



## Biossensor eletroquímico descartável para o diagnóstico da diabetes

INÊS MARIA DE SÁ VINAGRE

outubro de 2023

# **BIOSENSOR ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO DA DIABETES**

Inês Maria de Sá Vinagre

**2023**

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Departamento de Física

isen

P.PORTO

# **BIOSENSOR ELETROQUÍMICO DESCARTÁVEL PARA O DIAGNÓSTICO DA DIABETES**

Inês Maria de Sá Vinagre

Estudante n.º 1210639

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação da Doutora Felismina Teixeira Coelho Moreira e do Professor Doutor Joaquim Alves.

**2023**

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Departamento de Física

isen

P.PORTO

## **AGRADECIMENTOS**

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais não posso deixar de prestar o meu reconhecimento.

Agradeço à minha orientadora Doutora Felismina Moreira pelos conhecimentos transmitidos, pelo seu acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho e por toda a sua dedicação e carinho. Agradeço, também, ao Doutor Joaquim Alves pela sua orientação e por se demonstrar sempre disponível para ajudar.

A toda a equipa do LabRISE, agradeço a forma carinhosa com que me receberam, agradecendo especialmente à: Beatriz Moreira, Raquel Vaz, Raquel Pereira, Marta Dias e Catarina Santos. Destaca-se também nesta equipa a colaboração de Daniela Oliveira que se demonstrou sempre disponível para me ajudar, e sob a qual deixo um sentido agradecimento.

O meu profundo agradecimento ao meu namorado, por toda a ajuda, motivação e apoio.

Por último, aos meus pais agradeço pelo apoio que me deram ao longo de todo o meu percurso académico.



## RESUMO

A diabetes é considerada a “pandemia do século XXI”. Esta doença está associada a uma elevada morbidade e mortalidade relacionadas com o risco de complicações ao nível cardíaco, renal, vascular e oftálmico. Assim, torna-se urgente melhorar os métodos de diagnóstico da diabetes por forma a que estes sejam simples, rápidos e eficientes, diminuindo o número de casos de pacientes diabéticos. Por outro lado, é de extrema importância a monitorização contínua dos níveis de glucose por parte dos pacientes, pois elevados níveis de glucose (hiperglicemia) aumentam o risco de comorbidades, sendo que a hipoglicemia pode levar à morte.

Os biossensores são dispositivos que permitem identificar/quantificar diversas biomoléculas, através da transdução da ligação do analito a um elemento de reconhecimento, num sinal mensurável. Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos biossensores eletroquímicos enzimáticos, que graças à elevada especificidade das enzimas e à elevada seletividade/sensibilidade dos transdutores eletroquímicos, permitem desenvolver sistemas portáteis, miniaturizados e de baixo custo, para o diagnóstico de múltiplas doenças.

Perante este problema, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico enzimático descartável para o diagnóstico da diabetes, de baixo custo, preciso, simples e rápido. Para o desenvolvimento deste biossensor, o material de suporte utilizado foi um eletrodo impresso em ouro e o elemento de reconhecimento da glucose (analito) foi a enzima glucose oxidase.

Por forma a otimizar a superfície do eletrodo e a aderência da enzima ao substrato, foi imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho um nanomaterial biocompatível, o biografeno. Após a imobilização do biografeno por adsorção na superfície do eletrodo, foram testados dois mecanismos de imobilização da enzima glucose oxidase (GOx) com dois tempos de incubação diferentes. Numa primeira fase, foi testado o método de adsorção, que consiste na imobilização direta da enzima na superfície do eletrodo previamente modificado com biografeno. Foram testados dois intervalos de tempo distintos: 2 horas e 12 horas, recorrendo às técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e cronoamperometria para o controlo da modificação da superfície do eletrodo. Adicionalmente, explorou-se o método de aprisionamento/encapsulamento da enzima, mediante a polimerização eletroquímica do monómero, tiramina com o agente reticulante glutaraldeído, para os mesmos tempos de incubação. Para se avaliar o efeito do agente reticulante, desenvolveu-se um biossensor semelhante ao anterior, excluindo a presença do glutaraldeído, de modo a investigar o seu impacto na fixação.

Após a análise do desempenho do biossensor através da técnica de cronoamperometria para cada um dos métodos, concluiu-se que o método mais preciso e com uma maior gama de resposta, era o da adsorção de 2 horas. O biossensor apresentou uma gama de linearidade entre 1,0 mmol/L (limite inferior de resposta linear) e 40,0 mmol/L com um declive de 1,784 e um  $R^2$  de 0,9939. Assim, por forma a garantir a sua seletividade na presença da glucose, este foi testado em soro humano comercial e com diferentes interferentes que estão presentes no soro humano. A sua superfície foi caracterizada por microscopia eletrónica de transmissão e espectroscopia de *Raman*.

Este biossensor revelou ser sensível, seletivo e reprodutível para a deteção da glucose, possibilitando assim o diagnóstico e monitorização da diabetes, podendo a sua metodologia ser aplicada em investigação futuras com eletrodos à base microagulhas, para a monitorização contínua no fluido intersticial da pele.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes, Adsorção, Diagnóstico, Biossensor, Eletroquímica, Enzima como elemento de reconhecimento, Biografeno, Glucose oxidase.



## ABSTRACT

Diabetes is considered the “pandemic of the 21st century”. This disease is associated with significant morbidity and mortality due to the increased risk of cardiac, renal, vascular and ocular complications. Therefore, it is of utmost urgency to improve the methods of diabetes diagnosis to make it simple, fast and effective, thus reducing the number of diabetes cases. In addition, continuous monitoring of blood glucose levels by patients is of great importance, as hyperglycemia (high blood glucose levels) increases the risk of concomitant diseases, while hypoglycemia can be life-threatening.

Biosensors are devices that enable the identification and quantification of various biomolecules by converting the binding of the analyte to a recognition element into a measurable signal. Enzymatic electrochemical biosensors have been developed in the last decades, thanks to the high specificity of enzymes and the high selectivity and sensitivity of electrochemical transducers. These biosensors allow the development of portable, miniaturized and low-cost systems for the diagnosis of numerous diseases.

In response to this challenge, a low-cost, accurate, simple, and fast disposable enzymatic electrochemical biosensor for the diagnosis of diabetes was developed. To construct this biosensor, we used a gold-printed electrode as the support material and glucose oxidase as the recognition element for glucose (the analyte).

To optimize the surface of the electrode and improve the adhesion of the enzyme to the substrate, we incubated a biocompatible nanomaterial called graphene on the surface of the working electrode. After the successful immobilization of graphene by adsorption on the electrode surface, we tested two different methods of immobilization of glucose oxidase (GOx) enzyme with two different incubation times. First, we investigated the adsorption method in which the enzyme is immobilized directly on the surface of the electrode previously modified with graphene. Two different time intervals with two different incubation times (2 hours and 12 hours) were tested. Electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and chronoamperometry were used to monitor the changes in the electrode surface. Next, we investigated the enzyme inclusion/encapsulation method by electrochemical polymerization of the monomer Tiramine with the crosslinking agent glutaraldehyde. This was also performed with the same incubation times. To evaluate the effect of the crosslinking agent, we developed a biosensor similar to the previous one but without glutaraldehyde to analyze its effect on fixation. This approach allowed us to evaluate the enzyme inclusion method using only Tiramine as a fixative.

After analyzing the performance of the biosensor using the chronoamperometry technique, for each of the methods, we concluded that the 2-hour adsorption method was the most accurate, with a linear range between 1,0 mmol/L (lower limit of linear response) and 40,0 mmol/L, a slope of 1,784, and a correlation coefficient  $R^2$  of 0,9939. To ensure its selectivity in the presence of glucose, we tested the biosensor in commercial synthetic human serum and with various interferents present in human blood serum. The surface of the biosensor was characterized by transmission electron microscopy and Raman spectroscopy.

This biosensor has been shown to be sensitive, selective, and reproducible in the detection of glucose, allowing effective diagnosis and monitoring of diabetes. This methodology can be used in future research with micro-needle electrodes for continuous monitoring of interstitial skin fluid.

**KEYWORDS:** Diabetes, Adsorption, Diagnosis, Biosensor, Electrochemistry, Enzyme as a Recognition Element, Graphene, Glucose Oxidase.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	XIII
LISTAS DE SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XV
1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1. Enquadramento e pertinência .....	19
1.2. Questão e objetivos de investigação .....	19
1.3. Opções metodológicas .....	20
1.4. Apresentação do grupo de Investigação .....	20
1.5. Estrutura do trabalho .....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. Diabetes.....	23
2.1.1. Biomarcadores da diabetes .....	24
2.2. Métodos convencionais para deteção da glucose .....	27
2.2.1. Técnicas laboratoriais .....	27
2.2.2. Técnicas de monitorização doméstica/dispositivos comerciais.....	29
2.3. Biossensores.....	32
2.3.1. Óticos .....	33
2.3.2. Eletroquímicos.....	33
2.3.3. Elementos de (bio)reconhecimento .....	40
2.3.4. Biossensores enzimáticos de glucose .....	41
2.3.5. Imobilização de enzimas.....	46
2.3.6. Nanomateriais de imobilização .....	48
2.3.7. Cinética enzimática .....	49
2.3.8. Tipos de amostra .....	51
2.4. Análise qualitativa dos materiais .....	53
2.4.1. Espectroscopia de <i>Raman</i> .....	53
2.4.2. TEM .....	54
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	56
3.1. Material e Equipamento .....	56
3.1.1. Soluções .....	57
3.2. Preparação dos elétrodos.....	59
3.2.1. Construção dos elétrodos modificados à base de Bgr .....	59
3.2.2. Imobilização da GOx por adsorção .....	60
3.3. Procedimento eletroquímico.....	62
3.4. Análise do desempenho do biossensor .....	62
3.4.1. Curva de calibração .....	62
3.4.2. Estudo da seletividade .....	63
3.5. Análise qualitativa dos materiais.....	64

---

3.5.1. Análise em Raman .....	64
3.5.2. Análise em TEM .....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
4.1. Fabricação do biossensor .....	66
4.1.1. Imobilização da enzima por adsorção durante 2 horas .....	66
4.1.2. Imobilização da enzima por adsorção durante 12 horas .....	68
4.1.3. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 2 horas 68	
4.1.4. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 12 horas 70	
4.1.5. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir durante 2 horas.....	71
4.1.6. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir durante 12 horas.....	72
4.2. Avaliação do desempenho do biossensor.....	73
4.2.1. Calibração em tampão .....	73
4.2.2. Estudo da seletividade .....	86
4.2.3. Aplicação em soro .....	87
4.2.4. Caracterização físico-química em <i>Raman</i> .....	88
4.2.5. TEM .....	90
5. CONCLUSÃO.....	93
5.1. Conclusões finais .....	93
5.2. Limitações e investigação futura .....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-Sensor transdérmico para a detecção contínua da glucose no ISF da pele, com base em microagulhas [16].	24
Figura 2- Tipos de biomarcadores. Imagem adaptada de [19] , em <i>BioRender.com</i> .	25
Figura 3-Formação da HbA1c.Figura adaptada de [23] , em <i>BioRender.com</i> .	26
Figura 4-Funcionamento do sistema SMBG. Imagem adaptada de [51] , em <i>BioRender.com</i> .	30
Figura 5-Diagrama de blocos do aparelho de medição de glucose pelo método de picada no dedo. Imagem adaptada de [37] em <i>BioRender.com</i> .	30
Figura 6-Componentes de um sistema CGM. Imagem adaptada de [37] , em <i>BioRender.com</i> .	31
Figura 7-Componentes de um Biossensor. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i> .	32
Figura 8-Elétrodos constituintes de um Au-SPE. Imagem adaptada de [74] em <i>BioRender.com</i> .	34
Figura 9-Método enzimático- amperométrico para medição da concentração de glucose. Imagem adaptada de [37] em <i>BioRender.com</i> .	35
Figura 10-Método da hexoquinase para medição da concentração da glucose. Imagem adaptada de [37] , em <i>BioRender.com</i> .	35
Figura 11- Exemplo de um voltamograma cíclico. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i> .	36
Figura 12-Gráfico de bode .Imagem adaptada de [95] , por <i>BioRender.com</i> .	38
Figura 13-Gráfico de Nyquist. Imagem adaptada de [93] , por <i>BioRender.com</i> .	39
Figura 14-(Bio)analito alvo liga-se ao local ativo (esquerda), formando o complexo (bio)analito-enzima (meio), onde uma reação catalítica o converte o (bio)analito alvo num produto mensurável. Imagem adaptada de [99] , por <i>BioRender.com</i> .	41
Figura 15-Oxidação da glucose pela enzima GOx. Imagem adaptada de [113] , em <i>BioRender.com</i> .....	42
Figura 16-Esquema dos mecanismos de oxidação enzimática da glucose para as três gerações de biossensores. Imagem adaptada de [114] , por <i>BioRender.com</i> .....	42
Figura 17-Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de enzimas. Imagem adaptada de [133], em <i>BioRender.com</i> .	47
Figura 18-Cinética de <i>Michaelis-Menten</i> .Imagem adaptada de[154] , por <i>BioRender.com</i> .	50
Figura 19-Espetros <i>de Raman</i> para quatro materiais diferentes (frutose, glucose, S3,S9)registrados com um laser de 532 nm [180].	54
Figura 20- Esquema do modo de funcionamento da TEM. Imagem adaptada de [182] em <i>BioRender.com</i> .....	54
Figura 21-Potenciostato/galvanostato <i>Metrohm Autolab</i> [183].	56
Figura 22- Caixa de comutação com Au-SPE inserido. Imagem adaptada de [184], por <i>BioRender.com</i>	56
Figura 23-DXR <i>Raman</i> da <i>Thermo Scientific</i> [185].	57
Figura 24-Representação das duas soluções reacionais de polimerização preparadas. A solução A contém glutaraldeído, Tir e GOx. A solução B apenas contém glutaraldeído e Tir. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i> .....	58
Figura 25-Representação das duas soluções reacionais de polimerização preparadas. A solução C contém Tir e GOx. A solução D contém apenas Tir. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i> .....	58
Figura 26-Representação dos oitos padrões de diluição preparados para um volume final de 2 mL com as respectivas quantidades de solução mãe e de PBS. Imagem realizada em <i>BioRender.com</i> .	59
Figura 27-Procedimento experimental da imobilização do Bgr e da enzima GOx pelo método de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho do Au-SPE.	60
Figura 28-Procedimento experimental da imobilização do Bgr e da solução A , pelo método de aprisionamento na superfície do eletrodo de trabalho do Au-SPE. É também representado o processo de eletropolimerização com a colocação de 100 µL de água.	61

