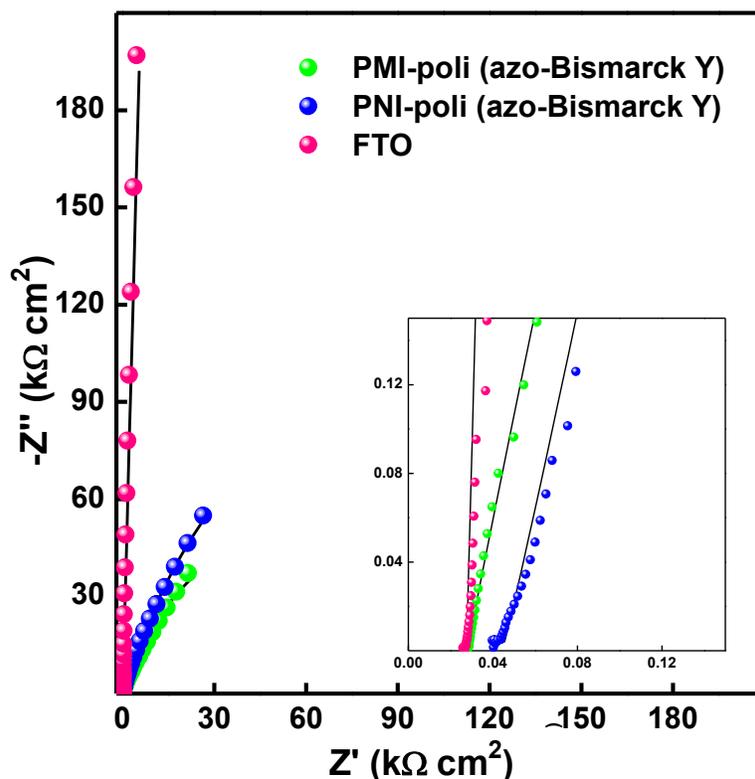


Ainda pelo voltamograma, foi possível observar um incremento dos valores de corrente no pico de potencial catódico do filme de PMI-poli(azo-BismarckY) em comparação ao filme de PNI-poli(azo-Bismarck Y), revelando uma influência da albumina na rede polimérica do filme. Essa diminuição na magnitude da corrente de pico catódico para o filme não impresso foi atribuída a dificuldade que os elétrons têm de alcançarem a superfície do eletrodo, justamente pela ausência de cavidades e conseqüentemente um aumento da barreira de difusão (CYRIAC; SIVASANKARAN; KUMAR, 2018).

5.2. Caracterização dos Eletrodos Modificados por Espectroscopia de Impedância/ Capacitância Eletroquímica.

O desempenho eletroquímico dos dispositivos de polímero com e sem impressão molecular foi investigado na ausência de um mediador redox (como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) (LACH et al., 2019). Esta abordagem permite uma investigação eletroquímica mais aprofundada dos fenômenos relacionados com a interação molécula molde-polímero. Para esta investigação, foi aplicado um potencial de +0,05 V vs ECS devido a um melhor desempenho eletroquímico (Seção 5.3.4). As caracterizações EIE dos eletrodos modificados foram registradas em 0,1 mol L⁻¹ de solução TF.

Figura 8. Gráficos de impedância complexa (Z' vs. Z'') para o PNI-poli(azo-Bismarck Y) (quadrado azul), PMI-poli(azo-Bismarck Y) (triângulo verde) e FTO (círculo rosa) em 0,10 mol L⁻¹ solução TF (pH 7,3) no potencial aplicado de +0,05 V (vs ECS). Inset: magnificação dos espectros de Nyquist.



Na Figura 8, a impedância dos eletrodos modificados é menor em comparação com eletrodo de FTO sem modificação, justamente porque o azopolímero é um material condutor, que facilita a transferência de elétrons na rede polimérica e diminui, conseqüentemente, a impedância do sistema como um todo (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016; TREVIZAN et al., 2021). A diferença nas dimensões dos arcos capacitivos para os eletrodos modificados está associada à diferença nos valores da resistência de transferência de carga em médias e baixas frequências (RANDVIIR; BANKS, 2013; VON HAUFF, 2019). O menor valor de resistência do filme está associado a um melhor desempenho eletroquímico na plataforma sensorial baseada em polímero semiconductor. Assim, o dispositivo de PMI-poli(azo-Bismarck Y) apresentou uma melhor condutividade eletrônica quando comparado ao PNI-poli(azo-Bismarck Y).

Além disso, a alta inclinação do arco capacitivo para eletrodo de FTO sem modificação se aproxima de 90° na região de baixa frequência, indicando um comportamento capacitivo. A linha reta com alta inclinação na região de baixa frequência pode confirmar que o eletrodo de FTO sem sofrer modificação se comporta como um capacitor (CÓRDOBA-TORRES, 2017). Nesta perspectiva, para melhor compreensão dos elementos presentes em cada eletrodo foi proposto circuito equivalente para modelar os dados obtidos.

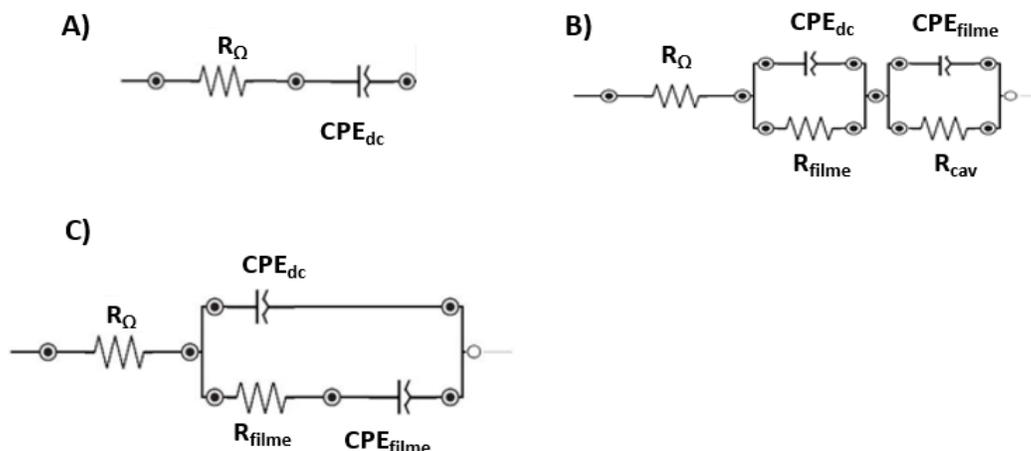
O substrato condutor de FTO sem modificação, exibiu como circuito equivalente uma resistência da solução (R_Ω) em série com um elemento de fase constante da dupla camada elétrica (CPE_{dc}) (Figura 9A). O eletrodo modificado para o filme impresso de PMI-poli(azo-Bismarck Y) apresentou como circuito equivalente, uma resistência da solução (R_Ω) em série com dois paralelos contendo um elemento de capacitância não ideal (CPE) e uma resistência de transferência de carga (R_{filme}) (Figura 9B). Sendo R_{filme} a resistência de transferência de carga para a interface solução/poli(azo-Bismarck Y), CPE_{dc} o elemento de fase constante da dupla camada elétrica, R_{cav} a resistência de transferência de carga para interface poli(azo-Bismarck Y)/cavidade ASH e CPE_{filme} o elemento de fase constante para o comportamento capacitivo não ideal do filme (OLEAN-OLIVEIRA; TEIXEIRA, 2018).

Para o filme sem impressão molecular, PNI-poli(azo-Bismarck Y), foi obtido um circuito contendo uma resistência da solução (R_{Ω}) em série com um paralelo composto por um elemento de fase constante associado a dupla camada elétrica (CPE_{dc}) e uma resistência de transferência de carga do filme (R_{filme}) em série a um elemento de fase constante associado ao filme de BBY (CPE_{filme}) (Figura 9C). Os valores obtidos através dos ajustes matemáticos em função dos circuitos equivalentes da Figura 9 são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist do eletrodo de FTO sem modificação, eletrodo modificado de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e de PNI-poli(azo-Bismarck Y) baseados nos modelos da Figura 9. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.

Eletrodos	R_{Ω}	R_{filme}	R_{cav}	CPE _{dc}	α_{dc}	CPE _{filme}	α_{filme}
	(k Ω cm ²)			(μ F cm ⁻² s ^{α-1})			
FTO	0,308	-----	-----	83,05	0,982	-----	-----
PMI-poli (Bismarck Y)	0,277	125,2	3,086	62,38	0,857	32,74	0,883
PNI-poli (Bismarck Y)	0,286	136,5	-----	20,11	0,922	13,85	0,961

Figura 9. Modelo de circuito equivalente para o ajuste matemático do espectro de Nyquist dos filmes de (A) FTO, (B) PMI-poli(azo-Bismarck Y) e (C) PNI-poli(azo-Bismarck Y) em potencial aplicado de +0,05 V (vs. ECS).



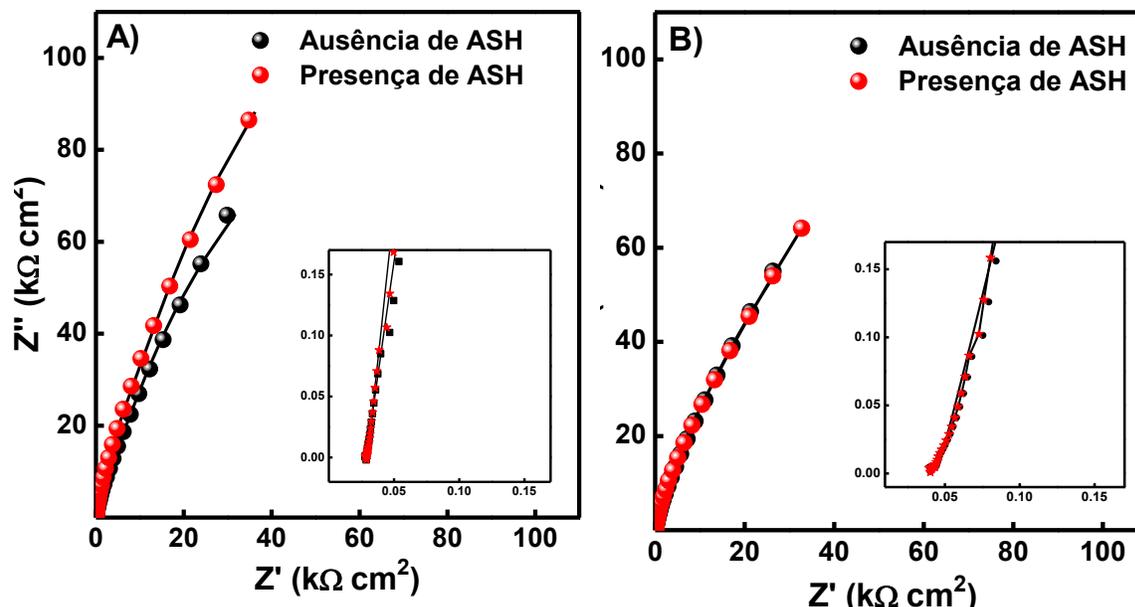
Fonte: O autor.

De acordo com os circuitos equivalente e seus respectivos dados apresentados na Tabela 2, foi possível verificar que o filme PMI-poli (Bismarck Y) apresenta uma resistência específica para cavidade da molécula molde, o que não é visto no filme PNI-poli (Bismarck Y), justamente pela ausência da proteína de ASH na sua rede polimérica. Ao analisar os valores de capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) e seus respectivos valores de α_{dc} , observou um alto valor de CPE_{dc} para o eletrodo de FTO quando comparado com os eletrodos de FTO modificados com o polímero condutor de BBY. A diminuição dos valores de capacitância foi atribuída a área recoberta pelo polímero de Bismarck Brown Y em função com a dificuldade de difusão do contra-íon através dos poros internos do filme polimérico formado (GONG et al., 2003; LIU et al., 2011). O filme modificado sem impressão molecular apresentou um menor valor de CPE_{dc} justamente por não exibir cavidades em sua rede polimérica, o que permite uma superfície mais uniforme do que o filme com impressão molecular.

Nesse sentido, os valores de α_{dc} foram menores para os eletrodos de PMI e PNI em comparação com o eletrodo de FTO sem modificação, devido organização das cargas do eletrólito no interior do filme polimérico. Além disso, foi relatado por Teixeira e colaboradores (2016) que o filme polimérico baseado no corante azo de Bismarck Brown Y forma filmes porosos e rugosos. Desta forma, Córdoba-Torres (2017) relata que a porosidade e a rugosidade de filmes poliméricos afetam diretamente os valores de α_{dc} , justificando a diminuição do valor de α_{dc} para os eletrodos modificados. No entanto, o eletrodo de FTO apresentou um valor de α_{dc} superior a 0,98 se aproximando de um capacitor ideal.

A fim de confirmar a formação dos sítios de ligação e das cavidades na rede polimérica do filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) com a molécula de albumina, foram realizadas medidas de EIE e ECE com os eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e PNI-poli(azo- Bismarck Y) na ausência e na presença de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de albumina.

Figura 10. Espectros de Nyquist em +0,05 V (vs ECS) para dispositivos PMI-poli(azo-Bismarck Y) (A) e PNI-poli(azo- Bismarck Y) (B) na presença (círculo vermelho) e ausência (círculo preto) de 0,5 ng mL⁻¹ de ASH em 0,10 mol L⁻¹ solução TF (pH 7,3). As linhas mostram o ajuste obtido por modelos de circuito de impedância na Figura 9. Inset: magnificação dos espectros de Nyquist.



Conforme os espectros de Nyquist na Figura 10, o eletrodo PMI-poli(azo Bismarck Y) e PNI-poli(azo Bismarck Y) apresentaram um comportamento distinto com a adição de albumina no meio. O eletrodo com impressão molecular exibiu um aumento do arco capacitivo frente a molécula de ASH, desencadeado justamente pelo efeito de bloqueio das cavidades na transferência de carga, causando um aumento resistência do sistema (TANG et al., 2018; BOLAT; TUGCE; ABACI, 2019; TREVIZAN et al., 2021).

No entanto, o eletrodo sem impressão molecular não exibiu diferença no arco capacitivo devido ausência de cavidades em sua rede polimérica. Portanto, foi comprovado a existência de sítios de ligação para a molécula de ASH no eletrodo PMI-poli(azo Bismarck Y), indicando que o sistema baseado em impressão molecular pode ser utilizado para identificação de biomoléculas complexas a partir dos valores de resistência e capacitância eletroquímica. Para obtenção dos valores dos parâmetros físico-químicos interfaciais, foram utilizados os modelos de circuito equivalente proposto na Figura 9 para descrever o comportamento dos eletrodos

modificados. Os valores obtidos através dos ajustes matemáticos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist do eletrodo modificado de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e de PNI-poli(azo-Bismarck Y) na ausência e na presença de ASH. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.

Filmes de poli(azo Bismarck Y)	R_{Ω}	R_{filme}	R_{cav}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{filme}	α_{filme}
	$(k\Omega cm^2)$			$(\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1})$			
Ausência de ASH							
PNI	0,286	136,5	-----	20,11	0,922	13,85	0,961
PMI	0,280	260,1	6,077	48,43	0,892	20,57	0,927
Presença de ASH							
PNI	0,272	140,2	----	19,25	0,901	16,52	0,956
PMI	0,282	336,9	13,99	34,04	0,885	17,34	0,912

O filme de PMI contém dois elementos resistivos (Figura 9B) que se comportam de forma semelhante para a albumina em solução. O R_{filme} aumenta consideravelmente na presença de albumina (Tabela 3) devido à interação da molécula molde nos sítios de ligação na matriz polimérica. O segundo elemento resistivo (R_{cav}) corresponde ao fenômeno de enchimento da albumina nas cavidades (YOO et al., 2014).

Ainda na Tabela 3, o elemento a resistência de transferência de carga (R_{filme}) para o eletrodo com impresso molecular, é muito sensível quando em contato com a albumina, apresentando um valor de $\Delta R_{filme}=76,8 k\Omega cm^2$ e em torno de 20,8 vezes maior que o valor do filme sem impressão molecular, corroborando proposta de formação das cavidades e sítios de ligação específicos para a molécula molde no filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y). Esta ideia é reforçada quando analisamos na perspectiva da capacitância eletroquímica.

Conforme relatado por Bueno e colaboradores (2012), filmes poliméricos com sítios ativos geram uma capacitância redox no sistema, que integralmente representa a densidade dos centros redox no carregamento capacitivo faradaico.

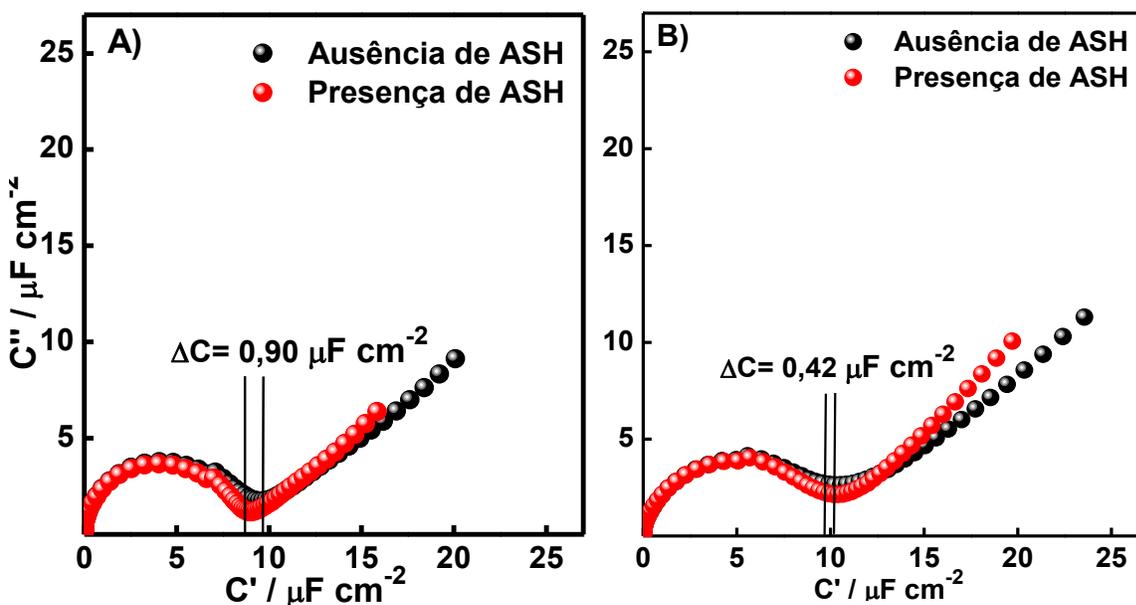
Sendo assim, a capacitância eletroquímica é influenciada por duas contribuições capacitivas, uma da capacitância no carregamento eletrostático relacionada com a perturbação no eletrodo-solução e outra devido a capacitância quantizada que está associada à perturbação das moléculas redox adsorvidas. Desta forma, os cálculos da capacitância complexa foram realizados usando as Equações (3) e (4) (FERNANDES et al., 2013).

$$C' = \frac{Z''}{\omega|Z|^2} \quad (3)$$

$$C'' = \frac{Z'}{\omega|Z|^2} \quad (4)$$

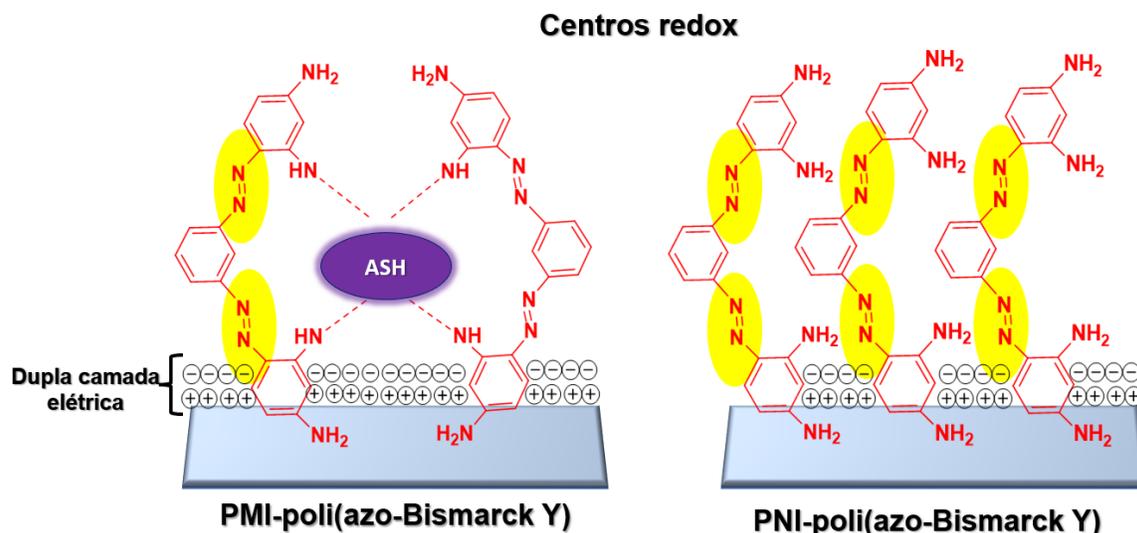
Onde ω é a frequência angular, Z'' é a impedância imaginária, $|Z|$ é a impedância absoluta, C' é a capacitância real e C'' é a capacitância imaginária. Esta abordagem é baseada em fenômenos capacitivos e é comumente utilizada na construção de sensores impedimétricos com biomoléculas (FERNANDES et al., 2013). Este formato explorou fenômenos interfaciais capacitivos, como o preenchimento da cavidade do sensor poli(azo-Bismarck Y)-MIP com a molécula molde e carregamento do filme. As Figura 11 A e B representam os espectros capacitivos de Nyquist para os eletrodos PMI-poli(azo-Bismarck Y) e PNI-poli(azo-Bismarck Y).

