

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais



Dissertação de Mestrado

**Sensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono para
monitoramento contínuo de glicose em animais**

VICTORIA PORTO MONKS

Pelotas, 2023

VICTORIA PORTO MONKS

“Sensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono para monitoramento contínuo de glicose em animais”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M745s Monks, Victoria Porto

Sensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono para monitoramento contínuo de glicose em animais / Victoria Porto Monks ; Neftalí Lenin Villarreal Carreño, orientador. — Pelotas, 2023.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Diabetes mellitus. 2. Glicose. 3. Grafeno. 4. Sensor eletroquímico. I. Carreño, Neftalí Lenin Villarreal, orient. II. Título.

CDD : 620.11063

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño (orientador)

Doutor em Química pela Universidade Federal De São Carlos.

Prof. Dr. Camila Monteiro Cholant

Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Bruno Da Silveira Noremberg

Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas.

Suplente:

Prof. Dr. Guilherme Kurz Maron

Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas.

VICTORIA PORTO MONKS

“Sensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono para monitoramento contínuo de glicose em animais”

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 18 de agosto de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Neftalí Lenin Villarreal Carreño (orientador)

Doutor em Química pela Universidade Federal De São Carlos.

Prof. Dr. Camila Monteiro Cholant

Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Bruno Da Silveira Noremberg

Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas.

Suplente:

Prof. Dr. Guilherme Kurz Maron

Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Pelotas.

RESUMO

MONKS, Victoria Porto. **Sensor eletroquímico baseado em nanoestruturas de carbono para monitoramento contínuo de glicose em animais**. Orientador: Neftalí Lenin Villarreal Carreño. 2023. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença causada pela produção insuficiente ou má absorção de insulina, hormônio de regulação da glicose no sangue que garante energia para o organismo. Dentro da Medicina Veterinária, a DM é uma das endocrinopatias mais diagnosticadas em clínica de pequenos animais, podendo acarretar sérias complicações. Portanto, quando o diagnóstico é feito de forma correta, e sua monitoração e tratamento são realizados, pode levar à estabilização da doença e qualidade de vida prolongada. O método mais comum para monitoração no dia a dia é a mensuração capilar, porém esta pode causar estresse nos animais, ocasionando muitas vezes a falha no tratamento. Assim, um dispositivo de monitoramento de glicose contínuo é indicado, por ser menos invasivo e fornecer dados sobre variações na concentração de glicose intersticial, porém apresenta custo elevado. Desta forma, o presente trabalho visou produzir um biossensor de glicose mais acessível em relação ao disponível no mercado. O mesmo foi produzido por meio de plataformas condutoras compostas por eletrodos de grafeno induzido por laser, que foram caracterizadas eletroquímica e morfologicamente. Foram estudadas também modificações com diferentes nanopartículas, a fim de aumentar a sensibilidade e estabilidade da plataforma sensora, visando a obtenção de um biossensor de glicose mais barato. A partir da modificação dos sensores com sulfato de cobre com adição de ureia, obteve-se sensores com baixo limite de detecção (10,46 μM), boa sensibilidade e resposta na faixa de concentração de glicose entre 3 e 4000 μM , além de apresentar eletrodos morfologicamente mais uniformes e homogêneos. A síntese de nanoestruturas de cobre através do processo de gravação direta a laser mostrou-se eficaz, simples, rápida e de baixo custo, tornando esta rota promissora para futuros estudos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; glicose; grafeno; sensor eletroquímico

ABSTRACT

MONKS, Victoria Porto. **Electrochemical sensor based on carbon nanostructures for continuous glucose monitoring in animals.** Advisor: Neftalí Lenin Villarreal Carreño. 2023. 54p. Dissertation – Postgraduate Program in Materials Science and Engineering. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

Diabetes Mellitus (DM) is a disease caused by insufficient production or malabsorption of insulin, a hormone that regulates blood glucose and providing energy for the body. Within Veterinary Medicine, DM is one of the most diagnosed endocrinopathies in small animal clinic, which can lead to serious complications. Therefore, when the diagnosis is made correctly, and its monitoring and treatment are carried out, it can lead to stabilization of the disease and prolonged quality of life. The most common method for day-to-day monitoring is capillary measurement, but this can cause stress in the animals, often leading to treatment failure. Thus, a continuous glucose monitoring device is indicated, as it is less invasive and provides data on variations in interstitial glucose concentration, however it is expensive. In this way, the present work aims to produce a more accessible glucose biosensor compared to the one available on the market. It was produced using conductive platforms composed of laser-induced graphene electrodes, which were characterized electrochemically and morphologically. Modifications with different nanoparticles were also studied in order to increase the sensitivity and stability of the sensor platform, aiming at obtaining a low-cost glucose biosensor. By modifying the sensors with copper sulfate and the addition of urea, sensors with a low detection limit (10.46 μM), good sensitivity and response in the glucose concentration range between 3 and 4000 μM were obtained, in addition to presenting electrodes morphologically more uniform and homogeneous. The synthesis of copper nanostructures through the direct laser engraving process proved to be effective, simple, fast and low cost, making this route promising for future studies.

Keywords: Diabetes Mellitus; glucose; graphene; electrochemical sensor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Variações dos tipos de materiais à base de carbono..	16
Figura 2: Estrutura cristalina do grafeno.	17
Figura 3: Ilustração de alguns designs normalmente utilizados como eletrodos de sensores.	18
Figura 4: Ilustração de padrões de LIG em poliimida..	19
Figura 5: Ilustração de como ocorre a DMT1..	20
Figura 6: Ilustração de como ocorre a DMT2..	21
Figura 7: Felino com os membros posteriores em posição plantígrada.....	22
Figura 8: Exemplos de punções venosas tradicionais em um felino realizadas a) na orelha e b) no coxim.....	23
Figura 9: Kit completo de monitoramento de glicose Freestyle Libre®.....	23
Figura 10: Ilustração do substrato com poliimida irradiado pelo laser de CO ₂	25
Figura 11: Ilustração dos três eletrodos que constituem os sensores eletroquímicos modificados com tinta prata/cloreto de prata.....	26
Figura 12: Processo de deposição, secagem e queima do eletrodo de trabalho do sensor.	28
Figura 13: LIG produzido com diferentes potências do laser.....	30
Figura 14: Voltametria cíclica do sensor de LIG.....	31
Figura 15: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose para sensores modificados com materiais sintetizados por micro-ondas.	32
Figura 16: Voltametria cíclica de sensor de LIG + nanopartículas de Cu, com e sem adição de glicose.	32
Figura 17: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose para sensores modificados com materiais sintetizados por GDL.....	33
Figura 18: Voltametria cíclica de sensor de LIG modificado com CuSO ₄ , com e sem glicose.	34
Figura 19: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose comparando os melhores materiais de cada método de síntese.	35
Figura 20: Sensores de CuSO ₄ com e sem ureia.	36
Figura 21: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose para sensores modificados com Cu(NO ₃) ₂ e CuSO ₄ , com e sem ureia.....	37
Figura 22: Voltametrias cíclicas dos sensores modificados com: a) Cu(NO ₃) ₂ , b) Cu(NO ₃) ₂ + ureia, c) CuSO ₄ , d) CuSO ₄ + ureia.....	38
Figura 23: Diferentes potências e velocidades de GDL.....	39
Figura 24: Diferenças de pico de corrente de sensores com e sem glicose, com diferentes potências e velocidades no processo GDL.	39

Figura 25: Diferenças de pico de corrente de sensores modificados com CuSO_4 + ureia com diferentes concentrações	40
Figura 26: Diferença de corrente para determinação do melhor potencial elétrico para aplicação	41
Figura 27: Cronoamperometria com potencial de aplicação de 0,4 V	41
Figura 28: Cronoamperometria com potencial aplicado de 4V para determinação da curva analítica	42
Figura 29: Curva analítica realizada para determinar a relação corrente x concentração de glicose	43
Figura 30: Voltametrias cíclicas realizadas com diferentes taxas de varredura	44
Figura 31: Relação linear entre a corrente de resposta e a velocidade de varredura	45
Figura 32: Microscopia Eletrônica de Varredura (AccV 15.0kV Probe 4.0).....	47

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

CE	Contra-eletrodo
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
ER	Eletrodo de referência
ET	Eletrodo de trabalho
GDL	Gravação direta a laser
IR	Infravermelho
LIG	Laser induced graphene
LOD	Limite de detecção
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MHS	Síntese hidrotermal assistida por micro-ondas
nm	Nanometro
PTFE	Politetrafluoretileno
UV	Ultravioleta
VC	Voltametria cíclica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Nanomateriais.....	15
3.2 Grafeno.....	15
3.3 Grafeno por Indução a Laser	17
3.4 Sensores Eletroquímicos	18
3.5 Diabetes e Monitoramento Glicêmico	20
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Preparação dos Sensores	25
4.2 Modificação dos Sensores	26
4.3 Caracterização dos Sensores	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Análises Eletroquímicas.....	30
5.2 Análises Morfológicas	45
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Com os avanços tecnológicos em medicina veterinária e com as mudanças na relação entre tutores e pets, é notório o aumento da expectativa de vida de cães e gatos, evidenciando o aumento na incidência de patologias associadas ao envelhecimento, como por exemplo, doenças do coração, distúrbios cognitivos, distúrbios endócrinos, onde podemos destacar a obesidade, causadora de várias outras doenças.

Em um estudo realizado por Pöppel et. al (2016), onde foi realizado o levantamento epidemiológico de doenças endocrinológicas em várias cidades do Rio Grande do Sul, com 1400 cães e gatos entre 2004 e 2014, baseados em exames laboratoriais, testes hormonais, e em exames de imagem, constatou que a Diabetes Mellitus (DM) foi a segunda doença que mais acometeu caninos (22%) e a primeira em felinos (42%).

A monitoração da glicemia para o tratamento da DM deve ser instituída de maneira precisa para evitar complicações, pois se negligenciada, pode levar o animal a óbito. O monitoramento seriado pelo método tradicional através da glicose capilar muitas vezes se torna complexo, pois estressa o animal devido as múltiplas punções venosas necessárias, dificultando a adesão dos tutores ao esquema de monitoramento proposto. Desta forma, os dispositivos de monitoramento de glicose contínuo são indicados por serem menos invasivos, porém, devido ao preço elevado, seu uso se torna limitado.

Com isso, sensores eletroquímicos contendo eletrodos a base de *laser induced graphene* (LIG) são uma alternativa mais viável para o monitoramento contínuo de glicose, pois são dispositivos de baixo custo de fabricação e fácil adaptação com nanomateriais metálicos. Estes dispositivos são capazes de fornecer informações qualitativas e/ou quantitativas sobre um determinado analito por meio de sua interação com um elemento de reconhecimento ligado a um transdutor, e este tem como função converter os sinais de reconhecimento em sinais mensuráveis e proporcionais à concentração do analito, no caso deste estudo, a glicose.

As nanopartículas demonstram ser materiais promissores dentro da medicina, pois além de suas propriedades intrínsecas, podem ser modificadas, gerando nanoconjugados com atividades sinérgicas.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo apresentar uma alternativa simples, de baixo custo e baseada em materiais carbonáceos modificados com nanomateriais com propriedades supermagnéticas combinadas com biocompatibilidade para aplicação em sensores de detecção de glicose. Também buscou a produção de um sensor com menores limites de detecção e maior sensibilidade.

2 OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo a fabricação de sensores eletroquímicos para monitoramento contínuo de glicose em animais, baseado em plataformas funcionais compostas por grafeno induzido por laser modificado com diferentes nanopartículas, visando a obtenção de menores limites de detecção e maior sensibilidade dos sensores.

2.1 Objetivos Específicos

- Fabricação de plataformas condutoras compostas por eletrodos de grafeno induzido por laser;
- Funcionalização química de estruturas de carbono via processo de decoração física e química das nanoestruturas de carbono;
- Síntese de nanomateriais para a modificação dos sensores;
- Modificação dos sensores com diferentes compósitos e nanopartículas buscando maior sensibilidade;
- Testagem com diferentes combinações de eletrodos para a montagem do dispositivo sensor;
- Avaliação das nanoestruturas quando incorporadas em um sistema de três eletrodos;
- Caracterização morfológica e estrutural dos sensores funcionalizados;
- Determinação da faixa de sensibilidade através da curva analítica;
- Divulgação dos resultados por intermédio de congressos nacionais e internacionais, como também pela elaboração de artigos científicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanomateriais

O significado do termo nanomateriais está vinculado a metodologia de processamento envolvendo a manipulação de partículas em uma escala conhecida como nano (10^{-9} m), não excedendo 100 nm em, pelo menos, uma dimensão (SMITH; HASHEMI, 2013). Há registros do uso de nanomateriais há centenas de anos, por exemplo, a Taça de Lycurgus datada no século IV d.C., o qual a composição engloba nanocristais metálicos de prata e ouro. Porém os estudos com materiais nanométricos começaram a ganhar maior destaque no século XX, levando ao aparecimento e consolidação das nanotecnologias e nanociências (MARTINS; TRINDADE, 2012).

O tamanho das partículas nas estruturas mudam suas propriedades ópticas, eletrônicas e mecânicas, e os elementos apresentados em nanoescala tem por características maior razão superfície/volume e maior exposição de carga dos átomos da parte interna da partícula, com isso, alterando os níveis de energia, estrutura eletrônica e reatividade dos átomos ao longo da estrutura. Além disso, as propriedades químicas, composição e o formato das partículas conferem propriedades específicas ao material (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Os nanomateriais metálicos e de carbono são os mais utilizados, sendo empregados nos setores de energia (YE; JAMES; TOUR, 2018), medicina (FARIA; MAZON, 2019), meio ambiente (TYAGI et al., 2020) e indústria (KUMARI; YADAV; YADAV, 2020). Com todas essas modificações, os nanomateriais tornam-se atraentes e podendo ser utilizados como ferramentas para melhorar os sensores eletroquímicos e otimizar suas características de seletividade e sensibilidade.

3.2 Grafeno

O grafeno é um material de carbono, sendo um dos mais revolucionários, em função das suas propriedades mecânicas, térmicas, ópticas, elétricas, compatibilidade com outros materiais, entre outras, e vem substituindo outros elementos em inúmeras aplicações (GEIM, 2009).