Figura 29- Procedimento experimental da imobilização do Bgr e da solução C, pelo método de aprisionamento na superfície do eletrodo de trabalho do Au-SPE. É também representado o processo de eletropolimerização com a colocação de 100 $\mu$ L de água. ....	62
Figura 30- Resultados da leitura em solução <i>redox</i> de ferro após a imobilização da enzima durante 2 horas. (A) representa o gráfico de CV antes da imobilização do Bgr. (B) representa o gráfico CV depois da fixação do Bgr. ....	67
Figura 31- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s, para o método de adsorção da enzima durante 2 horas. ....	67
Figura 32- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s para os métodos de adsorção da enzima de 12 e 2 h respectivamente. (A) gráfico CV com solução tampão PBS e com solução de glucose de 5 mmol/L preparada em tampão PBS pH 7,2. (B) representa a comparação dos gráficos CV com uma solução de glucose de 5mmol/L, comparando os dois métodos de adsorção (2 horas e 12 horas).....	68
Figura 33- Estrutura molecular e respectiva fórmula química do glutaraldeído[194].....	69
Figura 34- Estrutura molecular e fórmula química da Tir [197]. ....	69
Figura 35- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s, para o método de aprisionamento com glutaraldeído e poliTir durante 2 horas. ....	70
Figura 36- Resultados da leitura com dois padrões de diluição diferentes (0 mmol/L e 5 mmol/L) para o método de aprisionamento com glutaraldeído e poliTir durante 12 horas. (A) gráfico CV com solução PBS e com solução de glucose de 5 mmol/L. (B) representa a comparação entre os gráficos CV com uma solução de glucose de 5 mmol/L, comparando os métodos de aprisionamento para 2 horas e 12 horas. ....	71
Figura 37- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s, para o método de aprisionamento com Tir durante 2 horas. ....	72
Figura 38- Resultados da leitura com dois padrões de diluição diferentes para o método de aprisionamento com Tir durante 12 horas. (A) gráfico CV com solução PBS e com solução de glucose de 5mmol/L. (B) representa a comparação entre os gráficos CV com uma solução de glucose de 5 mmol/L para o método de aprisionamento com Tir durante 2 horas e 12 horas. ....	72
Figura 39. Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima na superfície do eletrodo de trabalho para o método de adsorção de 2 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L. ....	74
Figura 40- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima (pontos laranjas) e do chip sem enzima (pontos azuis), para o método de adsorção de 2 horas. ....	74
Figura 41- Gráfico da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de adsorção de 2 horas. ....	75
Figura 42- Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima na superfície do eletrodo de trabalho para o método de adsorção de 12 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L. ....	76
Figura 43- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de adsorção de 12 horas. ....	76
Figura 44- Gráfico da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de adsorção de 12 horas. ....	77

Figura 45-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com glutaraldeído e T <sub>ir</sub> na superfície do eletrodo de trabalho durante 2 horas (A) cronoamperograma do Au-SPE com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do Au-SPE sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L- 50 mmol/L.....	78
Figura 46- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliT <sub>ir</sub> e glutaraldeído durante 2 horas.	79
Figura 47-Gráfico da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com poliT <sub>ir</sub> e glutaraldeído durante 2 horas.....	79
Figura 48-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com glutaraldeído e poliT <sub>ir</sub> na superfície do eletrodo de trabalho durante 12 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L.....	80
Figura 49- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliT <sub>ir</sub> e glutaraldeído durante 12 horas. ....	80
Figura 50-Gráfico da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> para o Au-SPE com enzima e para o Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com T <sub>ir</sub> e glutaraldeído durante 12 horas. ....	81
Figura 51-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com poliT <sub>ir</sub> na superfície do eletrodo de trabalho durante 2 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L- 50 mmol/L. ....	82
Figura 52- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliT <sub>ir</sub> durante 2 horas. ....	82
Figura 53-Gráfico da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com poliT <sub>ir</sub> durante 2 horas. ....	83
Figura 54-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com T <sub>ir</sub> na superfície do eletrodo de trabalho durante 12 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L. ....	83
Figura 55- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliT <sub>ir</sub> durante 12 horas. ....	84
Figura 56-Gráfico da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com T <sub>ir</sub> durante 12 horas.....	84
Figura 57-Gráfico representativo dos resultados do teste de seletividade para as espécies interferentes, creatinina e BSA.....	87
Figura 58-Resultados relativos ao método de adsorção de 2 horas com soro <i>Cormay</i> (A) cronoamperograma cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) reta de calibração e respetiva equação para o chip com enzima.....	88
Figura 59-Gráfico com os espectros resultantes da análise de <i>Raman</i> para os diferentes materiais imobilizados na superfície do Au-SPE.....	89
Figura 60-Resultados relativos à análise por TEM do Bgr (A) Imagem TEM do Bgr com uma ampliação de 100,000 x (B) Imagem TEM do Bgr com uma ampliação de 200,000 x. ....	90



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Critérios de diagnóstico para a DM (FPG, OGTT, HbA1c).....	23
Tabela 2-Exemplos de biossensores eletroquímicos enzimáticos para a detecção da glucose publicados em (2018-2023).....	43
Tabela 3-Concentração de glucose para diferentes tipos de fluídos.....	51
Tabela 4-Lista de reagentes utilizados e sua respectiva origem.....	57
Tabela 5-Padrões de diluição preparados através da solução mãe e do PBS com a respectiva concentração final.....	63
Tabela 6-Lista de especificações e respectivas configurações para obtenção de cada um dos espectros de Raman.....	64
Tabela 7- Comparação entre os dados obtidos da reta de calibração e da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> para os dois métodos de adsorção (2 horas e 12 horas).....	85
Tabela 8-Comparação entre os dados obtidos da reta de calibração e da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> para os dois métodos de aprisionamento com glutaraldeído e poliTir (2 horas e 12 horas).....	85
Tabela 9-Comparação entre os dados obtidos da reta de calibração e da cinética de <i>Michaelis-Menten</i> para os dois melhores métodos (adsorção 2 horas e aprisionamento com Tir e glutaraldeído 12 horas). 86	
Tabela 10- Erros associados as soluções de glucose de concentração de 1,0 mmol/L, 2,5 mmol/L, 5,0 mmol/L e 10,0 mmol/L para um estudo triplicado. ....	88
Tabela 11- Valores das Bandas D e G e respectivo índice ID/IG, obtidos pela análise de <i>Raman</i> para os diferentes materiais utilizados.....	90



## LISTAS DE SIGLAS E SÍMBOLOS

### Lista de Siglas

AG	Albumina Glicada
ATP	Adenosina Trisfosfato
Au-SPE	<i>Gold Screen Printed Electrodes</i>
Bgr	Biografeno
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CA	Cronoamperometria
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CGM	<i>Continuous Glucose Monitoring</i>
CLE	<i>Cross Linking Enzyme</i>
CLEA	<i>Cross Linking Enzyme Aggregates</i>
CLEC	<i>Cross Linking Enzyme crystals</i>
CV	<i>Cyclic Voltametry</i>
DET	<i>Direct eletron transfer</i>
DGNs	Nanoestruturas dendríticas de ouro
DGS	Direção Geral da Saúde
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desorirribonucleico
DRP-DSC	Caixa Conectora DropSens
EIS	<i>Eletrochemical Impedance Spectroscopy</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FADH2	Flavina Adenina Dinucleotídeo Hidrogénio
FPG	Fasting Plasma glucose
G6P	Glucose-6-fosfato
GNR	<i>Graphene Nanoribbon</i>
GO	<i>Graphene Oxide</i>
GOx	Glucose oxidase
GR	Grafite
GS/MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
HbA1C	Hemoglobina glicosilada
HEMS	<i>Histology and Electron Microscopy Service</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IDGC-MS	<i>Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
iscCGM	<i>Intermittently Scanned Continuous Glucose</i>
LabRISE	<i>Laboratory for Research and Innovation in Sensors and Engineering</i>
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto

ISF	<i>Interstitial Fluid</i>
i3S	Instituto de Investigação e Inovação em Saúde
LD	Limite de deteção
LIRL	Limite Inferior de Resposta Linear
LSRL	Limite Superior de Resposta Linear
MCG	Medição Contínua Glucose
MIPs	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Hidrogénio
NCGM	<i>Non- Continuous Glucose Monitoring</i>
NIR	<i>Near Infrared Spectroscopy</i>
OCT	<i>Optical Coherence Tomography</i>
OGTT	<i>Oral Glucose Tolerance Test</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PANI	Camadas de Polianilina
PB	<i>Prussian Blue</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PMS	Fenazina Metosulfato
PoliTir	<i>PoliTiramine</i>
Ppy	Polipirrol
rGO	<i>Reduced Graphene Oxide</i>
rtCGM	<i>Real Time Continuous Glucose Monitoring</i>
SMBG	<i>Self-Monitoring Blood Glucose</i>
SNS	Serviço Nacional de Saúde
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
Tir	<i>Tiramine</i>

### Lista de Símbolos

c	Concentração de analito	mmol/L
C	Capacidade da dupla camada	F
D	Coefficiente de difusão	$cm^2 /s$
$\Delta E$	Varição da diferencial potencial aplicada	V
f	Constante de <i>faraday</i>	C
$I_{max}$	Corrente máxima atingida	$\mu A$
Is	Corrente normalizada	$\mu A$
$K_d$	Constante <i>Michaelis-Menten</i>	-
n	Número de eletrões	-
R	Resistência	$\Omega$
t	Tempo	s

---

T	Temperatura	°C
$v$	Velocidade	$m^2 / s$
$V_{max}$	Velocidade máxima	$m^2 / s$

---



## 1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo irá ser realizada uma breve introdução sobre o problema abordado e a sua importância para uma melhor qualidade de vida da população diabética. Assim, serão descritos os principais objetivos deste estudo, a metodologia utilizada e uma breve introdução do centro de investigação onde foi realizado o estudo experimental. Por fim, é mencionado a estrutura adotada no trabalho.

### 1.1. Enquadramento e pertinência

A diabetes é uma doença crónica em larga expansão, atingindo de uma forma crescente as características de uma verdadeira pandemia. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem cerca de 422 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo, sendo que este valor tem vindo a aumentar de forma constante nas últimas décadas [1]. Esta doença representa um conjunto de distúrbios autoimunes, metabólicos e genéticos, estando particularmente associada a níveis de glucose elevados (hiperglicemia) e à insuficiência parcial ou total da insulina produzida pelo pâncreas [2].

O diagnóstico precoce da diabetes é fundamental, uma vez que se os níveis de glucose no sangue se mantiveram elevados durante um período alargado de tempo, podem aumentar o risco de desenvolver complicações crónicas, tais como: doenças cardiovasculares, lesões renais, neuropatia diabética, retinopatia diabética, entre outros [3]. Do ponto de vista do paciente diabético, a diabetes é uma condição de saúde que requer atenção ao estilo de vida, à monitorização da glicemia, administração de insulina, podendo causar ansiedade e depressão [2]. Posto isto, é urgente melhorar os meios de diagnóstico e monitorização da diabetes, de forma a diminuir complicações médicas futuras, proporcionado assim uma melhor qualidade de vida a estes pacientes.

Tendo em conta os aspetos referidos anteriormente, o desenvolvimento de sensores simples, de rápida resposta e fáceis de manusear, podem ser uma solução para estes pacientes, face a métodos de diagnóstico mais convencionais (análises clínicas), que são invasivos. Por conseguinte, os métodos eletroquímicos são uma técnica analítica auspiciosa para construção de sensores de glucose, pois apresentam uma elevada sensibilidade, baixo custo e fornecem uma rápida resposta (nível de glucose no sangue).

Os biossensores eletroquímicos enzimáticos são uma solução promissora para o diagnóstico da diabetes, pois permitem melhorar a qualidade de vida dos pacientes, desenvolvendo dispositivos portáteis, miniaturizados e seletivos. Isto é conseguido, graças a elevada especificidade das enzimas e à seletividade dos transdutores eletroquímicos [4][5].

### 1.2. Questão e objetivos de investigação

O principal objetivo desta dissertação de mestrado é desenvolver um sensor eletroquímico enzimático descartável para o diagnóstico da diabetes, que seja seletivo, de baixo custo, simples e minimamente invasivo.

Por forma a atingir este objetivo final, serão estudados diferentes mecanismos de imobilização da enzima Glucose Oxidase (GOx), bem como várias técnicas eletroquímicas e nanomateriais. Os materiais sensores foram caracterizados quimicamente e morfolologicamente por técnicas de *Raman* e de Microscopia Eletrónica de Transmissão (do inglês: *Transmission electron microscopy*, TEM).

Numa primeira abordagem serão utilizados eletrodos impressos descartáveis de ouro (do inglês: *Screen-Printed Gold Electrodes*, Au-SPE), similares aos chips comercialmente disponíveis no mercado para a detecção da glucose. Como perspectiva futura, visiona-se aplicar a metodologia adotada nesta tese em microagulhas modificadas com materiais condutores, permitindo assim a monitorização contínua da glucose no fluido intersticial da pele (do inglês: *Interstitial Fluid*, ISF). Neste sentido, será utilizado um material biocompatível, como o Biografeno (Bgr), para posterior imobilização da enzima.

### 1.3. Opções metodológicas

Para o desenvolvimento do sensor eletroquímico enzimático foi aplicada a seguinte metodologia:

- Utilização de Au-SPEs e consequente modificação com materiais biocompatíveis como o Bgr;
- Ligação da enzima GOx como elemento de (bio)reconhecimento à superfície do Au-SPE previamente modificado com o nanomaterial; estudo de várias técnicas de imobilização da enzima, nomeadamente, mecanismo de adsorção e encapsulamento/aprisionamento;
- Avaliação do desempenho analítico do biossensor através de técnicas eletroquímicas (Voltametria cíclica (do inglês: *Cyclic Voltammetry*, CV) e cronoamperometria (do inglês: *chronoamperometry*, CA)), através de curvas de calibração, estudo de seletividade e análise de amostras de soro comercial.

### 1.4. Apresentação do grupo de Investigação

A dissertação foi desenvolvida numa das unidades de investigação do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), o *Laboratory for Research and Innovation in Sensors and Engineering*, LabRISE.

O LabRISE é uma unidade de investigação do ISEP, que visa o desenvolvimento de (bio)nanomateriais com aplicação no contexto médico e industrial. Um dos exemplos de nanomateriais utilizados para este efeito, são os biomiméticos, que são reconhecidos amplamente como anticorpos plásticos, dimensionados por impressão, em *bulk* ou em superfície, bem como pela sua interface direta ou indireta com superfícies sensoriais. O âmbito de aplicação do LabRISE estende-se ao desenvolvimento de biossensores com elementos de reconhecimento naturais como enzimas e anticorpos, e sensores inteligentes para aplicação em embalagens de alimentos. Estes sensores têm como base a transdução de sinais eletroquímicos e óticos.

### 1.5. Estrutura do trabalho

Este documento está organizado em cinco capítulos, descrevendo assim o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico enzimático para o diagnóstico da diabetes.

No presente capítulo, é dada a pertinência do trabalho desenvolvido ao longo da tese, onde é realizada uma breve introdução do tema e da instituição envolvida na concretização da mesma.