Figura 11. Diagrama capacitivo de Nyquist, registrados para os eletrodos de PMI-poli(azo Bismarck Y) (A) e PNI-poli(azo Bismarck Y) (B) em solução TF 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,3). Potencial fixo de 0,05 V vs ECS na ausência e na presença de ASH. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.



Na Figura 11 observa um comportamento semelhante entre os eletrodos PMI e PNI frente ao molde molecular. Ambos os eletrodos tiveram uma diminuição da capacitância redox dos sistemas, indicando um bloqueio no carregamento/descarregamento do filme/ solução com a adsorção das moléculas de albumina (BUENO et al., 2012; FERNANDES et al., 2013). Foram estimados valores de $C_{redox} = 9,57 \mu F cm^{-2}$ na ausência e de $C_{redox} = 8,67 \mu F cm^{-2}$ na presença de ASH para o eletrodo de PMI, enquanto que para o eletrodo PNI obteve um valor de $C_{redox} = 9,97 \mu F cm^{-2}$ e $C_{redox} = 9,55 \mu F cm^{-2}$ quando testados em solução sem e com albumina (Tabela 4). Portanto, o filme com impressão molecular obteve uma resposta de $0,90 \mu F cm^{-2}$ (cerca de 2 vezes maior que o ΔC_{redox} -PNI), confirmando a presença de sítios de ligação específicos e cavidades do molde molecular na rede polimérica. Portanto, o filme impresso por apresentar cavidades com tamanho e estrutura específica para albumina em sua rede polimérica, a adsorção ocorre de forma mais efetiva, diminuindo conseqüentemente a capacitância redox (BUENO et al., 2012; AFZALI; MOSTAFAVI; SHAMSPUR, 2020; TREVIZAN et al., 2021). Assim, o eletrodo de PMI exibiu uma maior sensibilidade em função a capacitância redox quando comparada ao filme não impresso.

Figura 12. Representação dos centros redox e da dupla camada elétrica formada no filme de poli(azo-Bismarck Y) para o eletrodo de PMI indicando a formação das cavidades/ sítio de ligação e de PNI sem impressão molecular.



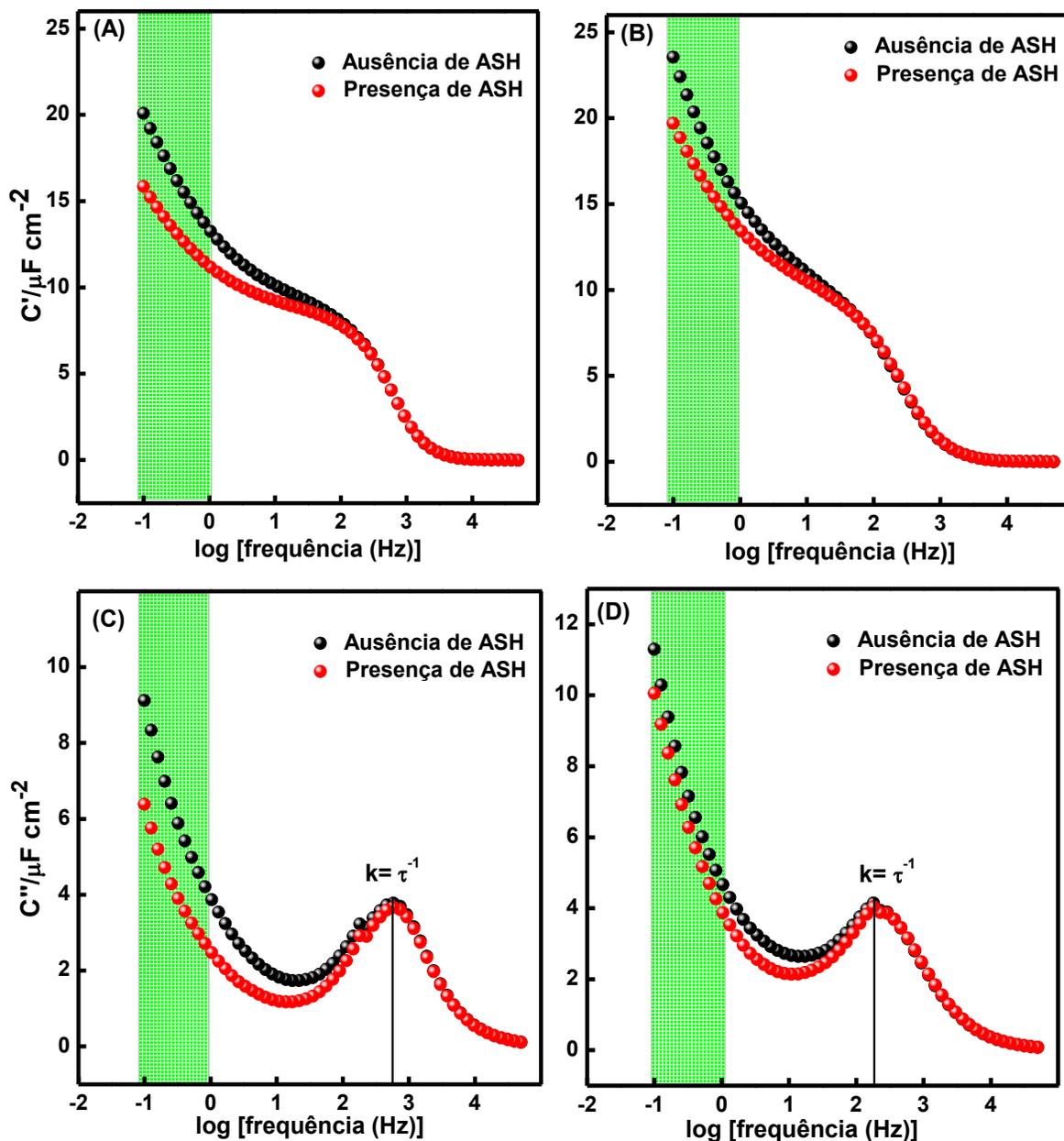
Fonte: Autoria Própria

O estudo do comportamento eletroquímico de eletrodos modificados aplicando um potencial fixo de redução/oxidação, tornam possível a caracterização do ambiente interfacial e a quantificação das atividades faradaicas e não faradaicas nas superfícies. Isso é possível uma vez que o desempenho redox dos filmes eletroquimicamente modificados é observado em escala de tempo e distintas intensidades de medições do espectro de corrente alternada. Nesta perspectiva, a análise por ECE permite uma varredura de frequências em função da capacitância do sistema, fornecendo uma visão completa do ambiente de molecular e dos sítios redox. Desta forma, foi analisado a capacitância real (Figura 13A e 13B) e imaginária (Figura 13C e 13D) em função da frequência aplicada dos filmes PMI e PNI frente ao molde molecular de ASH.

As Figura 13A e 13B, contém o diagrama de Bode o qual exibe uma resposta da capacitância real (C') em função da frequência, em que define os sinais faradaico na ausência (gráfico círculos pretos) e na presença de ASH (gráfico círculos vermelhos), aqui comparamos a magnitude de cada contribuição e notamos uma diferença entre o sinal redox de cada eletrodo modificado. O eletrodo sem impressão molecular, apresentou uma magnitude capacitiva do plano real superior

comparado com o filme com impressão molecular, justamente por apresentar uma distribuição polimérica dos sítios redox na superfície do eletrodo mais uniforme do que o filme com cavidades, facilitando o carregamento do filme PNI.

Figura 13. Os diagramas de Bode para capacitância complexa nas componentes real do filme PMI (A) e PNI (B) e imaginária do filme PMI (C) e PNI (D) em função da frequência em solução TF 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,3) na ausência e na presença de Albumina Sérica Humana (ASH) em atmosfera de N₂. Potencial fixo de 0,05 V vs ECS. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. O destaque em verde mostra a variação da capacitância em baixa frequências.



A Figura 13C e 13D contém também um diagrama de Bode decorrente capacitância imaginária em função do logaritmo da frequência, o qual observou o processo de relaxação dos filmes PMI e PNI na frequência no pico da C". Sendo assim, a frequência necessária para a relaxação do filme polimérico com impressão molecular foi de 584 Hz e sem impressão molecular foi de 181 Hz. A abordagem utilizada para os cálculos do tempo de relaxação se baseou no trabalho de Bueno e colaboradores (2016), em que foi aplicado o inverso da frequência de pico ($\tau_r = 1/f$) obtido pela Figura 13C e 13D. Desta forma, o filme de PMI apresentou um tempo de relaxação equivalente a 1.71ms^{-1} e filme de PNI apresentou um tempo de relaxação igual a 5.52ms^{-1} (Tabela 4). Foi conclusivo que a presença de cavidades da albumina afetou a estrutura molecular polímero em termos de perda de energia, necessitando de um tempo maior. Por sua vez, quando testados na presença de albumina, os eletrodos não demonstraram modificação de seu valor, sendo independente a presença da molécula molde no tempo de relaxação.

Nesta perspectiva, Cassu e Felisberti (2013), define o processo de relaxação de polímeros sendo a capacidade de mobilidade das cadeias poliméricas em realizar mudanças conformacionais, considerando fatores como ângulos de ligação, estrutura molecular e interações intermoleculares presentes na rede polimérica. Ainda nisso, o tempo de relaxação é estimado a partir de uma varredura de frequência (f), em que as cadeias poliméricas absorvem energia em apenas uma determinada faixa de frequência, dado em escala de tempo. Deste modo, o tempo em que ocorre a maior absorção de energia do polímero, é definido como tempo de relaxação.

Por meio destas informações e dos dados obtidos, note que o tempo de relaxação do filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) é superior ao filme sem impressão molecular, corroborando com a influência que as interações com o molde molecular tem na mobilidade da rede polimérica, configurando a este uma maior rigidez. Em contrapartida, o eletrodo de PNI é mais uniforme em relação a distribuição polimérica do filme de poli(azo-Bismarck Y), necessitando de um tempo de relação menor.

Ainda isso, autores relatam que é possível determinar a constante de cinética de transferência de elétrons (k) em superfície modificadas com filmes eletroativos a partir de análises da capacitância imaginária em função da varredura de frequência (BUENO et al., 2013). Os autores demonstraram que a taxa de transferência de elétrons está intrinsecamente relacionada com a capacitância redox e com todo o processo redox presente na superfície modificadas (Figura 12).

Deste modo, a constante de cinética de transferência de elétrons (k) é determinada pelo o inverso do tempo de relaxação ($k^{-1} = \tau_r$) ou pelo valor de frequência no ponto mais alto de C'' , indicando o momento em que a velocidade de transferência de elétrons é equivalente ao intervalo do tempo em termos de perda de energia. Neste momento, a influência da resistência de transferência de carga no sistema se torna insignificante e os elementos capacitivos do sensor atinge sua capacidade máxima. Os valores de k para o filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) foi de 584 s^{-1} e o filme de PNI-poli(azo-Bismarck Y) 181 s^{-1} (Tabela 4), sendo estes os mesmos valores da frequência de pico da Figura 13C e 13D já mencionadas. A diferença nos valores da taxa de transferência de elétrons é interpretada em função da magnitude do pico e da dispersão deste, estando diretamente relacionado com a eficácia dos sítios redox no acoplamento eletrônico.

Tabela 4. Parâmetros obtidos através dos espectros de capacitivos de Nyquist e Bode para o eletrodo modificado de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e de PNI-poli(azo-Bismarck Y) na ausência e na presença de ASH. Frequência de 0,1 Hz para os valores de C' e C'' .

Filmes de poli(azo Bismarck Y)	C'	C''	C_{redox}	τ_r	k
	(μF cm ⁻²)			(ms)	(s ⁻¹)
Ausência de ASH					
PNI	23,56	11,29	9,97	1,71	181
PMI	20,08	9,122	9,57	5,52	584
Presença de ASH					
PNI	19,70	10,05	9,55	1,71	181
PMI	15,85	6,383	8,67	5,52	584

A região de baixa frequência indicada nos gráficos da Figura 13 representa as escalas de tempo associadas ao carregamento completo do polímero molecularmente impresso. Com a adição de albumina no sistema, nota uma diminuição da capacitância real e imaginária em função da frequência, o que indica um processo de descarregamento dos filmes de PMI e PNI, ocasionados pela interação da albumina com os sítios redox do poli(azo-Bismarck Y). Foi observado que o processo de religação da albumina é mais sensível no plano da capacitância imaginária, apresentando uma resposta do sensor de PMI de $2,739 \mu\text{F cm}^{-2}$ e para o eletrodo de PNI de $1,24 \mu\text{F cm}^{-2}$, obtendo um fator de impressão ($\Delta C_{\text{MIP}} / \Delta C_{\text{NIP}}$) cerca de 2,2 vezes maior em relação ao filme sem impressão molecular.

No entanto, para a componente real capacitiva, o filme de PMI apresentou uma magnitude na variação da resposta do sensor maior, porém o eletrodo sem impressão molecular seguiu o mesmo comportamento, apresentando um fator de impressão molecular em torno de 1,10. Como foi descrito na Equação 4, a capacitância imaginária está diretamente relacionada com a impedância real (Z'), e, conseqüentemente, com uma maior sensibilidade para os elementos resistivos, especialmente a R_{cav} que é específico para o filme com impressão molecular, como visto no circuito equivalente proposto na Figura 9B.

5.3. Otimização do Filme Polimérico Molecularmente Impresso

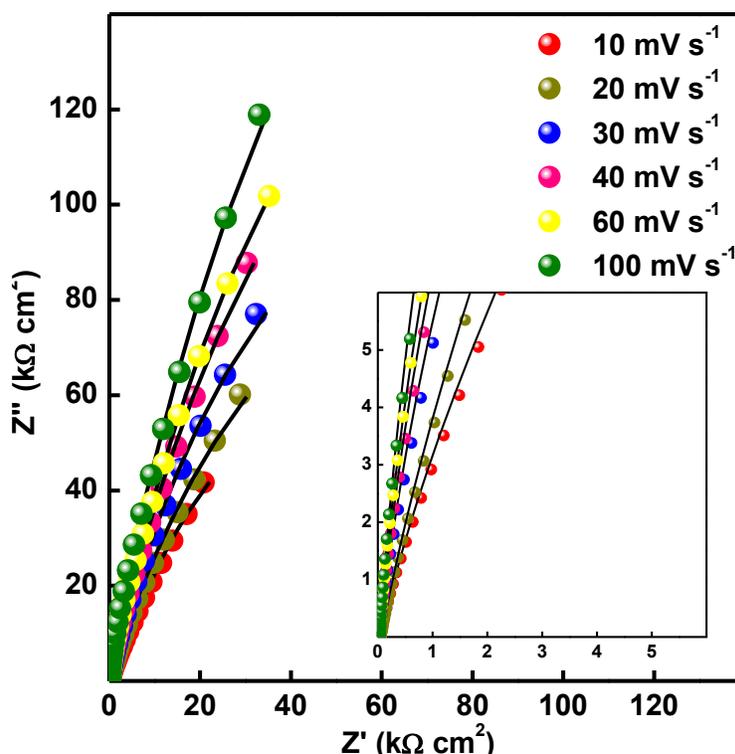
5.3.1. Efeito da Velocidade de Varredura na Construção do Filme de poli(azo-Bismarck Y) Frente ao Molde de Albumina Sérica Humana

É bem conhecido que a velocidade de varredura desempenha um papel fundamental na morfologia e estrutura dos filmes poliméricos, o que é de suma importância na construção de um sensor eletroquímico. Alguns autores relataram que filmes construídos em baixa velocidade de varredura permite a formação de uma superfície mais lisa, compacta e uniforme, já filmes construídos em altas velocidades de varredura obtém características como alta porosidade e irregularidades (GONG et al., 2003; LIU et al., 2011).

Nesta perspectiva, para compreender o efeito da velocidade varredura na etapa de eletropolimerização, os filmes poliméricos molecularmente impresso tiveram a taxa de varredura variada entre 10 a 100 mV s⁻¹. O estudo da espécie ativa para os eletrodos sintetizados em diferentes velocidades de varredura na etapa eletropolimerização foram avaliadas em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) e são apresentados na Figura 14.

De acordo com os espectros de impedância obtidos para os eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em diferentes velocidade de varredura, foi possível verificar similaridade no comportamento dos filmes, onde os filmes construídos em maiores velocidades de varredura 60-100 mV s⁻¹ apresentaram um arco capacitivo com uma angulação de aproximadamente 75°. Os outros filmes apresentaram um arco com uma angulação próxima a 65°. O incremento do arco capacitivo com o aumento da velocidade de varredura na etapa de eletropolimerização, indica uma diferença nos valores de resistência de transferência de carga. Para obtenção dos valores dos parâmetros físico-químicos interfaciais, foram utilizados um modelo de circuito equivalente para descrever o comportamento dos eletrodos modificados. O circuito equivalente descrito para o filme PMI-poli(azo-Bismarck Y) foi utilizado em todas as medidas de EIE apresentadas neste relatório. Os valores obtidos através dos ajustes matemáticos em função dos circuitos equivalentes na Figura 9B estão apresentados na Tabela 5.

Figura 14. Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferentes velocidades de varredura em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) com potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS. Atmosfera de N₂. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.



A partir dos dados obtidos pelo ajuste matemático foi possível calcular o valor de espécie ativa de cada eletrodo modificado em diferentes velocidades de varredura. Para o cálculo de espécie ativa se baseou na equação relatada por Oliveira e colaboradores (2021), em que a espécie ativa (Γ) foi calculada com base na relação $\Gamma = Q / nFA$, onde n é o número de elétrons decorrente do processo redox por unidade de monômero ($n = 2e^-$), F a constante de Faraday (96485,3399 C/mol e^-), A é a área do eletrodo (1,0 cm²) e Q é a carga, equivalente ao valor capacitância aparente (C_{app}), o qual foi calculada a partir dos valores de resistência de transferência de carga do filme (R_{filme}) α e CPE_{dl} pela Equação 5.

$$C_{app} = \frac{(R_{filme} \cdot CPE_{dl})^{1/\alpha}}{R_{filme}} \quad (5)$$

Tabela 5. Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo impedimétrico em solução aquosa de TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) para os diferentes filmes sintetizados com 20 ciclos de potenciais em diferentes velocidades de varredura aplicadas.

Velocidade de Varredura (mV s ⁻¹)	R _{filme} (kΩ cm ²)	CPE _{dc} (μF cm ⁻² s ^{α-1})	α _{dc} (μF cm ⁻² s ^{α-1})	Q (μC)	Γ (nmol cm ⁻²)
10	11,24	47,89	0,7885	40,56	0,210
20	11,76	42,82	0,7995	36,05	0,187
30	12,64	35,15	0,8578	30,72	0,159
40	13,19	23,65	0,9927	23,45	0,122
60	15,14	20,26	0,9323	18,59	0,096
100	18,50	17,84	0,9123	16,04	0,083

Fonte: O autor.

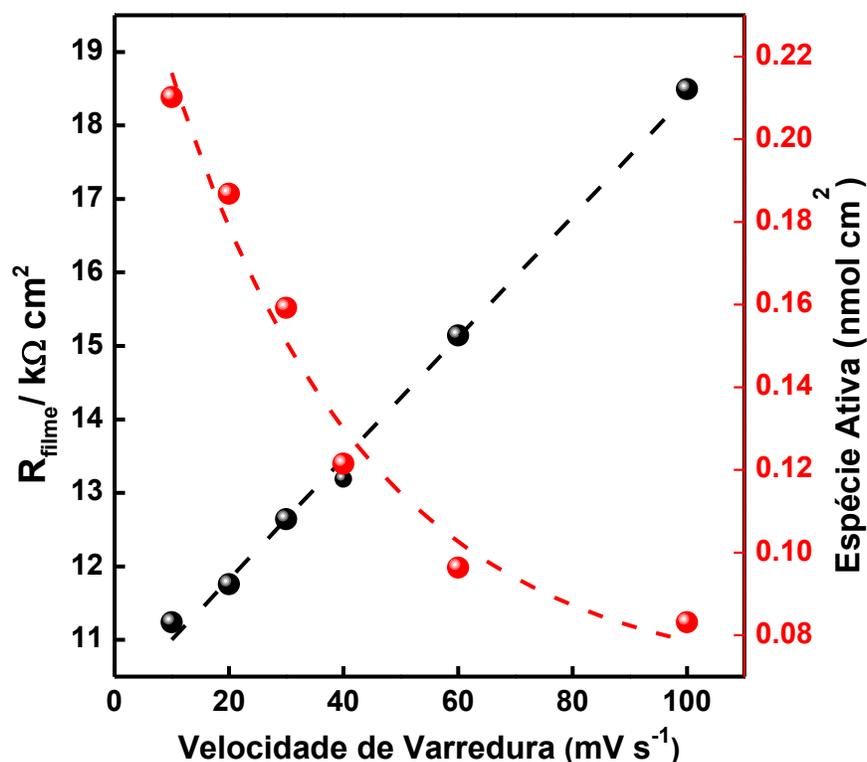
De acordo com os valores de espécie ativa, foi possível notar que filme sintetizados em menores velocidades de varreduras apresentam maior concentração de espécie ativa depositada na superfície do eletrodo. Esse processo é evidenciado por apresentar um maior tempo organização dos cátions radicais formados na etapa de eletropolimerização, permitindo que as espécies se distribuam de forma compacta e uniforme no eletrodo.

Além do mais, os filmes construídos em menores taxa de varredura apresentam valores de resistência de transferência de carga inferior que filmes construídos em maiores velocidades de varreduras (Figura 15). Assim, os menores valor resistivo está associado ao melhor desempenho eletroquímico da plataforma de impressão molecular. Portanto, os filmes poliméricos construídos em menores velocidade de varreduras apresentam uma condutividade eletrônica geral melhor do que filmes construídos em maiores velocidades de varredura.