O carbono tem diferentes formas de estruturas, e por muito tempo se considerou que em sua forma pura, em temperatura e pressão ambiente, existia apenas na forma de grafite e diamante, porém, outras estruturas do carbono são conhecidas, como o fulereno, nanotubos, grafeno, entre outros (Figura 1) (CARMONA; GUINEA, 2010; CHA et al., 2013).

ALOTROPIA DO CARBONO

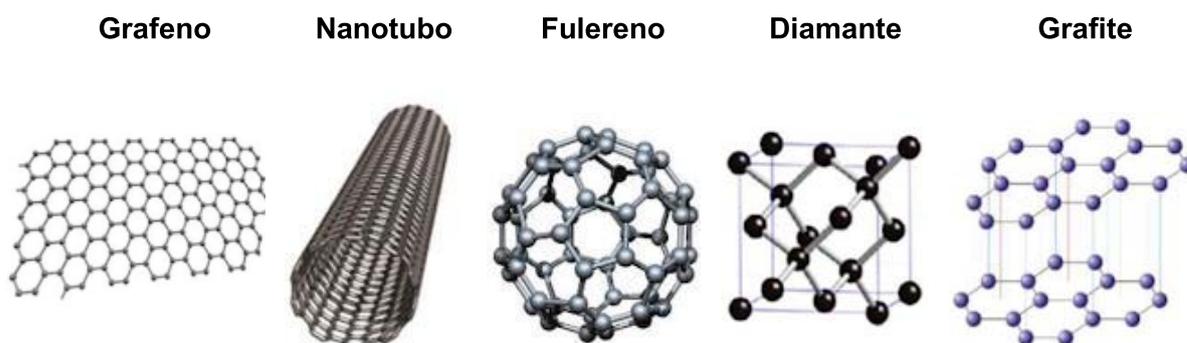


Figura 1: Variações dos tipos de materiais à base de carbono. Fonte: TIWARI et al., 2016 (adaptado).

O grafeno é constituído por uma camada única de átomos de carbono, ligados em estruturas cristalinas hexagonais através de ligações sp^2 , com um plano bidimensional. Ainda, uma estrutura de múltiplas camadas pode ser formada pelo empilhamento destas por interações do tipo ligações de Van der Waals (Figura 2) (TYAGI et al., 2020). Sendo assim, é possível afirmar que todo material gráfico de outras dimensões tem como base o grafeno. Outras características que o diferenciam são sua grande área superficial, excelente condutividade elétrica, facilidade de funcionalização e alta resistência mecânica (CHA et al., 2013).

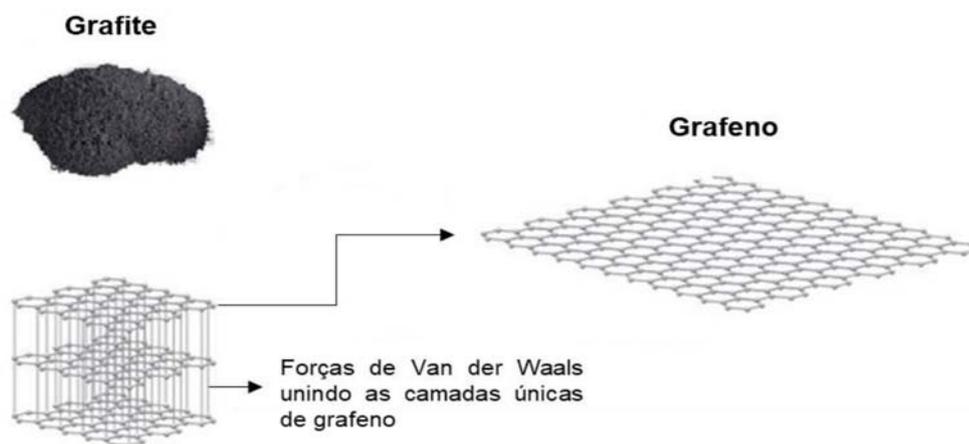


Figura 2: Estrutura cristalina do grafeno. Fonte: MELO, 2015 (adaptado).

3.3 Grafeno por Indução a Laser

Descrito pela primeira vez por LIN et al. (2014), o método denominado *laser induced graphene* (LIG), consiste em irradiar laser de CO₂, causando uma redução fototérmica no substrato, aumentando a relação C–C/C–O. Quando comparado aos demais métodos existentes de deposição química e física de vapor, é mais rápido, barato e simples, e também não requerer processos adicionais, podendo ser facilmente adaptado para fabricação em escala industrial.

A técnica consiste na eliminação dos grupos funcionais do material, deixando os átomos de carbono desbalanceados eletricamente, assim buscam se rearranjar com outros átomos de carbono vizinhos. Desta forma, os átomos de carbono sp³ são convertidos para sp², em um processo chamado “grafenização” (LIN et al., 2014) (DOSI et al., 2019). A técnica do LIG é amplamente abordada em diversos trabalhos com capacitores (LIN et al., 2014), sensor para glicose (TEHRANI; BAVARIAN, 2016), sensor de nitrogênio em solo (GARLAND et al., 2018), sensor para gás metano (DOSI et al., 2019), sensor de dopamina (XU et al., 2018), sensor de umidade (LAN et al., 2020), eletrodo separador de água em H₂ e O₂ (ZHANG et al., 2017), na utilização para tratamento de efluentes da indústria têxtil (RATHINAM et al., 2017), entre outros.

3.4 Sensores Eletroquímicos

Estes dispositivos são capazes de fornecer informações qualitativas e/ou quantitativas sobre um determinado analito por meio de sua interação com um elemento de reconhecimento ligado a um transdutor, e este tem como função converter os sinais de reconhecimento em sinais mensuráveis e proporcionais à concentração do analito. Estes sensores são normalmente compostos por três eletrodos, um eletrodo de trabalho (ET), um de referência (ER) e o contra eletrodo (CE), além de um eletrólito suporte e um elemento de transdução elétrica (LOGUERCIO et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022; ROSSATO et al., 2022).

Os eletrodos são fabricados pela técnica de gravação direta a laser (GDL), também utilizada para projetar/demarcar desenhos padronizados na superfície de diferentes materiais, como polímeros, metais, cerâmicas, vidro e madeira. A técnica GDL é baseada em transições de estado físico localizados, causados por um efeito térmico. A região onde o feixe de laser é irradiado resultam em alterações químicas e morfológicas, mantendo intactas as zonas onde o laser não foi direcionado, sem qualquer modificação química ou estrutural (LIU et al., 2019)

Esta técnica se destaca devido a sua capacidade de sintetizar grafeno de alta qualidade e alta área superficial em diferentes tipos de substratos, naturais e sintéticos, gerando uma classe de material denominada grafeno induzido por laser (laser induced graphene – LIG). Assim, plataformas contendo eletrodos a base de LIG podem ser fabricadas de forma simples, já que o processo ocorre em temperatura ambiente, sem utilização de reagentes químicos ou solventes e sem a necessidade de atmosferas inertes ou pós-tratamento, tornando o processo extremamente interessante para produções industriais em larga escala. Além disso, esta metodologia permite diferentes opções em relação as dimensões e formatos dos eletrodos a serem fabricados, podendo ser ajustadas de acordo com as condições de aplicação desejada, como exposto na Figura 3.



Figura 3: Ilustração de alguns designs normalmente utilizados como eletrodos de sensores.

Com grande absorção na região do infravermelho (Infrared – IR) e perto da região do ultravioleta (UV), a poliimida torna viável adquirir o grafeno poroso por meio da incidência de laser em sua superfície. Isso ocorre em função da abundante presença de carbono cristalino hexagonal dentro das estruturas de imida do material, com a possibilidade de ser efetivado a gravação de padrões em sua superfície, tal como ilustrado na Figura 4 (LI, 2020).

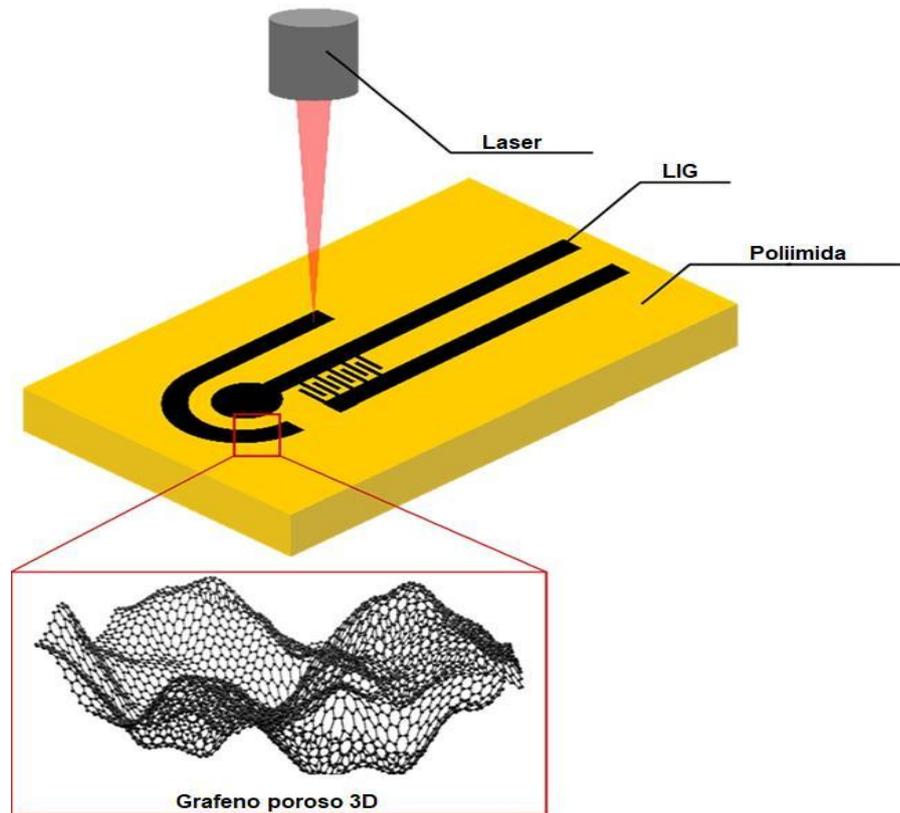


Figura 4: Ilustração de padrões de LIG em poliimida. Fonte: VIVALDI et al, 2021 (adaptado).

A detecção de glicose com sensores não enzimáticos é um método mais estável e econômico quando comparado aos sensores comuns de glicose, pois estes dependem de oxigênio, fazendo que os eletrodos livres de enzimas apresentem boa sensibilidade e seletividade (ZHANG et al, 2014).

3.5 Diabetes e Monitoramento Glicêmico

Uma das desordens endócrinas mais diagnosticadas em clínica de pequenos animais é a Diabetes Mellitus (DM), que consiste em uma síndrome caracterizada por hiperglicemia, ocasionada pela falta de insulina ou incapacidade de executar seus efeitos metabólicos (VEIGA, 2005). Produzida pelas células β na porção endócrina do pâncreas, a insulina auxilia na absorção de glicose no sangue e quando sua absorção é prejudicada, ocorre a deficiência de insulina, e os músculos, fígado e gordura corporal não absorvem mais a glicose sanguínea como fonte de energia, que por não ser aproveitada, fica armazenada na circulação, resultando em hiperglicemia (WIDMAIER; RAFF; STRANG, 2006).

Em cães, a Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) é a mais comum, e raramente acomete felinos (GOTTLIEB; RAND, 2018). É caracterizada por uma deficiência primária das células β pancreáticas causada pela sua destruição imunomediada, fazendo com que o pâncreas deixe de produzir insulina, o que impede que a glicose chegue às células. Em consequência, as células ficam sem combustível para produção de energia, ocasionando uma deficiência absoluta de insulina, conforme ilustrado na Figura 5, tornando insulino dependentes a maioria dos animais acometidos (REHMAN et al., 2020). A etiopatologia da DMT1 em cães é multifatorial, podendo ser de origem genética, patológica – obesidade, pancreatite, hiperlipidemia – ou de fatores ambientais, como alimentação inadequada, sedentarismo e administração de medicamentos (SLINGERLAND, FAZILOVA; PLANTINGA, 2009).

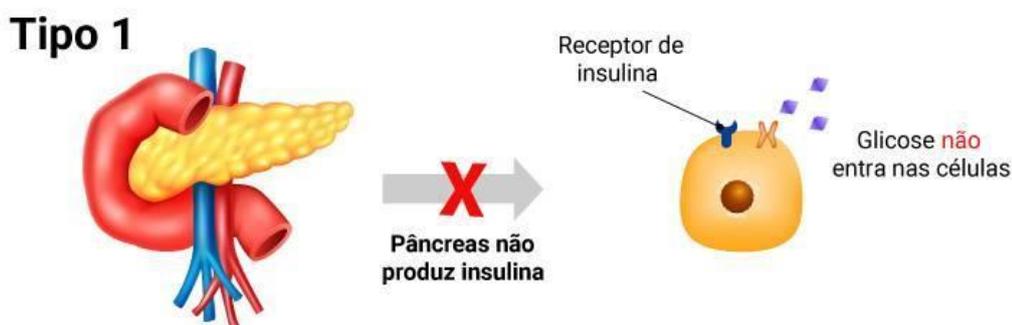


Figura 5: Ilustração de como ocorre a DMT1. Fonte: Unifesp, 2020.

Já em felinos, a Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2) é a mais diagnosticada, e em cerca de 80% dos gatos, é induzida pela obesidade, provocando uma deficiência

relativa de insulina, causado por patologias que prejudicam a ação da insulina, fazendo com que a glicose não entre nas células para produzir energia, causando um acúmulo de insulina no pâncreas, o sobrecarregando, levando a sua falha, conforme ilustrado na Figura 6 (DAVISON, 2015). A DM2 também é multifatorial, podendo ser desencadeada por patologias, como por exemplo: obesidade, pancreatite, acromegalia e insuficiência renal, ou por fatores ambientais, raciais e genéticos – idade, sedentarismo, sexo (machos apresentam maior predisposição) e/ou administração de medicamentos (REHMAN et al., 2020).