No capítulo dois procede-se a uma revisão da literatura sobre a contextualização teórica essencial para as diferentes etapas da pesquisa, sendo estas: a doença diabetes, metodologias para o diagnóstico, principais componentes de biossensores como elementos de (bio)reconhecimento e transdutores (destacando aqueles com maior relevância para o presente trabalho de pesquisa). Por fim, são referenciados os métodos de análise qualitativa dos materiais.

Posteriormente, no capítulo três são descritos detalhadamente todos os aspetos de natureza experimental associados à preparação do biossensor enzimático e às metodologias de caracterização. São mencionados

---

os vários materiais e equipamentos envolvidos, bem como os reagentes e os procedimentos específicos necessários.

No capítulo quatro são discutidos os resultados experimentais obtidos no âmbito do desenvolvimento do sensor eletroquímico em termos de construção e avaliação do seu desempenho analítico.

Por fim, no capítulo cinco estão sumarizadas as conclusões obtidas e as suas limitações, bem como as possíveis perspectivas futuras a adotar para obtenção de um biossensor comercial.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Diabetes

A Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica [1] em larga expansão, tendo-se vindo a tornar num dos problemas mais prementes e prevalentes das últimas décadas [6], sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a nível mundial, cerca de 422 milhões de pessoas têm diabetes, e que 1,5 milhões de mortes são diretamente atribuídas a esta doença [1]. Nos últimos anos, o número de casos, bem como a prevalência de diabetes têm aumentado, sendo que a Federação Internacional de Diabetes (do inglês: *International Diabetes Federation*, IDF) estima que esse número aumente para 643 milhões em 2030, e 738 milhões em 2045 [7].

Relativamente à prevalência de diabetes em Portugal, esta é uma das mais elevadas da Europa, sendo que em 2021 foram registados 79 241 novos casos de diabetes, havendo mais de 830 mil doentes inscritos no Serviço Nacional de Saúde (SNS [8]). Segundo a IDF, Portugal apresenta a segunda maior prevalência padronizada de diabetes da União Europeia com 9,1 % na população entre os 20 e os 79 anos [9].

Esta doença é caracterizada por níveis elevados de glucose (hiperglicemia), e de hemoglobina glicosilada (HbA1c) no sangue [10], que se devem essencialmente a uma deficiência absoluta ou relativa da insulina produzida pelo pâncreas. A hiperglicemia associa-se a longo prazo a diversos danos nos órgãos, podendo provocar: retinopatia, nefropatia, neuropatia autonómica causando sintomas gastrointestinais, geniturinários, bem como aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares

Atendendo à prevalência da diabetes nos últimos anos e às complicações a esta associadas, o diagnóstico precoce é essencial, evitando assim maiores danos à saúde destes pacientes.

O diagnóstico da diabetes é realizado através de exames como: glucose plasmática em jejum (do inglês: *Fasting Plasma glucose*, FPG); HbA1c e em certos casos teste oral de tolerância à glucose [11] (do inglês: *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT). Com base nos resultados dos exames mencionados anteriormente, é possível diagnosticar a diabetes [11](Tabela 1).

Tabela 1-Critérios de diagnóstico para a DM (FPG, OGTT, HbA1c).

Teste	Normal	Diabetes
FPG (mg/dL [mmol/L])	<100 (<5,6)	≥126 (≥7,0)
OGTT (mg/dL [mmol/L])	<140 (<7,8)	≥200 (≥11,1)
HbA1c (%)	<5,7	≥6,5

Existem ainda um conjunto de sintomas associadas à doença que auxiliam no seu diagnóstico, sendo os principais: poliúria, polidipsia, polifagia e fadiga [10]. Diagnosticada a diabetes, é necessário classificar a doença de forma a planificar a abordagem clínica e a decisão terapêutica a adotar pelo profissional de saúde. A diabetes pode ser classificada em: DM tipo 1, DM tipo 2 e diabetes gestacional.

Na DM tipo 1 ocorre destruição autoimune das células beta pancreáticas, fazendo com que haja uma deficiência absoluta de insulina [11], sendo classificada como idiopática.

A DM tipo 2 é a mais frequente [12], sendo caracterizada por resistência à insulina [13]. Este tipo de diabetes desenvolve-se principalmente em adultos, estando associado à predisposição genética, mas também à obesidade e ao sedentarismo.

A diabetes gestacional surge durante a gravidez, ocorrendo em pelo menos 5 % de todas as gestações [14], e é definida como uma intolerância à glicose [13]. Este tipo de diabetes pode provocar complicações durante a gravidez [15], sendo que aumenta o risco da grávida desenvolver DM tipo 2. Além das causas mencionadas, a diabetes também pode ser resultado de consumo de drogas, excesso de certas hormonas, e infeções.

A monitorização da diabetes, principalmente dos níveis de glicose no sangue, é crucial para permitir uma melhor qualidade de vida aos pacientes e conseqüentemente, diminuir os sintomas e o risco de desenvolver outras doenças. Assim, é fundamental uma monitorização frequente e a longo prazo dos níveis de glicose no sangue, especialmente antes e após as refeições, para garantir que os valores estão dentro dos parâmetros normais [16]. Por forma a permitir a monitorização da glicose destes pacientes, existem diversos aparelhos de medição de glicose, que têm vindo a evoluir ao longo das últimas décadas. Os medidores de glicose domésticos típicos são baseados em eletroquímica e necessitam de uma picada no dedo para proceder a leitura dos valores de glicose de sangue. Estes tipos de medidores para além de serem invasivos, não permitem uma leitura contínua dos valores, aumentando assim o risco para o paciente. Perante isto, a comunidade científica tem focado a sua investigação no desenvolvimento de aparelhos de medição contínua de glicose (MCG) não invasivos, que permitam a deteção não só através do sangue, como por exemplo, através de suor, lágrimas e urina [16]. Na Figura 1 está representado o mecanismo de funcionamento de um MCG baseado em microagulhas, que deteta glicose a partir do ISF.

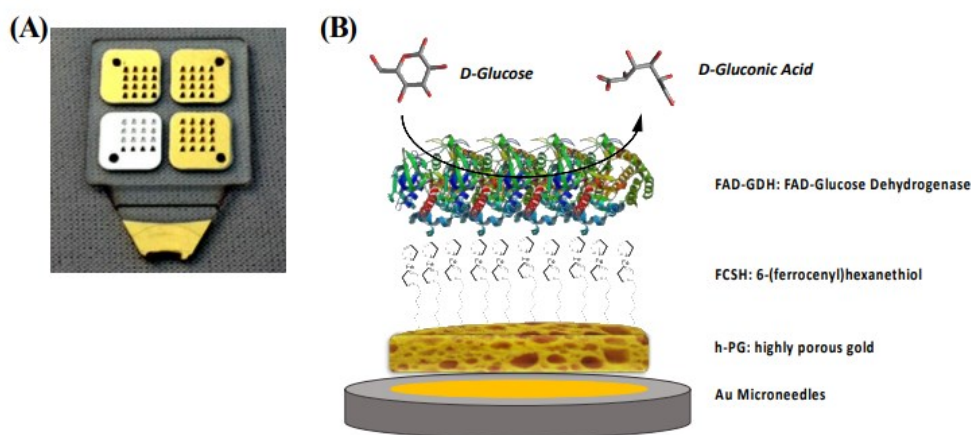


Figura 1-Sensor transdérmico para a deteção contínua da glicose no ISF da pele, com base em microagulhas [16].

### 2.1.1. Biomarcadores da diabetes

Os biomarcadores, também denominados de marcadores biológicos, são entidades que podem ser medidas, permitindo diferenciar estados normais de patológicos [17]. Além disso, podem ser utilizados para avaliar as respostas de um determinado medicamento terapêutico administrado, bem como a predisposição a uma determinada doença [18]. Tendo por base as suas principais aplicações clínicas, estes podem ser de diagnóstico, monitorização, farmacodinâmico, preditivo, prognóstico, segurança ou de risco [19] (Figura 2).

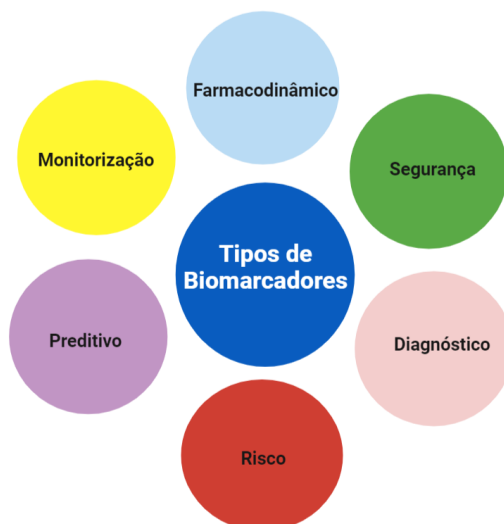


Figura 2- Tipos de biomarcadores. Imagem adaptada de [19] , em *BioRender.com*

Os biomarcadores devem ser facilmente mensuráveis e acessíveis, usando técnicas que permitam a sua inclusão na prática clínica [19]. Estes podem ser classificados como, histológicos (amostras de tecidos por biopsia), fisiológicos (funções dos órgãos), físicos (alterações das estruturas biológicas) e anatómicos [20]. Tendo em conta, o tipo de doença a estudar, os biomarcadores podem ser células específicas, genes, moléculas, enzimas ou hormonas.

A diabetes é uma doença complexa, sendo que os biomarcadores são um fator chave para o seu diagnóstico e monitorização. Este tipo de biomarcadores é comumente utilizado para determinar se os valores médios da glucose estão dentro dos parâmetros normais.

Ao longo deste capítulo serão descritos diversos tipos de biomarcadores utilizados, tais como gliconjugados (Hb1Ac; 1,5 anidroglicitol (1,5-AG)) e proteínas (frutosamina, albumina glicada (AG), adiponectina e fetuína-A).

#### **2.1.1.1. HbA1C**

A HbA1c é um dos biomarcadores frequentemente utilizado para o diagnóstico, prevenção e monitorização da diabetes, permitindo refletir o impacto do estilo de vida e da medicação no controlo glicémico do paciente nos últimos três meses [21]. Este gliconjugado é formado quando a glucose se liga ao grupo aminoterminal da subunidade  $\beta$  da hemoglobina [22], tal como se pode verificar na Figura 3. A HbA1c reflete assim, a glicemia crónica em vez dos níveis de glucose num único momento.

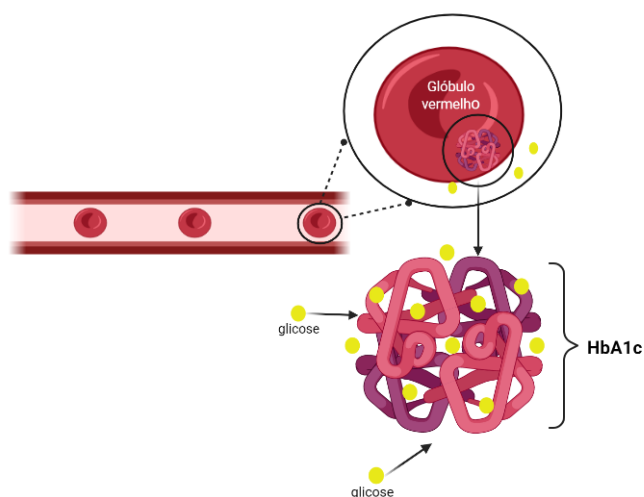


Figura 3-Formação da HbA1c. Figura adaptada de [23], em *BioRender.com*

Segundo a Direção Geral da Saúde (DGS), quando uma pessoa apresenta um valor de HbA1c igual ou superior a 6,5 %, tem diabetes, ou pré-diabetes se os valores se encontrarem entre 5,7 % a 6,4 % [24]. Apesar disso, deve-se privilegiar o valor tradicional da glicose em jejum ou os valores da prova de tolerância à glicose oral para o seu diagnóstico.

Comparativamente com os valores de glicose em jejum e do OGTT, a HbA1c é menos sujeita à variabilidade biológica, instabilidade pré-analítica e stresse agudo [17]. É de evidenciar que não é necessário que o paciente esteja em jejum antes de realizar o teste, sendo assim menos incómodo [21]. No entanto o valor de HbA1c pode ser afetado pela quantidade de glicose que penetra na membrana dos eritrócitos, ou pelo tempo de vida do eritrócito. Assim, qualquer que seja a condição que prolongue ou diminua o tempo de vida dos eritrócitos, pode os expor mais ou menos tempo ao efeito da glicose, fazendo com que o valor de HbA1c aumente ou diminua respetivamente. Para além disso, podem existir falsos aumentos deste biomarcador, devido à ingestão de álcool (ocorre a formação de um complexo acetaldeído), certos medicamentos e condições que diminuem a vida útil dos glóbulos vermelhos (anemia) [21]. Também podem ocorrer falsas diminuições devido à perda de sangue, pois encurta o tempo de vida dos eritrócitos.

#### 2.1.1.2. Frutosamina

A frutosamina (1-amino-1 desoxifrutose) é uma cetoamina derivada de uma reação entre a glicose e uma proteína (grupo amino), que tem vindo a ser utilizada como biomarcador da diabetes [25].

Este biomarcador permite avaliar as concentrações de glicose média no sangue nas últimas uma a quatro semanas, sendo assim utilizado como monitorização da diabetes [26]. Este método é complementar em condições clínicas em que a HbA1c é imprecisa (anemia) [25].

#### 2.1.1.3. Albumina glicada

Semelhante à frutosamina, a albumina glicada (AG) é uma cetoamina [27], formada pela glicação não enzimática da albumina sérica, que permite refletir os níveis glicémicos num prazo de duas a três semanas [28].

Comparativamente à HbA1c, os valores de AG não são afetados por mudanças no tempo de vida dos eritrócitos, pelo que fornecem medições mais precisas em casos de anemia [29].

Em certas condições, como a obesidade, a AG pode ser imprecisa, uma vez que os valores são mais baixos devido ao aumento do seu catabolismo e à diminuição da taxa de síntese de albumina devido à inflamação causada pela obesidade [25].

#### 2.1.1.4. adiponectina

A adiponectina é uma proteína secretada principalmente pelo tecido adiposo. Apresenta efeitos anti-inflamatórios e antidiabéticos, sendo essencial na proteção contra a resistência à insulina [30].

Este biomarcador tem um papel relevante no prognóstico da diabetes, sendo que alguns estudos demonstraram níveis mais baixos de adiponectina uma década antes do diagnóstico de diabetes [31]. Assim, valores mais elevados de adiponectina estão associados a uma redução do risco de diabetes [32]

#### 2.1.1.5. 1,5 anidroglicitol

O 1,5 anidroglicitol (1,5-AG) é um monossacarídeo dietético que tem sido sugerido como marcador da pré-diabetes [25]. Este biomarcador está presente no sangue dos tecidos de uma forma quase constante devido à reabsorção no túbulo renal proximal [33]. Como os túbulos proximais têm uma maior afinidade pela glucose do que a 1,5-AG, os altos níveis de glucose impedem a reabsorção deste monossacarídeo. No caso de hiperglicemia, as elevadas quantidades de glucose bloqueiam a reabsorção tubular, fazendo com que as concentrações séricas caiam.