Um outro fator a ser observado são os valores de α, a qual são utilizados como indicativo da heterogeneidade interfacial do filme polimérico sobre a superfície do eletrodo de FTO (GUPTA; PRICE, 2016; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008a; YOO et al., 2014; RADZUAN; SULONG; SAHARI, 2017). Dessa forma, toda alteração recorrente no filme polimérico, resulta numa deformação da dupla camada elétrica e conseqüentemente na diminuição do valor de α (CÓRDOBA-TORRES, 2015; GUPTA; PRICE, 2016; ARUNKUMAR; PAUL, 2017).

Nesse sentido, verificou-se que filmes construídos em menores velocidades de varredura, apresentam menores valores α_{dc} , indicando uma menor organização estrutural da dupla camada elétrica sobre os filmes formados em maiores velocidades de varredura. Assim, os filmes poliméricos com impressão de moléculas de alto peso molecular, tendem a gerar cavidades maiores e conseqüentemente uma menor organização estrutural na superfície polimérica (RANDRIAMAHAZAKA; ASAKA, 2010; ARUNKUMAR; PAUL, 2017). Portanto, filmes em menores velocidades de varredura apresentam um maior tempo na formação do polímero, gerando mais sítios de ligação e cavidades molecularmente impressas para proteína de ASH, o que resulta em um menor valor de α_{dc} .

Figura 15. Dependência da resistência de transferência de carga em potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS (eixo Y esquerdo - preta) e concentração de espécies ativas (eixo Y direito - vermelha) em função da velocidade de varredura na formação do filme PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH.

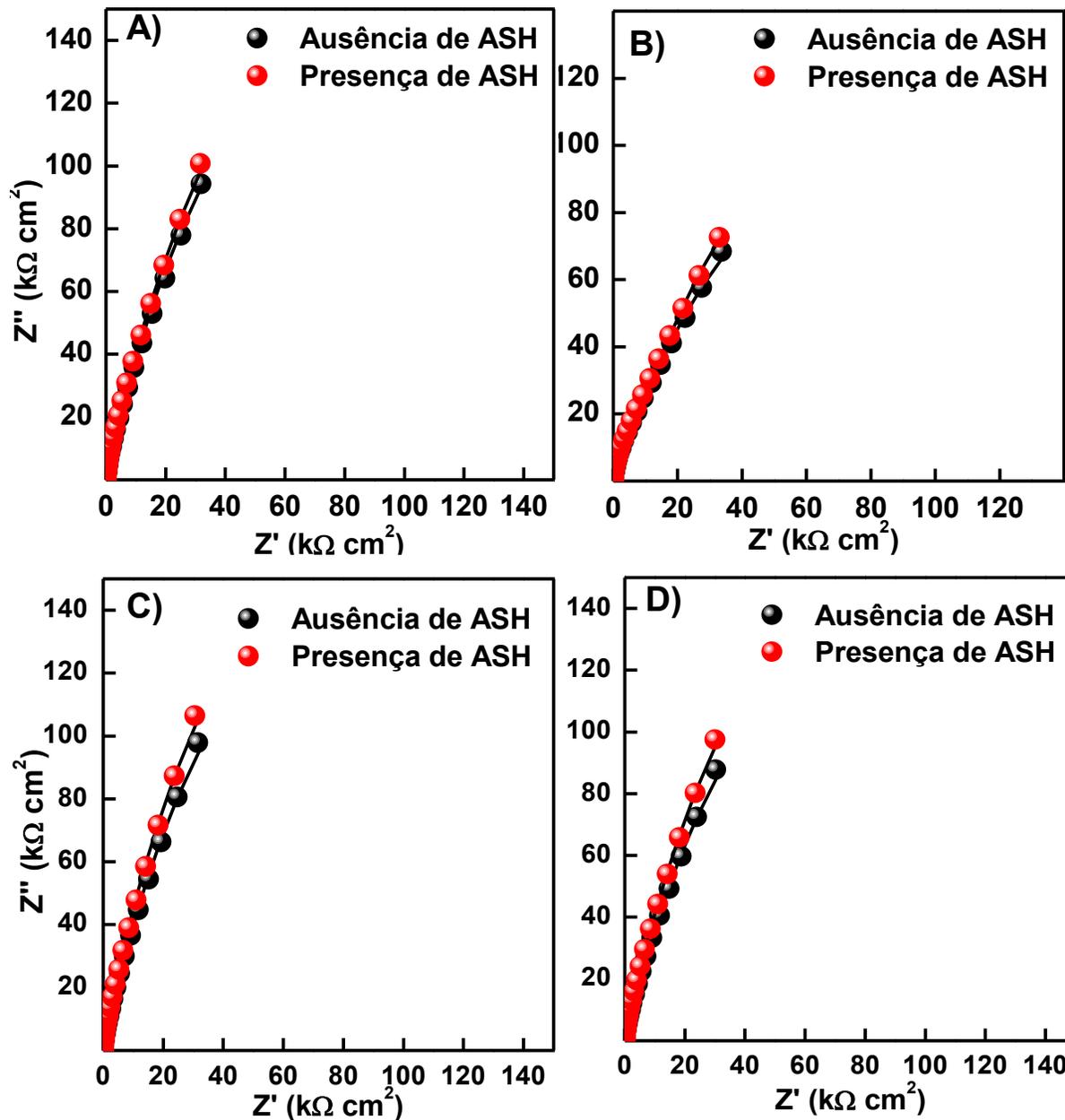


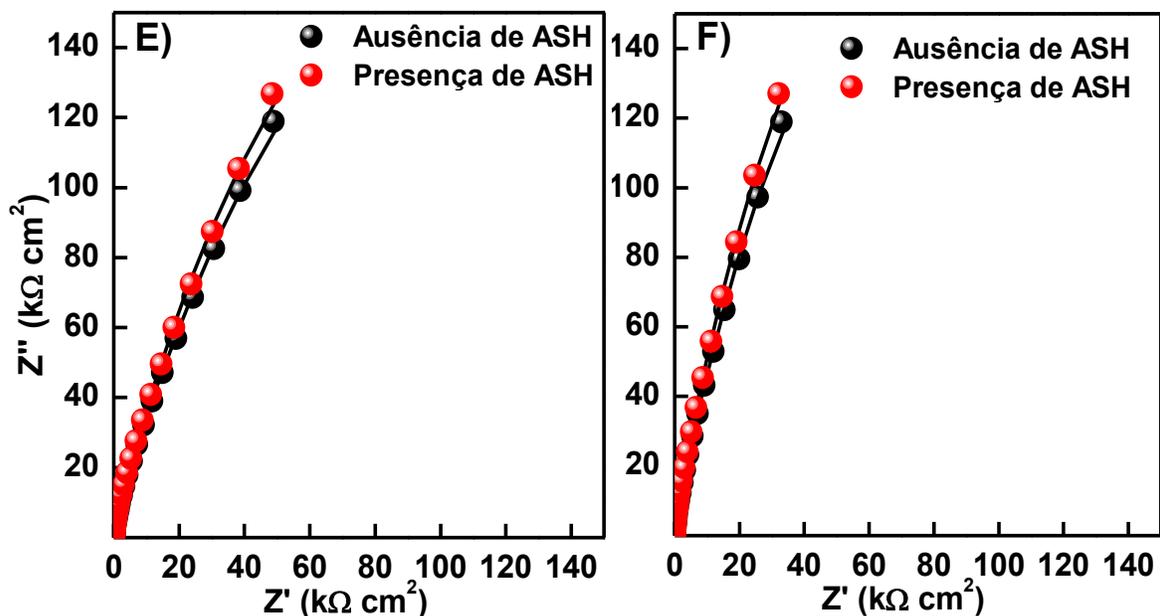
A resposta eletroquímica dos filmes de PMI construídos são dependentes do número de sítios de ligação específicos para a albumina gerados no polímero durante a etapa de eletropolimerização, portanto, maiores velocidades de varredura proporcionam uma menor quantidade de sítios de ligação devido a limitação da difusão dos monômeros de BBY para a superfície do eletrodo (LASIA, 2002; ARUNKUMAR; PAUL, 2017). Assim, há uma concentração menor de cátions radicais formados, afetando o crescimento da cadeia polimérica, resultando em uma menor concentração de sítios ativos no filme e conseqüentemente um menor número de cavidades de ASH geradas na rede polimérica.

Após isso, o desempenho eletroquímico dos dispositivos molecularmente impresso sintetizados em diferentes velocidades de varreduras foram estudados na ausência e na presença de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ASH em solução aquosa TF de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esta abordagem permite compreender a resposta eletroquímica da albumina em função das cavidades formadas na superfície polimérica. A Figura 16 apresenta os espectros obtidos para os eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em diferentes velocidades de varredura na ausência e na presença de ASH.

Figura 16. Espectros de impedância do plano complexo de Nyquist registrados para os eletrodos de FTO/PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,3) formados com 20 ciclos de

potenciais em velocidades de 10 (A), 20 (B), 30 (C), 40 (D), 60 (E) e 100 mV s⁻¹ (F). Potencial fixo de 0,05 V vs ECS na ausência e na presença de 0,5ng mL⁻¹ de ASH em atmosfera de N₂. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz.





Conforme os espectros de Nyquist obtidos para os eletrodos modificados de PMI-poli(azo-Bismark Y) em diferentes velocidades de varredura testados na ausência e na presença da molécula de ASH, foi possível verificar que todos os filmes apresentaram um arco capacitivo com uma angulação de aproximadamente 70° . Os filmes quando testados na presença da molécula molde apresentaram um incremento do arco capacitivo, sinalizando uma alteração nos valores de resistência de transferência de carga a partir da interação entre a molécula molde e suas devidas cavidades e sítios de ligação na rede polimérica (YOO et al., 2014). Nesse sentido, para melhor compreensão dos elementos interfaciais foi realizado o ajuste matemático baseado no circuito equivalente proposto na Figura 9B. Esses valores obtidos estão resumidos na Tabela 6.

Foi verificado através da análise dos valores de resistência de transferência de carga do filme (R_{filme}) e da cavidade (R_{cav}) para os filmes em potencial aplicado de $+0,05 \text{ V}$ (vs. ECS), que houve um aumento dos valores de R_{filme} e R_{cav} com o aumento da velocidade de varredura (Tabela 6). Esse comportamento foi observado tanto para os filmes testados na ausência quanto na presença de ASH.

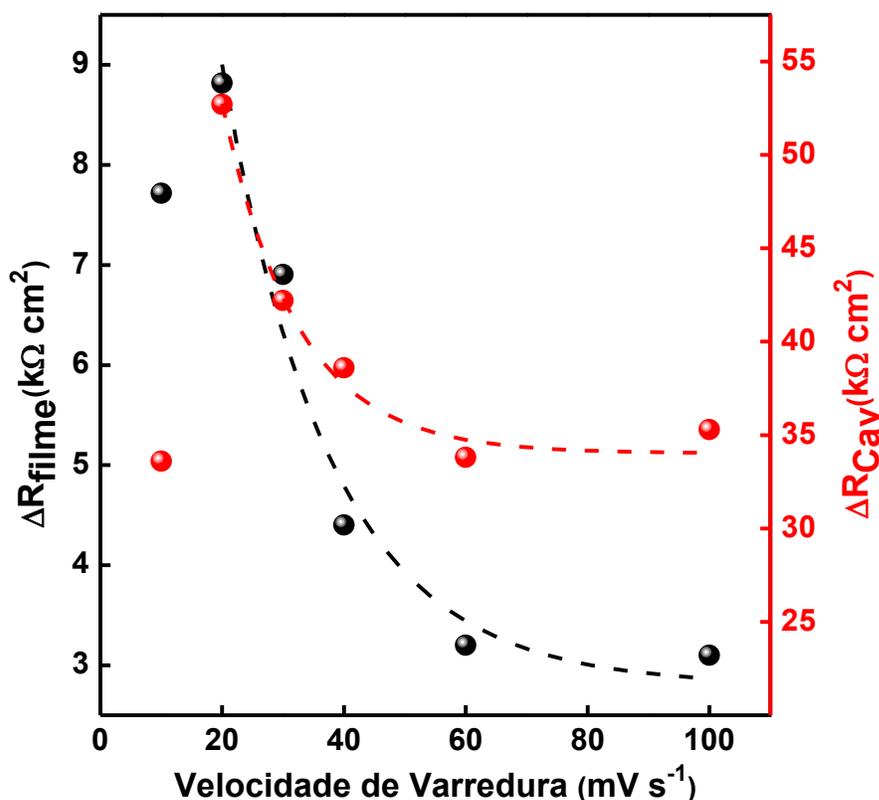
Tabela 6. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes velocidades de varredura baseados nos modelos da Figura 9B. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.

Filmes de poli(azo Bismarck Y)	R_{Ω}	R_{filme}	R_{cav}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{filme}	α_{filme}
	$(k\Omega\text{ cm}^2)$			$(\mu F\text{ cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1})$			
Ausência de ASH							
10	0,278	541,9	3,683	83,05	0,981	14,98	0,921
20	0,280	271,9	7,821	62,86	0,982	19,62	0,932
30	0,275	495,7	8,365	57,77	0,953	14,95	0,931
40	0,265	387,1	11,64	45,43	0,984	17,51	0,924
60	0,282	472,8	18,69	28,20	0,901	12,64	0,945
100	0,277	600,3	14,13	29,73	0,963	13,27	0,932
Presença de ASH							
10	0,272	575,5	11,40	52,46	0,950	15,20	0,877
20	0,273	324,6	16,64	46,44	0,902	21,17	0,893
30	0,268	537,9	15,57	45,86	0,962	16,48	0,882
40	0,269	425,7	16,24	43,46	0,921	16,72	0,902
60	0,276	506,6	22,99	26,63	0,892	12,33	0,925
100	0,279	635,6	17,23	28,82	0,962	12,48	0,892

Além disso, foi verificado uma diminuição significativa dos valores de α_{dc} frente a molécula de ASH, indicando uma alteração na morfologia dos eletrodos (DEOG et al., 2014; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016). Nesta perspectiva, a diminuição do valor de α_{dc} , é devido a difusão da proteína de ASH pela dupla camada elétrica até seus respectivos sítios de ligação, provocando, portanto, uma deformação na dupla camada elétrica e na capacitância do filme (DEOG et al., 2014; MESQUITA; NOGUEIRA, 2015). A incorporação das moléculas de ASH em suas respectivas cavidades impressa na rede polimérica do filme de poli(azo Bismarck Y) aumenta a taxa de transferência de carga do sistema (Figura 17) (BOLAT; TUGCE; ABACI, 2019).

Esse aumento da taxa de transferência de carga após a religação da molécula de ASH sob a superfície do eletrodo modificado pode ser explicado pelas possíveis interações de hidrogênios entre o molde de ASH e o BBY, na quais os grupos aminos e carboxila presente na proteína de ASH são capazes de interagir com o grupo amina do monômero de BBY (BOLAT; TUGCE; ABACI, 2019; QIU et al., 2014). As interações eletrostática e o do empilhamento π - π dos anéis aromáticos do polímero com a proteína, podem auxiliar no aumento da resistência do sistema como um todo, uma vez que se trata de um molécula complexa e com vários sítios de ligação (BOLAT; TUGCE; ABACI, 2019; QIU et al., 2014).

Figura 17. Dependência da R_{filme} (eixo Y esquerdo - preto) e da R_{cav} (eixo Y direito - vermelho) em potencial aplicado de 0,05 (V vs ECS) em função da velocidade de varredura na formação do filme molecularmente impresso de poli(azo-Bismarck Y)-ASH.



Dessa forma, o filme que obteve melhor desempenho eletroquímico foi o de 20 mV s^{-1} , apresentando a maior variação na resposta da R_{filme} e R_{cav} , quando testado na ausência e na presença de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de ASH. Já filmes construídos em velocidade de varredura superior a 20 mV s^{-1} diminuí exponencialmente seu

desempenho eletroquímico. Esse comportamento era esperado, uma vez que a rede polimérica construída em maiores velocidades de varredura é distribuída de forma irregular na superfície do eletrodo, diminuindo exponencialmente o fator de impressão molecular para ASH e conseqüentemente a resposta impedimétrica do sensor.

5.3.2. Efeito da Número de Ciclos na Construção do Filme de poli(azo-Bismarck Y) Frente ao Molde de Albumina Sérica Humana

O número de ciclos de potenciais aplicados na etapa de eletropolimerização é um fator imprescindível na formação de filmes polimérico com impressão molecular em superfície condutoras/ semicondutoras e no desempenho eletroquímico frente a molécula molde. O número de ciclos está intrinsecamente relacionado com a quantidade de matéria eletrodepositada sobre o substrato condutor, influenciando em aspectos físico-químicos e morfológicos do filme polimérico (CYRIAC; SIVASANKARAN; KUMAR, 2018a).

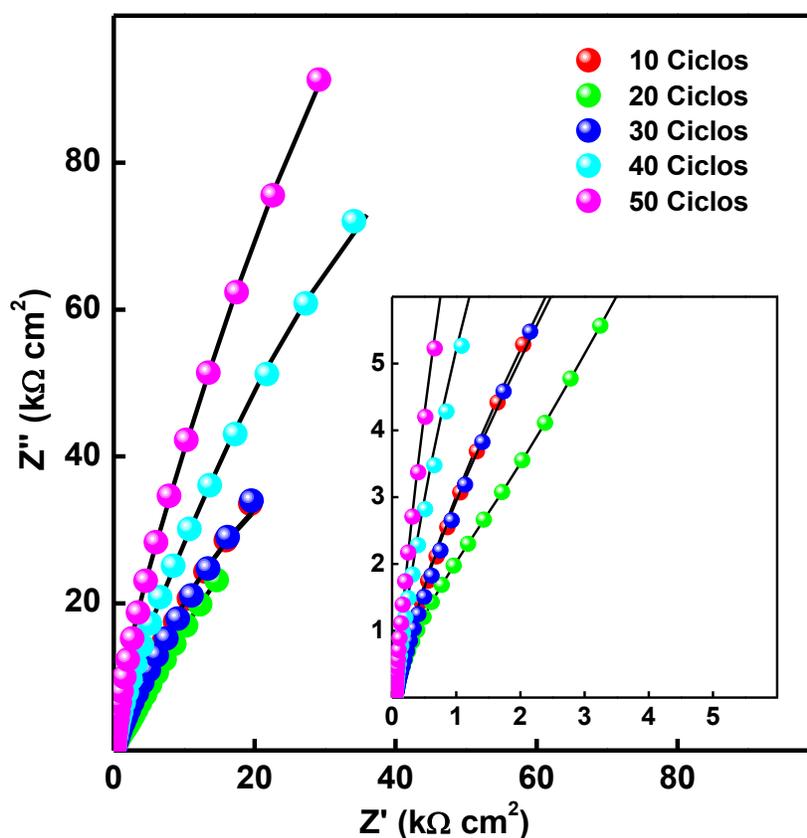
A fim de estudar o efeito do número de ciclos na construção de eletrodos modificado com poli(azo-Bismarck Y) na presença de Albumina Sérica Humana como molde molecular, foi realizada a análise dos filmes formados com 10, 20, 30, 40 e 50 ciclos em uma velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} . O estudo foi realizado através dos filmes formados sobre eletrodos de FTO e investigados pela técnica de EIE em solução TF $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,3).

Conforme os espectros obtidos para os eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) formados em diferentes números de ciclos de potenciais aplicados, foi possível verificar similaridade no comportamento dos filmes, onde todos apresentaram um arco capacitivo com uma angulação de aproximadamente 65° . Foi observado um arco capacitivo de menor magnitude para o filme formado com 20 ciclos, causado pelo efeito de uma matriz polimérica mais condutora.

Em contrapartida, notou que os filmes de 30, 40 e 50 ciclos de potenciais aplicado apresentaram um incremento do arco capacitivo, indicando um

impedimento de transferência de elétrons causado pela proteína de ASH impressa no filme de poli(azo-Bismarck). Já o filme de 10 ciclos teve um arco capacitivo superior ao eletrodo de 20 ciclos, o que está relacionado com a uma quantidade de matéria do polímero condutor depositado. Os parâmetros físico-químicos interfaciais foi obtido a partir dos ajustes matemáticos presente no modelo de circuito equivalente proposto na Figura 9B.

Figura 18. Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferente número de ciclos de potenciais aplicado em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) com potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS. Atmosfera de N₂. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. Inset: magnificação dos espectros de Nyquist.



Foram determinados os valores dos elementos resistivos e capacitivos presentes no circuito equivalente. Conforme a Equação 5, foi possível calcular o valor de espécie eletroquimicamente ativa de cada eletrodo modificado em diferentes números de ciclos. O cálculo de espécie ativa se baseou nos valores de capacitância aparente (C_{app}), o qual foi calculado a partir dos dados de resistência

de transferência de carga do filme (R_{filme}), do elemento de capacitância não ideal (CPE_{dl}) e α como descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo impedimétrico em solução aquosa de TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) para os filmes sintetizados em 20 mV⁻¹ aplicando diferentes ciclos de potenciais.