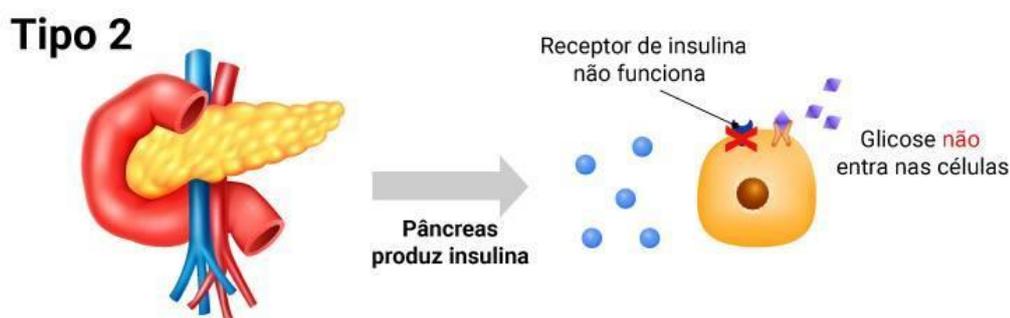


Figura 6: Ilustração de como ocorre a DM2. Fonte: Unifesp, 2020.

A sintomatologia clássica da Diabetes Mellitus inclui poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e letargia (NELSON; REUSCH, 2014). A neuropatia diabética é um sinal clássico em felinos, onde os membros posteriores do animal se apresentam em posição plantígrada (Figura 7), com alterações de marcha devido a ataxia e fraqueza muscular, causando diminuição dos reflexos, déficit proprioceptivos, dificuldade ao saltar e dor neuropática (RAND, 2020). Retinopatias são menos comuns em animais do que em humanos, mas também podem se manifestar como sinal clínico de DM, principalmente em cães (HERRING; PANCIERA; WERRE, 2014).



Figura 7: Felino com os membros posteriores em posição plantígrada. Fonte: PRAHL et al, 2007.

A monitoração da glicemia para o tratamento da Diabetes Mellitus deve ser instituída de maneira precisa para evitar complicações, pois o tratamento incorreto com insulina pode causar hipoglicemia, hiperglicemia transitória e morte (MOONEY; PETERSON, 2015). Os métodos de monitoramento de glicose podem ser através da concentração sérica de frutossamina, hemoglobina glicada, glicose urinária, glicose capilar ou mensuração contínua via intersticial (JERICÓ, ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015). A monitoração seriada de glicemia pelo método tradicional através da glicose capilar muitas vezes se torna um problema, seja no ambiente familiar ou hospitalar, pois estressa o animal devido as múltiplas punções venosas necessárias (Figura 8), dificultando a adesão dos tutores ao esquema de monitoramento proposto pelo Médico Veterinário (NELSON; COUTO, 2015).

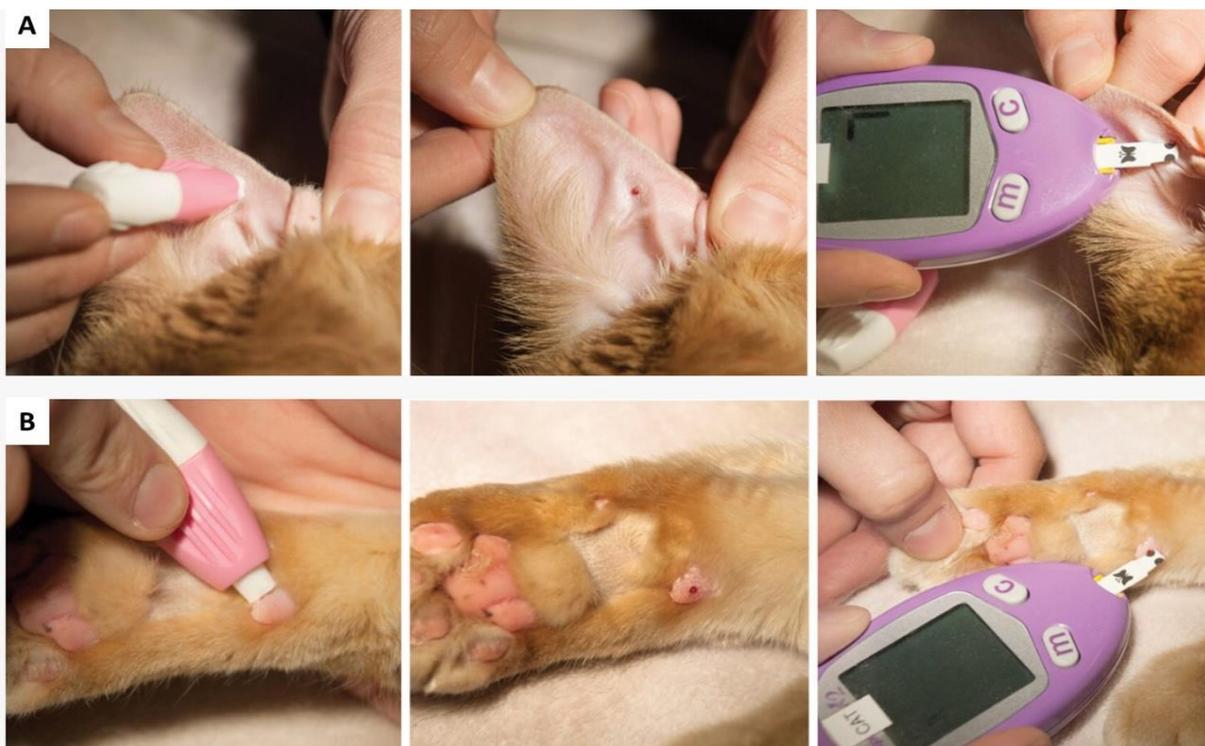


Figura 8: Exemplos de punções venosas tradicionais em um felino realizadas a) na orelha e b) no coxim. Fonte: BUGBEE; FUJISHIRO; MADELINE, 2019.

Neste caso, o uso do dispositivo Freestyle Libre® (Figura 9) é indicado, pois é de fácil aplicação e obtêm aferições contínuas por até 14 dias (CORRADINE et al., 2016). Dispositivos de monitoramento de glicose contínuo são menos invasivos e fornecem dados sobre variações na concentração de glicose intersticial ao longo do dia, porém, devido ao preço elevado, seu uso se torna limitado (REINEKE et al., 2010).



Figura 9: Kit completo de monitoramento de glicose Freestyle Libre®. Fonte: Freestyle/Abbott.

Outros problemas encontrados nesses dispositivos, segundo um estudo de Hafner et al. (2013), é que cerca de 10% a 25% dos sensores falharam, mesmo quando colocados com a técnica correta, pois pode ocorrer falha no adesivo, sangramento, microincrustação no sensor, e devido ao espaço subcutâneo limitado de alguns animais e até o movimento do paciente, pode deslocar o sensor do espaço intersticial. O autor também cita que a maioria dos sensores de glicose contínua dura de 5 a 10 dias em pacientes veterinários.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação dos Sensores

Para obtenção dos sensores de grafeno foram utilizados filmes de poliimida (Kapton[®]), fixados em um substrato de polietileno com espessura de 1mm e irradiados pelo laser de CO₂ (Router VS3020P, 40W, Visutec[®]) (Figura 10). O laser resulta na irradiação de temperaturas acima de 2500 °C, e pelo efeito dos processos fototérmicos, ocorre a quebra das ligações C–O, C=O e N–C da poliimida. Estes átomos se rearranjam por meio de ligações com átomos de carbono vizinhos, formando estruturas gráficas com elevada área superficial, porosidade e excelente condutividade elétrica, tornando-se interessante para aplicação na área de sensores eletroquímicos (NORIMATSU; KUSUNOKI, 2014).

Para avaliar a melhor condição de fabricação, foram testadas diferentes potências (3,8 e 4,2 W) combinadas com diferentes velocidades (10 a 100 mm/s) e através deste mecanismo é encontrado o melhor desempenho, observado nos picos anódicos e catódicos dos sensores nos filmes Kapton[®].

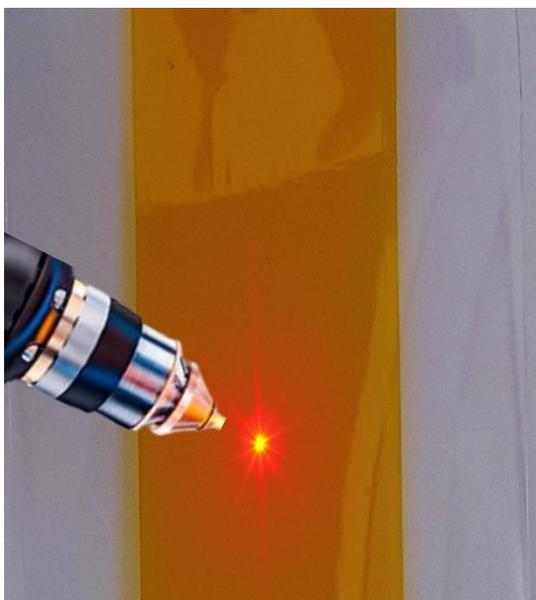


Figura 10: Ilustração do substrato com poliimida irradiado pelo laser de CO₂.

Os sensores eletroquímicos foram confeccionados em um design contendo três eletrodos, de trabalho (ET), de referência (ER) e contra eletrodo (CE), como ilustrado

na Figura 11. Os eletrodos ET e CE são formados apenas por LIG, com áreas de 12,5 e 24 mm², respectivamente, enquanto o eletrodo de referência, com área de 6,25 mm², passa por um processo de modificação, de modo a fornecer um potencial elétrico fixo e definido, garantindo a correta aquisição dos dados do eletrodo de trabalho durante a análise. O processo se baseia em recobrir o eletrodo com uma tinta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) ALS da BAS Inc. Tokyo Japan®.

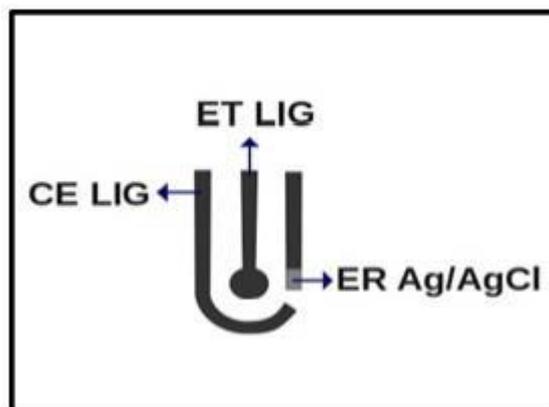


Figura 11: Ilustração dos três eletrodos que constituem os sensores eletroquímicos modificados com tinta prata/cloreto de prata.

4.2 Modificação dos Sensores

Para melhorar a relação entre os limites de detecção, eficiência, tempo de fabricação e custo-benefício, foram investigadas modificações na composição do eletrodo de trabalho, que pode variar de acordo com a necessidade de aplicação, principalmente no que se refere a quantidade de analito que precisa ser detectado. Tais modificações foram realizadas pela adição de diferentes materiais como ferro, nanotubos de carbono, nióbio, titânio, platina, cobre, estanho, tioureia e ureia, transformando o LIG em um compósito.

Para as modificações citadas, foram testadas duas rotas diferentes. A primeira foi realizada a partir da síntese de nanopartículas de diferentes compostos por micro-ondas. Essas nanopartículas foram dissolvidas em diferentes soluções, e estas foram depositadas pela técnica de *drop casting* no eletrodo de trabalho, que neste primeiro momento contém apenas uma camada de LIG. Após a deposição, os sensores foram secos com auxílio de uma lâmpada infravermelha a fim de acelerar o processo. Então realiza-se uma segunda queima através do laser com objetivo de fixar a deposição

das partículas. Para este primeiro momento, as partículas testadas foram sintetizadas através da rota de síntese hidrotermal assistida por micro-ondas (MHS).

A MHS é uma das formas mais eficientes para realização de síntese, pois é um método de alta qualidade para sintetizar nanopartículas. Esse processo possui excelentes características como tempo e temperatura de síntese baixas, além de permitir uma mistura mais homogênea entre os precursores, o que melhora sua reatividade, resultando em um material mais uniforme, com morfologia nanoestruturada. Em adição, é uma rota economicamente viável, além de não causar danos ao meio ambiente, pois não são utilizados solventes orgânicos (ORTIZLANDEROS et al., 2012). Nesse processo, a etapa inicial envolve a introdução de uma solução aquosa contendo os precursores em um recipiente feito de politetrafluoretileno (PTFE). Posteriormente, o recipiente é acondicionado dentro de um reator, em aço, o qual é hermeticamente selado. A subsequente etapa consiste no aquecimento do sistema em forno com parâmetros de temperatura e duração determinados (CHEN; MAO, 2007). A aplicação de radiação micro-ondas desempenha um papel crucial ao acelerar o processo de aquecimento e as reações necessárias para alcançar a cristalização do material desejado.

Para a segunda metodologia utilizada, os compostos foram dissolvidos e depositados no eletrodo de trabalho por *drop casting*, sem a síntese prévia das nanopartículas no micro-ondas. Nesta rota, foi esperada a formação das nanopartículas através de uma segunda queima do eletrodo de trabalho, conforme mostrado na Figura 12, gerando uma segunda camada de LIG já com os modificantes agregados, otimizando a incorporação dos compostos na estrutura de grafeno e esperando a formação de nanopartículas.

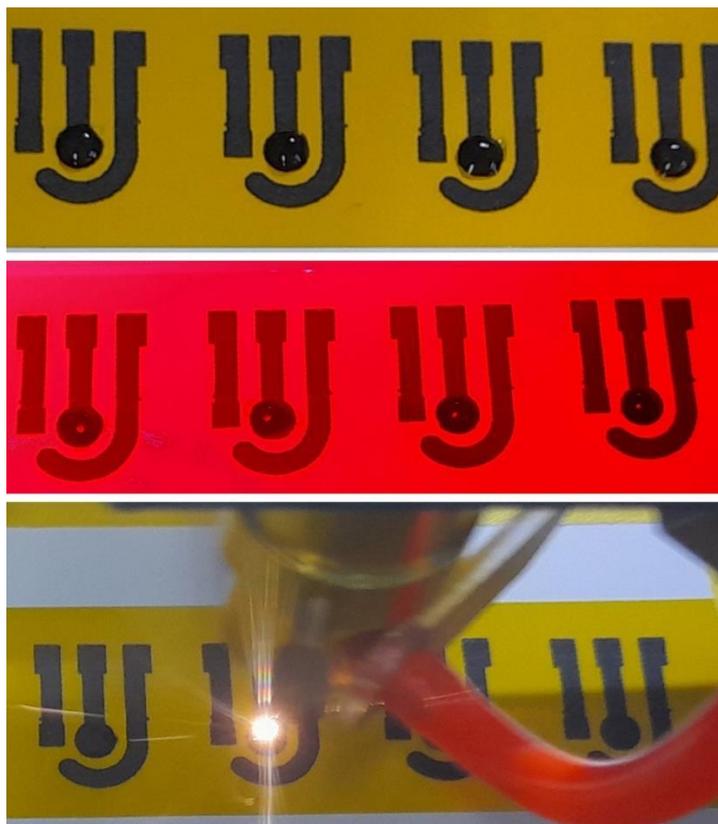


Figura 12: Processo de deposição, secagem e queima do eletrodo de trabalho do sensor.