Relativamente aos outros testes de diagnóstico, este é mais estável e menos dispendioso, sendo que reflete os níveis de glucose nos últimos 10 a 14 dias [34].

#### 2.1.1.6. Fetuína-A

A fetuína-A é uma glicoproteína multifuncional, que é sintetizada principalmente nos hepatócitos e secretado no soro humano em altas concentrações [35].

Este biomarcador está relacionado com a disfunção metabólica e com a resistência à insulina, associando-se assim ao aumento de risco de diabetes [36].

Nos seres humanos, os níveis altos deste biomarcador podem estar principalmente associados à DM tipo 2, face à presença de dois fatores de risco: resistência à insulina e obesidade.

## 2.2. Métodos convencionais para deteção da glucose

O controlo glicémico é essencial para um melhor controlo da diabetes por parte do paciente, uma vez que elevados ou baixos níveis de glucose podem causar hiperglicemia e hipoglicemia, respetivamente [37]. Por forma a evitar complicações médicas futuras, tais como danos nos tecidos e doenças cardiovasculares, os valores de glucose devem ser monitorizados continuamente.

Existem diversos métodos, cada um com diferentes utilidades e limitações para a monitorização do controlo da glicemia. A primeira patente de um aparelho de monitorização de glucose no sangue foi registada em 1971 nos EUA por *Anton Clemens* [38], e consistia num dispositivo que avaliava a mudança de cor das tiras de reagentes à base de enzimas [39]. A partir desta época, têm vindo a ser desenvolvidos novos métodos que permitem a avaliação do controlo glicémico de forma contínua e não invasiva, e que irão ser abordadas ao longo dos próximos capítulos. Como principais métodos de deteção de glucose, serão abordadas técnicas laboratoriais que dependem essencialmente de métodos enzimáticos e de hexoquinase [37], e técnicas de monitorização doméstica.

### 2.2.1. Técnicas laboratoriais

#### 2.2.1.1. ELISA

O ensaio de imunoabsorção enzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), é um teste imunológico muito sensível, que é utilizado para detetar e quantificar substâncias, tais como: anticorpos, antigénios, proteínas e hormonas. Por forma a se conseguir produzir um resultado mensurável, é necessário um anticorpo marcado com enzima [40] (tipo de proteína que possui regiões

específicas para se ligar ao antígeno) e um antígeno (substância que quando ligada ao anticorpo promove a resposta do sistema imunológico), estabelecendo assim uma interação antígeno-anticorpo.

O método ELISA geralmente é realizado em placas de poliestireno. Dependendo do tipo de ELISA pode ser utilizado um anticorpo de detecção primário (anticorpo liga-se apenas a proteína de interesse), ou um anticorpo de detecção secundário (um anticorpo conjugado com uma enzima liga-se a um anticorpo não conjugado com enzima).

Existem quatro tipos principais de ELISA, sendo estes:

- ELISA direto (placa revestida com antígeno; anticorpo de triagem);
- ELISA indireto (placa revestida com antígeno; triagem antígeno/anticorpo);
- ELISA sanduíche (placa revestida com anticorpo; antígeno de triagem)
- ELISA competitivo (anticorpo de triagem).

A detecção do anticorpo específico é realizada após a lavagem dos poços da placa, através da mudança de cor do substrato cromogénico (adicionada a placa).

Este tipo de técnica além de ser utilizado em laboratório, é também utilizada nas áreas de medicina e de indústria alimentar, como ferramenta de diagnóstico e de controlo de qualidade [40].

#### **2.2.1.2. Gas chromatography–mass**

A espectrometria de massas por cromatografia gasosa (do inglês: *Gas Chromatography Mass Spectrometry*, GS/MS), é uma técnica constituída por um cromatógrafo gasoso que está acoplado a um espectrómetro de massas. Através destas técnicas, misturas complexas de substâncias químicas podem ser separadas, identificadas e quantificadas, permitindo assim a análise de diferentes compostos [41].

Um estudo realizado por *M.L. Di Gioia et al* [42], utilizou esta técnica para determinação da concentração da glucose na saliva humana. Esta consistiu na derivação da glucose com anidrido acético, para posterior análise da glucose penta-acetilada por GS/MS. Apesar do método desenvolvido ser sensível, e preciso, este não permite uma monitorização contínua dos valores da glucose, e depende do fluxo salivar, que influencia diretamente a concentração de glucose na saliva.

Relativamente à cromatografia de gás de diluição de isótopos- espectrometria de massa (do inglês: *isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry*, IDGC-MS), esta é recomendada pelo Centro de controlo e prevenção de doenças (do inglês: *Center for Diseases Control and Prevention*, CDC), como uma técnica de referência. Esta técnica é utilizada para medição da glucose, sendo que a amostra é diluída com um isótopo de glucose, para posterior medição num cromatógrafo a gás com uma massa de detetor espectrométrico[43]. Devido à necessidade de preparar a amostra, este método não é aplicável para medição contínua dos valores de glucose no sangue [44].

#### **2.2.1.3. Colorimétrica**

Os métodos colorimétricos permitem determinar a concentração de uma determinada substância em solução, através da comparação de cores ou da faixa de comprimento de uma cor da substância padrão. Esta comparação pode ser efetuada através de um espectrofotómetro que compara a intensidade da cor obtida com a cor padrão.

A detecção de glucose, também pode ser realizada por métodos colorimétricos, tendo como vantagens: o baixo custo experimental, um processo de operação simples e um efeito de detecção visível. Além disso este método utiliza peroxidases naturais que permitem tornar o biosensor mais seletivo e bioativo.

Contudo, as peroxidases naturais têm um custo elevado e são mais propensas ao processo de desnaturação, limitando assim a sua aplicação [45].

Atualmente, um dos exemplos comerciais da detecção colorimétrica da glucose, é o da empresa *Thermo Fisher Scientific* [46]. Este kit de detecção colorimétrica permite quantificar e detetar a glucose em diferentes amostras (plasma, soro, urina, tampões, meios de cultura). É constituído por: uma placa transparente, padrões de glucose, leitura de microplacas, e outros componentes. O princípio deste ensaio baseia-se nos seguintes passos:

1. Padrão de beta-D-glucose é fornecida para gerar uma curva padrão para o ensaio, e todas as amostras são lidas a partir desta curva;
2. As amostras são misturadas com o substrato colorimétrico, peroxidase e a GOx (para iniciar a reação);
3. A reação é incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos;
4. A GOx ao reagir com a glucose produz peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), que na presença da peroxidase de rábano, reage com o substrato colorimétrico incolor, tornando-o num produto cor-de-rosa;
5. O produto cor-de-rosa é lido a 560 nm.

Apesar das vantagens mencionadas, as técnicas laboratoriais são invasivas, dispendiosas, não são portáteis, havendo necessidade de obtenção de amostras de sangue dos pacientes, e de técnicos de laboratório especializados. Um fator crucial no diagnóstico e na monitorização da diabetes é a rapidez dos resultados, pelo que nestes métodos esta não se verifica, sendo necessários longos períodos de espera.

### 2.2.2. Técnicas de monitorização doméstica/dispositivos comerciais

As técnicas de monitorização doméstica são destinadas ao uso pessoal dos diabéticos, permitindo-lhes realizar uma autoavaliação dos níveis de glucose. Estas técnicas podem ser de monitorização não contínua (do inglês: *Non-Continuous Glucose Monitoring*, NCGM), ou de monitorização contínua de glucose (do inglês: *Continuous Glucose Monitoring*, CGM).

Os dispositivos NCGM, também conhecidos por automonitorização da glucose no sangue (do inglês: *Self-Monitoring Blood Glucose*, SMBG), necessitam de uma amostra de sangue periférico para a determinação do nível de glucose, de acordo com o plano de horários estabelecido [37]. Relativamente aos testes laboratoriais a reação ocorre diretamente na tira de teste, que está ligada a um medidor.

Estes dispositivos utilizam um biossensor com a enzima GOx [47], pelo que quando a amostra de sangue é colocada na tira de teste, a glucose é oxidada pela enzima GOx, fazendo com que seja gerada uma certa quantidade de corrente na tira de teste, que é proporcional ao nível de glucose [37]. Os eletrões gerados pela passagem de corrente, vão ser direcionados para o medidor, que contém um conversor de corrente para tensão, fornecendo assim uma diferença de potencial proporcional ao nível de glucose [37]. Atualmente, o mercado deste tipo de dispositivos tem vindo a aumentar, sendo as marcas mais comuns a *Roche* [48], *Johnson & Johnson* [49], e a *Abbott* [50].

Os SMBG apresentam diversas vantagens, destacando-se o facto de ser portátil, barato, e de fácil manuseamento, permitindo que o paciente meça os níveis de glucose várias vezes ao dia, onde quer que esteja. Não obstante, apresenta uma grande desvantagem, pois não permite uma avaliação contínua dos valores de glucose, e necessita que a pele seja perfurada a cada medição para obtenção da amostra de sangue (Figura 4).

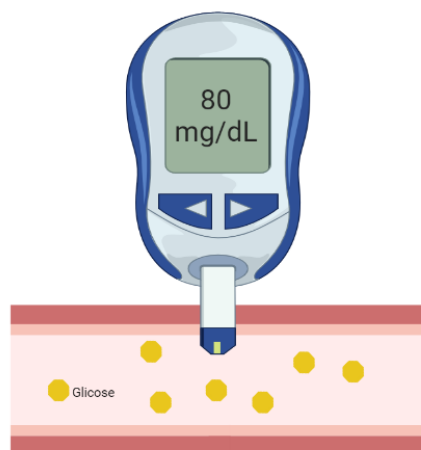


Figura 4-Funcionamento do sistema SMBG. Imagem adaptada de [51] , em *BioRender.com*

Dado que nesta patologia existe um risco acrescido de infecções e dificuldade no processo de cicatrização, sucessivas medições, podem aumentar ainda mais esse risco, dando a origem a feridas crônicas. Em certos pacientes, este método pode provocar dor e stress antes da colheita do sangue. Por outro lado, as tiras de teste e a agulha de sangue são descartáveis, podendo ter um impacto ambiental negativo se mal descartadas. Ademais, o prazo de validade da tira é curto, e um armazenamento inadequado pode interferir nos resultados [47].

Tal como se pode visualizar na Figura 5, a tira de teste é composta por três elétrodos: (1) o elétrodo de trabalho, com um formato circular, onde são depositados os materiais (exemplo: Bgr), e que vai permitir determinar a corrente gerada pela reação; (2) o elétrodo de referência, na zona direita do chip , que mantém a tensão de referência constante durante a reação química; (3) o contra elétrodo, na zona esquerda do chip, que fornece corrente ao elétrodo de trabalho quando ligado à respetiva fonte [37].

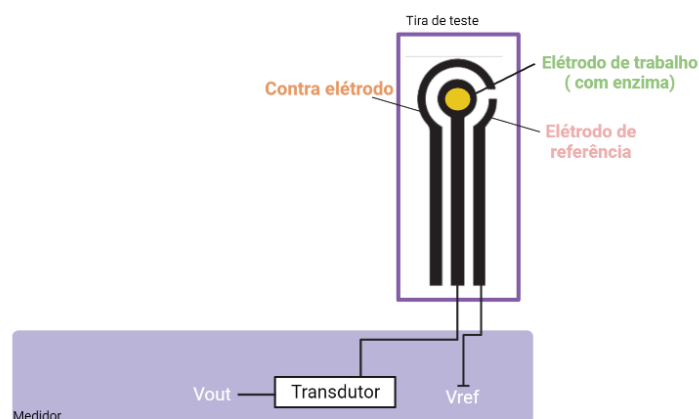


Figura 5-Diagrama de blocos do aparelho de medição de glicose pelo método de picada no dedo. Imagem adaptada de [37] em *BioRender.com*

Nos últimos anos, têm vindo a surgir novas inovações tecnológicas para a diabetes, sendo de principal destaque os CGM. Estes foram desenvolvidos no início dos anos 90 [52], sendo atualmente menores, mais baratos e mais fáceis de manusear [53], fornecendo alertas programáveis quando ocorrem descidas ou subidas dos níveis de glicose.

Os CGM são dispositivos vestíveis que contrariamente aos SMBG, permitem medir a concentração de glucose subcutânea continuamente (por exemplo a cada 1-5 minutos), por vários dias, permitindo controlar de forma sistemática os valores de glucose, reduzindo assim o risco de complicações associadas à diabetes [54].

Estes sistemas são geralmente constituídos por três componentes, que estão ilustrados na Figura 6: (1) um sensor de glucose baseado em GOx que é inserido no tecido adiposo subcutâneo; (2) um transmissor, que está conectado ao sensor e que permite a transferência de dados; (3) recetor, que está ligado a um monitor/*smartphone* que exibe a leitura do valor de glucose.

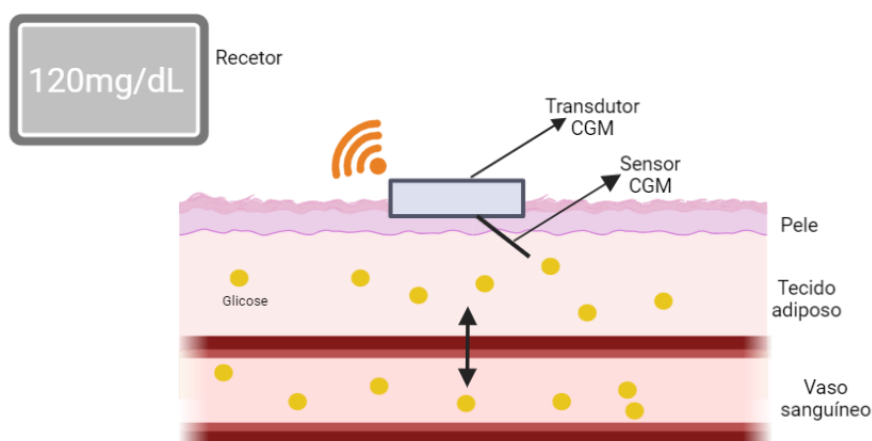


Figura 6-Componentes de um sistema CGM. Imagem adaptada de [37] , em *BioRender.com*

Em comparação com os SMBG, os CGM, não requerem uma amostra de sangue, pois são inseridos no tecido subcutâneo, alcançando assim a glucose presente no ISF. Através da técnica eletroquímica, este sensor utiliza a enzima GOx para oxidar a glucose, tal como acontece na tira de teste dos SMBG [37]. Atualmente existem dois tipos de CGM, o sistema de monitorização contínua em tempo real (do inglês: *Real Time Continuous Glucose Monitoring*, rtCGM) e o sistema de monitorização contínua de glucose com varredura intermitente (do inglês: *Intermittently Scanned Continuous Glucose*, iscCGM).