Número de Ciclos	R_{filme} (k Ω cm ²)	CPE_{dc} ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	α_{dc} ($\mu\text{F cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Q (μC)	Γ (nmol cm ⁻²)
10	119	36,6	0,886	44,3	0,229
20	80,6	48,2	0,862	59,9	0,310
30	125	60,4	0,853	85,37	0,442
40	150	58,6	0,829	91,70	0,475
50	169	56,6	0,759	115,9	0,600

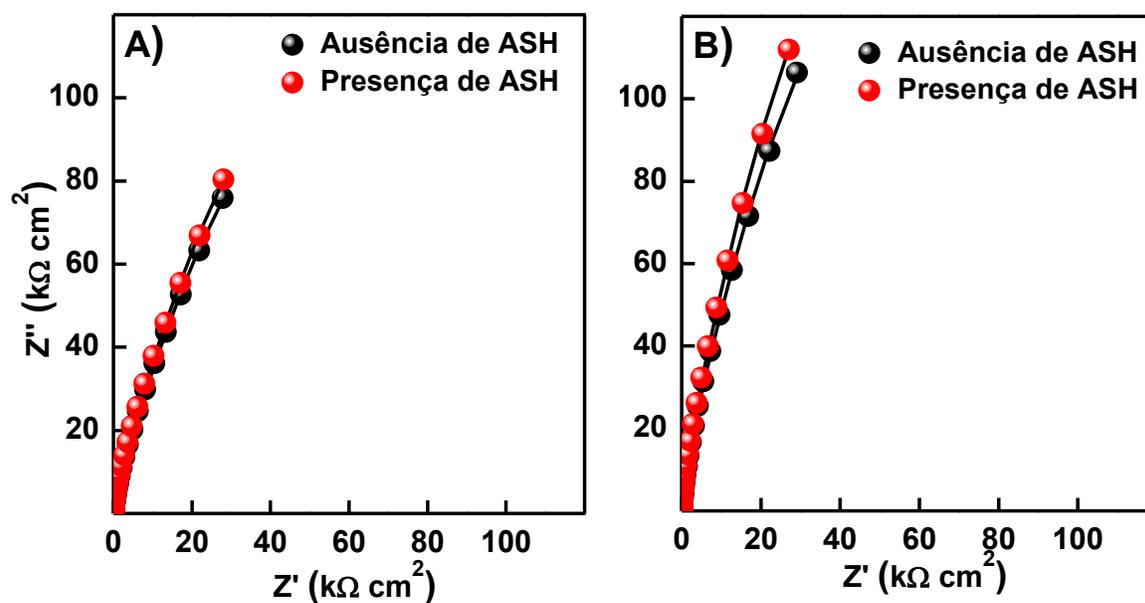
Fonte: O autor.

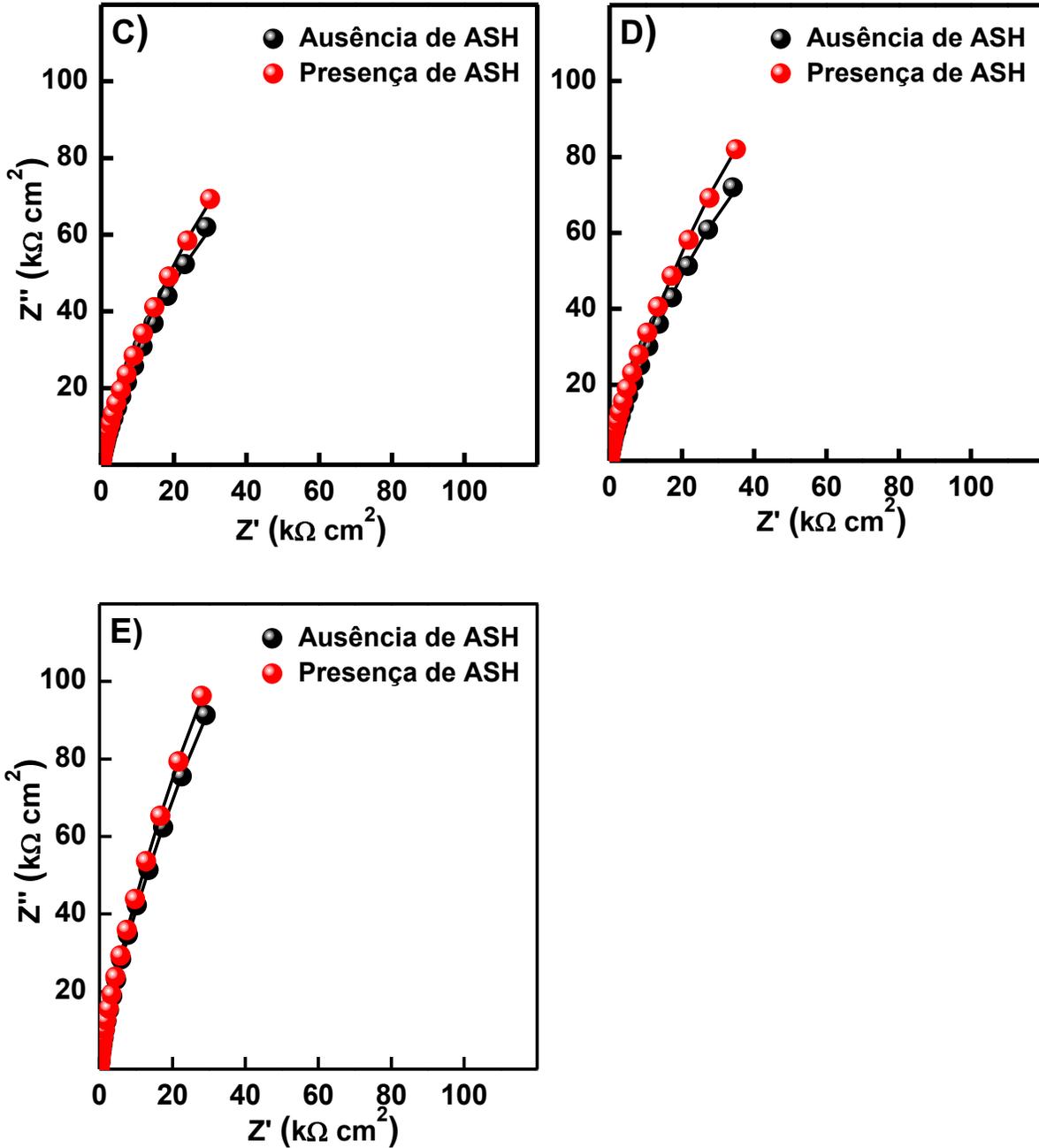
Conforme os valores de espécie ativa, observou que quanto maior o números de ciclos aplicado na formação do poli(azo-Bismarck Y), maior foi a concentração de espécie ativa depositada na superfície do eletrodo. Notou-se um aumento da R_{filme} para os eletrodos de 30, 40 e 50 ciclos. Esse efeito foi relatado por Shayeh e colaboradores (2016) no estudo de polímero condutor baseado em PANI (polianilina), onde o aumento da espessura do filme polimérico influencia diretamente na cinética da reação de redução e oxidação dos grupos azo presentes nas camadas mais interna filme polimérico. Ainda nisso, a presença do molde molecular na matriz polimérica torna desfavorável reação de redox do polímero, uma vez que os aminoácidos livres da albumina devem interagir com toda a molécula de Bismarck Brown Y, aumentando consideravelmente a resistência do sistema.

Ao analisar os dados de capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) e seus respectivos valores de α_{dc} , notou uma diminuição dos valores de CPE_{dc} para os eletrodos de 40 e 50 ciclos. No entanto, não observou alteração no comportamento de α_{dc} com o aumento da espessura dos filmes poliméricos. A diminuição dos valores de CPE_{dc} para os filmes poliméricos de 40 e 50 ciclos é evidenciada pela dificuldade de difusão do contra-íon para os poros internos do filme polimérico.

O desempenho eletroquímico dos filmes de PMI está diretamente relacionado com número de cavidades e sítios de ligação específicos para o molde molecular de ASH gerados na superfície do polímero. Portanto, o estudo do número de ciclo afeta diretamente na quantidade de espécie depositada, e conseqüentemente, das cavidades formadas. Sendo assim, filmes construídos em maiores números de ciclos apresentam uma concentração maior de cátions radicais formados, o que permite uma maior concentração de sítios ativos no filme polimérico. A fim de verificar o comportamento eletroquímico dos eletrodos sintetizado em diferentes números de ciclos foram realizados estudos na ausência e na presença de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de ASH em solução TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Este estudo permite analisar o desempenho eletroquímico dos filmes molecularmente impressos em função das cavidades geradas. Figura 19 contém os espectros de impedância para os eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes número de ciclos frente ao molde molecular no processo de religação (Figura 19).

Figura 19. Espectros de impedância do plano complexo de Nyquist registrados para os eletrodos de FTO/PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,3), filmes formados em 10 (A), 20 (B), 30 (C), 40 (D) e 50(E) ciclos. Potencial fixo de $0,05 \text{ V}$ vs ECS na ausência e na presença de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de ASH em atmosfera e N_2 . Frequência aplicada de 50 kHz a $0,10 \text{ Hz}$.





Conforme os espectros de Nyquist obtidos para os eletrodos modificados de PMI-poli(azo-Bismark Y) em diferentes números de ciclos, foi possível verificar que todos os filmes quando testados na presença da molécula molde apresentaram um pequeno deslocamento do arco capacitivo direcionado para o eixo da impedância imaginária na região de baixa frequência, o que indica alterações nos parâmetros resistivos do sistema (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes números de ciclos baseados no modelo de circuito equivalente proposto na Figura 9B. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.

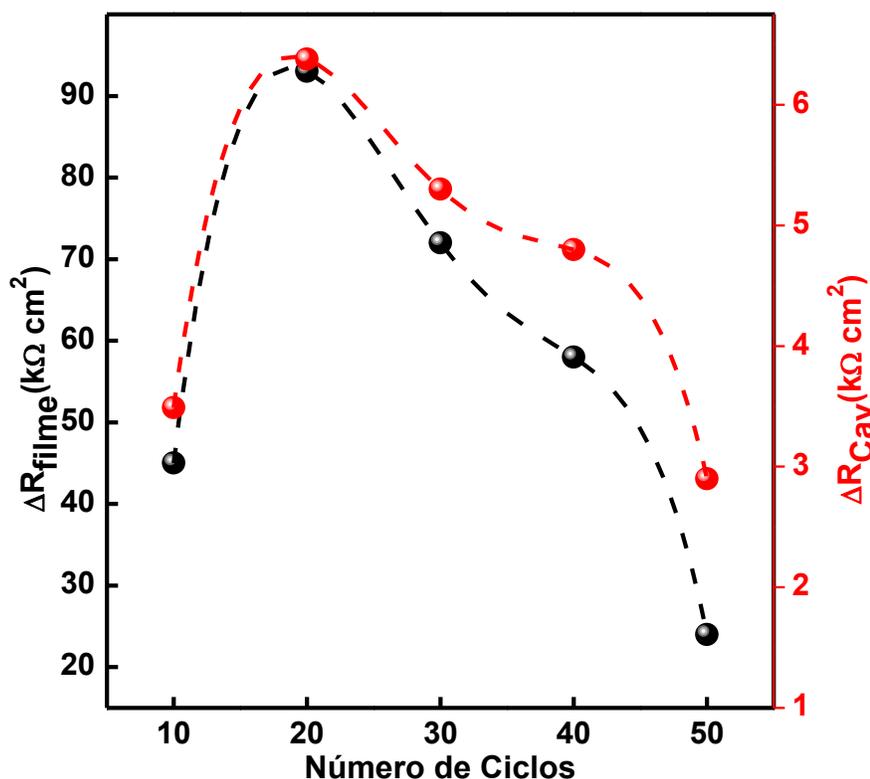
Filmes de poli(azo Bismarck Y)	R_{Ω}	R_{filme}	R_{cav}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{filme}	α_{filme}
	$(k\Omega cm^2)$			$(\mu F cm^{-2} s^{\alpha-1})$			
Ausência de ASH							
10	0,283	368	9,71	19,5	0,96	51,9	0,90
20	0,296	591	9,92	18,7	0,92	55,2	0,90
30	0,278	231	10,3	21,7	0,93	58,1	0,90
40	0,281	247	12,3	15,9	0,92	35,8	0,87
50	0,275	458	16,7	14,6	0,89	34,1	0,86
Presença de ASH							
10	0,285	403	13,2	18,9	0,93	50,7	0,89
20	0,292	684	16,3	18,1	0,92	53,7	0,89
30	0,274	293	15,6	20,3	0,92	55,8	0,89
40	0,275	325	17,1	18,3	0,91	33,9	0,86
50	0,276	482	19,6	16,8	0,88	43,1	0,85

Foram obtidos os valores de resistência de transferência de carga do filme (R_{filme}) e da cavidade (R_{cav}) em potencial aplicado de +0,05 V (vs. ECS), onde todos os eletrodos de PMI tiveram um aumento dos valores de R_{filme} e R_{cav} com o aumento do número de ciclos (Tabela 8). Choi e colaboradores (2022) estudaram o comportamento impedimétrico de um polímero molecularmente impresso na detecção da citocina IL-1 β , em que relataram a influência da proteína no aumento da resistência de transferência carga, especialmente para filmes construídos em menores números de ciclos.

Esse processo é mais expressivo para filmes impressos finos, uma vez que apresentam uma menor concentração do polímero condutor depositado e cavidade com sítios de ligação mais livres no processo de religação. Ainda nisso, impressores moleculares de molde isolantes com alto peso molecular, dificulta a

transferência de elétrons entre as cadeias poliméricas, o que conseqüentemente aumenta a resistência do sistema como um todo.

Figura 20. Dependência da R_{filme} (eixo Y esquerdo - preto) e da R_{cav} (eixo Y direito – vermelho) em potencial aplicado de 0,05 (V vs ECS) em função do número de ciclos de potenciais aplicado na eletropolimerização do filme molecularmente impresso de poli(azo-Bismarck Y)-ASH.



A Figura 20 apresenta a variação da resistência de transferência de carga (R_{filme} e R_{cav}) em função do número de ciclos na detecção da albumina sérica humana. Foi observado que a partir do 20º ciclo de potencial aplicado houve uma diminuição na magnitude do R_{filme} e R_{cav} , em que número de ciclos inferior a 20°, está relacionado com a formação de uma fina camada da membrana polimérica resultando em um número insuficiente de sítios de ligação do PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH, como também cavidades mais propensas à quebra durante a remoção do molde. Por outro lado, números de ciclos superiores a 20° indica a obstrução dos sítios de ligação/ cavidade presentes nas camadas interna do filme polimérico, tornando uma região inativada para o molde molecular, diminuindo o desempenho eletroquímico do sensor molecularmente impresso.

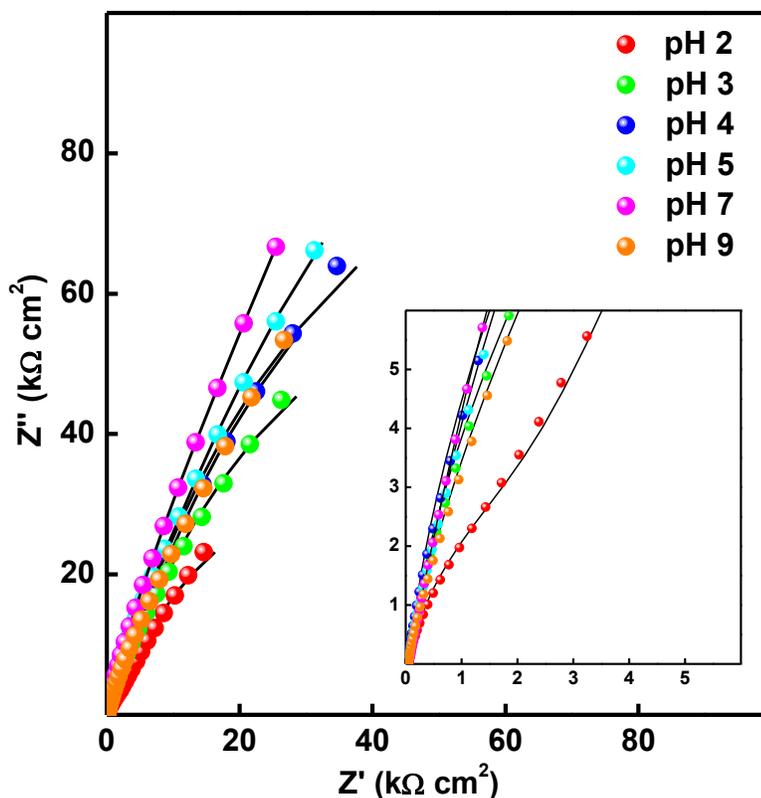
Ainda na Tabela 8, foi analisado os dados de capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) e seus respectivos valores de α_{dc} , o qual notou valores crescentes até o 30° ciclo, e uma diminuição de seus valores de CPE_{dc} para os eletrodos modificados com 40° e 50° ciclos. Esse mesmo comportamento também foi observado para a capacitância do filme (CPE_{filme}). A diminuição dos valores de capacitância está relacionada com o aumento da espessura do filme e das cavidades formadas pelo molde de ASH, o que dificulta o processo de difusão do contra-íon para as camadas internas filme polimérico formado, como também na organização dos íons na superfície do polímero, afetando os dois componentes capacitivos (WANG, 2017).

Portanto, o eletrodo modificado com 20° ciclos de potenciais aplicado foi o que apresentou o melhor desempenho eletroquímico para formação de sítios de reconhecimento molecular no processo de adsorção/religação da albumina sérica humana na superfície do eletrodo.

5.3.3 Efeito do pH na Construção do Filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) Frente ao Molde de Albumina Sérica Humana

O efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na solução de eletropolimerização exerce uma influência direta na formação de filmes poliméricos. No estudo de plataformas sensoriais molecularmente impressas, a concentração de H⁺ da solução de polimerização está diretamente relacionada com a formação do polímero e com tipo de interações intermoleculares entre o monômero e a molécula molde (etapa de complexação). Os estudos do pH no processo de eletropolimerização do monômero de BBY foram realizados em uma solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ utilizando ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de potássio (KOH) para regular os diferentes pH, variando de 2 até 9. O estudo da concentração de espécie ativa para os eletrodos sintetizados em diferentes pH foram realizadas por EIE em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3).

Figura 21. Espectros de plano complexo de Nyquist para os filmes formados em diferentes pH e testados em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) com potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS. Atmosfera de N₂. Frequência aplicada de 50 kHz a 0,10 Hz. Inset: magnificação dos espectros de Nyquist.



Conforme os espectros apresentados na Figura 21, foi possível verificar que todos eletrodos de PMI apresentaram um comportamento de arco capacitivo. Entretanto, o filme polimérico sintetizado em pH 2,0 apresentou um semicírculo indicando uma região de controle cinético (DOMINGUEZ-BENETTON et al., 2012), e uma reta de angulação de aproximadamente 60° na região de controle de transporte de massa (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008e). No entanto, esse comportamento não foi evidenciado para os filmes formados em pH superior a 2,0.

Ainda nisso, os espectros de impedância para os eletrodos modificados com soluções poliméricas de pH 2,0 e 3,0 foram as que apresentaram a menor magnitude do arco capacitivo, indicando um filme polimérico menor resistência de transferência eletrônica. Deste modo, o comportamento eletroquímico dos espectros de impedância é respaldado no cálculo da concentração de espécie ativa (Equação 2) de cada filme polimérico formado em diferentes pH (Tabela 9). Para

realização dos cálculos realizou os ajustes matemáticos aplicando o circuito equivalente proposto na Figura 9B.

Tabela 9. Dados eletroquímicos obtidos a partir do estudo impedimétrico em solução aquosa de TF 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,3) para os filmes sintetizados em 20 mV⁻¹ aplicando diferentes ciclos de potenciais.

Ph	R _{filme} (kΩ cm ²)	CPE _{dc} (μF cm ⁻² s ^{α-1})	α _{dc} (μF cm ⁻² s ^{α-1})	Q (μC)	Γ (nmol cm ⁻²)
2	141	48,6	0.897	60,6	0,314
3	189	44,1	0.896	56,7	0,292
4	227	41,1	0.894	53,5	0,277
5	230	39,9	0.900	51,0	0,264
7	250	30,8	0.891	39,5	0,205
9	220	24,3	0.888	29,5	0,155

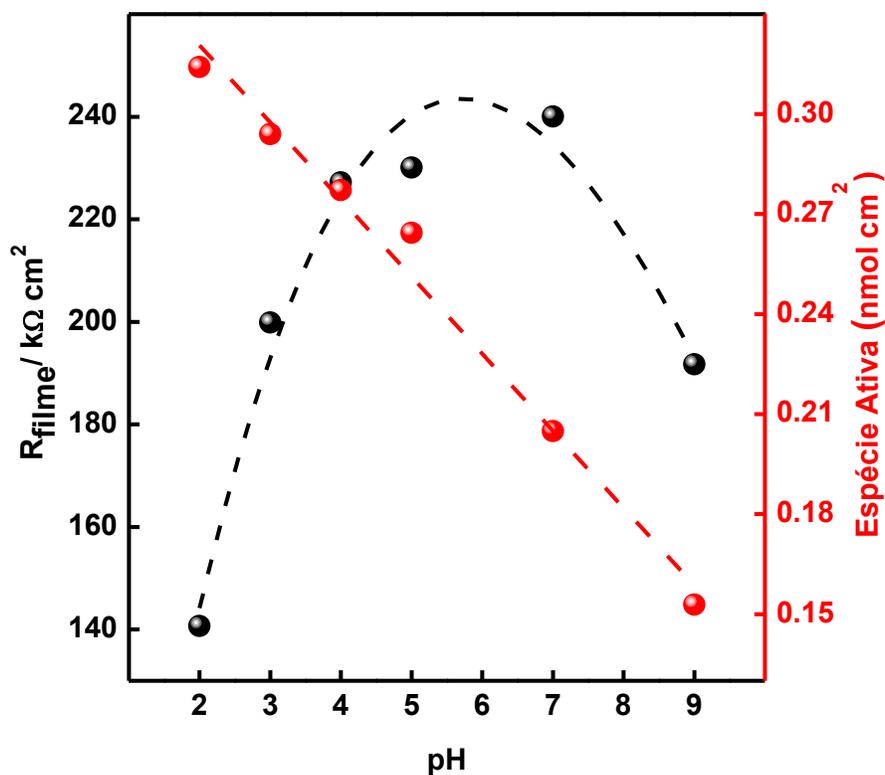
Fonte: O autor.