Compondo o sistema eletroquímico foi utilizado como eletrólito uma solução de NaOH 0,1 M, sendo este o eletrólito de suporte usualmente utilizado para sensores não enzimáticos de glicose, e para os testes eletroquímicos, foi preparada uma solução de glicose de 1 mM, diluída no eletrólito de NaOH (TEHRANI; BAVARIAN, 2016).

4.3 Caracterização dos Sensores

A caracterização eletroquímica foi realizada utilizando um potenciostato de bancada (Autolab PGSTAT302N - METROHM®) e um potenciostato portátil (PalmSens®). Entre as análises está a voltametria cíclica (VC), realizada com a janela de potencial entre -0,4 e 0,6 V, e velocidade de varredura de 50 mV/s. Tais análises possibilitaram uma visão geral dos níveis de sensibilidade e seletividade dos sensores, e viabilizaram a determinação da curva analítica. Foi realizada também uma

análise de cronoamperometria em diferentes potenciais, visando definir o melhor potencial de oxidação da glicose.

As nanoestruturas dos sensores também foram avaliadas de forma morfológica por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (Shimadzu SSX-550 Superscan® - AccV 15.0kV Probe 4.0) (MEV).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes preliminares para identificar as melhores potências de radiação do laser foram realizados, onde observou-se que as potências mais altas dentro do proposto na metodologia (2,4 e 5,4 W), na velocidade 100 mms^{-1} , apresentaram melhores resultados quanto aos picos anódicos e catódicos, corroborando com resultados de LIN et al. (2014). O aumento da potência do laser leva a um maior grau de grafenização, entretanto, à medida que a potência sobe acima de 8,4%, a qualidade dos filmes começa a ser prejudicada formando fissuras devido à grafenização excessiva pelo processo de oxidação, conforme mostrado na Figura 13, onde nota-se o LIG uniforme (Figura 13A) com 8,2% de potência de laser. Já na Figura 13B, o LIG começa a demonstrar pequenas falhas em sua composição, e nas Figuras 13C e 13D já ocorre um processo claro de degradação, mostrando fissuras evidentes devido ao aumento da energia térmica.

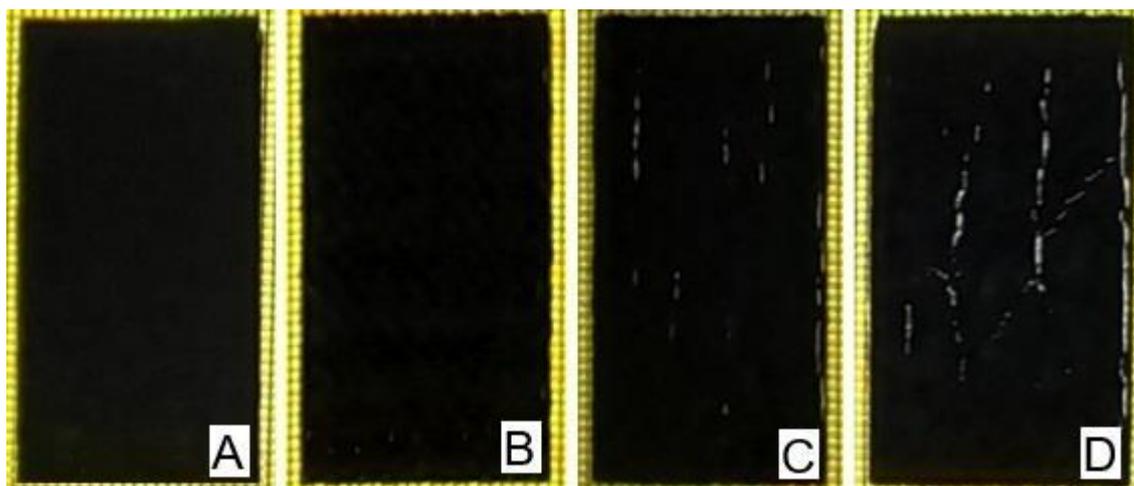


Figura 13: LIG produzido com diferentes potências do laser, onde: a) 8,2%, b) 8,4%, c) 8,6%, d) 8,8%.

5.1 Análises Eletroquímicas

Foram realizadas análises eletroquímicas dos sensores para medir a resposta elétrica com e sem analito. Baseado no estudo de Tehrani & Bavarian (2016), a técnica mais adequada para avaliar o pico de oxidação na detecção de glicose é a voltametria cíclica (VC), onde é aplicado uma janela de potencial específica, enquanto é medida a corrente de resposta.

Diante disto, o primeiro teste realizado foi com o sensor contendo somente LIG (Figura 14). Foi usada uma janela de potencial entre -0,4 e 0,6 V, porém não foi constatada uma diferença significativa de corrente, além da ausência de corrente relacionadas ao pico de oxidação, evidenciando a necessidade de modificação dos sensores.

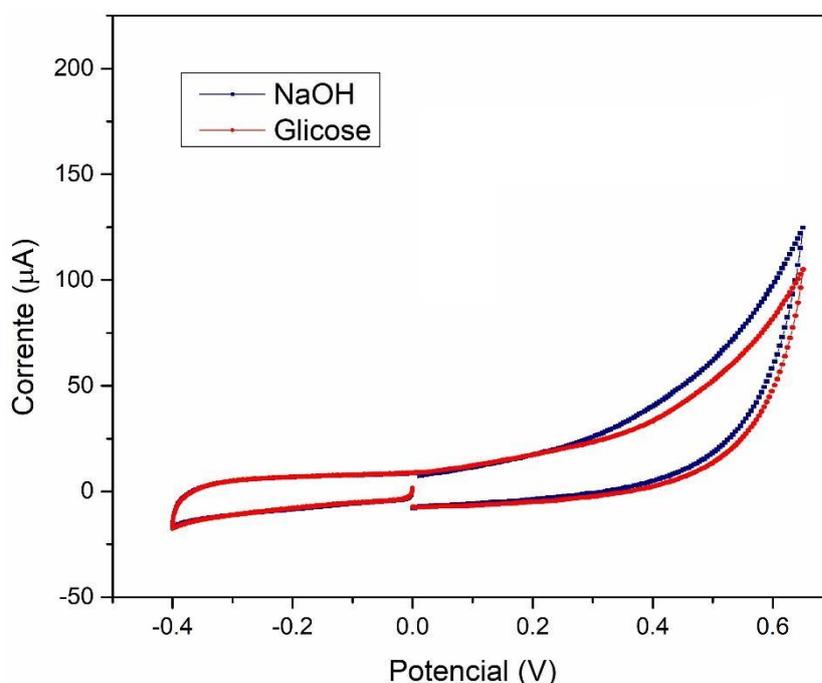


Figura 14: Voltametria cíclica do sensor de LIG.

Na Figura 15, os compostos foram sintetizados através da técnica por micro-ondas. No gráfico é mostrada a diferença entre a corrente do pico anódico para a análise com e sem glicose. Nota-se que a resposta de corrente tanto para o óxido de ferro quanto para a magnetita são as mesmas, porém quando adicionado silicato à magnetita, houve um aumento significativo na corrente. Já na modificação com óxido de grafeno, a adição de óxido de titânio obteve uma resposta de corrente muito baixa, principalmente quando comparado ao GO com platina. As modificações com cobre foram as que apresentaram as maiores correntes, mostrando-se um excelente material para melhorar a resposta do sensor de glicose.

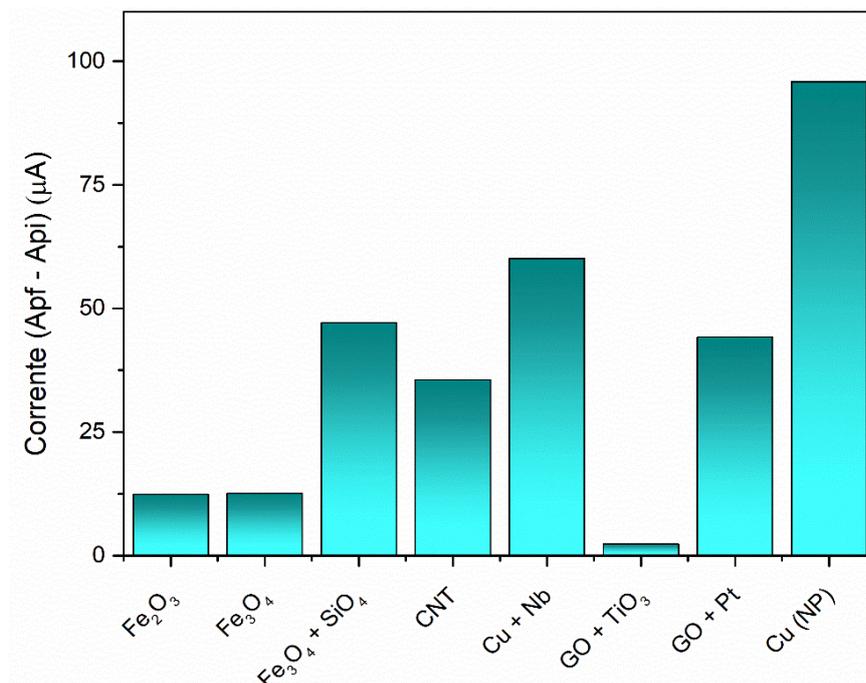


Figura 15: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose para sensores modificados com materiais sintetizados por micro-ondas.

Como visto na Figura 15, as nanopartículas de cobre apresentaram melhor desempenho, com diferença de pico de corrente de 95 µA. Os valores para esta medida foram retirados da voltametria cíclica, conforme mostrada na Figura 16.

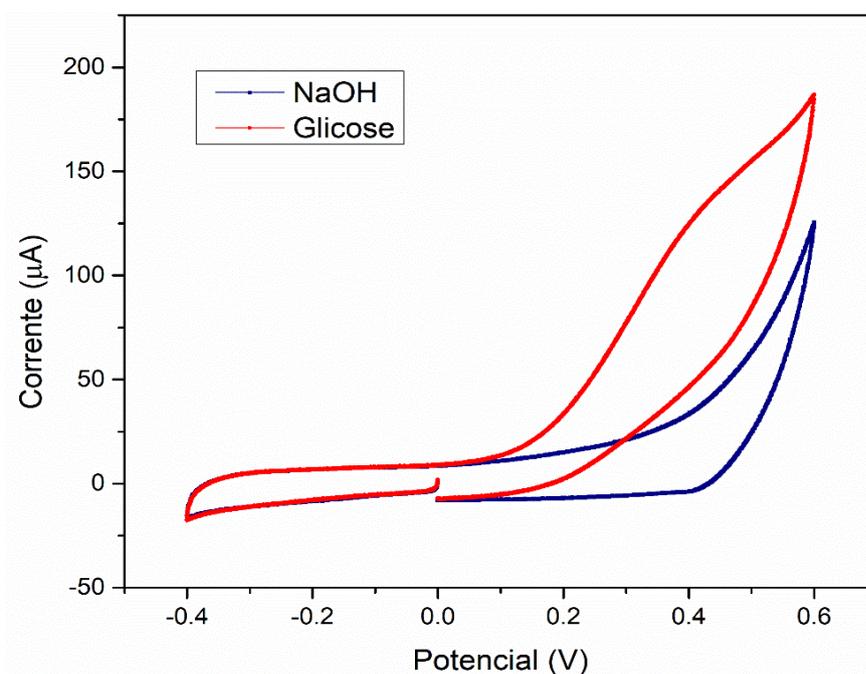
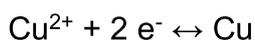


Figura 16: Voltametria cíclica de sensor de LIG + nanopartículas de Cu, com e sem adição de glicose.

Na Figura 17, os compostos foram depositados por *drop casting* e a síntese destes foi realizada através da gravação direta a laser (GDL). Observa-se que alguns materiais não apresentaram diferença de pico de corrente significativa, com valores abaixo de 20 μA , impossibilitando a identificação da glicose. Também pode-se notar que todos os materiais contendo cobre na sua composição apresentaram resultados significativos, onde destacam-se o nitrato de cobre e o sulfato de cobre. A reação de oxirredução do cobre pode ser vista abaixo.



Precursores de cobre foram os escolhidos devido à sua estabilidade física e química, além de ser de baixo custo e também é de fácil mistura com polímeros (MALLIK et al. 2001).

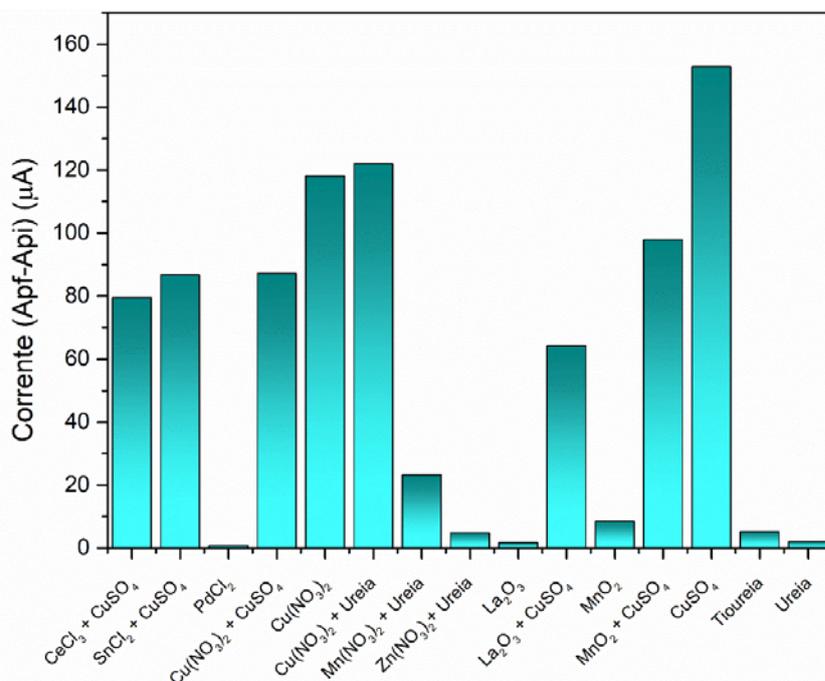


Figura 17: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose para sensores modificados com materiais sintetizados por GDL.