O sensor dos iscCGM mede os níveis de glucose a cada minuto, mas apenas os armazena a cada 15 minutos, enquanto os sistemas de rtCGM exibem os valores automaticamente [55]. Uma das grandes vantagens do rtCGM face aos iscCGM, é que estes podem ser ligados a bombas de insulina, funcionando como um sistema de circuito fechado. Graças à tecnologia presente no rtCGM, os valores de insulina são exibidos, permitindo que pacientes, principalmente com DM tipo 1, adaptem manualmente as doses de insulina com base no valor de glucose lido [56]. Os CGM permitiram melhorar a qualidade de vida destes pacientes através da medição contínua da glucose e dos alarmes gerados aquando de uma descida/subida abrupta dos níveis de glucose, diminuindo assim os riscos associados à hiperglicemia e hipoglicemia.

Apesar dos avanços, existem ainda problemas associados a leituras imprecisas, devido a uma má inserção do sensor sobre a pele. Dado que é colocado na pele, pode causar irritação e desconforto [37]. Ademais, há necessidade de recalibrações por falta de padronização dos métodos de *software* para análise dos dados gerados, bem como há necessidade de desenvolver diretrizes para a prática clínica de CGM [54]. Outra desvantagem está relacionada com o impacto ambiental, dado que os materiais utilizados não são recicláveis, fator que deve ser tido em consideração em investigações futuras [57].

### 2.3. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que medem as alterações dos processos biológicos e que as convertem num sinal elétrico, através de um componente biológico e um detetor físico-químico [58]. Assim, beneficiam da sensibilidade e da especificidade da biologia, através de medições (bio)analíticas com formatos simples e fáceis de manusear [59].

Estes dispositivos são compostos pelos seguintes elementos [60](Figura 7):

- **Elemento de (bio)reconhecimento/Bioreceptor:** Molécula que vai reconhecer especificamente o analito (exemplos: enzimas, aptámeros, anticorpos);
- **Analito de interesse/ Biocomponente:** Substância de interesse a detetar (exemplos: glucose, colesterol);
- **Transdutor:** Regista os dados e transforma o estímulo num sinal elétrico. Este converte a interação do bioreceptor com o analito, num sinal mensurável. (óticos, eletroquímicos, colorimétricos);
- **Condicionamento de Sinal:** Processa o sinal adquirido para posterior análise e exibição no *display*. Este sistema consiste num conjunto de circuitos eletrónicos que realizam as funções de amplificação, filtragem e conversão de um sinal analógico para digital;
- **Display:** Constituído por hardware e software, permite a exibição dos resultados do biossensor, através da ligação ao sistema de componentes eletrónicos. O sinal de saída do *display* depende dos requisitos do utilizador final, pelo que pode ser demonstrado um resultado numérico, gráfico, imagem, entre outras.

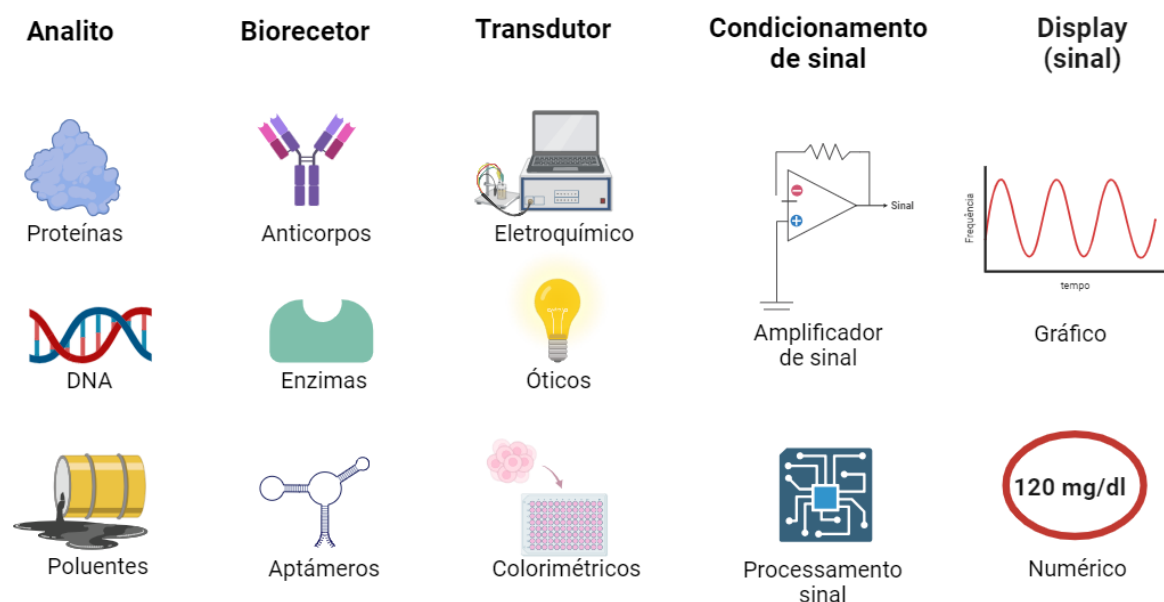


Figura 7-Componentes de um Biossensor. Imagem realizada em *BioRender.com*

O conceito base de biossensor foi elucidado pela primeira vez em 1962 pelos investigadores *Clark* e *Lyons*, com a descrição de um “elétrodo enzimático [61]”. Desde então, tem havido um grande desenvolvimento dos biossensores, sendo estes atualmente utilizados nos setores da indústria alimentar, na área médica, setor marítimo, proporcionando uma melhor sensibilidade e estabilidade face aos

métodos tradicionais [58]. Devido ao crescimento da população mundial e ao seu envelhecimento, o número de problemas causados por doenças crônicas têm vindo aumentar, pelo que os biossensores têm se tornado essenciais para melhorar a qualidade de vida da população. Através do desenvolvimento de sensores miniaturizados e portáteis, tem sido possível identificar diversos biomarcadores, permitindo uma vigilância constante e em tempo real [60].

Ao longo deste capítulo irão ser abordados dois tipos de biossensores, os óticos e os eletroquímicos, e quais as suas aplicações nas áreas de investigação.

### 2.3.1. Óticos

Os biossensores óticos têm vindo a tornar-se uma poderosa ferramenta de deteção e de análise nas mais diversas áreas, tanto na saúde como na monitorização ambiental [62]. Comparativamente com os dispositivos baseados na eletroquímica, estes utilizam as propriedades físicas da luz, e dependem da deteção de fótons em vez de eletrões [63].

Nestes dispositivos, através das alterações da luz emitida por um sistema, por exemplo biológico, é possível quantificar a concentração do analito de interesse. Podem ser observadas várias propriedades, como: comprimento de onda, reflexão, absorção, fluorescência, entre outros [64]. Atualmente, estes biossensores, de acordo com o método utilizado, podem ser divididos em tomografia ótica coerente (do inglês: *Optical Coherence Tomography*, OCT), espectroscopia, fluorescência, espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), espectroscopia de *Raman*, entre outras [16].

A espectroscopia de *Raman* é um dos métodos que tem sido mais utilizado para o desenvolvimento de CGM não invasivos nas últimas décadas. Este método depende dos estados rotacionais e vibracionais das moléculas, sendo utilizado para identificar diferentes tipos de moléculas, com base nas bandas de absorção [65]. Um estudo realizado por *D. Yang et al* [66] demonstrou a deteção rápida e contínua da glucose na faixa de 0,1 a 30 mmol/L, através da mudança induzida pela glucose na emissão da dispersão de *Raman*. Contudo, a espectroscopia de *Raman* apresenta limitações relacionados com a biocompatibilidade, toxicidade, entre outros [65].

No caso da técnica NIR, esta depende da absorção e dispersão, decorrentes das vibrações moleculares. Para a medição da glucose são utilizados dois modos de medição, o de transmitância e o de refletância. Apesar de terem sido realizados vários estudos [67] para a deteção de glucose por NIR, existem ainda diversos problemas, entre os quais a interferência entre o espectro de glucose e o espectro de outras moléculas (ureia, lactato [68]), impedindo assim a sua utilização no mercado [65].

Os sensores óticos de glucose baseados no método de fluorescência, utilizam fluoróforos e reagentes que se podem ligar de forma reversível às moléculas de glucose, exibindo assim diferentes sinais óticos para diferentes concentrações [65]. Em 2019, *S. Yu et al* [69], relataram um sensor ótico de glucose baseado em fluorescência com pontos quânticos de carbono, em que a intensidade de fluorescência variava linearmente com a concentração de glucose na faixa de 0 a 120  $\mu\text{M}$ .

Apesar deste tipo de deteção estar em expansão e ser menos invasiva, é de elevado custo, sendo que nos processos de imobilização de biomoléculas podem ocorrer perdas de material e contaminação [70].

### 2.3.2. Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos têm vindo a ter um impacto bastante positivo nas mais diversas áreas, principalmente na área da saúde, devido ao fornecimento de respostas rápidas, sensíveis e precisas [71]. Estes podem ser utilizados em diferentes elementos de (bio)reconhecimento (exemplos: enzimas,

tecidos, moléculas), pois estes tipos de sensores apresentam especificidade no processo de (bio)reconhecimento [72].

Relativamente ao seu funcionamento, os biossensores são dispositivos analíticos que fazem a transdução de eventos químicos, como por exemplo uma reação enzima-substrato, num sinal elétrico (corrente, tensão, impedância [73]), que é proporcional à concentração de analito. Este sinal elétrico resulta da transdução do sinal gerado pela reação química, de forma a que este seja mensurável.

As células eletroquímicas são geralmente constituídas por um conjunto de três eléctrodos: o eléctrodo de trabalho, o contra eléctrodo e o eléctrodo de referência. Um dos exemplos de células eletroquímicas é o Au-SPE (Figura 8).



Figura 8-Eléctrodos constituintes de um Au-SPE. Imagem adaptada de [74] em *BioRender.com*

O eléctrodo de trabalho é o que contacta diretamente com o analito, servindo como elemento de transdução na reação eletroquímica. Especificamente, é aplicado um certo potencial, de forma a que haja transferência de electrões, entre o analito e o eléctrodo. Para que se consiga determinar a diferença de potencial, é utilizado o eléctrodo de referência, que deve estar a uma certa distância do eléctrodo de trabalho, para garantir que o potencial aplicado seja estável e constante. Por outro lado, o contra eléctrodo permite que a corrente gerada seja constante, de forma a que esta não interfira com o sistema (potencial aplicado [75]). É de salientar que estes eléctrodos devem ser quimicamente estáveis e condutores, sendo assim utilizados compostos de platina, carbono, ouro ou silício (dependendo do tipo de analito [76]).

Os métodos enzimáticos- amperométricos e a hexoquinase são métodos eletroquímicos prepostos para medir as concentrações de glucose no sangue. No método enzimático-amperométrico (Figura 9), ocorre oxidação da glucose na presença da enzima GOx, oxigénio ( $O_2$ ) e água ( $H_2O$ ), formando ácido glucónico e  $H_2O_2$  [37]. Posteriormente é produzido um sinal amperométrico proporcional à concentração de glucose, devido à oxidação eletroquímica do  $H_2O_2$  no ânodo do eléctrodo.

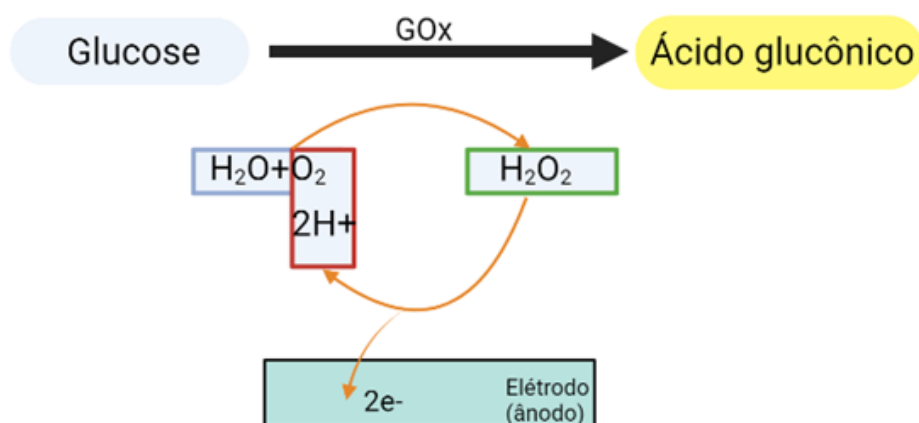


Figura 9-Método enzimático- amperométrico para medição da concentração de glicose. Imagem adaptada de [37] em *BioRender.com*

A função da enzima hexoquinase é relevante na regulação da glicose, sendo essencial para a sua metabolização. No método da hexoquinase (Figura 10), ocorre um conjunto de reações químicas (Figura 10). Numa primeira fase, devido à presença de adenosina trifosfato (ATP) e íons de magnésio, a glicose reage com a enzima hexoquinase, produzindo glicose-6-fosfato (G6P) e adenosina difosfato (ADP). Numa segunda fase, a glicose-6 fosfato (G6P) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) sofrem oxidação com a glicose-6-fosfato desidrogenase, sendo reduzidas a 6-fosfogluconato e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH), respetivamente.



Figura 10-Método da hexoquinase para medição da concentração da glicose. Imagem adaptada de [37] , em *BioRender.com*

A quantidade de NADH produzida é proporcional à quantidade de glicose presente na amostra, tendo como propriedade a absorção da luz na gama dos 340 nm. Os métodos descritos anteriormente, são precisos e sensíveis. Estes dependem dos modelos existentes de cada fabricante, sendo que podem ser utilizados na calibração de outros glicosímetros.

Ao longo deste capítulo irão ser descritos quatro tipos de sensores eletroquímicos, tendo por base o tipo de medição efetuada (corrente, potencial, condutividade e impedância). Assim, serão abordados os sensores: amperimétricos [77]; potenciométricos [78]; voltamétricos [79] e impedimétricos [80].

### 2.3.2.1. Sensores voltamétricos

O CV é um método eletroquímico utilizado para determinar as propriedades *redox* das moléculas em solução [81]. Frequentemente, é utilizado como um método sensível para investigar materiais nos elétrodos [82], através da aplicação de um determinado potencial no elétrodo de trabalho.

Esta técnica dá origem a um gráfico denominado de voltamograma cíclico, em que o eixo das coordenadas representa o potencial aplicado, e o eixo das ordenadas a corrente gerada pelo potencial aplicado (Figura 11).

O método de CV inicia-se com a aplicação de um potencial num valor para o qual nenhuma redução ocorre. À medida que o potencial aumenta para regiões mais negativas (catódicas), há redução do composto em solução, sendo gerado um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Após o potencial atingir um valor para o qual nenhuma reação de redução ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, até ao valor inicial. Se a reação for reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (mais próximos da superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao pico da redução [81].