Foi verificado um aumento dos valores da resistência redox do filme (R_{filme}) até o pH 7,0 com uma pequena diminuição para o filme construído em pH 9,0. Esse comportamento demonstra que o polímero construído em pH 2,0 acumula material eletroativo favorecendo a condutividade eletrônica na cadeia polimérica (NARESH; LEE, 2021; TREVIZAN et al., 2021).

Além disso, foi observada uma diminuição do elemento capacitivo (CPF_{dc}) com o aumento do pH da solução de eletropolimerização. Dessa forma, a capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) está vinculado com o número de espécies eletroativas do polímero depositadas no substrato condutor (WOLFART et al., 2016). Portanto, filmes construídos em pH superiores ocorre uma deposição ineficiente do polímero pela ausência de prótons no meio, o que é respaldado pelo aumento da resistência transferência eletrônica e uma diminuição da capacitância da dupla camada.

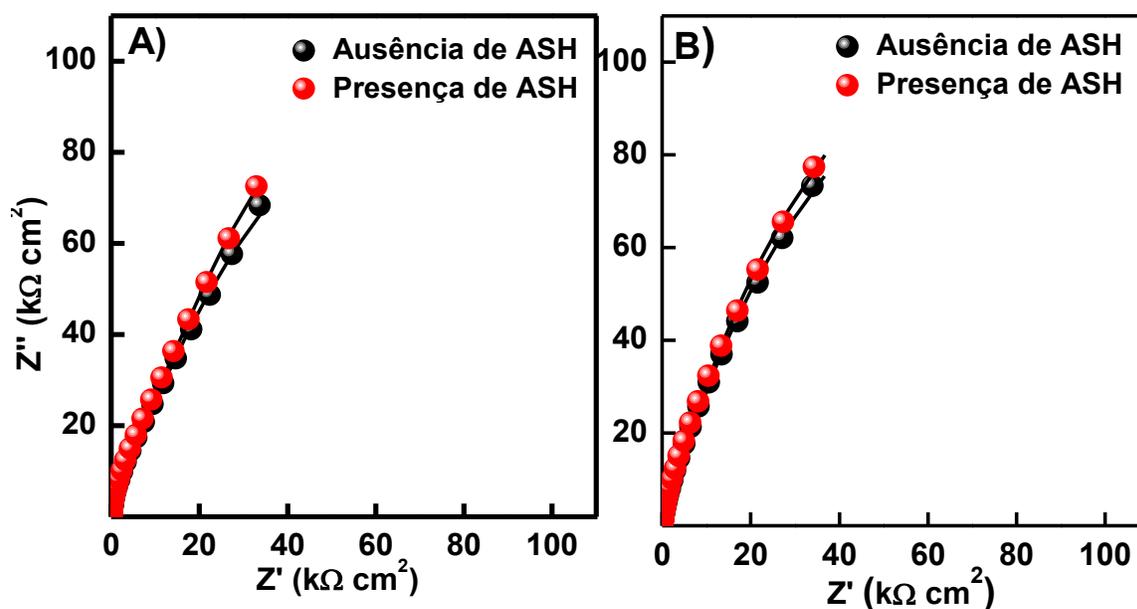
A quantidade de espécie ativa na superfície do eletrodo apresentou uma dependência linear com o logaritmo da concentração de H^+ na solução de polimerização, indicando a influência da quantidade de ácido no meio eletrolítico (Figura 22). Dessa forma, os filmes formados em pH superior a 2,0 apresentam uma menor quantidade de material poli(azo-Bismarck Y) ativo na superfície do eletrodo. Isso porque quando o valor de pH é maior que 2,0 a quantidade de prótons no meio não é suficiente para que ocorra a formação do cátion radical de forma efetiva, dificultando o acoplamento azo para a formação da cadeia polimérica (HWANG; SANTHANAM; LIN, 2001; LI et al., 2002). Nesse sentido, ao analisar a resistência de transferência de carga (R_{filme}), observou um aumento do R_{filme} na medida em que diminuía a concentração de prótons do meio eletrolítico, corroborando com a perspectiva de que filmes baseados em azo polímero necessita de uma alta concentração H^+ na solução de polimerização.

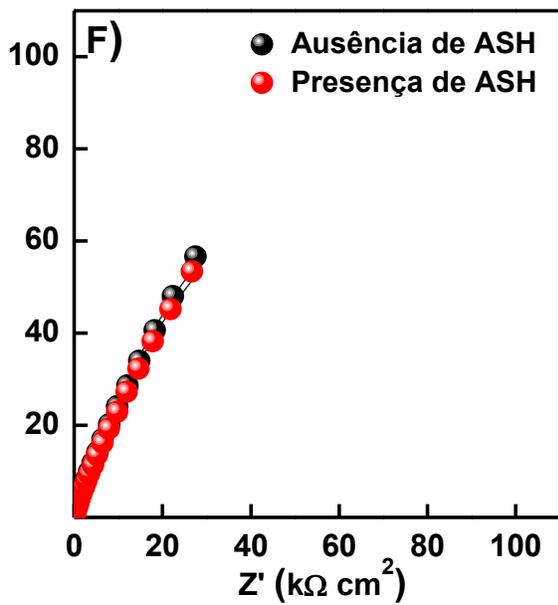
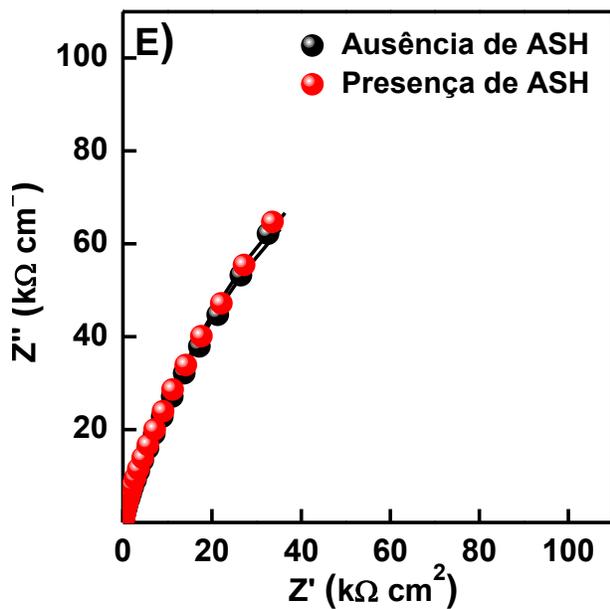
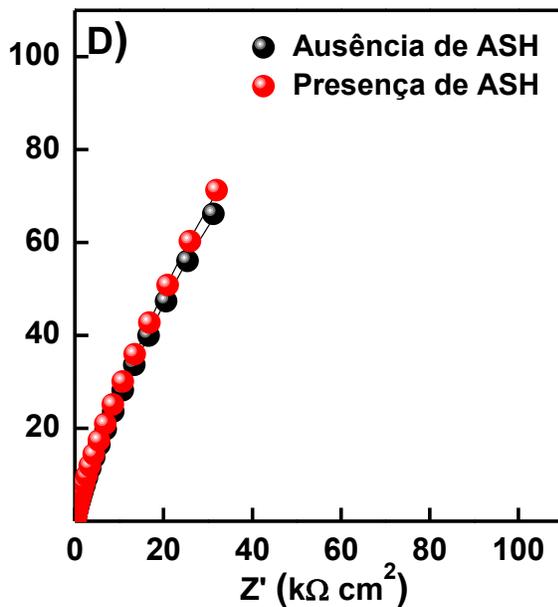
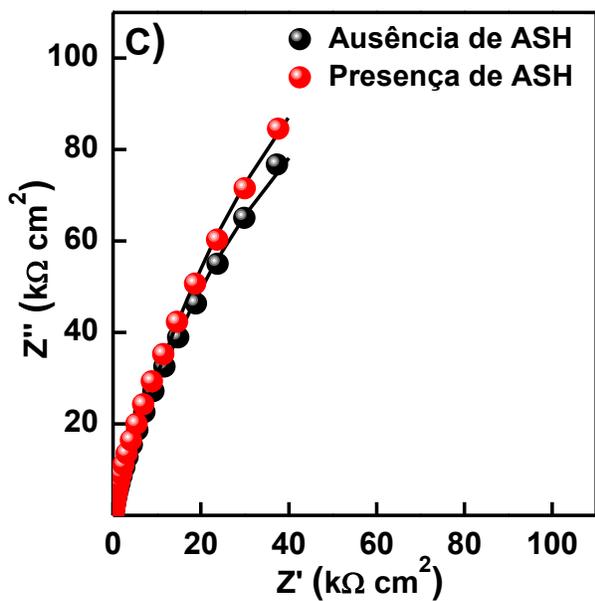
Figura 22. Dependência da resistência de transferência de carga (R_{filme}) em potencial aplicado de +0,05 V vs. ECS (eixo Y esquerdo - preta) e concentração de espécies ativas (eixo Y direito - vermelha) em função do pH na formação do filme PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH.



Por outro lado, para compreender melhor o efeito da concentração de H^+ na formação das cavidades e dos sítios de ligação do molde molecular na etapa de eletropolimerização do monômero de Bismarck Brown Y, foram estudados os espectros de impedância eletroquímica de cada eletrodo de PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH após a remoção e a religação ASH (Figura 23). Pelos espectros de impedância, foi possível notar um aumento sutil no arco capacitivo dos filmes obtidos em meio ácido quando testados na presença de ASH. No entanto, os filmes construídos em pH neutro e básico não apresentaram diferença no arco capacitivo frente a molécula de ASH, indicando a formação insuficiente de cavidades na superfície do eletrodo.

Figura 23. Espectros de impedância do plano complexo de Nyquist registrados para os eletrodos de FTO/PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,3), filmes formados em diferentes pH 2,0 (A); 3,0 (B); 4,0 (C); 5,0 (D); 7,0(E) e 9,0(F). Potencial fixo de $0,05 \text{ V}$ vs ECS na ausência e na presença de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de ASH em atmosfera e N_2 . Frequência aplicada de 50 kHz a $0,10 \text{ Hz}$.





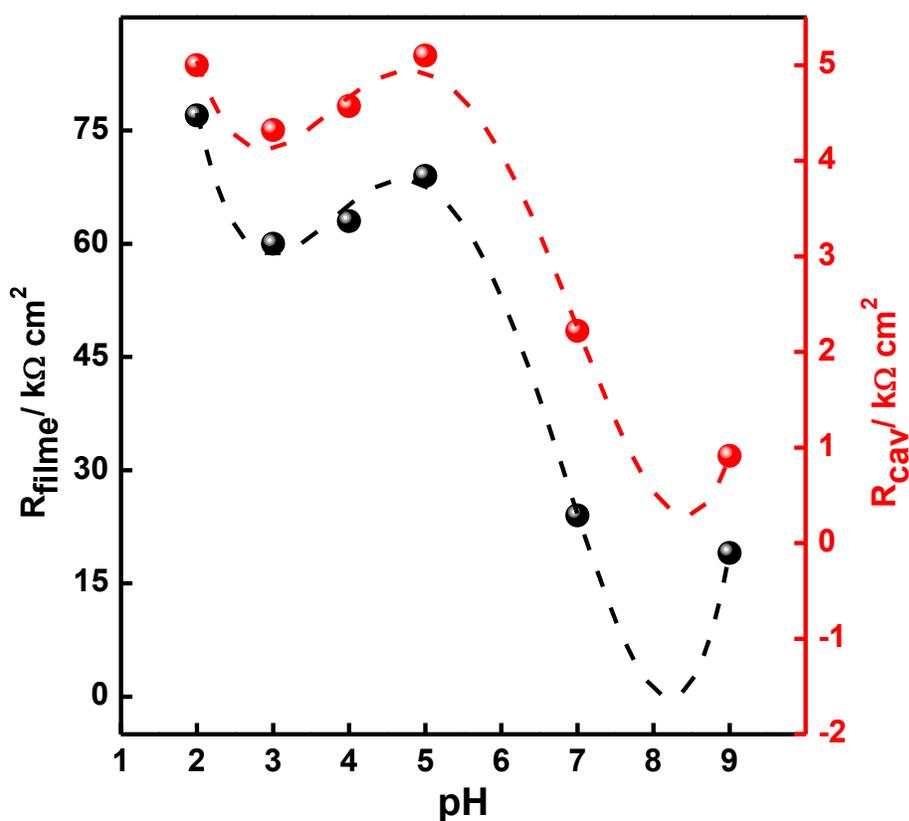
Para alcançar valores quantitativos dos elementos interfaciais resistivos e capacitivos foram realizados ajustes matemáticos para os modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 9B. O modelo de circuito equivalente utilizado contém três elementos resistivos, sendo uma resistência da solução (R_{Ω}), uma resistência de transferência de carga relacionado a interface filme/solução (R_{filme}) e uma resistência de transferência de carga para a interface cavidade/eletrodo relacionada ao comportamento do filme polimérico frente a impressão molecular de cavidades (R_{cav}). Os elementos capacitivos são designados para a capacitância da dupla camada (CPE_{dc}) e capacitância do polímero (CPE_{filme}), sendo este último específico para filmes poliméricos condutores. Para melhor compreensão dos resultados obtidos, os dados foram organizados na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros obtidos através dos ajustes matemáticos dos espectros de Nyquist dos filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) construídos em diferentes pH baseados nos modelos da Figura 9B. Os erros apresentados para os ajustes matemáticos foram menores de 2%.

Filmes de poli(azo Bismarck Y)	R_{Ω}	R_{filme}	R_{cav}	CPE_{dc}	α_{dc}	CPE_{filme}	α_{filme}
pH	(k Ω cm ²)			(μ F cm ⁻² s ^{α-1})			
Ausência de ASH							
2,0	0,298	130	5,90	43,1	0,899	28,2	0,924
3,0	0,285	269	7,28	41,1	0,919	18,1	0,948
4,0	0,310	279	7,93	38,7	0,920	17,2	0,943
5,0	0,288	303	10,5	44,3	0,836	21,1	0,920
7,0	0,283	235	8,98	42,3	0,918	20,2	0,890
9,0	0,296	242	7,69	51,4	0,863	23,7	0,891
Presença de ASH							
2,0	0,292	207	10,9	42,3	0,860	27,1	0,877
3,0	0,280	329	11,6	40,9	0,910	17,3	0,952
4,0	0,305	342	12,5	38,7	0,915	16,2	0,940
5,0	0,269	372	15,6	42,6	0,800	19,8	0,910
7,0	0,289	259	11,2	41,2	0,906	19,5	0,887
9,0	0,292	261	8,60	49,5	0,860	22,4	0,890

A Tabela 10 apresenta os valores de resistência de transferência de carga para os filmes construídos em diferentes pH testados em solução TF a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na ausência de na presença de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ da molécula de ASH. Todos os eletrodos na presença do molde molecular indicaram um aumento da R_{filme} e R_{cav} como esperado pelos espectros de impedância na Figura 23. Esse comportamento foi estudado por Choi e colaboradores (2022), o qual correlaciona o aumento da resistência de transferência de carga com a capacidade de reconhecimento molecular do polímero impresso para o molde molecular. A Figura 23 representa os dados da resistência de transferência de carga referente ao filme e a cavidade em função do pH utilizado na eletropolimerização.

Figura 24. Dependência da R_{filme} (eixo Y esquerdo - preto) e da R_{cav} (eixo Y direito – vermelho) em potencial aplicado de $0,05 \text{ (V vs ECS)}$ do pH na solução de eletropolimerização do filme molecularmente impresso de poli(azo-Bismarck Y)-ASH.



Conforme a Figura 24, o polímero construído em pH 2,0 foi o que apresentou melhor desempenho analítico em função dos elementos resistivos. A ampliação da resposta eletroquímica teve influência direta do pH ácido na formação da matriz polimérica. Esse comportamento, comprova a relação de que quanto maior a concentração de espécie ativa do polímero, maior a quantidade de cavidade e sítios de ligação presentes no interstício da matriz do polímero, aumentando consequentemente a resposta do sensor no pH 2,0.

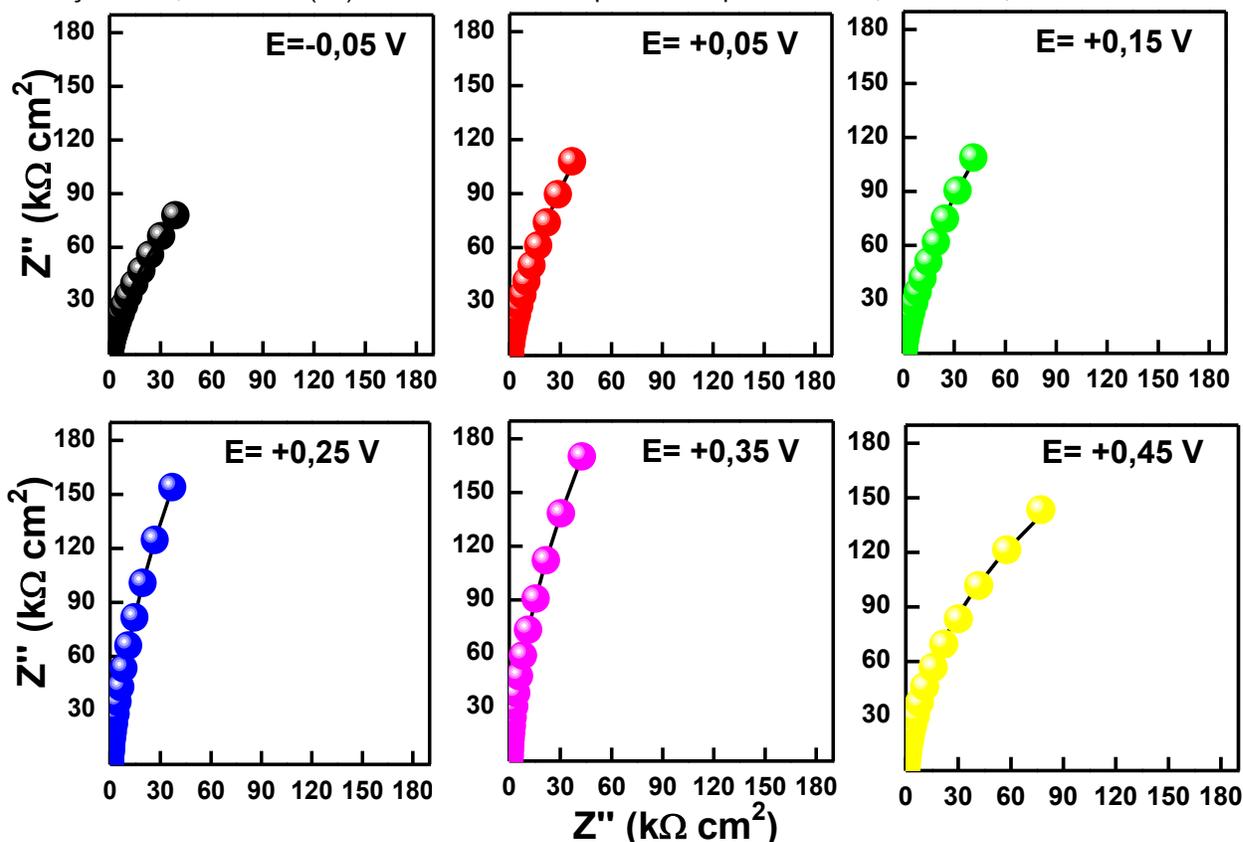
No pH 5,0 observou um aumento da variação resistência redox do polímero e da cavidade. Esse comportamento é relatado pela magnificação das interações eletrostática do polímero com a proteína de ASH, uma vez que o pKa do polímero é de 5,6 (carregado positivamente) e o ponto isoelétrico da proteína é de 4,7 (carregado negativamente) no pH 5,0 (SUN et al., 2022; TREVIZAN et al., 2019) Portanto, o melhor pH a ser utilizada na eletropolimerização do monômero de BBY sobre o eletrodo condutor FTO foi o de 2,0.

5.3.4. Influência do Potencial Aplicado

Para investigação e estudo do desempenho eletroquímico do filme molecularmente impresso, foram realizadas medidas de EIE aplicando diferentes potenciais e correlacionando com o comportamento eletroquímico do filme de PMI-(azo Bismarck Y) estudado por voltametria cíclica (Figura 7). Na Figura 25, pode-se observar os espectros de impedância e as alterações na dimensão do arco capacitivo nos diferentes potenciais aplicados.

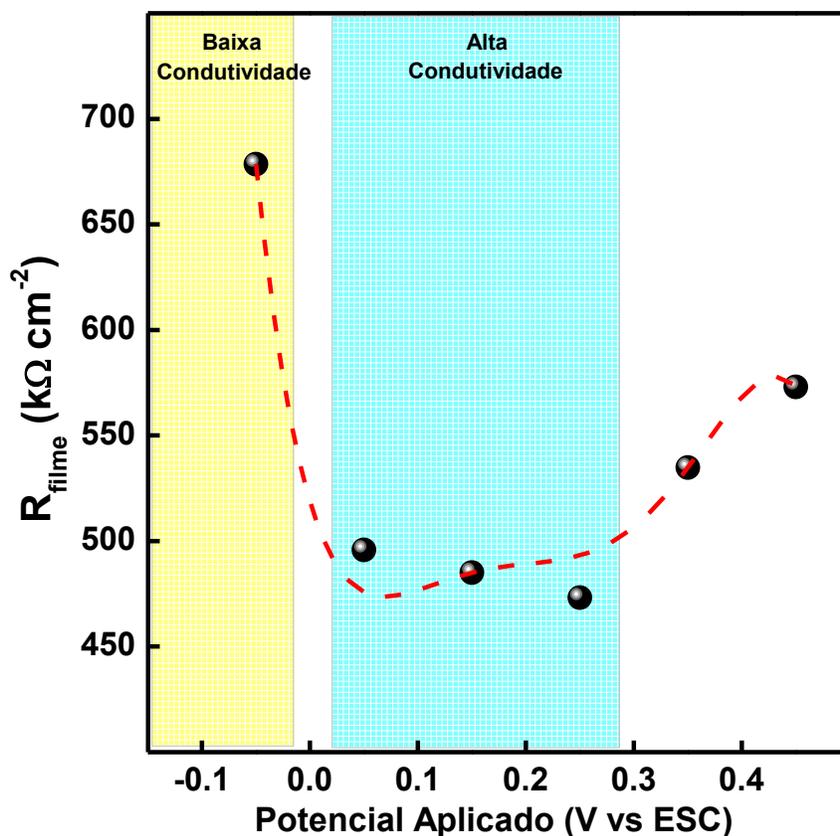
O circuito equivalente proposto para obtenção dos dados quantitativos foi apresentado na Figura 9B, onde o mesmo circuito foi usado para modelar o comportamento do sistema em diferentes potenciais. O circuito elétrico contém três elementos de resistência, sendo uma resistência da solução (R_{Ω}), uma resistência de transferência de carga da interface filme/solução (R_{filme}) e uma resistência de transferência de carga atribuída a interface cavidade/solução para filme de PMI-poli(azo Bismarck Y).