Na Figura 17, a maior diferença de pico de corrente foi o de sulfato de cobre, com aproximadamente 153 μA . Os valores para esta medida foram obtidos da voltametria cíclica realizada e apresentada na Figura 18.

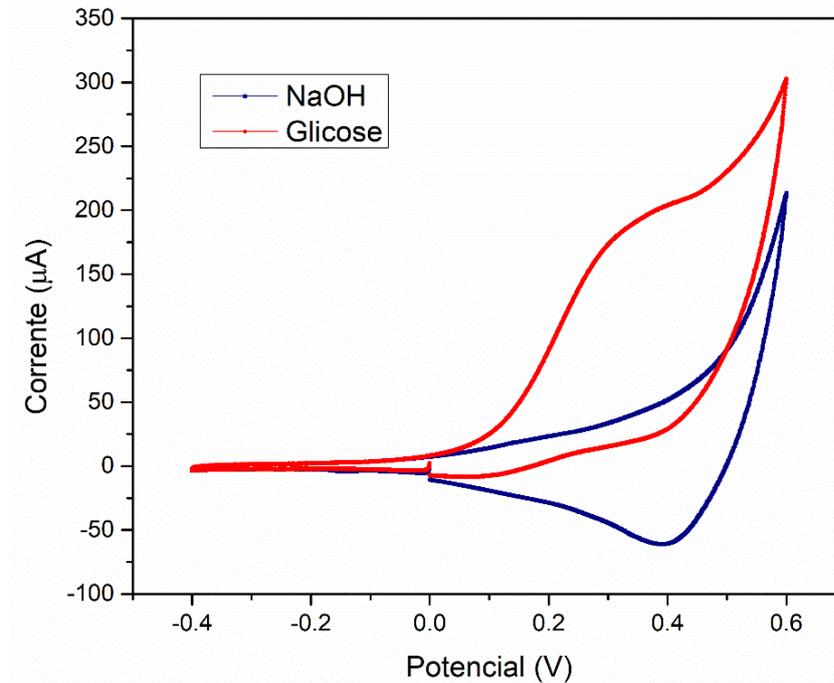


Figura 18: Voltametria cíclica de sensor de LIG modificado com CuSO_4 , com e sem glicose.

Na Figura 19, é mostrado os melhores resultados entre as duas sínteses, isto é, a maior diferença de pico de corrente com o material sintetizado por micro-ondas (NP cobre), e o que obteve a maior diferença de pico de corrente sintetizado via GDL (CuSO_4).

Adicionalmente foram realizados testes do sulfato de cobre com adição de ureia, uma vez que esta se mostrou promissora em adição a outros materiais. Na Figura 17 é possível notar que a modificação dos sensores somente com ureia não apresentou bons resultados, porém quando usada em conjunto com outro material, houve uma melhora na resposta de picos de corrente, com e sem glicose. A partir disto, optou-se por testar o sulfato de cobre também com ureia.

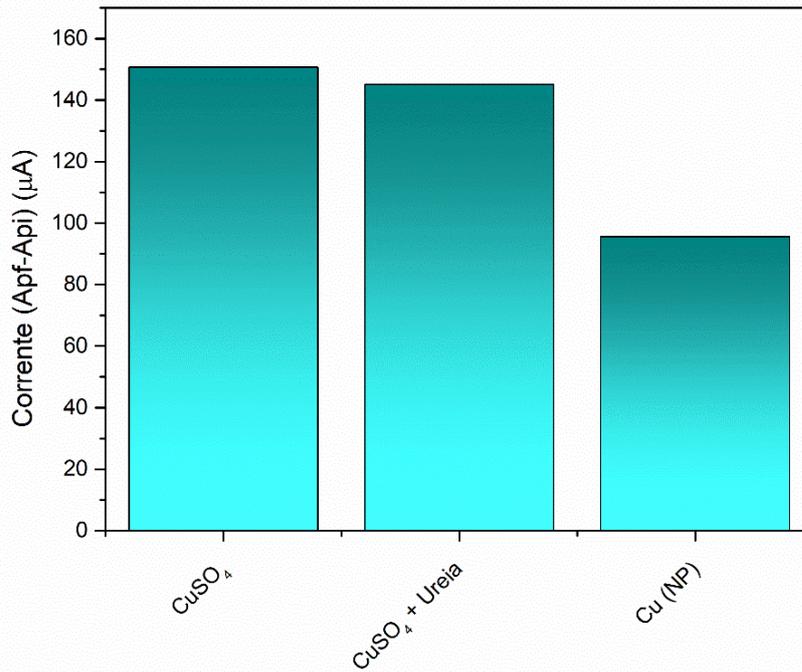


Figura 19: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose comparando os melhores materiais de cada método de síntese.

Após os testes, os resultados mostraram que a adição de ureia ao sulfato de cobre não aumentou a diferença de pico de corrente quando comparada com a diferença de pico de corrente do sulfato de cobre. Porém, após os testes, notou-se que a ureia torna o sensor com sulfato de cobre mais uniforme, mesmo com maiores concentrações do modificante, como pode se observar na Figura 20. Visando confirmar essa hipótese, também foi realizado a análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

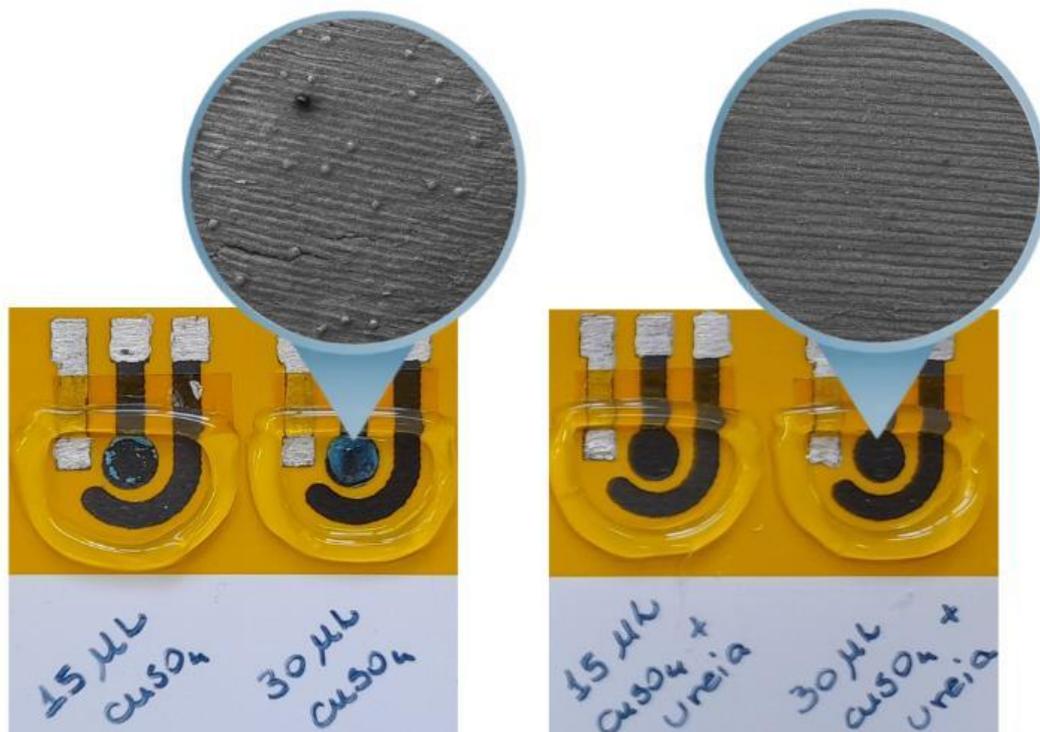


Figura 20: Sensores de CuSO_4 com e sem ureia.

Baseados nos resultados das Figuras 17 e 19, onde o nitrato de cobre e o sulfato de cobre apresentaram melhores resultados, novos testes foram realizados apenas com esses materiais. Considerando a questão da homogeneidade apresentada na Figura 20, também foram realizados testes com adição de ureia. Assim foram realizados testes com as quatro modificações apresentadas na Figura 21, onde o sulfato de cobre apresentou maior diferença de pico de corrente com e sem ureia.

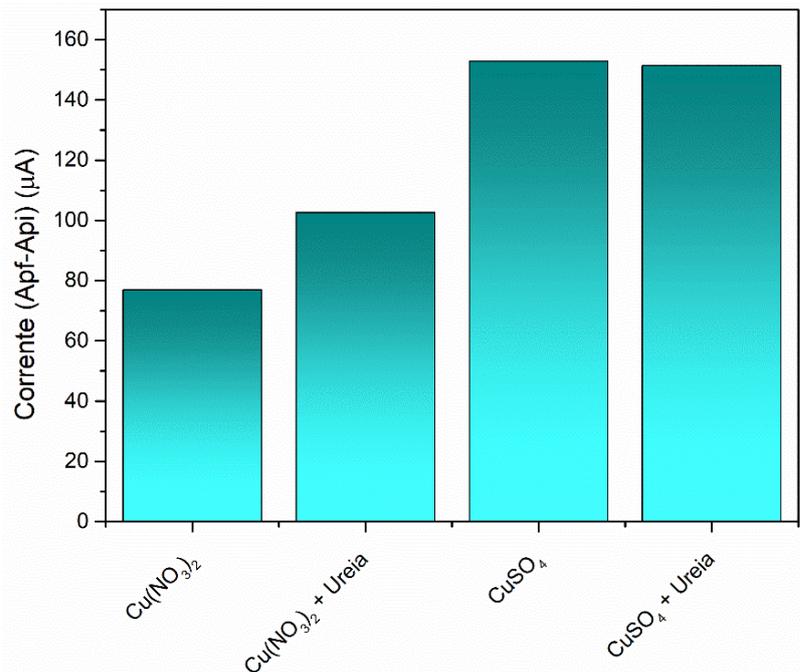


Figura 21: Diferença de corrente no pico de oxidação com e sem glicose para sensores modificados com $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ e CuSO_4 , com e sem ureia.

A Figura 22 mostra as voltametrias cíclicas dos sensores com as modificações anteriores. Todas modificações responderam à presença de glicose, entretanto a maior diferença de corrente na presença e ausência de glicose foi com sulfato de cobre. A adição de ureia no sulfato de cobre não apresentou melhora significativa na resposta, porém, como citado anteriormente, sua adição leva à uma melhor homogeneidade, o que pode apresentar uma melhor reprodutibilidade. Sendo assim, esta foi a modificação de escolha para seguir os testes de curva analítica.

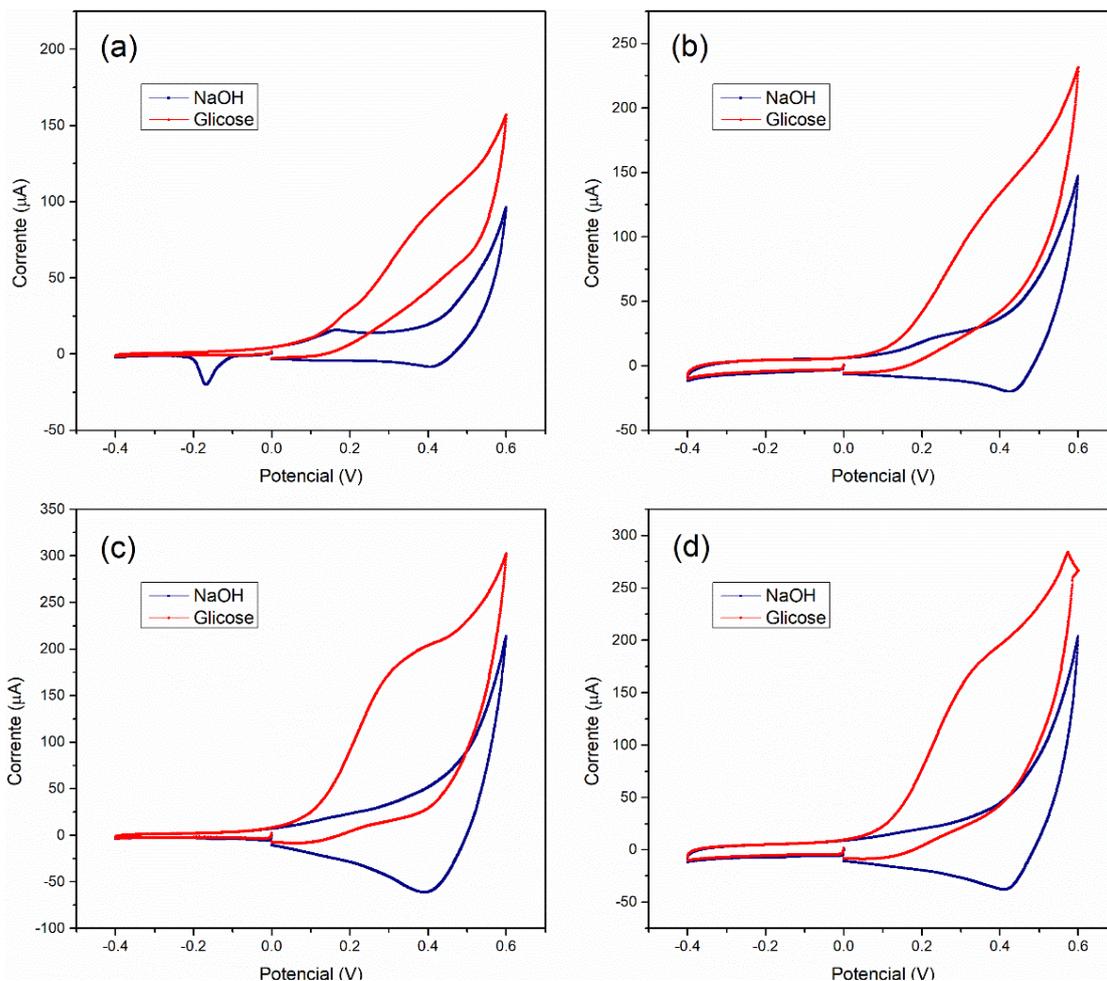


Figura 22: Voltametrias cíclicas dos sensores modificados com: **a)** $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, **b)** $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ + ureia, **c)** CuSO_4 , **d)** CuSO_4 + ureia.