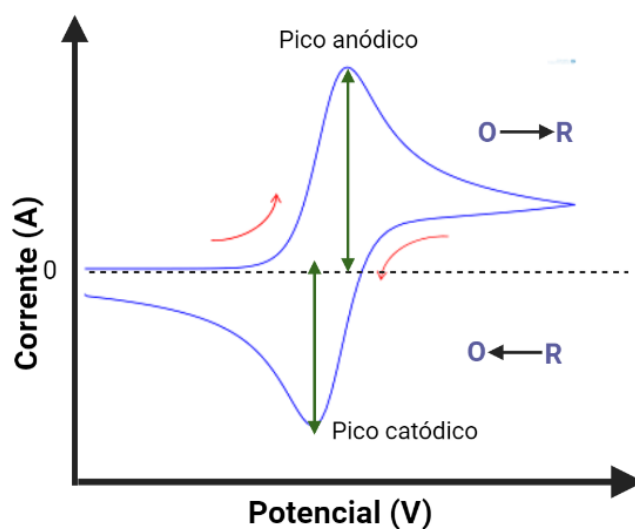


Figura 11- Exemplo de um voltamograma cíclico. Imagem realizada em *BioRender.com*

No caso de eletrodos modificados, o CV permite comprovar se ocorreu ou não a imobilização do composto, e avaliar o seu comportamento eletroquímico. Além disso, parâmetros como potencial anódico, pico catódico, e respetivas intensidades, podem fornecer informações sobre a transferência de eletrões.

*K. Promsuvan et al* [83] desenvolveram um sistema composto por um *smartphone* e um potencióstato de campo próximo conectado a um eletrodo de carbono serigrafado, para quantificar a glucose presente no soro de sangue humano. Este eletrodo foi modificado com tinta de grafeno azul da Prússia (do inglês: *Prussian Blue*, PB) e funcionalizado com ácido poli (3,4 etileno dioxitiofeno): ácido polissulfónico embebido em nano partículas de ouro e revestido com GOx. O comportamento electrocatalítico deste sistema foi caracterizado por CV em 0,10 mmol/L de tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate Buffered Saline*, PBS) com 1,0 mmol/L de glucose. Verificou-se que antes da adição de glucose, existia um pico *redox* característico associado ao PB, e que após a adição da glucose, esse pico de redução aumentou, enquanto a corrente do pico de oxidação diminuiu. Desta maneira, foi possível comprovar a utilização do sistema para quantificar os níveis de glucose, na faixa de concentração de 0,5 a 500  $\mu\text{M}$ .

Num estudo realizado por *R. Bi et al* [84] o desempenho eletroquímico e o efeito electrocatalítico de um biossensor baseado em nanoestruturas dendríticas de ouro com revestimento de precipitação enzimática para deteção da glucose, foi realizado através da voltametria cíclica. Através da análise dos CVs foi possível verificar que após a adição de glucose à solução tampão que houve um aumento no pico de oxidação e uma diminuição do pico de redução. Neste estudo, verificaram que a corrente do pico do eletrodo Gox-DenAu/CC é significativamente menor do que a do eletrodo DenAu/CC, e que após a precipitação e reticulação da enzima que a corrente do pico diminuiu significativamente. Esta análise permitiu assim demonstrar que o método de revestimento por precipitação da enzima melhorou a condutividade, permitindo uma melhor transferência dos eletrões da enzima. Ademais, a estabilidade

proporcionada pelo método de precipitação, permitiu aumentar a sensibilidade do biossensor, apresentando uma faixa linear de detecção da glucose entre 0,02 mmol/L e 31,7 mmol/L.

### 2.3.2.2. Sensores Amperimétricos

A amperometria é umas das técnicas eletroquímicas, em que é aplicado um potencial constante no elétrodo de trabalho, gerando assim uma corrente transiente inicial  $i(t)$ , que está relacionada com a atividade e a concentração das espécies *redox* da interface. Comparativamente aos outros métodos, a amperometria está associada a uma melhor relação sinal-ruído, sendo assim utilizada para quantificar analitos conhecidos [85].

A CA é umas técnicas de impulso da amperometria, que determina a corrente que flui através do elétrodo de trabalho em função do tempo, a um potencial constante. O fluxo de corrente gerado está diretamente relacionado com o gradiente de concentração das espécies reduzidas ou oxidadas na superfície do elétrodo de trabalho.

O investigador *Cottrell*, demonstrou que o processo de indução de corrente é controlado por difusão, uma vez que a intensidade de corrente está relacionada com a taxa de difusão do analito. Esta relação é medida através da seguinte Equação (1), onde:  $n$ , é o número de eletrões presentes no processo *redox*;  $F$ , a constante de *faraday*;  $c$ , a concentração do analito;  $t$ , o tempo e  $D$ , o coeficiente de difusão [86].

$$I_f = \frac{nFAD^{1/2}c}{(\pi t)^{1/2}} \quad \text{Equação 1}$$

Além desta contribuição, a intensidade de corrente medida é influenciada pela corrente capacitiva, tal como é possível visualizar na Equação (2), onde:  $t$ , é o tempo;  $C$ , a capacidade da dupla camada;  $R$ , a resistência, e  $\Delta E$ , a variação da diferença de potencial aplicada.

$$i_c = \frac{\Delta E}{R} e^{-t/RC} \quad \text{Equação 2}$$

O gráfico que representa essa variação da corrente em função do tempo, é denominada por cronoamperograma. Neste tipo de gráficos é observado um pico inicial de corrente que corresponde a carga de dupla camada, que depois diminui com o tempo. Segundo a equação de *Cottrell* isto ocorre porque o analito se começa a difundir para a superfície do elétrodo para reagir com esta [87].

Em 2020 *T. Sridara et al* [88], desenvolveram um sensor amperométrico não enzimático com base em nanocompósitos de carbono (C-dots) e óxido de cobre (CuO), para a determinação da glucose. A CA foi empregue neste estudo, tendo sido aplicado um potencial constante de 0,5 V. Para posterior análise, foram utilizados os valores de corrente no intervalo de tempo de 80 a 100 s, tendo-se verificado que a corrente aumentou com a concentração de glucose. Para além disso, foi possível estabelecer o limite de saturação, que ocorreu acima de 5 mmol/L.

Num trabalho realizado por *A.D. Daud et al* [89], foi desenvolvido um sensor de glucose não enzimático baseado numa estrutura de metal orgânica. Foram realizadas mediações de CA fixando um potencial de 0,55 V. Através da análise dos resultados obtidos pela CA, comprovou-se que este biossensor exibia uma excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação da glucose com um limite de detecção (LD) mais baixo.

### 2.3.2.3. Sensores potenciométricos

Os sensores potenciométricos, permitem medir a diferença de potencial entre o eléctrodo de trabalho e o de referência, sob condições estáticas [90]. Assim, este tipo de sensores não utilizam corrente, ajudando a manter inalterada a composição do analito durante o processo [91].

Nesta técnica eletroanalítica, quando o eléctrodo de trabalho está em contacto com o analito de interesse, ocorre uma acumulação de potencial na sua superfície, enquanto que o eléctrodo de referência mantém o potencial nulo. Quanto maior for o potencial no eléctrodo de trabalho, maior será concentração de analito, pelo que são duas variáveis diretamente proporcionais [90].

Quando os eléctrodos de referência são estáveis e precisos, os sensores potenciométricos são sensíveis e seletivos [91].

### 2.3.2.4. Sensores impedimétricos

Os sensores impedimétricos são construídos imobilizando o analito na superfície do eléctrodo. A técnica que é mais comum de se utilizar neste método é a espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês: *Electrochemical Impedance Spectroscopy*, EIS). Esta técnica consiste na aplicação de uma tensão variável (frequência), para medição da impedância gerada (potencial/corrente) [91]. Assim, através do EIS é possível detetar analitos, as propriedades do eléctrodo principal, bem como os processos que ocorreram na superfície do eléctrodo [92]. O espectro de impedância de um sistema eletroquímico pode ser representado através dos gráficos de *Nyquist* ou de Bode.

O gráfico de Bode é um tipo de gráfico logarítmico (Figura 12), em que o eixo das abcissas é a escala logarítmica da frequência ( $\log(f)$ ) e o eixo das ordenadas a escala logarítmica da impedância ( $\log(|Z|)$ ) [93]. Este permite fornecer informações da frequência, bem como determinar a faixa de frequência necessária para obter valores mais estáveis [94].

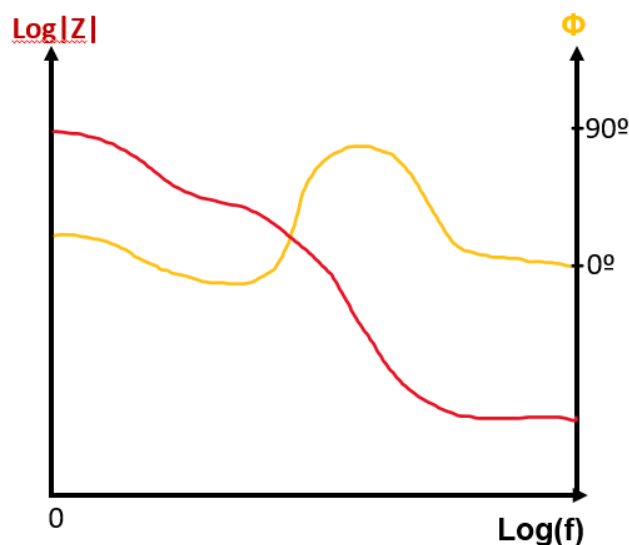


Figura 12-Gráfico de bode .Imagem adaptada de [95] , por BioRender.com

Os gráficos de *Nyquist* (Figura 13) geralmente têm uma porção semicircular e outra linear. A porção linear representa o processo limitado por difusão, que é representado no eixo das abcissas pela componente real da impedância ( $Z'$ ). A porção semicircular corresponde à transferência dos eletrões, que é representada no eixo das ordenadas, pela componente imaginário da impedância ( $Z''$ ).

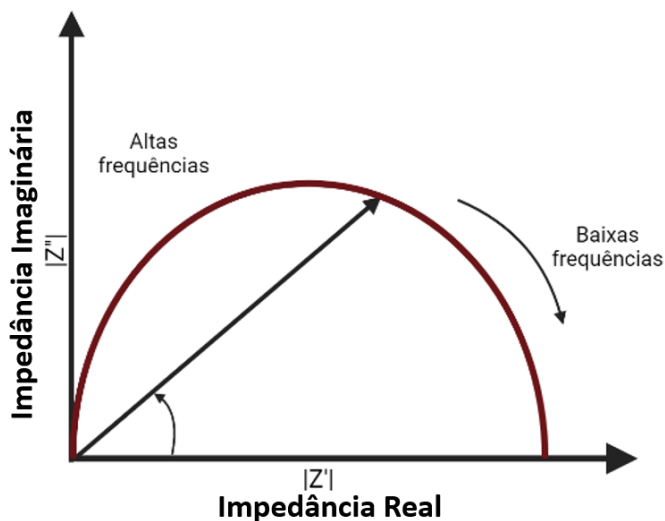


Figura 13-Gráfico de *Nyquist*. Imagem adaptada de [93], por *BioRender.com*

A área do semicírculo representa a resistência à transferência de carga [96]. Assim, quanto maior essa área, maior será a resistência. Através deste gráfico é possível extrair a cinética da transferência de eletrões, características de difusão [93], permitindo assim verificar se ocorreu ou não a ligação do analito à superfície do eletrodo.

Num estudo realizado por *C. Boukharouba et al* [97], foi desenvolvido um sensor eletroquímico de glucose não enzimático através da eletrodeposição de hidróxido de dendritos de cobre sob um eletrodo de grafite de lápis  $\text{Cu}(\text{OH})_2/\text{PGE}$ . Por forma a avaliar o desempenho de eletrodos modificados e não modificados e a sua resposta analítica, foi aplicado o método EIS. Perante a análise dos gráficos de *Nyquist* gerados, foi possível visualizar uma diminuição substancial da resistência nos eletrodos modificados, comprovando assim que o cobre facilita a transferência de eletrões. Relativamente à resposta analítica, a incorporação de glucose na solução de hidróxido de sódio, alterou significativamente o gráfico de *Nyquist*, demonstrando assim que o aumento da concentração da glucose faz diminuir gradualmente o diâmetro dos semicírculos.

Um biossensor eletroquímico para deteção de glucose foi desenvolvido, tendo sido utilizados de nanotubos de carbono cultivados *in situ* em conjuntos de microelectrodos de ouro impressos num substrato de vidro (CNTs/Au MEA) [98]. As respostas electrocatalíticas e electroquímicas foram examinadas por EIS. Os gráficos de *Nyquist* demonstraram uma redução significativa da resistência à transferência de carga à medida que se adiciona mais glucose. Esta redução pode ser atribuída a atividade enzimática, uma vez que esta permite a transferência de eletrões entre a molécula do substrato e o eletrodo. Foi também possível verificar que o uso de CNTs/Au MEA produzia um aumento significativo de corrente devido ao aumento da área superficial, e que o aprisionamento da enzima evitava a sua lixiviação.

Os principais objetivos dos elementos de (bio)reconhecimento, é aumentar a seletividade entre o elemento de (bio)reconhecimento e o (bio)analito alvo. Existem várias classes de elementos de (bio)reconhecimento que podem influenciar o desempenho do biossensor

A fabricação destes biossensores engloba vários campos multidisciplinares, como por exemplo, a química, a biologia, a física, a eletrônica e a engenharia. Graças a este trabalho multidisciplinar, têm surgido novos elementos de (bio)reconhecimento, sendo os mais utilizados os aptâmeros, enzimas, polímeros de impressão molecular [91] (do inglês: *Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs), pois permitem aumentar a sensibilidade dos mecanismos de detecção [71].

### 2.3.3. Elementos de (bio)reconhecimento

#### 2.3.3.1. MIPs

Os MIPs são um exemplo de elementos de (bio)reconhecimento sintéticos, que utilizam uma matriz polimérica modelada, de forma a atingir a especificidade do analito no meio [99]. Assim, para a sua síntese é necessária a interação entre uma molécula alvo, um monômero funcional e um agente de reticulação. Numa primeira fase, os monômeros e as moléculas alvo formam um complexo por interações entre os seus grupos funcionais, e posteriormente o reticulador estabiliza-o, sendo responsável pela sua rigidez. Após isto, é extraída a molécula molde, e nanocavidades complementares à molécula extraída são formadas.

Existem diversos métodos de polimerização empregues para a fabricação de MIPs, sendo um deles a eletropolimerização. Esta técnica permite o crescimento de filmes poliméricos *in situ* sobre os elétrodos, através da aplicação de energia eletroquímica, tornando-se assim uma vantagem face a outros métodos[100]. Vários artigos relataram esta técnica de polimerização para o desenvolvimento de MIPs para detecção de glucose. *Y. Cheng et al* [101], desenvolveram um MIP para detecção seletiva da glucose com base num sistema catalítico sinérgico enzima-enzima, de forma a colmatar a falta de especificidade das sondas de detecção de GOx.