Figura 25. Espectros de Nyquist da resposta eletroquímica do filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução TF 0,10 mol L⁻¹ (N₂) em um intervalo de potencial aplicado de -0,05 V to +0,45 V vs. ECS.



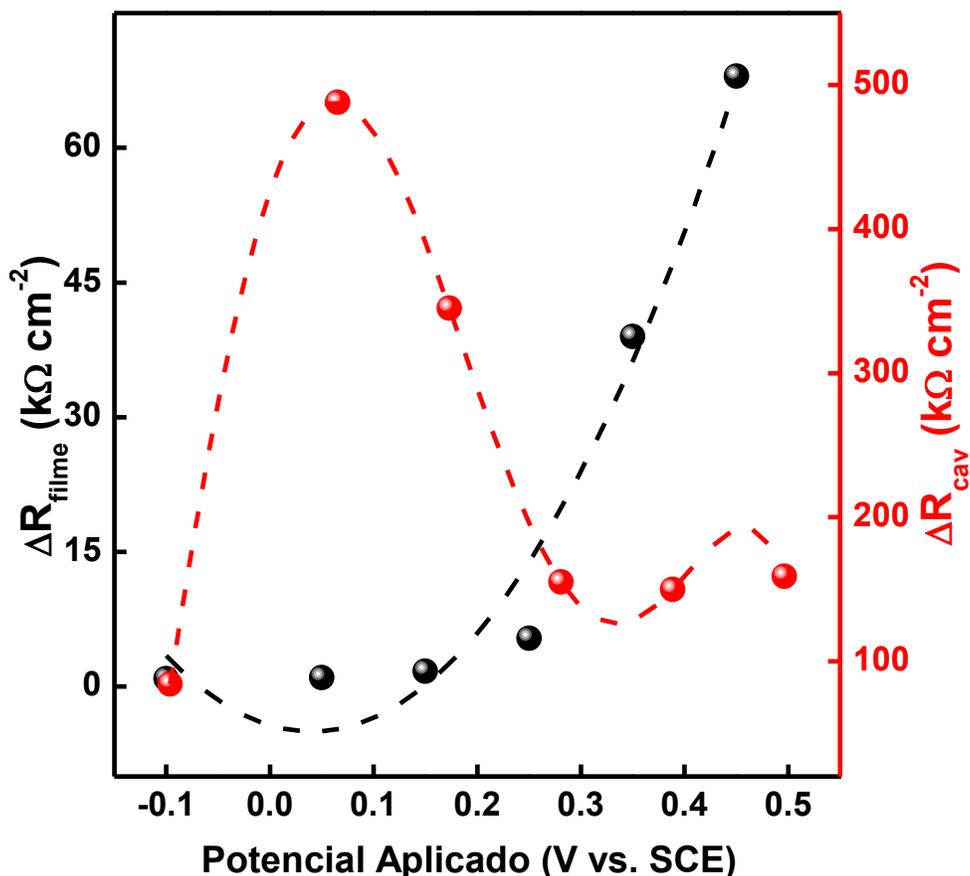
A Figura 26 apresenta os valores da R_{filme} em solução TF a 0,1 mol L⁻¹ em função da variação do potencial aplicado. No primeiro instante, analisou o potencial de -0,05 V, abrangendo a região de baixa condutividade (PAULSEN; FRISBIE, 2012; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2022). Nesse potencial, a rede polimérica se encontra totalmente reduzida. Nessa conformação, o filme PMI-poli(azo Bismarck Y) tem sua π -conjugação azo interrompida devido a a formação das hidrazinas pelo processo de redução.

Figura 26. Valores de R_{filme} do eletrodo de PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH em função do potencial aplicado em solução aquosa de TF 0,10 mol L⁻¹.



Analisando a região de alta condutividade no intervalo de 0,05 até 0,25 V, notou-se um baixo valor de R_{filme} , justamente por ser a região em que ocorre os processos redox do filme polimérico. No potencial de 0,25 V inicia o processo de oxidação do polímero, onde estrutura azo volta com sua π -conjugação, aumentando a transferência eletrônica e corroborando com o menor valor de resistência transferência de carga (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016; TREVIZAN et al., 2021). Após verificar o desempenho eletroquímico do filme molecularmente impresso, foi analisado a resposta sensorial frente a variação do potencial aplicado. Para melhor compressão dos dados, se baseou-se nos elementos de resistência de transferência de carga e de capacitância redox.

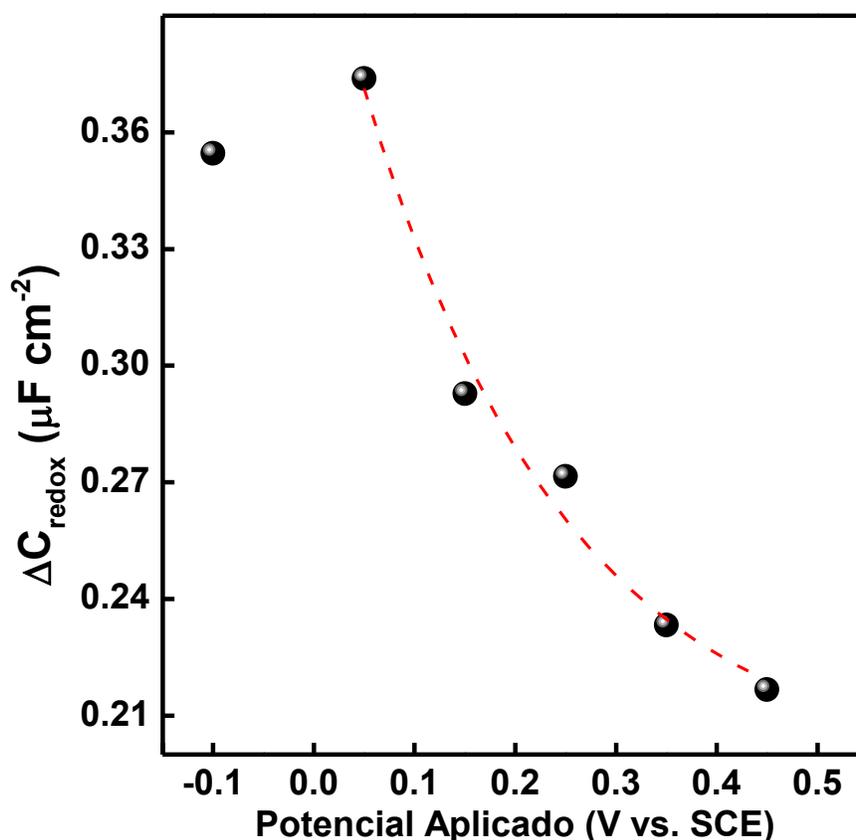
Figura 27. Gráfico da dependência do ΔR_{filme} (eixo Y esquerdo - preto) e da ΔR_{cav} (eixo Y direito - vermelho) em função do potencial aplicado do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução de STF 0,10 mol L⁻¹.



A Figura 27 apresenta os valores de ΔR_{filme} e ΔR_{cav} obtidos a partir dos testes feitos na ausência e na presença de AHS. O gráfico obtido demonstrou um aumento exponencial do ΔR_{filme} à medida em que o filme foi oxidado. Esse fenômeno atípico é evidenciado em filmes molecularmente impresso por biomoléculas, onde o alto peso molecular e os diferentes sítios de ligação interferem na π -conjugação do polímero, o que causa um aumento da resistência de transferência de carga (RANDRIAMAHAZAKA; ASAKA, 2010; ARUNKUMAR; PAUL, 2017; TREVIZAN et al., 2021). Por outro lado, analisando a resposta da segunda resistência relacionada no preenchimento da cavidade, notou-se um aumento da resistência até o potencial de +0,05 V e posteriormente uma diminuição dos valores de ΔR_{cav} para os potenciais subsequentes.

No potencial de +0,05 V o polímero tem sua conformação azo parcialmente reduzida em hidrazina. Essa ausência de ligações duplas da hidrazina torna o filme polimérico mais flexível, o que facilita o processo religação entre ASH e cavidade. Nos potenciais de oxidação nota-se uma resposta inferior, devido a formação de um filme π -conjugado com ligações mais curtas e mais rígidas (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016; OLEAN-OLIVEIRA et al., 2022). Essa configuração dificulta a menor mobilidade da molécula de ASH nos interstícios polimérico, tendo uma menor interação com o elemento de resistivo associado a cavidade.

Figura 28. Gráfico da dependência da ΔC_{redox} em função do potencial aplicado do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em solução de STF 0,10 mol L⁻¹.



Afim de compreender melhor o processo relacionado ao preenchimento de cavidade, foi analisado os dados por capacitância redox no processo adsorptivo da albumina. As Figura 28 representam os valores de ΔC_{redox} , em função do potencial aplicado para o eletrodo PMI-poli(azo-Bismarck Y). Os dados obtidos através da capacitância complexa indicam que processo de religação da ASH é mais expressivo nos potenciais de redução devido corroborando com os dados ΔR_{cav} . Foi observado também uma diminuição exponencial a medida em que a ligação azo se formava na rede polimérica. Sendo assim, o potencial de 0,05 V foi escolhido para dar continuação das investigações devido ao seu melhor desempenho eletroquímico.

5.4. Caracterização Espectroscópica e Morfológica

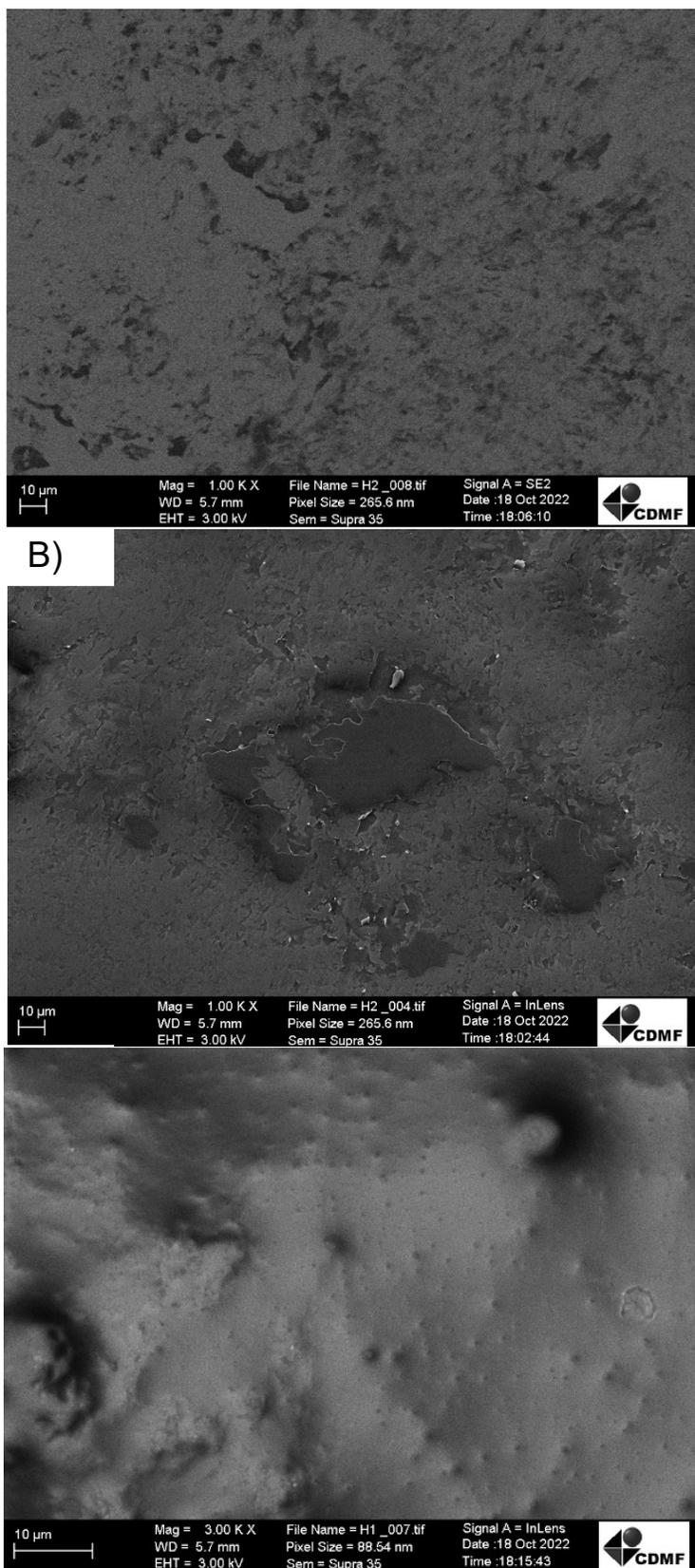
5.4.1. Caracterização Morfológica por Microscopia de Eletrônica de Varredura

Para investigar a morfologia dos materiais modificados, medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para obtenção das imagens e caracterização das superfícies poliméricas. Ao decorrer das análises buscou um comparativo entre o eletrodo sem modificação e os eletrodos PMI e PNI. O objetivo da análise morfológica, era levantar indícios que corroborassem com a proposta de um filme molecularmente impresso formado através da técnica de eletropolimerização.

Baseado na Figura 29A, observou que o eletrodo de FTO sem modificação apresentou um relevo liso e com pequenas falhas estruturais na deposição do óxido de flúor. No entanto, para os eletrodos eletropolimerizados, foi possível notar diferenças morfológicas quando comparada com eletrodo de FTO sem modificação, inferindo a formação da rede polimérica e sua aderência na superfície do eletrodo. Além disso, os eletrodos de PMI e PNI apresentaram superfícies poliméricas uniformes e homogêneas (TREVIZAN et al., 2021; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016). Tal morfologia foi atribuída a característica intrínseca dos filmes de poli-(azo-Bismarck Y).

Na Figura 29B notou-se a formação de placas homogêneas na superfície do eletrodo MIP, sendo um indicativo da presença de albumina na rede polimérica, uma vez que as imagens foram obtidas do eletrodo ainda sem extrair a albumina das cavidades. Já para o eletrodo de PNI (Figura 29C), foi observado a presença de aglomerados pontuais em toda a superfície do sensor, com pequenas irregularidades.

Figura 29. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do eletrodo de FTO sem modificação (A), dos eletrodos de PMI-poli(azo-Bismarck Y) (B) e PNI-poli(azo-Bismarck Y).

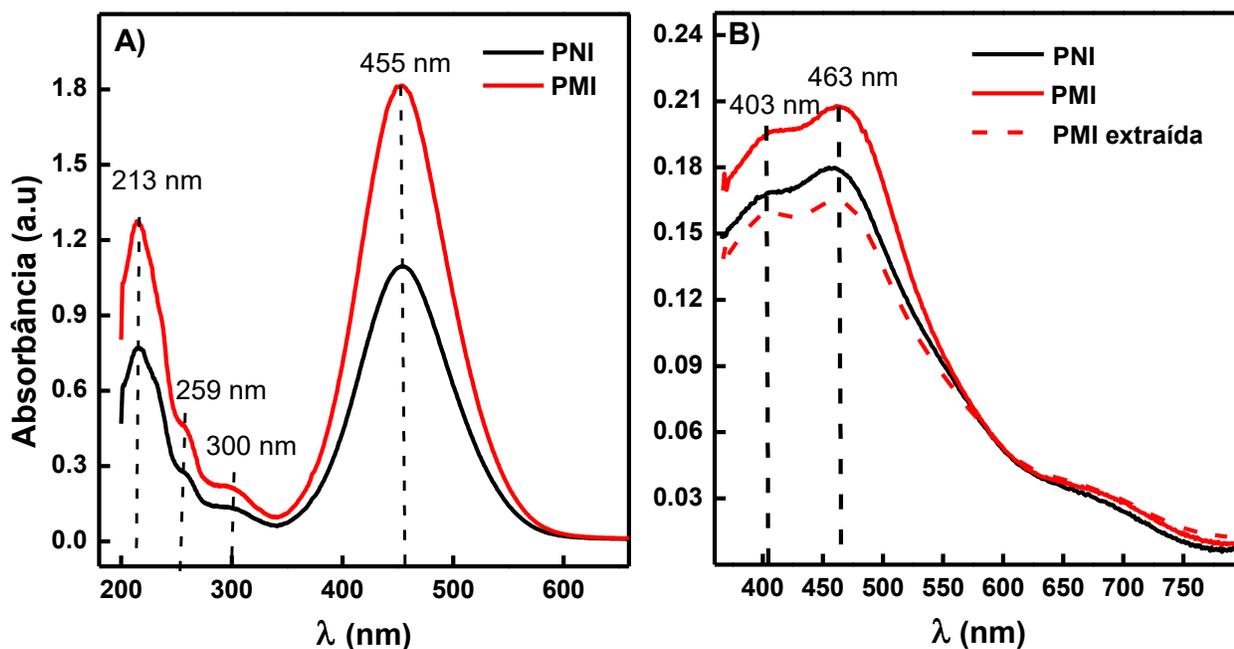


Portanto, as imagens de MEV corroboram com a proposta de eletrossíntese de filme polimérico com impressão molecular para biomoléculas e com os dados obtidos da caracterização por ECE, uma vez que a adição do molde molecular no mesmo monômero, ocasionou alterações em suas morfologias.

5.4.2. Caracterização por Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-Vis)

O comportamento óptico das soluções e dos filmes finos baseado no poly(azo-Bismarck Y) tiveram suas propriedades investigadas pela espectroscopia de absorção no UV-Vis. Na Figura 30A são mostrados os espectros de UV-Vis para a solução do monômero Bismarck Brown Y na presença e na ausência do molde molecular de ASH, em que foi evidenciado duas bandas de absorção na região de 213 nm e 455 nm (TAN et al., 2007; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016). A primeira banda de absorção está associada com a forma trans do monômero, enquanto a segunda banda está relacionada com a forma cis do grupo azobenzeno, sendo esta a forma predominante do monômero em solução.

Figura 30. Espectros de absorção no UV-Vis para os filmes de PMI-poli(azo-Bismarck Y) e PNI-poli(azo Bismarck Y) sobre eletrodo de FTO.



Notou-se um aumento na intensidade no pico de absorção para a solução contendo a proteína de ASH, devido a presença de aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina e também pela albumina estar auxiliando no processo de ressonância do polímero a partir da interação entre monômero-molde (JAHANBAN-ESFAHLAN et al., 2022).

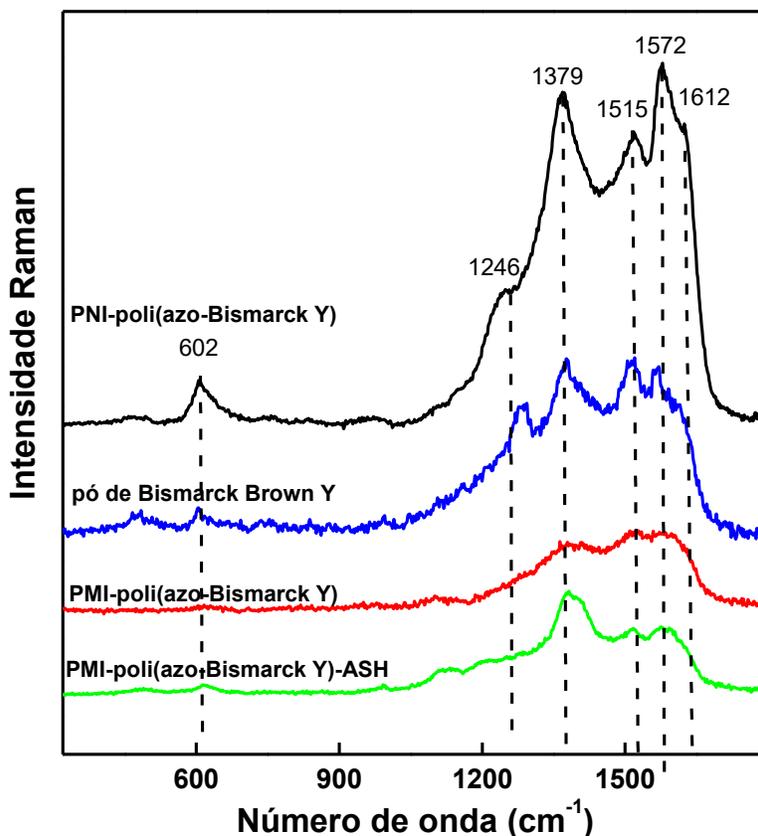
Analisando os espectros de UV-vis da Figura 30B para o PNI-poli(azo-Bismarck Y), PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH, e PMI-poli(azo-Bismarck Y) extraído, foi observado um desdobramento da banda de 455nm (presente na solução) em: 403 nm (transições π - π^*) e em 463nm (transições n - π^*) do polímero de BBY formado na superfície de FTO (TAN et al., 2007; MERINO; RIBAGORDA, 2012). Além disso, o filme PMI após a etapa de extração apresentou uma diminuição da absorvância do sistema, indicando a influência da albumina da absorvância molar do filme polimérico quando comparado com o filme PNI. No entanto, uma melhor definição entre as bandas 403 a 463 nm foi observado para o filme de PMI-poli(azo-Bismarck Y) extraído. Isso sugere que após a extração, a estrutura do polímero BBY é mantida.