Após os testes com vários materiais, foi determinado que o sulfato de cobre foi material que obteve a melhor resposta para o sensor de glicose. Diante disso, foram realizados testes com diferentes potências e velocidades do laser na segunda queima, afim de identificar a melhor resposta de corrente para a modificação com CuSO_4 apenas na área de modificação do eletrodo de trabalho, conforme ilustrado na Figura 23, com a fileira superior contendo apenas LIG e a inferior contendo LIG + CuSO_4 .

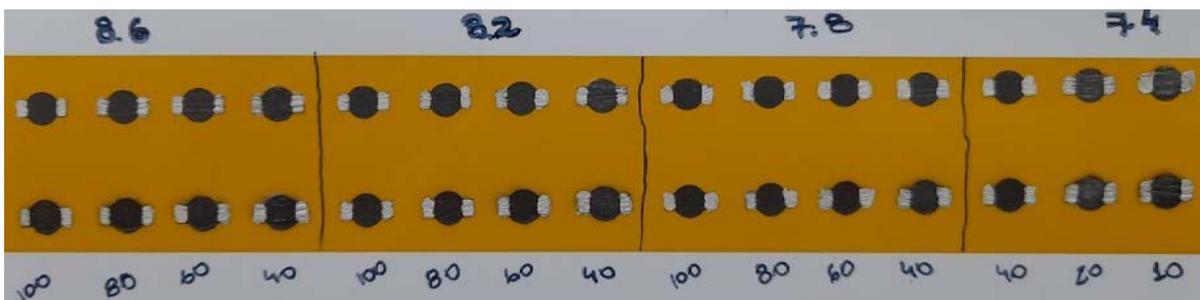


Figura 23: Diferentes potências e velocidades de GDL.

Como visto na imagem acima, nem todas combinações de velocidade/potência formam um grafeno homogêneo, onde algumas fissuras são formadas. Após, foram produzidos sensores com os melhores parâmetros e realizadas as análises voltamétricas a fim de estudar a resposta dos sensores com esses parâmetros, conforme o gráfico da Figura 24. Para tal, foi comparada a corrente do pico anódico com e sem glicose. A corrente de resposta para a potência 8.2% com velocidade 80 mm.s^{-1} foi a que obteve maior diferença de corrente entre as análises com e sem glicose, com 82 μA , o que sugere que essa é a condição otimizada para a produção dos sensores modificados com CuSO_4 .

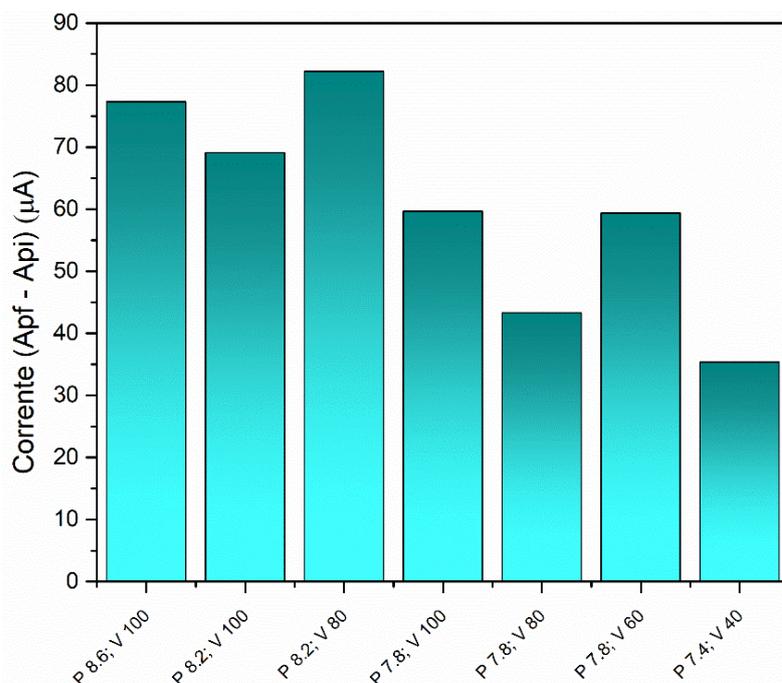


Figura 24: Diferenças de pico de corrente de sensores com e sem glicose, com diferentes potências e velocidades no processo GDL.

Visando a otimização dos sensores, estes foram confeccionados com diferentes concentrações de solução de CuSO_4 e ureia. Para os testes, foram utilizadas três condições diferentes de soluções, onde:

- A.** 5 μL solução de 0,1 M CuSO_4 + 0,5 M de ureia
- B.** 10 μL solução de 0,1 M CuSO_4 + 0,5 M de ureia
- C.** 10 μL solução de 0,4 M CuSO_4 + 2,0 M de ureia

A partir das soluções acima, foram realizadas voltametrias dos sensores, conforme a Figura 25. Com a solução A, a resposta da corrente foi próxima 60 μA . A solução B apresentou 79 μA de corrente, e ao quadruplicar a concentração da solução de CuSO_4 e ureia, a resposta da corrente baixa para 63 μA , sugerindo uma saturação do dopante do eletrodo de trabalho.

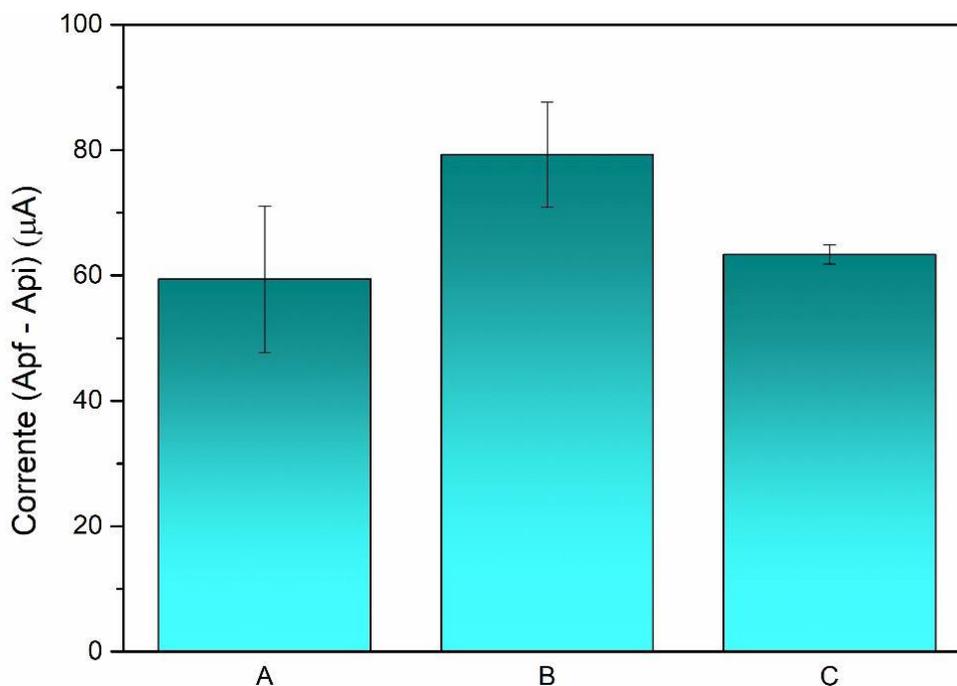


Figura 25: Diferenças de pico de corrente de sensores modificados com CuSO_4 + ureia com diferentes concentrações.

A fim de realizar a curva analítica, foi investigado o melhor potencial de oxidação da glicose. Para tal, foram performadas cronoamperometrias com diferentes potenciais (0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 V) com tempo de aplicação de potencial de 50 segundos para amostras com e sem glicose. A partir dos resultados, foi calculada a maior diferença de resposta de corrente, conforme a Figura 26.

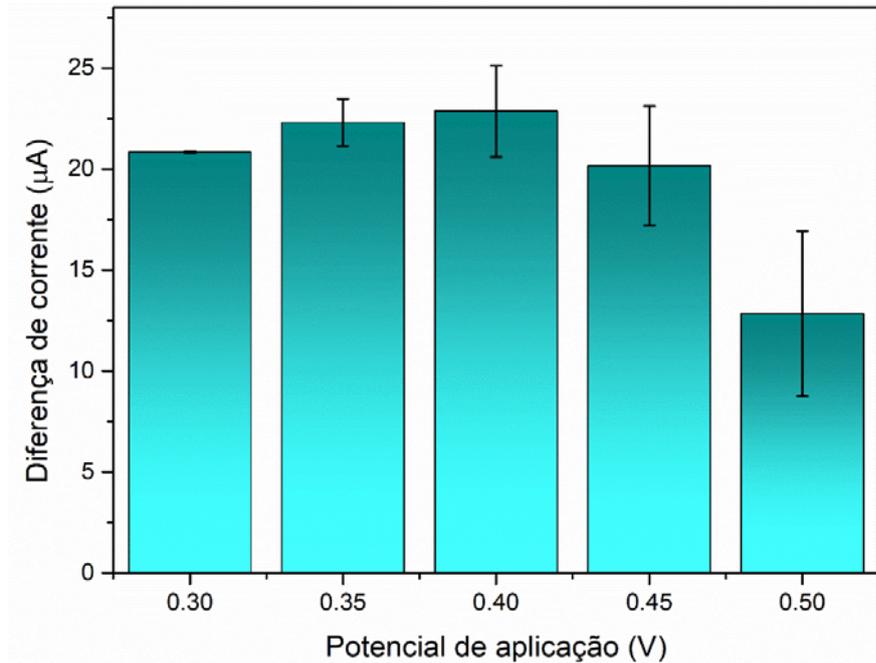


Figura 26: Diferença de corrente para determinação do melhor potencial elétrico para aplicação.

A partir do gráfico apresentado, foi possível identificar que as análises realizadas com potencial 0,4 V apresentam a maior diferença, o que sugere a realização da curva analítica com este potencial. A cronoamperometria realizada com estes parâmetros é apresentada na Figura 27.

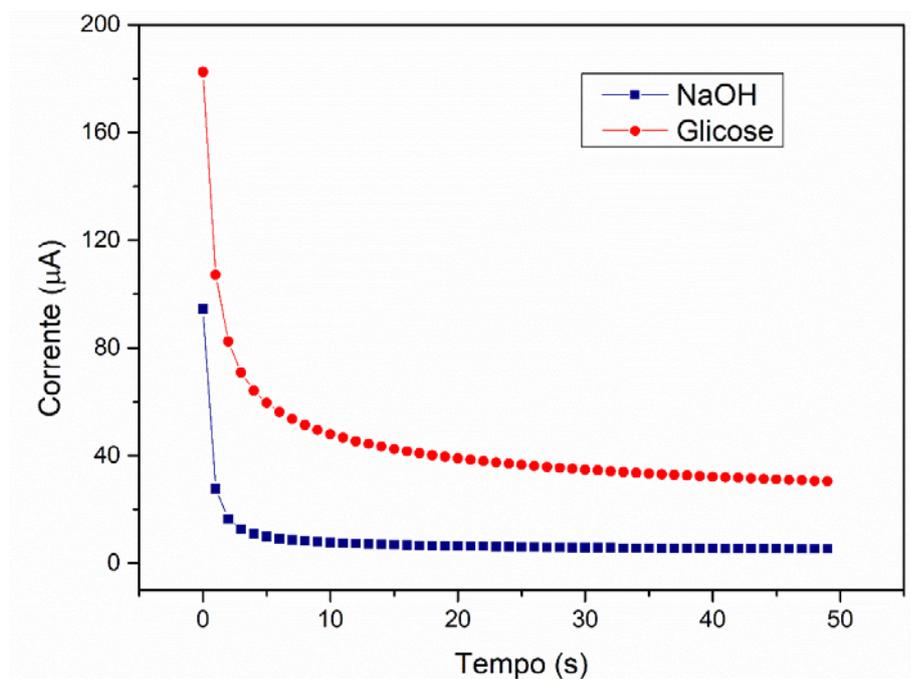


Figura 27: Cronoamperometria com potencial de aplicação de 0,4 V

A partir dos resultados obtidos na análise anterior, o potencial de aplicação otimizado foi determinado como 0,4 V. Análises de cronoamperometria foram realizadas visando obter a curva analítica, utilizando aplicação de potencial durante 50 segundos na faixa de concentração de glicose variando entre 3 e 4000 μM , conforme Figura 28.

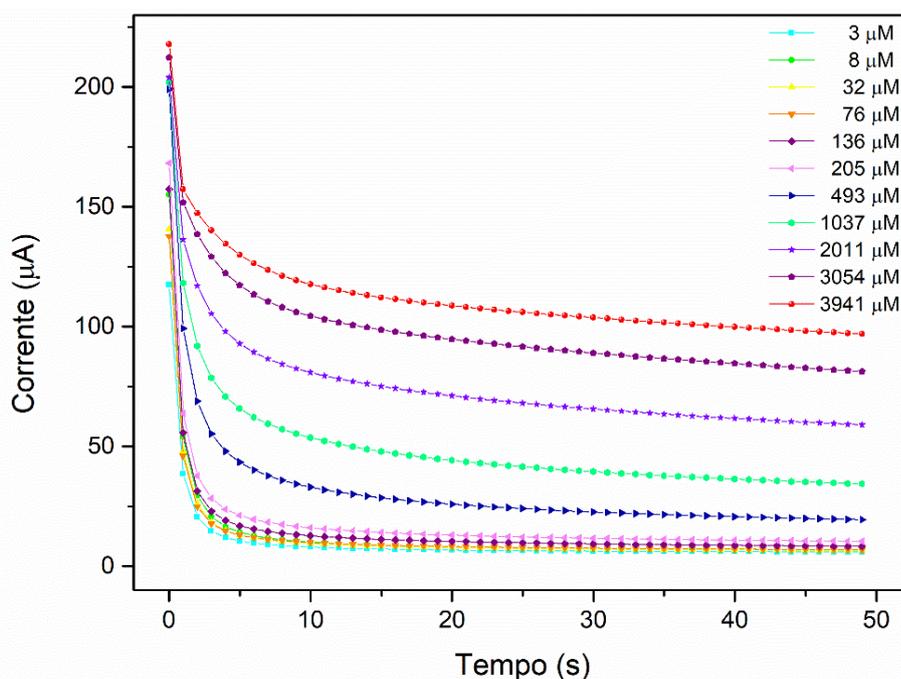


Figura 28: Cronoamperometria com potencial aplicado de 0,4 V para determinação da curva analítica.