Por forma a aumentar a sensibilidade, podem ser utilizadas nanopartículas de ouro. Num estudo realizado por *H. Wu et al* [102], foi desenvolvido um MIP com *carbon dots* e quitosana, com uma elevada atividade eletroquímica e capacidade de reconhecimento da glucose

Os sensores de glucose baseados em MIPs podem colmatar os problemas de estabilidade associados às enzimas presentes nos dispositivos comerciais de glucose. No entanto, existem algumas limitações, como baixa eficiência de reconhecimento, baixo desempenho de detecção eletroquímica, e uma possível incompatibilidade entre a molécula e o solvente da reação [103].

#### 2.3.3.2. Aptâmeros

Os aptâmeros, têm se destacado como elementos de (bio)reconhecimento principalmente no campo da biomedicina, devido as várias aplicações de diagnóstico e de administração de medicamentos [104]. Estes são compostos por cadeias de ácidos nucleicos, permitindo que estes interajam especificamente com a molécula alvo. Para além disso, podem estabelecer uma forte interação entre diversos alvos, tais como pequenas moléculas [105], proteínas [106], células cancerígenas, entre outras.

As enzimas são elementos de origem biológica que aceleram as reações químicas. São dos elementos de (bio)reconhecimento mais utilizados, devido às suas afinidades específicas de ligação e às suas atividades catalíticas [107]. De acordo com a especificidade da reação estas podem ser divididas em seis classes: (1) oxidoreduases; (2) transferases; (3) hidrolases; (4) lyases; (5) isomerases; (6) ligases.

*S. Liu et al* [108] desenvolveram um *biochip* portátil para monitorização simultânea de glucose e insulina para diagnóstico de diabetes. Foram então desenvolvidos dois aptâmeros específicos para a detecção glucose e insulina, em amostras de saliva humana. Como trabalho futuro os autores pretendem integrar este sistema em microagulhas na pele para detecção de glucose e insulina no ISF. Porém, a aplicação de aptâmeros ainda está numa fase inicial, sendo necessário realizar mais estudos para compreender as

interações entre o aptâmero e a molécula alvo, bem como entender a farmacocinética antes de proceder a ensaios clínicos [109].

### 2.3.3.3. Enzimas

Os sensores enzimáticos têm sido muito utilizados em aplicações de biossensores devido aos produtos de reação mensuráveis (elétrons, prótons), que decorrem de processos catalíticos [107]. Nas reações catalíticas, as enzimas ligam-se ao substrato no centro ativo, fazendo com que seja garantida a melhor orientação para que a reação ocorra. Desta forma, os sensores promovem a exclusão de água, permitindo que haja estabilização no estado de transição. Especificamente a enzima captura o (bio)analito alvo, formando um complexo (bio)analito-enzima, onde ocorre a reação catalítica que permite a conversão do (bio)analito alvo num produto de reação mensurável [99] (Figura 14).

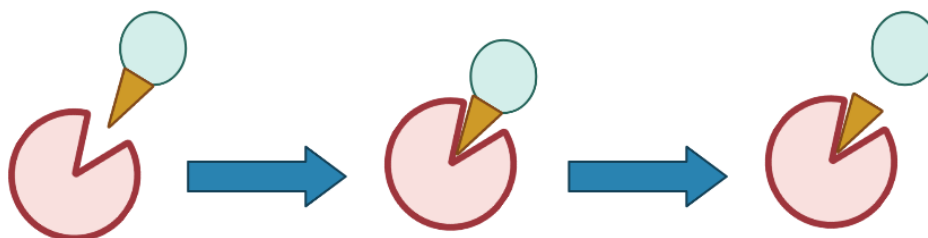


Figura 14- (Bio)analito alvo liga-se ao local ativo (esquerda), formando o complexo (bio)analito-enzima (meio), onde uma reação catalítica o converte o (bio)analito alvo num produto mensurável. Imagem adaptada de [99], por BioRender.com

Apesar das vantagens destes biossensores, existem um conjunto de fatores que alteram as atividades das enzimas. Entre os quais, destacam-se: (1) temperatura, que influencia a velocidade da reação; (2) o pH ideal, que difere entre enzimas; (3) o tempo, que quanto maior, maior o contacto da enzima com o substrato, havendo mais produtos; (4) concentração da enzima, que à medida que aumenta, maior é a velocidade da reação. Consequentemente, estes fatores podem restringir a atividade em tempo real e diminuir a estabilidade dos biossensores[110].

### 2.3.4. Biossensores enzimáticos de glucose

A detecção da glucose é um fator muito importante no diagnóstico e na monitorização da diabetes, pois elevados níveis podem aumentar o risco de desenvolver outras comorbidades. É necessário então que estes pacientes consigam determinar os valores de glucose no seu dia a dia, por forma a monitorizar melhor a doença.

Ao longo dos últimos anos a comunidade científica tem vindo aprimorar os biossensores de glucose, de modo que estes sejam mais seletivos e precisos, melhorando a qualidade de vida de milhões de diabéticos.

Graças a sensibilidade das técnicas eletroquímicas e à seletividade da metodologia enzimática, os biossensores enzimáticos de glucose têm vindo a ser uma das primeiras opções para diagnóstico e monitorização da diabetes [111]. Neste tipo de biossensores a enzima que é frequentemente utilizada é a GOx, devido à sua elevada estabilidade, sensibilidade e seletividade [112]. O principal componente desta enzima é o centro *redox*, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O FAD quando é reduzido pela interação com a glucose é convertido em Flavina Adenina Dinucleotídeo Hidrogénio (FADH<sub>2</sub>), produzindo um subproduto, o gluconato, tal como se pode verificar na Figura 15.

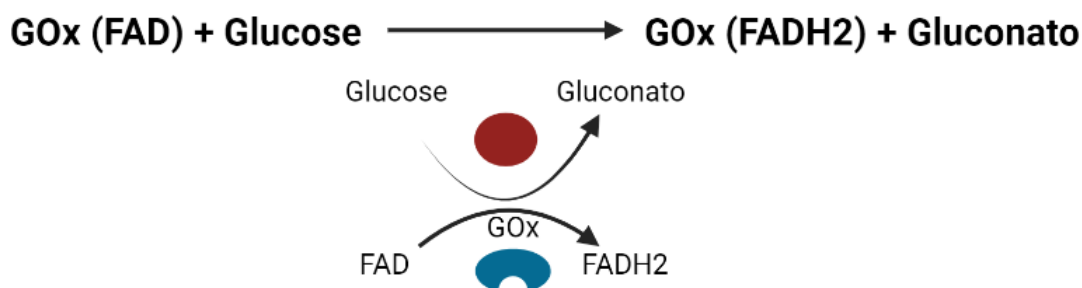


Figura 15-Oxidação da glucose pela enzima GOx. Imagem adaptada de [113] , em *BioRender.com*

Atualmente existem três gerações de biossensores enzimáticos de glucose, que diferem de acordo com o tipo mediador de oxidação. Na primeira geração é o  $\text{O}_2$ , na segunda geração é utilizado um aceitador de elétrons sintético, e na terceira geração ocorre transferência direta de elétrons (não existindo necessidade de mediador [113]), (Figura 16).

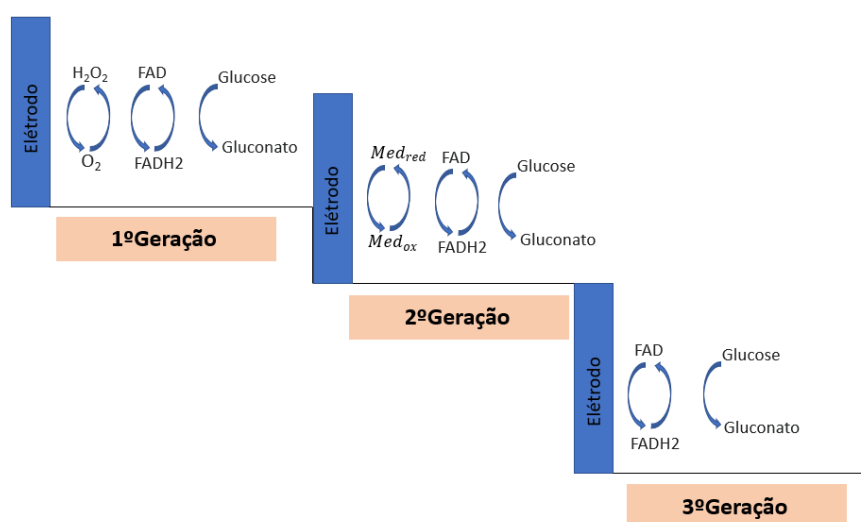


Figura 16-Esquema dos mecanismos de oxidação enzimática da glucose para as três gerações de biossensores. Imagem adaptada de [114] , por *BioRender.com*

O primeiro biossensor eletroquímico para detecção de glucose, foi desenvolvido por *Clark*, sendo que desde então a investigação tem-se focado em desenvolver biossensores menos invasivos e mais sensíveis. Assim, de forma a compreender melhor a sua evolução irão ser abordadas as três gerações dos biossensores enzimáticos de glucose.

Na Tabela 2 são demonstrados três estudos de cada uma das gerações de biossensores, onde são descritos os materiais, os mediadores *redox* e respectivos limites de detecção. Relativamente aos biossensores de primeira geração estes não têm mediador *redox*, pois utilizam o oxigênio. É de salientar que em alguns dos estudos mencionados na Tabela 2, não foram indicadas as gamas de trabalho nos artigos.

Tabela 2-Exemplos de biossensores eletroquímicos enzimáticos para a detecção da glicose publicados em (2018-2023).

1ª geração				2ª geração				3ª geração			
Material	Redox Probe	Gama de trabalho	[REf]	Material	Redox Probe	Gama de trabalho	[REf]	Material	Redox Probe	Gama de trabalho	[REf]
Células de biocombustível enzimáticas de glicose/oxigênio	-	-	[115]	Eléttodos de haste de grafite modificados electroquimicamente por nanoestruturas dendríticas de ouro.	Fenazina metossulfato.	-	[116]	Sensor de glicose num eléctrodo de carbono impresso em tela (SPCE).	Cofatores de FAD.	1 a 14 mmol/L	[117]
Nanofibras de cobre com nanopartículas de ouro e nanofibras de óxido de grafeno.	-	0,001-0,1 mmol/L	[118]	Biossensor eletroquímico baseado num polímero <i>redox</i> de ósmio e GOx em nanotubos de carbono.	Complexo de ósmio.	-	[119]	Glucose desidrogenase (GDH) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas hidroligados a quitosana.	FAD-GDH.	0,0-5,5 mmol/L	[120]
Eletrofação de nanofibras de	-	0,25-600 µmol/L	[121]	Nanobiossensor baseado num composto de óxido	grafite/cobalto/quitosana	1,0 -15,0 mmol/L	[122]	Nanotubos de carbono em susbtrato de vidro	-	70-700 µmol/L.	[123]

---

carbono Ni/CoO.				grafite/cobalto/quitosan a (GO/Co/quitosana)				revestido com óxido de estanho dopado com flúor.			
--------------------	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--

### 2.3.4.1. Primeira geração

Os biossensores de glucose de primeira geração eram baseados no uso do oxigênio como um substrato natural e na detecção do  $H_2O_2$  produzido [124]. Tal como mencionado anteriormente, o conceito de eletrodo enzimático, foi desenvolvido pelo *Clark e Lyon*, sendo que mais tarde tornou-se num produto comercial em 1975 capaz de detetar a glucose, com base na detecção amperimétrica do  $H_2O_2$  nas amostras de sangue [125]. Esta primeira geração era estável e facilmente usada em aplicações miniaturizadas [114].

No entanto, o principal problema é a interferência eletroativa, pois o  $H_2O_2$  exige um elevado potencial de operação para uma alta seletividade. Este problema é minimizado, recorrendo a membranas seletivas [121], e ao uso do PB [126], reduzindo assim o acesso do interferente à superfície do transdutor.

Uma outra desvantagem é a solubilidade restrita do oxigênio nos fluidos biológicos, pois se a concentração  $O_2$  nos fluidos for baixa, esta não é suficiente para que ocorra a oxidação da glucose [124]. Desta forma, estes tipos de sensores são propensos a erros, devido a flutuações da tensão do oxigênio. Com a intenção de superar este problema, algumas abordagens incluem a utilização de um eletrodo enzimático com pasta de carbono rica em oxigênio[115]. Devido ao elevado efeito catalítico dos nanomateriais [118] [121] (nanocubos, nanopartículas, nanofibras,entre outros), estes são utilizados para o desenvolvimento de biossensores, permitindo melhorar a sua seletividade.

### 2.3.4.2. Segunda geração

Por forma a colmatar os problemas existentes nos biossensores de primeira geração, surgiram os biossensores de segunda geração, em que o oxigênio foi substituído por um aceitador de eletrões sintético, designado de mediador *redox*. Este mediador é então capaz de transportar eletrões da enzima para a superfície do eletrodo de trabalho [124]. Contrariamente aos de primeira geração, não ocorre a formação de  $H_2O_2$ , mas sim de um mediador reduzido.

Na segunda geração o processo catalítico é constituído em três etapas: (1) transferência de eletrões da glucose para os centros FAD da enzima GOx, provocando a sua redução GOx (FADH2); (2) o mediador artificial ( $Med_{ox}$ ) é reduzido a  $Med_{red}$  devido a transferência de eletrões dos centros FADH2 para o mediador sintético ( $Med_{ox}$ ); (3) transporte de eletrões do mediador artificial até ao eletrodo, resultando numa corrente quantificável [114].

Existem uma grande variedade de mediadores de eletrões, como o ferroceno, quininos, azul metileno, que permitiram melhorar o desempenho dos sensores [124]. Apesar dos mediadores possuírem baixo peso molecular, propriedades reversíveis, menor potencial *redox* (evita a oxidação de espécies interferentes), baixa toxicidade, estes têm dificuldade em manter contacto entre os constituintes do biossensor (enzima-mediador-eletrodo) [127][113].

Num estudo realizado por *N. German et al* [116], foi desenvolvido um biossensor, que consistia em eletrodos de haste de grafite (do inglês: *Graphite Rush*,GR) modificados eletroquimicamente por nanoestruturas dendríticas de ouro (DGNs), e em camadas de polianilina (PANI) ou polipirrol (Ppy) depositadas por polimerização enzimática. O mediador utilizado neste sensor foi a fenazina metossulfato, permitindo facilitar a transferência de carga entre o centro *redox*-ativo da enzima e a superfície do eletrodo.