O início da absorção na região de 600 nm está relacionado com a transição do orbital n - π^* do grupo azo (KIBENA et al., 2012). Já em banda de região de comprimentos de ondas mais longos é evidenciado a absorção em 700nm relacionado com estado polarônico do polímero (MERINO; RIBAGORDA, 2012; TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016). As propriedades espectrais observadas indicam a formação de fortes interações intermoleculares em todos os filmes poliméricos sintetizados. Dito isso, o isômero cis do polímero permite uma influência do fator de ressonância no sistema π -conjugado, o que torna a conformação cis mais condutora (TEIXEIRA; BARSAN; BRETT, 2016).

5.4.3. Caracterização por Espectroscopia de Espalhamento Raman

A especiação química da superfície do sensor molecularmente impresso foi investigada pela Espectroscopia Raman. O estudo se baseou na caracterização estrutural dos eletrodos de PNI-poli(azo-Bismarck Y), PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH antes da extração e de PMI-poli(azo-Bismarck Y) após a extração. Para fins de comparação foi obtido também o espectro Raman do pó de Bismarck Brown Y. Na Figura 31 foi apresentado os espectros dos eletrodos estudados, em que todos os materiais apresentaram bandas semelhantes ao pó de Bismarck Brown Y, comprovando o processo de deposição do polímero na superfície do substrato condutor de FTO.

Figura 31. Espectros de espalhamento Raman dos filmes PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH (verde) PMI-poli(azo-Bismarck Y) (vermelho), PNI-poli(azo-Bismarck Y) (preto) e do pó de BBY(azul) Intervalo espectral de 300 a 1700 cm^{-1} . Laser de excitação 514 nm.



As bandas características do Bismarck Brown Y em 1379 cm^{-1} (C–C *stretching*), 1515 cm^{-1} (N=N *cis* azobenzene), 1572 cm^{-1} (R–C–C *stretching*) (R = anel benzênico) foram observadas em todos os espectros Raman (EDWARDS, et al., 2022). No entanto, apenas os eletrodos PMI-poli(azo-Bismarck Y) sem o molde e PNI-poli(azo-Bismarck Y) apresentaram a banda em 602 cm^{-1} , a qual é atribuída a torção CNNC, e associado a isomeria *cis* azobenzene (EDWARDS, et al., 2022). Esses resultados corroboram com os dados de UV-vis, confirmando a formação do filme polímero molecularmente impresso utilizando a eletropolimerização como método de síntese.

Ainda, a banda em 1278 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C–N e comparada ao pó de Bismarck Brown Y, foi observada com deslocamento para 1196 cm^{-1} para o eletrodo PMI-poli(azo-Bismarck Y) extraída e para 1246 cm^{-1} para o eletrodo PNI-poli(azo-Bismarck Y) (EDWARDS, et al., 2022). A ausência de picos nessas regiões para o filme PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH sem extrair, fornece indícios que a interação da albumina com o polímero acontece através dos grupos nitrogenados mais interno.

A presença do molde molecular na rede polimérica provoca deformação, dificultando as vibrações do polímero nessas regiões do espectro de Raman. Por fim, foi observado um ombro em 1612 cm^{-1} em todos os espectros, o qual está associado ao NH_2 *scissoring* (EDWARDS, et al., 2022). No filme PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH sem extrair, notou-se uma baixa intensidade da banda em 1612 cm^{-1} , o que provavelmente indica deformações realizadas pelo molde molecular quando interagido com o filme polimérico.

5.5. Estudos dos parâmetros em solução aquosa

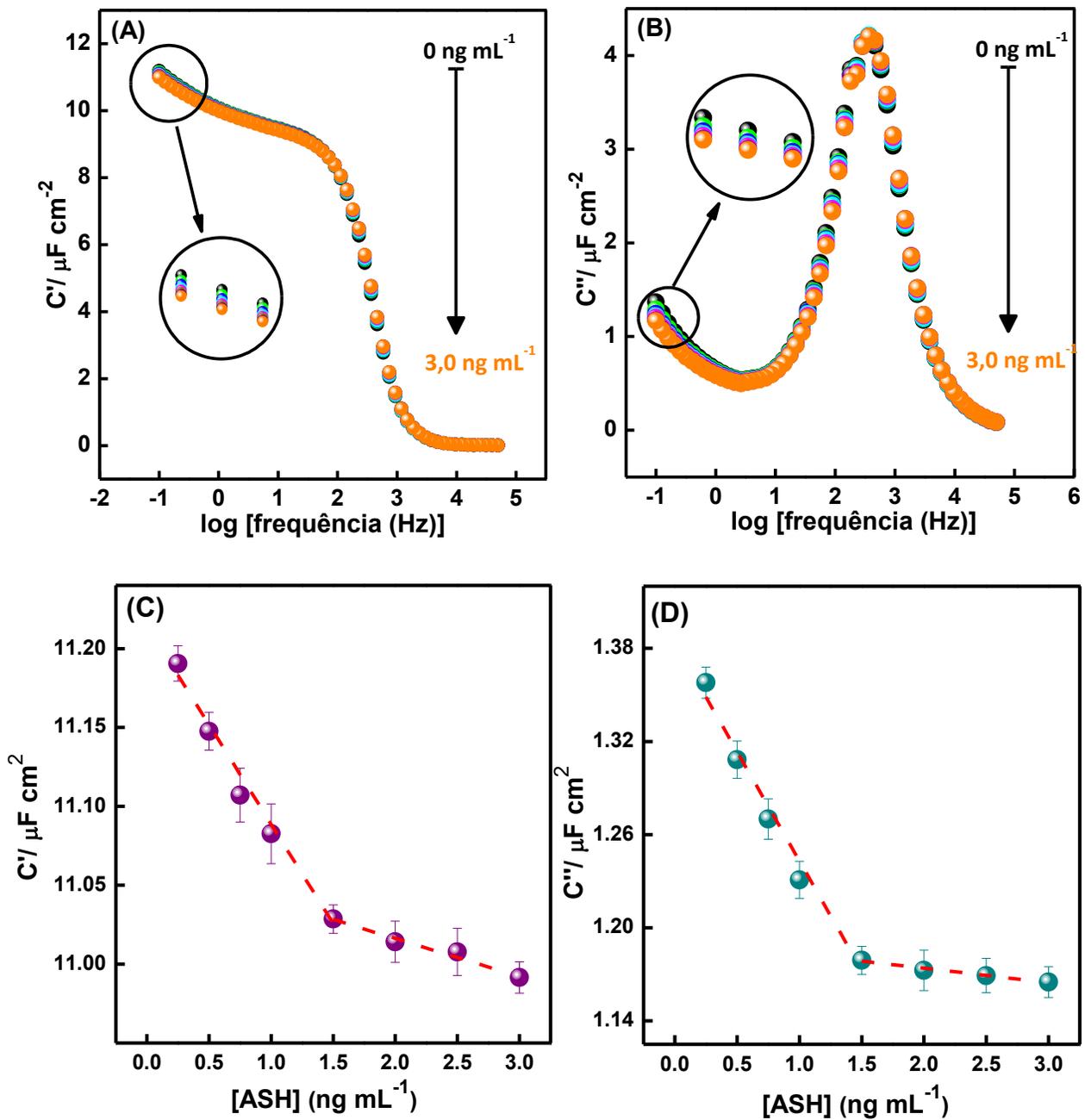
5.5.1. Curva Analítica

O desempenho analítico do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y)-ASH foi investigado frente a diferentes concentrações do marcador biológico de ASH conduzida por meio da técnica de Espectroscopia de Capacitância Eletroquímica. Para essa etapa foi utilizado como padrão para as adições uma solução de solução TF contendo $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ASH com pH 7,3 (25°C) em atmosfera de nitrogênio saturado.

A abordagem utilizada para construção da curva analítica foi baseada nos valores de capacitância real (C') e imaginária (C'') do sistema. Essa perspectiva de análise permitiu uma visualização mais clara dos fenômenos no preenchimento da cavidade e no carregamento do filme molecularmente impresso em função da variação da concentração da ASH. As Figura 32A e 32B apresentam os espectros de capacitância imaginária e real com ênfase na baixa frequência.

As curvas analíticas são representadas na Figura 32C e Figura 32D, indicando uma relação linear da capacitância real e imaginária em função da concentração de ASH. A faixa de concentração de ASH para parâmetros reais e imaginários foi de $0,25$ a $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ com uma sensibilidade de resposta de $0,1275 \mu\text{F mL cm}^{-2} \text{ ng}^{-1}$ ($r = 0,995$) e $0,1407 \mu\text{F mL cm}^{-2} \text{ ng}^{-1}$ ($r = 0,993$). Para concentrações superiores a $1,5 \text{ ng mL}^{-1}$ ocorre um desvio da linearidade, o que pode ser atribuído à saturação das cavidades impressas disponíveis na superfície do eletrodo modificado.

Figura 32. Espectros da impedância de Bode para capacitância real (A) e imaginária (B) em diferentes concentrações de ASH. Curvas analíticas para diferentes concentrações de ASH obtidas em 0,10 Hz para capacitância real imaginária (C) e (D). N = 3.



Foi observado maiores variações na resposta do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) para os dados de capacitância imaginária, apresentando uma maior sensibilidade no reconhecimento molecular da ASH comparado com os dados reais de capacitância. O limite de detecção do sensor foi calculado usando a relação de $3S/m$, onde S é o desvio padrão do branco e m é a sensibilidade (ou seja, a inclinação da curva de calibração). Os valores de LD para ASH foram encontrados em $0,24 \text{ ng mL}^{-1}$ para capacitância real e $0,22 \text{ ng mL}^{-1}$ capacitância imaginária, respectivamente.

Buscou-se comparar os parâmetros analíticos (intervalo de resposta e limite de detecção) com diferentes trabalhos relatados na literatura (Tabela 11). Assim, foi possível verificar que o filme polimérico molecularmente impresso demonstrou desempenho analítico satisfatório, uma vez que apresentou limite de detecção menor que os trabalhos da literatura.

Tabela 11. Parâmetros analíticos de diferentes plataformas sensoriais para albumina sérica humana.

Referência	Limite Detecção ng mL⁻¹	Faixa linear	Técnica Eletroquímica
STANKOVIĆ et al., 2020	1,55	2,5 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Amperiométrico
CHAO et al., 2021	250	0,02 a 0,38 mg mL^{-1}	Fluorescência
ZHENG et al., 2018	123	0,01 a 1,00 mg mL^{-1}	Fluorescência
Presente Trabalho	0,22	0,25 a 1,5 ng mL^{-1}	ECE

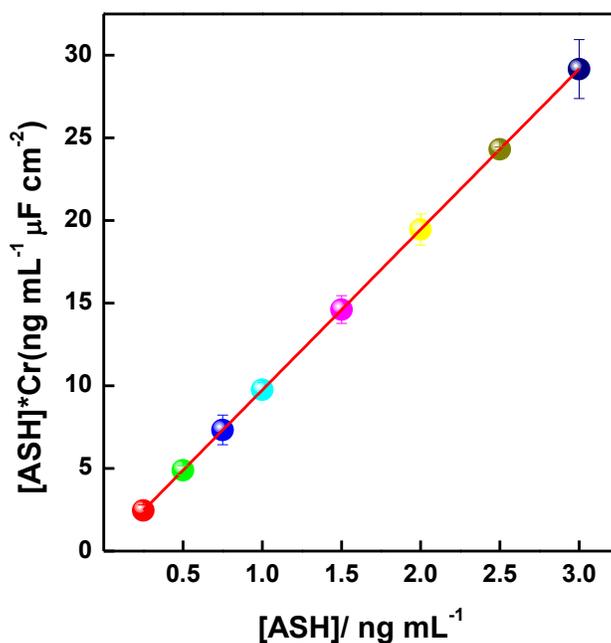
5.5.2. Afinidade de ligação entre Albumina Sérica Humana e cavidade

Uma vez realizada a otimização do sensor, a afinidade de ligação da albumina com o polímero molecularmente impresso foi investigada pelo modelo de adsorção de Langmuir (KOR; ZAREI, 2016; NISHITANI; SAKATA, 2018; TREVIZAN et al., 2021). Sendo assim, a constante de afinidade de ligação (K_d) pode ser calculada a partir da Equação 5.

$$\frac{[ASH]}{\Delta R} = \frac{[ASH]}{R_m} + \frac{1}{K_d R_m} \quad (5)$$

onde ΔR corresponde ao inverso da capacitância redox ($1/C_R$) do sistema, R_m é o sinal máximo e $[ASH]$ é a concentração de albumina sérica humana. Sendo assim, o gráfico de $[ASH] \times C_R$ versus $[ASH]$ (Figura 33) segue o comportamento de uma equação da reta, fornecendo dados dos coeficientes linear e angular para a linha gerada de $1/(K_d R_m)$ e $1/R_m$. A constante de afinidade de ligação foi de $0,267 \text{ l ng}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$) para o complexo poli(azo-Bismarck Y)-ASH, concordando com os valores esperados para sensores molecularmente impresso.

Figura 33. Relação Linear de $[ASH] \times C_R$ versus $[ASH]$. Forma de isoterma de Langmuir usada para o complexo poli(azo Bismarck Y)-ASH.

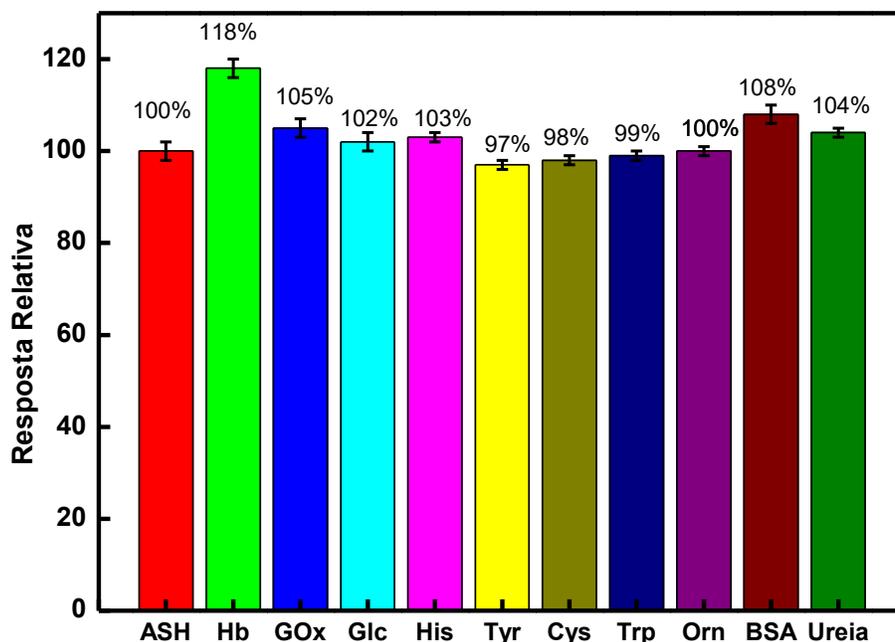


5.5.3. Estudo de Seletividade

O reconhecimento molecular do sensor PMI é um dos parâmetros mais importantes para examinar a eficácia do processo de impressão. O estudo de seletividade foi investigado com espécies concomitantes que podem atuar como interferentes em fluidos biológicos, como hemoglobina (Hb), glicose oxidase(GOx), albumina sérica bovina (BSA), ureia, glicose (Glc), L-ornitina (Orn), L-tirosina (Tyr), L-histidina (His), L-cisteína (Cys) e Triptofano (Trp).

Para testar a seletividade do sensor, o eletrodo de PMI-poli(azo-Bismarck Y) foi testado na presença dos interferentes com uma concentração 1000 vezes maior que a da molécula de ASH. Os resultados foram monitorados a partir dos valores de C_{redox} do sistema. Para o cálculo da resposta relativa considerou a razão entre o sinal do interferente (S_i) e o sinal da molécula de ASH (S_{ASH}). A Figura 34 apresenta a resposta relativa do sensor PMI em função dos diferentes interferentes estudados.

Figura 34. Resposta relativa (S_i / S_{ASH}) do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) em função de diferentes analitos. As medidas foram conduzidas em solução TF (pH=7,3) em meio desareado.



Baseado na Figura 34, o dispositivo apresentou valores de interferência abaixo de 5% para moléculas que são comuns em análises clínicas como glicose, aminoácidos, ureia e a enzima glicose oxidase. A albumina de origem bovina (BSA) demonstrou perturbar a resposta total do sistema em uma interferência de 8%. A molécula de BSA e ASH, apesar de serem estruturalmente semelhantes, a etapa de complexação na construção do sensor, demonstrou ser eficaz na formação de interações específicas com grupos funcionais existentes apenas na molécula de ASH.

No entanto, para a hemoglobina os valores de interferência foram significativos, acima de 15%. Tal interferência já era esperado, uma vez que ambas moléculas de Hb e ASH apresentam propriedades de adsorção e ocupação de sítios ativos presente na interface polímero/solução.

Visto isso, para uma possível aplicação do sensor em amostra real, será necessário um tratamento da amostra para retirada da hemoglobina em solução. Um dos métodos mais comuns na separação de proteínas é a eletroforese em gel, uma vez que se baseia na mobilidade das macromoléculas carregadas e de um campo elétrico aplicado (CHU, et al., 2009).

Portanto, foi possível concluir que o sensor é seletivo para maioria das moléculas estudadas. Foi comprovado a formação de cavidades específicas para ASH quando comparada com a molécula de BSA que possui estruturas similar. Além disso, o sensor apresentou um bom reconhecimento molecular para ser aplicado em amostras reais.

5.5.4. Estudo de Reprodutibilidade e Estabilidade

A reprodutibilidade e estabilidade do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) foi investigada a partir imersão do sensor em uma solução de ASH a $0,5\text{ng mL}^{-1}$ para a realização do processo de religação. A resposta de cada eletrodo foi monitorada através da EIE. A reprodutibilidade foi investigada utilizando sete eletrodos de PMI eletropolimerizados em distintos substratos de FTO, apresentando um desvio padrão de 8,98%. A estabilidade do sensor foi avaliada utilizando um único eletrodo de PMI-poli(azo-Bismarck Y) durante um período de 14 dias, o qual apresentou um desvio padrão de 9,81%.

Os valores de reprodutibilidade a estabilidade apresentada para o filme molecularmente impresso aumentam a confiabilidade dos resultados analíticos apresentados. Esses resultados demonstram a possibilidade de aplicação do sensor de PMI-poli(azo-Bismarck Y) na detecção de ASH em fluidos biológicos.

6. CONCLUSÃO

Por meio da técnica de eletropolimerização, foi possível obter a formação de um filme polimérico molecularmente impresso baseado no monômero Bismarck Brown Y utilizando a albumina sérica humana como molde molecular.

Ao realizar as investigações comparativas utilizando a Espectroscopia de Impedância/ Capacitância Eletroquímica foi observado que o filme PMI-poli(azo-Bismarck Y) obteve um melhor desempenho eletroquímico quando comparado com o filme sem impressão molecular. Foi observado uma resistência específica da cavidade para albumina como característica intrínseca do filme molecularmente impresso e um aumento nos valores de resistência de transferência de carga quando testado na presença de albumina.

Além disso, foi estudado o comportamento adsorptivo da proteína de ASH no processo de carregamento/ descarregamento dos filmes e no preenchimento das cavidades com o molde molecular. Ainda nisso, o filme com impressão molecular apresentou uma adsorção de moléculas de albumina superior em comparação ao filme sem impressão molecular, reafirmando a presença de cavidades na rede polimérica do filme PMI-poli(azo-Bismarck Y) e corroborando com os dados de EIE.

Pelos estudos eletroquímicos, caracterizações morfológicas e de especiação química, foi confirmada a presença de cavidades e alterações morfológica quando a albumina está presente na etapa de eletropolimerização. Através da espectroscopia de Raman, foi confirmada que a interação da albumina com o filme polimérico acontece através os grupos nitrogenados mais interno do polímero. Maiores estudos serão conduzidos para maiores esclarecimentos.

Dessa maneira, foi possível realizar a otimização do sensor molecularmente impresso, e através de medidas de espectroscopia de capacitância eletroquímica, foi construída uma curva analítica com valores de limite detecção e quantificação adequados para a aplicação do sensor em fluidos biológicos. O sensor também demonstrou ser seletivo para moléculas menores e com estrutura e forma similar.