A curva analítica da Figura 29, foi realizada a partir dos resultados apresentados, indicando a relação entre a corrente de resposta e a concentração de glicose analisada, que pode ser representada por $y = 5,79774\text{E-}6 + 2,42846\text{E-}8 \times x$ ($R^2 = 0,98456$), onde y representa a corrente e x representa a quantidade de glicose. Assim, a mesma pode ser expressa como: $I_p = 5.79774\text{E-}6 + 2.42846\text{E-}8 * [\text{GLICOSE}]$.

A partir desta, é possível afirmar que na ausência de glicose, é esperada uma resposta de corrente de $5.79774\text{E-}6 \mu\text{A}$, enquanto que para cada aumento unitário na concentração de glicose, haverá um aumento proporcional em $2.42846\text{E-}8$ unidades de corrente.

Foi realizado também o cálculo do Limite de Detecção para os 11 pontos amostrados a partir da Equação (1) (JOTHI, 2018), utilizando $n = 3$. Para o desvio padrão do branco foi utilizado $n = 9$. Foi obtido um valor de coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,98456.

$$LOD = \frac{3,0 \cdot \sigma}{S} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

LOD = Limite de Detecção

σ = desvio padrão do branco

S = coeficiente angular da reta (*slope*)

Assim, obteve-se o seguinte Limite de Detecção:

$$LOD = \frac{3,0 \cdot 8,47 \times 10^{-8}}{2,43 \times 10^{-8}}$$

$$LOD = 10,46 \mu\text{M}$$

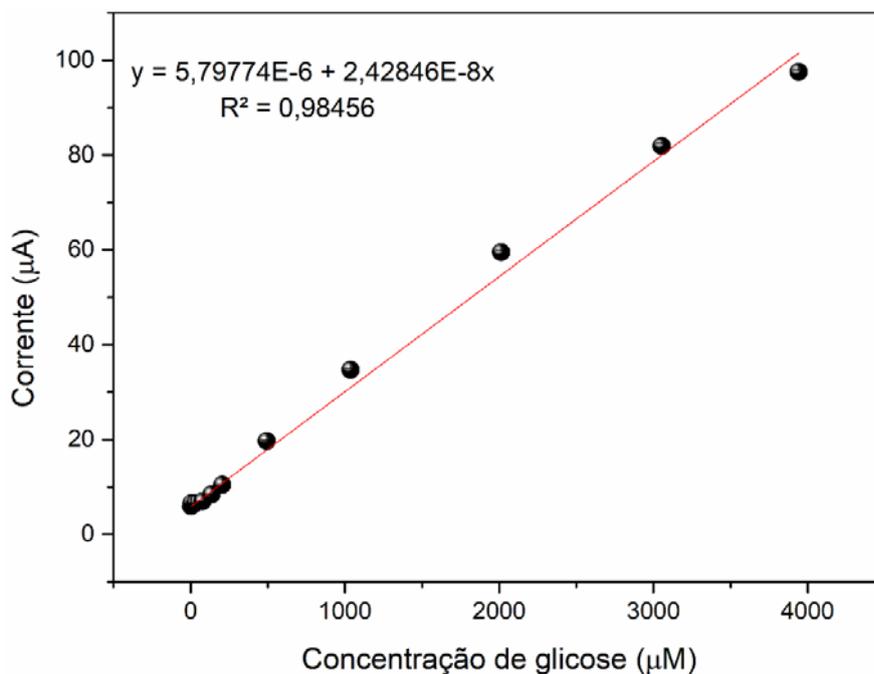


Figura 29: Curva analítica realizada para determinar a relação corrente x concentração de glicose.

O valor de limite de detecção apresentado se encontra de acordo com alguns resultados publicados na literatura sobre sensores de glicose (ZOU, R. et al, 2019; GAO, X. et al, 2021)

A Figura 30 mostra as voltametrias cíclicas realizadas com diferentes velocidades de varredura na presença de 1 mM de glicose, visando identificar a transferência de elétrons na superfície do eletrodo. As variações das taxas de varredura de 10 a 130 mV/s demonstraram um comportamento linear com o aumento da corrente de resposta da glicose, com um comportamento de irreversibilidade com apenas o processo de oxidação.

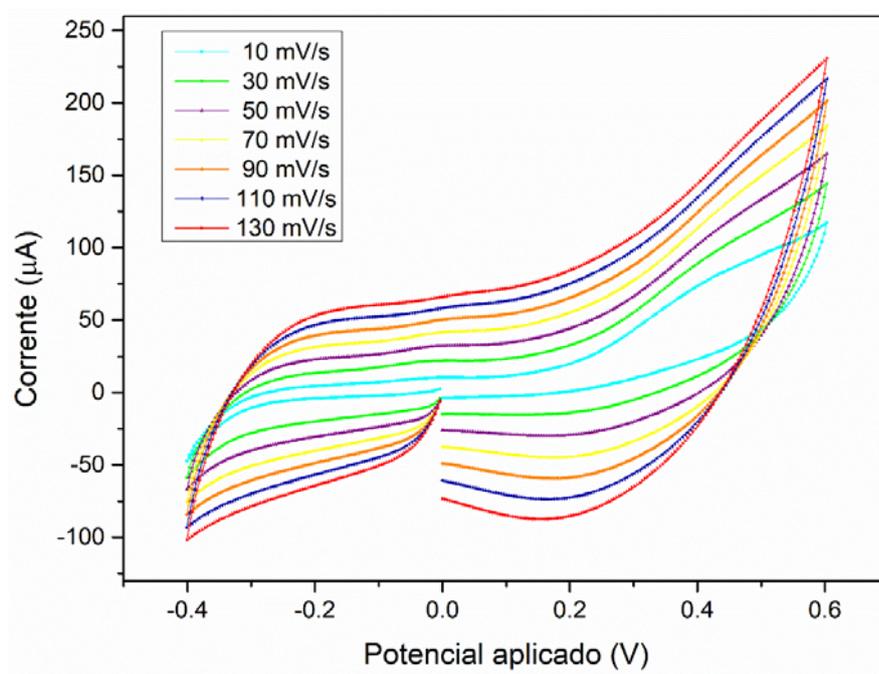


Figura 30: Voltametrias cíclicas realizadas com diferentes taxas de varredura.

Calculada a relação linear entre a corrente do pico de oxidação à 0,4V e a velocidade de varredura ($I_p \times v$), observa-se um comportamento linear de acordo com a seguinte equação: $I_p = 7,09163E-5 + 5,8354E-7 v$ ($R^2 = 0,99213$). Este resultado indica um processo majoritariamente controlado por difusão, conforme a Figura 31.

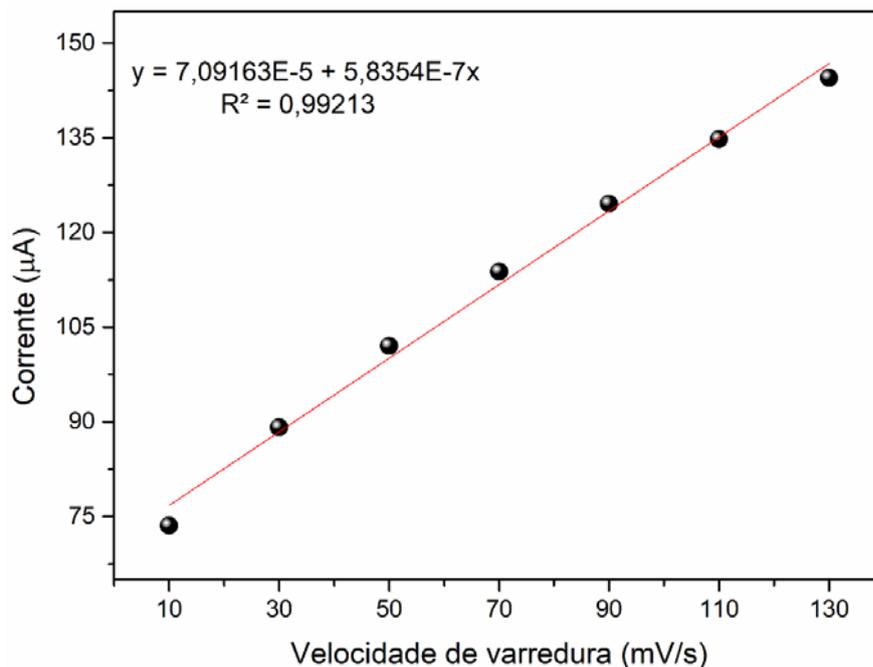


Figura 31: Relação linear entre a corrente de resposta e a velocidade de varredura.

5.2 Análises Morfológicas

A Figura 32A mostra as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura, onde é possível observar a diferença de morfologia do material LIG com um processo de queima comparado com dois processos de queima. Com o processo de duas queimas, ocorre um aumento da porosidade, o que pode estar relacionado ao aumento da área superficial, propriedade importante para eletrodos sensores. A Figura 32B apresenta uma formação de “*Cellular Networks*”, assemelhando-se ao trabalho de Abdulhafez et al (2021), no qual estudou-se a morfologia do LIG.

A morfologia dos diferentes materiais impregnados no eletrodo de trabalho foi analisada separadamente, sendo a primeira modificação com ureia (Figura 32C e D), a segunda com sulfato de cobre (Figura 32E e F), e por último sulfato de cobre + ureia (Figura 32G e H). Em todos os casos, foram apresentadas modificações distintas em comparação com o LIG, uma vez que os processos de queima provocaram a síntese dos materiais impregnados na estrutura do LIG. Para a modificação com ureia, pode-se notar um surgimento de maior quantidade de folhas e fibras, enquanto para o sulfato de cobre, ocorre o surgimento de nanoestruturas de cobre em forma esférica.

Para o sensor modificado com sulfato de cobre e ureia, ocorre uma síntese da estrutura destes de forma laminar com nanoestruturas circulares. Vale ressaltar que até o momento não foi encontrada na bibliografia o método de síntese de nanoestruturas de cobre no processo de GDL, sendo este simples, rápido e de baixo custo.

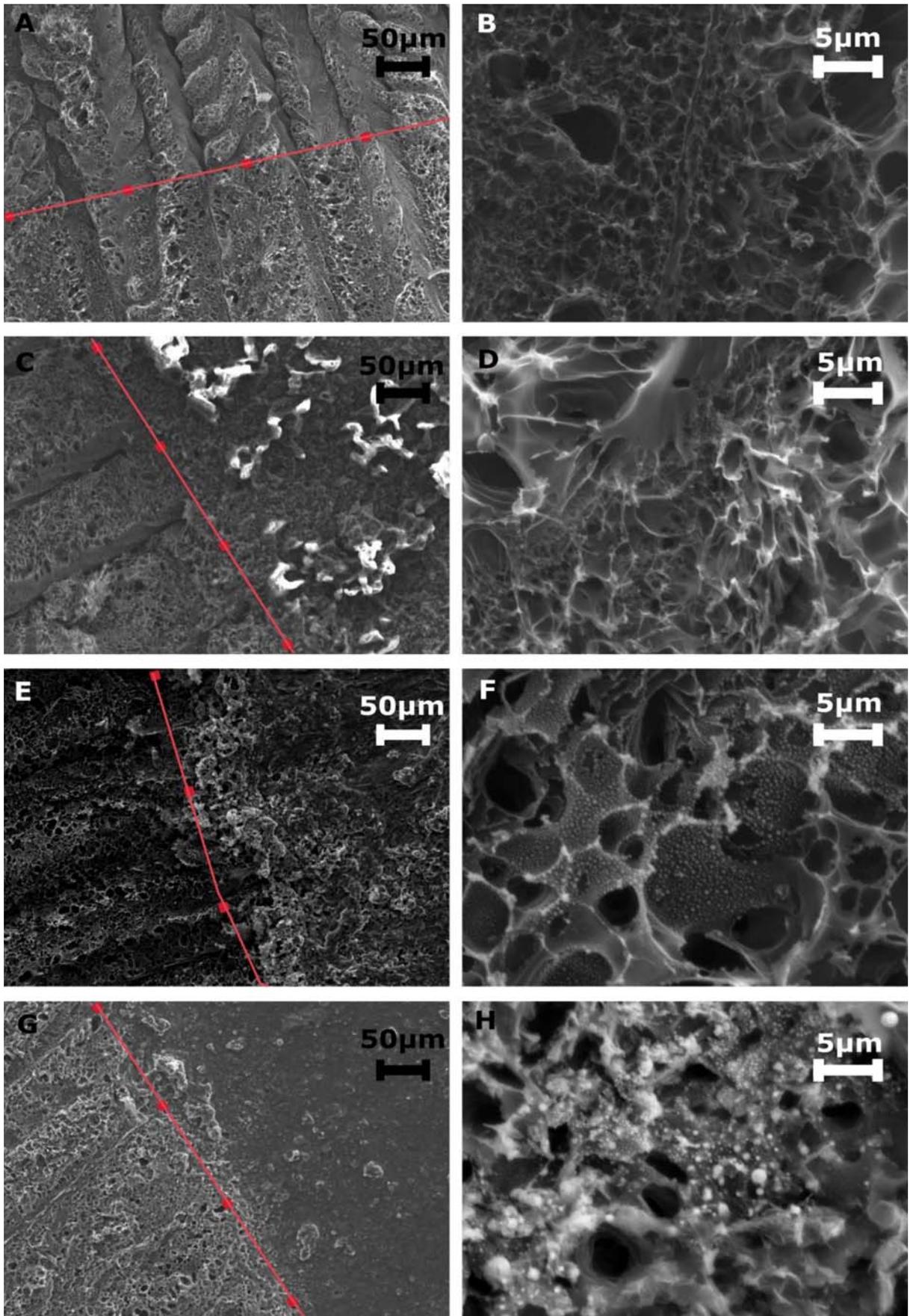


Figura 32: Microscopia Eletrônica de Varredura (AccV 15.0 kV Probe 4.0)

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram estudados sensores para detecção de glicose pela técnica de grafeno induzido a laser, que se destacam em relação às técnicas de produção convencionais, pois sua preparação é rápida, fácil e possui reduzido custo de construção, possibilitando a fabricação em larga escala.

Os sensores foram modificados e testados com diferentes materiais a fim de melhorar sua eficiência, onde a melhor modificação foi utilizando precursores de cobre. Foram obtidos ótimos resultados utilizando nanopartículas de cobre sintetizadas via micro-ondas, mas ainda abaixo dos resultados obtidos com sulfato de cobre sintetizados via gravação direta a laser, onde se obteve uma diferença de pico de corrente de aproximadamente 150 μA entre as amostras com e sem glicose. Também se notou que incorporar ureia ao sulfato de cobre tornou o eletrodo de trabalho modificado mais uniforme e homogêneo, hipótese confirmada após sua análise morfológica por MEV, sem comprometer a sensibilidade sensora e com diferença de pico de oxidação também próxima a 150 μA .

A partir de análises eletroquímicas através de técnicas como cronoamperometria e voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura, também foi possível realizar a curva analítica, a fim de entender a relação entre a corrente de resposta e a concentração de glicose, bem como investigar o comportamento difusional do processo de transferência de cargas.

Na Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível observar a diferença de morfologia dos sensores com LIG a partir de diferentes processos de queima, ocorrendo um aumento de porosidade quando o eletrodo de trabalho passa pelo processo de duas queimas, o que pode estar relacionado ao aumento da área superficial, propriedade importante para sensores. Quando a modificação foi realizada apenas com ureia, a quantidade de fibras e folhas aumentou, enquanto apenas para o sulfato de cobre ocorreu a formação de nanoestruturas de cobre em formato esférico. Já no sensor modificado com sulfato de cobre e ureia, ocorreu a síntese da estrutura destes de forma laminar com nanoestruturas esféricas.

Diante disso, a metodologia, bem como os procedimentos e parâmetros utilizados para produção e modificação, se mostraram promissores para a produção

de sensores de glicose, tendo o sulfato de cobre mostrado excelentes resultados. Todavia, ao se adicionar ureia, foram obtidos melhores resultados morfológicos, sugerindo que esta modificação foi a mais adequada para utilização como eletrodo de trabalho. Por fim, a síntese de nanoestruturas de cobre através do processo de GDL ainda não foi encontrada na bibliografia, sendo este simples, rápido e de baixo custo, além de ter sua eficácia comprovada nos testes realizados, validando o sensor produzido e tornando esta rota de síntese promissora para futuros estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULHAFEZ, M.; TOMARAEI, G. N.; BEDEWY, M. Fluence-dependent morphological transitions in laser-induced graphene electrodes on polyimide substrates for flexible devices. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 3, p. 2973-2986, 2021.

BUGBEE, A.; FUJISHIRO, C.; MADELINE, A. Issues in endocrinology: Managing Feline Diabetes Mellitus. **Today's Veterinary Practice**, v. 9, n.1, p. 44–50, 2019.

CARMONA, J. G.; GUINEA, F. El grafeno, una lámina de carbono cuyo espesor puede ser de un solo átomo, muestra propiedades electrónicas exóticas que revisten un gran interés para la investigación fundamental y el desarrollo de nuevos materiales. **Investigación y Ciencia**, p. 43, 2010.

CHA, C.; SHIN, S. R.; ANNABI, N.; DOKMECI, M. R. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for. **ACS nano**, v.7, n.4, p.2891–2897, 2013.

CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. **Chemical reviews**, v. 107, n. 7, p. 2891-2959, 2007.

CORRADINI, S.; PILOSIO, B.; DONDI, F. et al. Accuracy of a flash glucose monitoring system in diabetic dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 30, n. 4, p. 983-988, 2016.

DAVISON, L. J. Diabetes mellitus and pancreatitis—cause or effect?. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 1, p. 50-59, 2015.

DOSI, M.; LAU, I.; ZHUANG, Y.; SIMAKOV, D. S.; FOWLER, M. W.; POPE, M. A. Ultrasensitive Electrochemical Methane Sensors Based on Solid Polymer Electrolyte-Infused Laser-Induced Graphene. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.11, n.6, p.6166–6173, 2019.

FARIA, A. M.; MAZON, T. Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructuresbased rapid electrochemical biosensor. **Talanta**, v.203, n.January, p.153–160, 2019.

FreeStyle Libre – Abbott Laboratórios Do Brasil Ltda – Disponível em <https://www.freestyle.abbott/br-pt/home.html>. Acesso em: 22 Jan. 2023.

GAO, X.; FENG, W.; ZHU, Z.; WU, Z.; LI, S.; KAN, S.; QIU, X; GUO, A; CHEN, W; YIN, K. Rapid fabrication of superhydrophilic micro/nanostructured nickel foam toward high-performance glucose sensor. *Advanced Materials Interfaces*, v. 8, n. 7, p. 2002133, 2021.

GARLAND, N. T.; MCLAMORE, E. S.; CAVALLARO, N. D.; MENDIVELSO-PEREZ, D.; SMITH, E. A.; JING, D.; CLAUSSEN, J. C. Flexible Laser-Induced Graphene for Nitrogen Sensing in Soil. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.10, n.45, p.39124–39133, 2018.

GEIM, A. K. Graphene: status and prospects. **Science**, v.324, 2009. p.1530 – 1543.

GOTTLIEB, S.; RAND, J. Managing feline diabetes: current perspectives. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 9, p. 33, 2018.

HAFNER, M.; LUTZ, T. A.; REUSCH, C.E.; ZINI, E. Evaluation of sensor sites for continuous glucose monitoring in cats with diabetes mellitus. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 2, p. 117-123, 2013.

HERRING, I. P.; PANCIERA, D. L.; WERRE, S. R. Longitudinal prevalence of hypertension, proteinuria, and retinopathy in dogs with spontaneous diabetes mellitus. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 28, n. 2, p. 488-495, 2014.

JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M.; **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Rio de Janeiro: Roca, 7045 p, 2015.

JOTHI, L.; NEOGI, S.; KUMAR JAGANATHAN, S.; NAGESWARAN, G. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by a novel electrochemical sensor based on N₂/Ar RF plasma assisted graphene nanosheets/graphene nanoribbons. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p.236-242, 2018.

KUMARI, S.; YADAV, B. S.; YADAV, R. B. Synthesis and modification approaches for starch nanoparticles for their emerging food industrial applications: A review. **Food Research International**, v.128, p.108765, 2020.

LAN, L.; LE, X.; DONG, H.; XIE, J.; YING, Y.; PING, J. One-step and large-scale fabrication of flexible and wearable humidity sensor based on laser-induced graphene for real-time tracking of plant transpiration at bio-interface. **Biosensors and Bioelectronics**, v.165, n.March, p.112360, 2020.

LI, S.; ZHANG, C.; WANG, S.; LIU, Q.; FENG, H.; MA, X.; GUO, J. Electrochemical microfluidics techniques for heavy metal ion detection. **Analyst**, v. 143, n. 18, p. 4230–4246, 2018.

LIN, J.; PENG, Z.; LIU, Y.; RUIZ-ZEPEDA, F.; YE, R.; SAMUEL, E. L.; YACAMAN, M. J.; YAKOBSON, B. I.; TOUR, J. M. Laser-induced porous graphene films from commercial polymers. **Nature Communications**, v.5, p.1–8, 2014.

LIU, L. X.; CHEN, W.; ZHANG, H. B.; WANG, Q. W.; GUAN, F.; YU, Z. Z. Flexible and multifunctional silk textiles with biomimetic leaf-like MXene/silver nanowire nanostructures for electromagnetic interference shielding, humidity monitoring, and self-derived hydrophobicity. **Advanced Functional Materials**, v. 29, n. 44, p. 1905197, 2019.

LOGUERCIO, L. F.; THESING, A.; NOREMBERG, B. S.; LOPES, B. V.; MARON, G. K.; MACHADO, G.; POPE, M. A.; CARRENO, N. L. V. Direct laser writing of poly (furfuryl alcohol)/graphene oxide electrodes for electrochemical determination of ascorbic acid. **ChemElectroChem**, v. 9, n. 17, p. e202200334, 2022.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v.35, n.7, p.1434–1446, 2012.

MALLIK, K., M. MANDAL, N. PRADHAN, T. PAL. Seed mediated formation of bimetallic nanoparticles by UV irradiation: A photochemical approach for the preparation of “core-shell” type structures. **Nano Letters**, v. 1, n. 6, p. 319-322, 2001.

MELO, B. M. de S. **Estrutura eletrônica de folhas de grafeno onduladas**. 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Física) – Instituto de Física, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2015.

MOONEY, C. T.; PETERSON, M. E. **Manual de endocrinologia em cães e gatos**. 4. ed. São Paulo: Roca, 423 p, 2015.

NELSON, R. W.; REUSCH, C. E. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. T1-T9, 2014.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 4442 p., 2015.

OLIVEIRA, M. E.; LOPES, B. V.; ROSSATO, J. H. H.; MARON, G. K.; GALLO, B. B.; LA ROSA, A. B.; BALBONI, R. D. C.; ALVES, M. L. F.; FERREIRA, M. R. A.; PINTO, L. S.; CONCEIÇÃO, F. R.; PIVA, E.; PEREIRA, C. M. P.; ESCOTE, M. T.; CARREÑO, N. L. V. Electrochemical Biosensor Based on Laser-Induced Graphene for COVID-19 Diagnosing: Rapid and Low-Cost Detection of SARS-CoV-2 Biomarker Antibodies. **Surfaces**, v. 5, n. 1, p. 187-201, 2022.

ORTIZ-LANDEROS, J.; GÓMEZ-YÁÑEZ, C.; LÓPEZ-JUÁREZ, R.; DÁVALOS-VELASCO, I.; PFEIFFER, H. Synthesis of advanced ceramics by hydrothermal crystallization and modified related methods. **Journal of Advanced Ceramics**, v. 1, p. 204-220, 2012.

PÖPPL, Á. G.; COELHO, I. C.; DA SILVEIRA, C. A.; MORESCO, M. B.; DE CARVALHO, G. L. C. Frequency of endocrinopathies and characteristics of affected dogs and cats in southern Brazil (2004-2014). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 9-9, 2016.

PRAHL, A.; GUPTILL, L.; GLICKMAN, N. W.; TETRICK, M., GLICKMAN, L. T. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in cats presented to veterinary teaching hospitals. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 9, n. 5, p. 351-358, 2007.

RAND, J. S. Diabetes Mellitus in Dogs and Cats. **Clinical Small Animal Internal Medicine**, p. 93-102, 2020.

RATHINAM, K.; SINGH, S. P.; LI, Y.; KASHER, R.; TOUR, J. M.; ARNUSCH, C. J. Polyimide derived laser-induced graphene as adsorbent for cationic and anionic dyes. **Carbon**, v.124, p.515–524, 2017.

REHMAN, H. U; KAKAR, N.; KAKAR, A.; KHAN, S. Classification, etiology, similarities and management of diabetes mellitus in canine and feline with respect to humans. **IJCIRAS**, v. 3, p. 10-20, 2020.

REINEKE, E. L.; FLETCHER D. J.; KING L. G.; DROBATZ K. J. Accuracy of a continuous glucose monitoring system in dogs and cats with diabetic ketoacidosis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 3, p. 303-312, 2010.

ROSSATO, J. H. H.; OLIVEIRA, M. E.; LOPES, B. V.; GALLO, B. B.; LA ROSA, A. B.; PIVA, E.; BARBA, D.; ROSEI, F.; CARREÑO, N. L. V.; ESCOTE, M. T. A Flexible Electrochemical Biosensor Based on NdNiO₃Nanotubes for Ascorbic Acid Detection. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 3, p. 3394–3405, 2022.

SLINGERLAND, L. I.; FAZILOVA, V. V.; PLANTINGA, E. A., et al. Indoor confinement and physical inactivity rather than the proportion of dry food are risk factors in the development of feline type 2 diabetes mellitus. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 247-253, 2009.

SMITH, W. F.; HASHEMI, J. **Fundamentos de engenharia e ciência dos materiais**. Amgh Editora, 2013.

TEHRANI, F.; BAVARIAN, B. Facile and scalable disposable sensor based on laser engraved graphene for electrochemical detection of glucose. **Scientific Reports**, v.6, n.May, p.1–10, 2016.

TIWARI, S. K.; KUMAR, V.; HUCZKO, A.; ORAON, R.; ADHIKARI, A. D.; NAYAK, G. C. Magical allotropes of carbon: prospects and applications. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 41, n. 4, p. 257-317, 2016.

TYAGI, D.; WANG, H.; HUANG, W.; HU, L.; TANG, Y.; GUO, Z.; OUYANG, Z.; ZHANG, H. Recent advances in two-dimensional-material-based sensing technology toward health and environmental monitoring applications. **Nanoscale**, v.12, n.6, p.3535–3559, 2020.

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo – Disponível em <https://sp.unifesp.br/ultimas-noticias/setor-especializado-diabetes>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VIVALDI, F. M.; DALLINGER, A.; BONINI, A.; POMA, N.; SEMBRANTI, L.; BIAGINI, D.; SALVO, P.; GRECO, F.; DI FRANCESCO, F. Three-dimensional (3D) laser-induced graphene: structure, properties, and application to chemical sensing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 26, p. 30245-30260, 2021.

VEIGA, A. P. M. Obesidade e diabetes mellitus em pequenos animais. **Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**, p. 82-91, 2005.

WIDMAIER, E. P.; RAFF, H.; STRANG, K. T. Regulação do metabolismo energético: Controle e integração do metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras. In: **Fisiologia Humana: Mecanismos das Funções Corporais**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 584-95, 2006.

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

YE, R.; JAMES, D. K.; TOUR, J. M. Laser-Induced Graphene. **Accounts of Chemical Research**, v.51, n.7, p.1609–1620, 2018.

ZHANG, J.; ZHANG, C.; SHA, J.; FEI, H.; LI, Y.; TOUR, J. M. Efficient Water-Splitting Electrodes Based on Laser-Induced Graphene. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.9, n.32, p.26840–26847, 2017.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; SU, L.; ZHANG, Z.; HUO, D.; HOU, C.; LEI, Y. CuO nanowires based sensitive and selective non-enzymatic glucose detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 86-93, 2014.

ZOU, R.; SHAN, S.; HUANG, L.; CHEN, Z.; LAWSON, T.; LIN, M.; LIU, Y. High-performance intraocular biosensors from chitosan-functionalized nitrogen-containing graphene for the detection of glucose. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 1, p. 673-679, 2019.