REFERÊNCIAS

- AFZALI, M.; MOSTAFAVI, A.; SHAMSPUR, T. A novel electrochemical sensor based on magnetic core@shell molecularly imprinted nanocomposite (Fe_3O_4 @graphene oxide@MIP) for sensitive and selective determination of anticancer drug capecitabine, **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 6626-6638, 2020.
- ARUNKUMAR, M.; PAUL, Amit. Importance of electrode preparation methodologies in supercapacitor applications. **ACS omega**, v. 2, n. 11, p. 8039, 2017.
- BALDONESCHI, V.; PALLADINO, P.; BANCHINI, M.; MINUNNI, M.; SCARANO, S. Norepinephrine as new functional monomer for molecular imprinting: an applicative study for the optical sensing of cardiac biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 157, p. 112161, 2020.
- BARROS, L. A.; CUSTODIO, R.; RATH, S. Design of a new molecularly imprinted polymer selective for hydrochlorothiazide based on theoretical predictions using Gibbs free energy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2300–2311, 2016.
- BOIERO, C.; ALLEMANDI, D.; LONGHI, M.; LLABOT, J. M. RP-HPLC method development for the simultaneous determination of timolol maleate and human serum albumin in albumin nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 186-189, 2015.
- BOLAT, G.; VURAL, O. A.; YAMAN, Y. T.; ABACI, S. Polydopamine nanoparticles-assisted impedimetric sensor towards label-free lung cancer cell detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, p. 111549, 2021.
- BUENO, P. R.; BENITES, T. A.; GOES, M. S.; DAVIS, J. J. A facile measurement of heterogeneous electron transfer kinetics. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 22, p. 10920-10926, 2013.
- BUENO, P. R.; BENITES, T. A.; DAVIS, J. J. The mesoscopic electrochemistry of molecular junctions. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy: a versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 30, p. 8822-8829, 2012.
- CANFAROTTA, F.; LEZINA, L.; GUERREIRO, A.; CZULAK, J.; PETUKHOV, A.; DAKS, A.; SMOLINSKA, K.; POMA, A.; PILETSKY, S.; BARLEV, N. A. Specific drug delivery to cancer cells with double-imprinted nanoparticles against epidermal growth factor receptor. **Nano letters**, v. 18, n. 8, p. 4641-4646, 2018.
- CASSU, S. N.; FELISBERTI, M. I. Dynamic mechanical behavior and relaxations in polymers and polymeric blends. **Quimica Nova**, v. 28, p. 255-263, 2005.
- CHAO, X., YAO, D., QI, Y., YUAN, C., & HUANG, D. A fluorescent sensor recognized by the FA1 site for highly sensitive detection of HSA. **Analytica Chimica Acta**, v. 1188, p. 339201, 2021.
- CHEN, R. N.; KANG, S. H.; LI, J.; LU, L. N.; LUO, X. P.; WU, L. Comparison and recent progress of molecular imprinting technology and dummy template molecular imprinting technology. **Analytical Methods**, v. 13, n. 39, p. 4538-4556, 2021.
- CHEN, Z.; LIU, H.; CHEN, J.; ZHU, W.; LIU, Y.; MIN, J.; CHEN, X.; LI, B.; YANG, X. Separation and enrichment of sibikoside from *Sibiraea angustata* with magnetic surface dummy template molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography B**, v. 1178, p. 122767, 2021.

CHU, C. H.; LAM, H. C.; LEE, J. K.; WANG, M. C.; LU, C. C.; SUN, C. C.; CHUANG, M. J.. Common hemoglobin variants in southern Taiwan and their effect on the determination of HbA1c by ion-exchange high-performance liquid chromatography. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 72, n. 7, p. 362-367, 2009.

CHUNG, C Y.; YANG, J.; HE, J.; YANG, X.; HUBBARD, R.; JI, D. An investigation into the impact of variations of ambient air pollution and meteorological factors on lung cancer mortality in Yangtze River Delta. **Science of The Total Environment**, p. 146427, 2021.

COLE, G. A. et al. Neuron specific enolase as a useful histochemical marker for the neuro-endocrine system of the lung. **Journal of Pathology**, v. 2, p. 351-352, 1980.

CÓRDOBA-TORRES, Pedro. Relationship between constant-phase element (CPE) parameters and physical properties of films with a distributed resistivity. **Electrochimica Acta**, v. 225, p. 592-604, 2017.

CYRIAC, Soumya T.; SIVASANKARAN, Unni; KUMAR, Krishnapillai Girish. Biopolymer based electrochemical sensor for ponceau 4R: an insight into electrochemical kinetics. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 165, n. 14, p. B746, 2018.

DAI, J.; CORTALEZZI, M. F. DE. Heliyon Influence of pH , ionic strength and natural organic matter concentration on a MIP-Fluorescent sensor for the quantification of DNT in water. **Heliyon**, v. 5, n. July 2018, p. e01922, 2019.

DEHGHANI, M.; NASIRIZADEH, N.; YAZDANSHENAS, M. E. Determination of cefixime using a novel electrochemical sensor produced with gold nanowires/graphene oxide/electropolymerized molecular imprinted polymer. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, n. December 2018, p. 654–660, 2019.

DUAN, H. B.; CAO, J. T.; YANG, J. J.; WANG, H.; LIU, Y. M. Simultaneous determination of four local anesthetics by CE with ECL and study on interaction between procainamide and human serum albumin. **Talanta**, v. 154, p. 341-345, 2016.

EL-RAHMAN, H. A. A.; OHSAKA, T.; KITAMURA, F.; TOKUDA, K. Oxidative polymerization of p-aminoazobenzene in acetonitrile. A new electroactive polymer. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 315, n. 1–2, p. 161–174, 1991.

FERNANDES, F. C. B.; GÓES, M. S.; DAVIS, J. J.; BUENO, P. R. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors and Bioelectronics** , v. 50, p. 437-440, 2013.

FU, X.; MENG, M.; ZHANG, Y.; YIN, Y.; ZHANG, X.; XI, R. Chemiluminescence enzyme immunoassay using magnetic nanoparticles for detection of neuron specific enolase in human serum. **Analytica chimica acta**, v. 722, p. 114-118, 2012.

GANDHI, M.; INDIRAMMA, J., JAYAPRAKASH, N. S., KUMAR, A. S. An Efficient Electrochemical Sandwich ELISA for Urinary Human Serum Albumin-Biomarker Based on Highly Redox-Active Thionine Surface-Confined MWCNT/PEDOT. PSS Platform. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, p. 116018, 2022.

GONG, J.-L.; GONG, F.-C.; ZENG, G.-M.; SHEN, G.-L. et al. A novel electrosynthesized polymer applied to molecular imprinting technology. **Talanta**, 61, n. 4, p. 447-453, 2003.

GUPTA, S.; PRICE, C. Investigating graphene/conducting polymer hybrid layered composites as pseudocapacitors: Interplay of heterogeneous electron transfer, electric double layers and mechanical stability. **Composites Part B: Engineering**, v. 105, p. 46–59, 2016

HWANG, B. J.; SANTHANAM, R.; LIN, Y. L. Nucleation and growth mechanism of electroformation of polypyrrole on a heat-treated gold/highly oriented pyrolytic graphite. **Electrochimica Acta**, v. 46, n. 18, p. 2843–2853, 2001.

JIN, B.; HUANG, A.; ZHONG, R.; HAN, B. The value of tumor markers in evaluating chemotherapy response and prognosis in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. **Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 417-423, 2010.

KARAMI, Pari et al. Dual-modality impedimetric immunosensor for early detection of prostate-specific antigen and myoglobin markers based on antibody-molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 202, p. 111-122, 2019.

KHAN, S.; WONG, A.; ZANONI, M. V. B.; SOTOMAYOR M. D. P. T. Electrochemical sensors based on biomimetic magnetic molecularly imprinted polymer for selective quantification of methyl green in environmental samples, **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, 2019.

KHANMOHAMMADI, Akbar et al. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review. **Talanta**, v. 206, p. 120251, 2020.

KIM, H. S.; LEE, T.; YUN J.; LEE, G.; HONG, Y. Cancer protein biomarker identification and quantification using nanoforest substrate and hand-held Raman spectrometer. **Microchemical Journal**, v. 160, p. 105632, 2021.

KOR, Kamalodin; ZAREI, Kobra. Development and characterization of an electrochemical sensor for furosemide detection based on electropolymerized molecularly imprinted polymer. **Talanta**, v. 146, p. 181-187, 2016.

KUTNER, W. "Gate Effect" in p-Synephrine Electrochemical Sensing with a Molecularly Imprinted Polymer and Redox Probes. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 12, p. 7546-7553, 2019.

LACH, P.; CIEPLAK, M.; MAJEWSKA, M.; NOWORYTA, K.R.; SHARMA, P.S.; LASIA, Andrzej. Electrochemical impedance spectroscopy and its applications. In: **Modern aspects of electrochemistry**. Springer, Boston, MA, 2002. p. 143-248.

LANGE, U.; MIRSKY, V. M. Chemiresistors based on conducting polymers: A review on measurement techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, n. 2, p. 105-113, 2011.

LEE, H.; YI, S. Y.; KWON, J. S.; CHOI, J. M.; LEE, D. S.; LEE, S. H.; SHIN, Y. Rapid and highly sensitive pathogen detection by real-time DNA monitoring using a nanogap impedimetric sensor with recombinase polymerase amplification, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 179, n. 1, 2021.

LI, X. G. et al. Novel multifunctional polymers from aromatic diamines by oxidative polymerizations. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 9, p. 2925–3030, 2002.

LI, W.; ZHANG, X.; LI, T.; JI, Y.; LI, R. Molecularly imprinted polymer-enhanced biomimetic paper-based analytical devices: a review. **Analytica Chimica Acta**, 2021.

LI, Y.; LI, Z.; YE, W.; ZHAO, S.; YANG, Q.; MA, S.; XIAO, G.; LIU, G.; WANG, Y.; YUE, Z. Gold nanorods and graphene oxide enhanced AgInS₂ quantum dot-based photoelectrochemical sensors for detection of dopamine. **Electrochimica Acta**, v. 295, p. 1006-1016, 2019.

LIN, Y.; KANNAN, P.; ZENG, Y.; QIU, B.; GUO, L.; LIN, Z. Enzyme-free multicolor biosensor based on Cu²⁺-modified carbon nitride nanosheets and gold nanopyramids for sensitive detection of neuron specific enolase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 283, p. 138-145, 2019.

LIU, Y. T.; DENG, J.; XIAO, X. L.; DING, L. et al. Electrochemical sensor based on a poly(para-aminobenzoic acid) film modified glassy carbon electrode for the determination of melamine in milk. **Electrochimica Acta**, 56, n. 12, p. 4595-4602, 2011.

LÜTFI, M.; EREN, T.; ATAR, N. Sensors and Actuators B : Chemical A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide : Application to selective determination of tyrosine in milk. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 210, p. 149–157, 2015.

MAIA, D. J.; PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J.; NEVES, S. D. Conductive polymer synthesis in solid host matrices. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 204-215, 2000.

MERINO, E.; RIBAGORDA, M. Control over molecular motion using the cis–trans photoisomerization of the azo group. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 8, n. 1, p. 1071-1090, 2012.

NARESH, Varnakavi; LEE, Nohyun. A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors**, v. 21, n. 4, p. 1109, 2021.

NGUY, Tin Phan et al. Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 246, p. 461-470, 2017.

NISHITANI, Shoichi; SAKATA, Toshiya. Potentiometric adsorption isotherm analysis of a molecularly imprinted polymer interface for small-biomolecule recognition. **ACS omega**, v. 3, n. 5, p. 5382-5389, 2018.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; BRITO, A. O. G.; TEIXEIRA, F. S. M. Mechanism of Nanocomposite Formation in the Layer-by-Layer Single-Step Electropolymerization of π -Conjugated Azopolymers and Reduced Graphene Oxide: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. **ACS omega**, v. 5, n. 40, p. 25954-25967, 2020.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; OLEAN-OLIVEIRA, T.; MORENO, C. S. A.; SERAPHIM, P. M.; TEIXEIRA, F. S. M. Chemiresistor sensor based on azo-polymer and graphene for real-time monitoring of mitochondrial oxygen consumption. **ACS sensors**, v. 4, n. 1, p. 118-125, 2018.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; PACHECO, J. C.; SERAPHIM, P. M.; TEIXEIRA, F. S. M. Synergistic effect of reduced graphene oxide/azo-polymer layers on electrochemical performance and application as nonenzymatic chemiresistor sensors for detecting superoxide anion radicals. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 852, p. 113520, 2019.

OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Development of a nanocomposite chemiresistor sensor based on π -conjugated azo polymer and graphene blend for detection of dissolved oxygen. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 271, p. 353-357, 2018.

OLEAN-OLIVEIRA, André et al. Role of anion size in the electrochemical performance of a Poly (thionine) redox conductive polymer using electrochemical impedance spectroscopy. **Polymer**, v. 258, p. 125291, 2022.

OLIVEIRA, Y. A.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; TEIXEIRA, M. F. S. Molecular architecture based on palladium-salen complex/graphene for low potential water oxidation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 880, p. 114928, 2021.

ONUR, Z.; ERTU, H. D. Sensors and Actuators B : Chemical A short footnote : Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. v. 202, p. 448–453, 2014.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. Preliminary Graphical Methods. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, p. 333–351, 2008a.

PALÈNCIA, L.; FERRANDO, J.; MARÍ-DELL'OLMO, M.; GOTSENS, M.; MORRISON, J.; DZUROVA, D.; LUSTIGOVA, M.; COSTA, C.; SANZ, M. R.; BOSAKOVA, L.; SANTANA, P.; BORRELL, C. Socio-economic inequalities on cancer mortality in nine European areas: The effect of the last economic recession. **Cancer epidemiology**, v. 69, p. 101827, 2020.

PAULSEN, Bryan D.; FRISBIE, C. Daniel. Dependence of conductivity on charge density and electrochemical potential in polymer semiconductors gated with ionic liquids. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 4, p. 3132-3141, 2012.

PARLAPIANO, M.; AKYOL, C.; FOGLIA, A.; PISANI, M.; ASTOLFI, P.; EUSEBI, A. L.; FATONE, F. Selective removal of contaminants of emerging concern (CECs) from urban water cycle via Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): potential of upscaling and enabling reclaimed water reuse. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 105051, 2021.

PAULING, Linus. A theory of the structure and process of formation of antibodies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 10, p. 2643-2657, 1940.

PHAN, T.; PHI, T.V.; TRAM, D. T.; EERSELS, K.; WAGNER, P.; LIEM, T. T. Chemical Development of an impedimetric sensor for the label-free detection of the amino acid sarcosine with molecularly imprinted polymer receptors. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 246, p. 461–470, 2017.

PILETSKY, S. A.; TURNER, A. P. F. Sensores eletroquímicos baseados em polímeros impressos molecularmente. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 14, n. 5, p. 317-323, 2002.

RADZUAN, Nabilah Afiqah Mohd; SULONG, Abu Bakar; SAHARI, Jaafar. A review of electrical conductivity models for conductive polymer composite. **international journal of hydrogen energy**, v. 42, n. 14, p. 9262-9273, 2017.

RANDRIAMAHAZAKA, Hyacinthe; ASAKA, Kinji. Electromechanical analysis by means of complex capacitance of bucky-gel actuators based on single-walled carbon nanotubes and an ionic liquid. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 41, p. 17982-17988, 2010.

RANDVIIR, Edward P.; BANKS, Craig E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098-1115, 2013.

RANJAN, P.; PARIHAR, A.; JAIN, S.; KUMAR, N.; DHAND, C.; MURALI, S.; MISHRA, D.; SANGHI, S, K.; CHAURASIA, J. P.; SRIVASTAVA, A. K; KHAN, R. Biosensor-based diagnostic approaches for various cellular biomarkers of breast cancer: A comprehensive review. **Analytical Biochemistry**, p. 113996, 2020.

SHAYEH, J. S.; NOROUZI, P.; GANJALI, M. R. Effect of thickness on the capacitive behavior and stability of ultrathin polyaniline for high speed super capacitors. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 52, n. 10, p. 933–937, 2016.

REHAN, H. H. Electrosynthesis of conducting polymer films from the azo dye methoxy red. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 30, n. 8, p. 945–951, 2000.

RIFAI, N; GILLETTE, M A.; CARR, S A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 971-983, 2006.

SAHA, P.; MOITRA, P.; BHATTACHARJEE, U.; BHATTACHARYA, S. Selective pathological and intracellular detection of human serum albumin by photophysical and electrochemical techniques using a FRET-based molecular probe. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 114007, 2022.

SAEED, U.; FATIMA, B.; HUSSAIN, D.; ASHIQ, R.; ASHIQ, M. N.; HAQ, M. CoTe Nanorods Based Electrochemical Sensor for Quantitative Detection of Albumin from Chronic Kidney Disease Patients. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, p. 115999, 2022.

SEQUOIA, E.; GENIES, E. M.; TSINTAVIS, C. Redox mechanism and electrochemical polyaniline deposits behaviour of. **Polymer**, v. 195, p. 109–128, 1985.

SUN, D.; XIE, J.; CHEN, C. J.; LIU, J. T. Analyzation of the binding mechanism and the isoelectric point of glycated albumin with self-assembled, aptamer-conjugated films by using surface plasmon resonance. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 214, p. 112445, 2022.

SUN, H.; XIANG, J.; ZHANG, X.; CHEN, H.; YANG, Q.; LI, Q.; XU, G. A colorimetric and fluorometric dual-modal supramolecular chemosensor and its application for HSA detection. **Analyst**, v. 139, n. 3, p. 581-584, 2014.

STANKOVIĆ, V.; ĐURĐIĆ, S.; OGNJANOVIĆ, M.; ANTIĆ, B.; KALČER, K.; MUTIĆ, J.; STANKOVIĆ, D. M. Anti-human albumin monoclonal antibody immobilized on EDC-NHS functionalized carboxylic graphene/AuNPs composite as promising electrochemical HSA immunosensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 860, p. 113928, 2020.

STANKOVIĆ, S.; STANKOVIĆ, S.; STANKOVIĆ, R.; RISTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, O.; VOJNOVIĆ, M. Some aspects of the electrochemical synthesis of polypyrrole. **Reactive and Functional polymers**, v. 35, n. 3, p. 145-151, 1997.

TAN, D.; HAN, C.; YU, Z.; SUN, X.; CHEN, J.; SHAO, X.; WANG, D. Dummy molecularly imprinted polymers for class-selective extraction of amphetamine-type stimulants from alcoholic and nonalcoholic beverages. **Journal of Chromatography A**, p. 462759, 2021.

TANCHAROEN, C.; SUKJEE, W.; YENCHITSOMANUS, P.; PANYA, A.; PETER A.LIEBERZEIT, P. A.; SANGMA, C. Selectivity enhancement of MIP-composite sensor for explosive detection using DNT-dengue virus template: a co-imprinting approach. **Materials Letters**, v. 285, p. 129201, 2021.

Tang, M.; Zhu, S.; Liu, Z.; Jiang, C.; Wu, Y.; LI, H.; Wang, B.; Wang, E.; Ma, J.; Wang, C. Tailoring π -conjugated systems: from π - π stacking to high-rate-performance organic cathodes, **Chem**, v. 4, p. 2600-2614, 2018.

TAO, J.; JATOI, A.; CRAWFORD, J.; LAM, W. W.; HO, J. C.; WANG, X.; PANG, H. Role of Dietary Carbohydrates on Risk of Lung Cancer. **Lung Cancer**, 2021.

TEIXEIRA, M. F. S.; BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. Molecular engineering of a π -conjugated polymer film of the azo dye Bismarck Brown Y. **RSC Adv.**, v. 6, n. 103, p. 101318–101322, 2016.

TREVIZAN, H. F.; OLEAN-OLIVEIRA, A.; CARDOSO, C. X.; TEIXEIRA, M. F. Azo-Polímero Molecularmente Impresso como Estratégia no Desenvolvimento de uma Nova Plataforma Sensorial para Detecção de Ácido Úrico. **Colloquium Exactarum**.. v. 11, n.3, p. 63-74, 2019.

VON HAUFF, Elizabeth. Impedance spectroscopy for emerging photovoltaics. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 123, n. 18, p. 11329-11346, 2019.

YANG, G.; XIAO, Z.; TANG, C.; DENG, Y.; HUANG, H.; HE, Z. Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111416, 2019.

WANG, D.; WANG, X. Amphiphilic azo polymers: Molecular engineering, self-assembly and photoresponsive properties. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 2, p. 271-301, 2013.

WANG, G.; YIN, P.; WANG, J.; MA, P.; WANG, Y.; CAI, Y.; QI, H.; LIU, A. Specific Heptapeptide Screened from pIII Phage Display Library for Sensitive Enzyme-linked Chemiluminescence Immunoassay of Vascular Endothelial Growth Factor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, p. 129555, 2021.

WANG, X.; WANG, Y.; YE, X.; WU, T.; DENG, Y.; WU, P.; LI, C. Sensing platform for neuron specific enolase based on molecularly imprinted polymerized ionic liquids in between gold nanoarrays. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 99, p. 34-39, 2018.

WANG, X. **Azo Polymers: Synthesis, Functions and Applications**. 1. ed. Berlin: Springer, 2017.
WOLFART, F.; DUBAL, D. P.; VIDOTTI, M.; HOLZE, R.; GÓMEZ-ROMERO, P. Electrochemical supercapacitive properties of polypyrrole thin films: influence of the electropolymerization methods. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 20, n. 4, p. 901-910, 2016.

WULANDARI, M.; URRACA, J. L.; DESCALZO, A. B.; AMRAN, M. B.; MORENO-BONDI, M. C. Molecularly imprinted polymers for cleanup and selective extraction of curcuminoids in medicinal herbal extracts. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 407, n. 3, p. 803-812, 2015.

ZHANG, W.; FENG, X.; YI, J.; NIU, Y.; XU, L. A novel electrochemical biomimetic sensor based on E-MIP artificial acceptor and SI-ATRP assisted signal amplification. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 842, p. 24-33, 2019.

ZHENG, D. J.; XU, J.; SU, M. M.; SUN, Z. G.; JIAO, Q. C.; YANG, Y. S.; ZHU, H. L. A small, steady, rapid and selective TICT based fluorescent HSA sensor for pre-clinical diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 271, p. 82-89, 2018.

YOO, H. D.; JANG, J. H.; RYU, J. H.; PARK, Y.; OH, S. M. Impedance analysis of porous carbon electrodes to predict rate capability of electric double-layer capacitors. **Journal of Power Sources**, v. 267, p. 411-420, 2014.