O principal objetivo deste estudo era avaliar a eficiência das camadas de PANI e Ppy, tendo-se concluído que o Ppy formado enzimaticamente era mais adequado, permitindo assim uma resposta mais rápida e com baixo limite de detecção (até 19,9 mmol/L). Deste modo, através da combinação de nanoestruturas dendríticas com camada de polímero foi possível melhorar a resistência das espécies interferentes e a sua estabilidade, bem como aumentar a faixa de determinação de glucose em amostras reais.

Um dos exemplos comerciais de um biossensor de segunda geração é o *Diabetes Care*, desenvolvido por Heller [128] para a empresa *Abbott* [129].

#### 2.3.4.3. Terceira geração

Na terceira geração, os biossensores dependem da transmissão direta de elétrons (do inglês: *Direct Transmission of electrons*, DET) sem mediador, que tem como fator determinante a distância entre o centro *redox* da enzima e a superfície do eletrodo [130]. Este tipo de mecanismo tem diversas vantagens, pois permite a remoção de mediadores lixiviáveis artificiais [113], e pode operar em baixos potenciais reduzindo assim os efeitos de interferência [125]. No entanto, devido à estrutura molecular da enzima, surgem dificuldades na transferência eficiente de elétrons para a superfície do eletrodo, pois existe uma camada isolante de proteína que envolve a enzima [113].

Em estudos diversos, foram utilizados polímeros condutores [118] e nanomateriais [131] de forma a tentar desenvolver uma matriz para a transferência de elétrons entre o FAD e o eletrodo. Apesar disso, a terceira geração ainda apresenta inúmeras restrições devido à dependência da enzima, e de esta ser influenciada por fatores ambientais externos (pH, humidade, temperatura [130]).

Num trabalho realizado por *A. K. M. Kafi et al* [132], foi desenvolvido um biossensor enzimático para deteção da glucose, baseado na imobilização da GOx com nanofibras multiporosas (MPNFs) de SnO<sub>2</sub> sobre um eletrodo de ouro modificado com PB e quitosana. Por forma a aumentar a transferência de elétrons, foi utilizada a MNPNF de SnO<sub>2</sub>, aumentando assim o desempenho eletrocatalítico. Este biossensor apresenta uma resposta rápida, bem como estabilidade a longo prazo e repetibilidade. Além disso, SnO<sub>2</sub> pode ser um material promissor para o desenvolvimento de biossensores mais avançados.

Apesar de ter havido uma grande evolução desde a primeira geração até à terceira geração, os biossensores ainda apresentam numerosas limitações, levando ao desenvolvimento de sistemas não enzimáticos de glucose, em que a oxidação ocorre diretamente na superfície do eletrodo [114]. Há assim a necessidade de investir em técnicas e materiais com a finalidade de obter um sensor que seja mais estável, sensível, seletivo e económico.

#### 2.3.5. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas na superfície do transdutor é uma das etapas mais importantes e críticas no desenvolvimento dos biossensores. Existem vários métodos de imobilização de enzimas, sendo que estes são empregues de acordo com as características analíticas do sensor (sensibilidade, precisão, estabilidade) e também tendo em conta o custo final deste [111]. Alguns desses métodos imobilização são a adsorção, encapsulamento e a reticulação (Figura 17), sendo que em alguns casos podem ser combinadas.

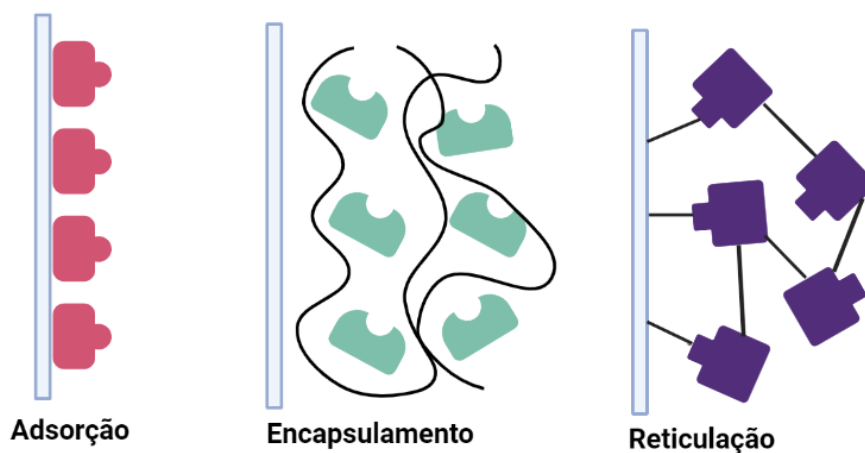


Figura 17-Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de enzimas. Imagem adaptada de [133], em *BioRender.com*

Nesta etapa, é necessário que as enzimas se consigam manter ligadas à superfície do transdutor, sem que ocorra alterações na sua estrutura e atividade biológica. Deste modo, é necessário garantir a sensibilidade do sensor, através da imobilização das enzimas orientadas para a superfície do transdutor, com o seu centro ativo exposto [133].

#### 2.3.5.1. Adsorção

A adsorção é o método mais simples de imobilização uma vez que é apenas necessário dissolver as enzimas numa solução tampão, colocando-as posteriormente em contato com o transdutor durante um determinado período de tempo. Este método consiste na ligação da enzima a um suporte inerte através de interações iônicas e hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e forças de *Van der Waals*). Além de ser um método simples de executar, também tem a vantagem de não ser necessário realizar uma funcionalização prévia da superfície de imobilização [133].

A principal desvantagem deve-se às ligações estabelecidas que são fracas, sendo que qualquer mudança nas condições do meio (temperatura, pH), pode levar à dessorção da enzima, afetando assim a estabilidade do sensor [111].

Um dos exemplos deste método de imobilização, é um sensor de glucose baseado em GOx imobilizada em nanopartículas de ouro decoradas com nanotubos de carbono e grafeno [134] (GR-MWNTs/AuNPs/GOx), em que foram colocados 5  $\mu$ L da enzima GOx no filme à temperatura ambiente. Através deste estudo, verificou-se que o sensor apresentou estabilidade e reprodutibilidade significativas, revelando assim as potenciais aplicações deste método.

#### 2.3.5.2. Encapsulamento

O encapsulamento consiste na polimerização *in situ* de uma matriz em torno do composto a ser imobilizado. Neste método a enzima é então incorporada na mistura reativa a ser polimerizada. À medida que a polimerização ocorre, é formada uma matriz polimérica que vai aprisionar a enzima, confinando-a à sua estrutura. Esta estratégia permite assim melhorar o desempenho e a estabilidade do sensor, visto que a matriz polimérica estabiliza a enzima protegendo a sua atividade durante mais tempo [135].

Podem ser utilizadas diferentes mecanismos de encapsulamento, tais como polímeros orgânicos, partículas de sílica de sol-gel, garantindo assim uma melhor integração na plataforma de transdução [136]. Atualmente, são utilizados materiais híbridos porosos, tais como estruturas de metal orgânicas, pois são muito estáveis, pouco densas e possuem um elevado número de poros. Para além disso, fornecem suporte enzimático, permitindo que ocorram fortes interações entre a parte orgânica e a enzima, evitando assim a sua dessorção.

Num exemplo da aplicação do encapsulamento [137], a enzima GOx foi imobilizada numa matriz de quitosana numa folha de titânio com nanopartículas de ouro. Uma vez que a matriz de imobilização deve ser inerte e biocompatível, foi utilizada a quitosana, que é um material reconhecido por apresentar estas características [138]. Por fim, concluiu-se que este método de imobilização podia ser aplicável, pois o material produzido apresentava elevada seletividade.

Uma das principais vantagens do encapsulamento é permitir que não haja contato direto entre a enzima e o meio, evitando assim efeitos de inativação [135]. Adicionalmente, o procedimento envolvido neste método é simples, sendo que podem ser utilizados vários tipos de proteínas, sem que ocorram alterações estruturais

Por outro lado, no processo de polimerização são utilizados diversos precursores que podem inativar a atividade da enzima, limitando assim as transferências de massas. Além disso, o tamanho dos poros não é “controlável” podendo levar a dessorção da enzima.

### 2.3.5.3. Reticulação

A imobilização de enzimas por reticulação é um processo irreversível, onde são formadas fortes ligações intermoleculares, entre as moléculas da enzima. Neste método é utilizado um agente de reticulação como ligante, para que sejam estabelecidas ligações entre as moléculas da enzima, em agregados reticulados tridimensionais [139]. O agente de reticulação é uma molécula química que tem pelo menos duas extremidades reativas que se vão a ligar a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima, promovendo assim a agregação física das moléculas da enzima [140]. O glutaraldeído é um agente de reticulação muito utilizado devido à sua variedade de aplicações, baixo valor e disponibilidade. Este agente tem a capacidade de reticular as moléculas, uma vez que tem amina na sua composição. Apesar disso, o seu mecanismo de ação ainda não é perfeitamente conhecido devido a incertezas no seu tamanho e estrutura [139], sendo que por vezes pode provocar alterações na estrutura da enzima, levando à perda da sua atividade [141].

Existem três técnicas de reticulação: (1) enzima reticulada (do inglês: *Cross Linking Enzyme*, CLE); (2) formação de um agregado enzimático reticulado (*Cross Linking Enzyme Aggregates*, CLEA) e (3) cristais enzimáticos reticulados (do inglês: *Cross Linking Enzyme crystals*, CLEC[139][142]).

Num estudo realizado por *B. Tan et al* [143], foi desenvolvido um material biocompósito de nanopartículas de ouro e um polímero conjugado doador-aceitador, no qual foi aplicado o método de reticulação para imobilização da enzima. O processo de imobilização foi concebido com auxílio de uma solução com GOx e glutaraldeído (agente de reticulação), que foi posteriormente colocada em contacto com a superfície durante 30 minutos a 8 °C.

Tendo por base a informação referida acima, a reticulação tem como principal vantagem a capacidade de estabelecer uma ligação forte entre a enzima e o suporte, mas tem como desvantagens o difícil controlo da reação e a perda da atividade biológica.

### 2.3.6. Nanomateriais de imobilização

Atualmente com o desenvolvimento da nanotecnologia, os nanomateriais têm sido utilizados principalmente nas áreas de medicina, farmácia e química. Devido ao facto dos nanomateriais fornecerem maior condutividade elétrica e disporem de um tamanho de nanoescala, estes podem amplificar os sinais, atuando assim como materiais de suporte eficientes para a imobilização de enzimas [144]. O desempenho dos biossensores enzimáticos pode também ser melhorado graças à capacidade de adaptação das propriedades dos nanomateriais. Relativamente à sua estrutura química estes podem ser orgânicos ou inorgânicos.

Os nanomateriais orgânicos como metais, nanotubos de carbono, grafeno, óxido de grafeno (do inglês: *Graphene Oxide*, GO), contribuem para o aumento da amplificação do sinal e são biocompatíveis. Por outro lado, os nanomateriais inorgânicos, têm uma síntese relativamente simples e permitem aceleração dos elétrons durante a transferência. Tendo em conta as suas dimensões os nanomateriais podem ser por exemplo: partículas, estruturas 3D e nanotubos.

Existem diversos métodos de imobilização dos nanomateriais nos biossensores. Estes podem ser sintetizados diretamente na superfície do transdutor, e as enzimas serem imobilizadas diretamente nas nanopartículas. Uma outra estratégia pode ser aplicada antes imobilização, que consiste na síntese individual de cada um dos nanomateriais, sendo estes posteriormente misturados com a solução enzimática [145].

O grafeno é um dos nanomateriais constituído por apenas uma camada de átomos de carbono, com uma estrutura de favo de mel. Este é um dos novos nanomateriais utilizados nos biossensores, devido às suas propriedades óticas, mecânicas, elétricas e químicas, que permitem estabelecer uma superfície específica quimicamente ativa [146][147]. Além disso, é biocompatível, e tem uma elevada resistência mecânica e condutividade térmica [148]. Este nanomaterial é um dos materiais utilizados no transdutor dos biossensores de glucose, na medida em que apresenta uma alta atividade catalítica com o  $H_2O_2$  e eletroquímica com a GOx.

Existem diferentes técnicas para utilizar o grafeno nos biossensores eletroquímicos. Uma delas é utilizar o grafeno como um material de suporte para imobilização da enzima, em que devido a sua especificidade vai expor os seus átomos de carbono às enzimas. Outra técnica é utilizar este nanomaterial como um meio de transferência de elétrons, aumentando assim a condutividade elétrica e a mobilidade. Relativamente aos biossensores de terceira geração, este permite acelerar o DET, melhorando a sensibilidade do biossensor [149].

Por forma a aumentar a estabilidade, a relação enzima-substrato, as enzimas são imobilizadas em suportes sólidos (nanomateriais, compostos orgânicos, entre outros). Assim, *S. H. Baek et al.* [118], desenvolveram um biossensor baseado em nanoflor de cobre com partículas de ouro e nanofibras de GO, melhorando assim as características analíticas deste. Devido às modificações das nanofibras, foi possível produzir uma reação catalisada eficiente, facilitando assim o aumento de corrente com o aumento da concentração de glucose.

O grafeno pode também ser utilizado nos biossensores sobre a forma de GO, óxido de grafeno reduzido (do inglês: *Reduced Graphene Oxide*, rGO), nanofitas de grafeno (do inglês: *Graphene Nanoribbon*, GNR), entre outras.

No presente trabalho, o grafeno foi sintetizado de forma biocompatível, tendo sido produzido Bgr, de acordo com o processo descrito na seguinte referência [150]. No processo de esfoliação da grafite foram utilizadas proteínas de fontes alimentares (soro bovino,  $\beta$ -lactoglobulina, lisozima, ovoalbumina e hemoglobina), de forma a garantir a biocompatibilidade do grafeno.

### 2.3.7. Cinética enzimática

Um dos marcos da história da bioquímica ao nível enzimático, é a equação de *Michaelis-Menten*, que permitiu realizar estudos cinéticos numa base experimental e teórica bem consolidada [151]. De forma mais simplista, este modelo baseia-se no seguinte esquema/equação enzimática:



Equação 3

Neste modelo, quando a enzima (E) se liga ao substrato (S), vai ser formado um complexo entre a enzima e o substrato (ES). Após isso, o substrato pode-se separar da enzima, sendo livre, ou então pode-se transformar em produto (P) [152]. Através deste esquema, foi estabelecida a equação de *Michaelis-Menten* (Equação 4):

$$v = \frac{(V_{max} \times [S])}{(K_d + [S])} \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $v$  é a velocidade,  $V_{max}$  é a velocidade máxima para a qual toda a enzima está complexada ao substrato,  $[S]$  é a concentração presente do substrato, e  $K_d$  a constante de *Michaelis-Menten*.

Através da análise do substrato sob a ação catalítica de uma enzima, estes concluíram que a velocidade da reação aumenta de forma hiperbólica (Figura 18) com a concentração do substrato, e que esta aumenta linearmente com a concentração da enzima (qualquer constante de concentração de substrato [153]).

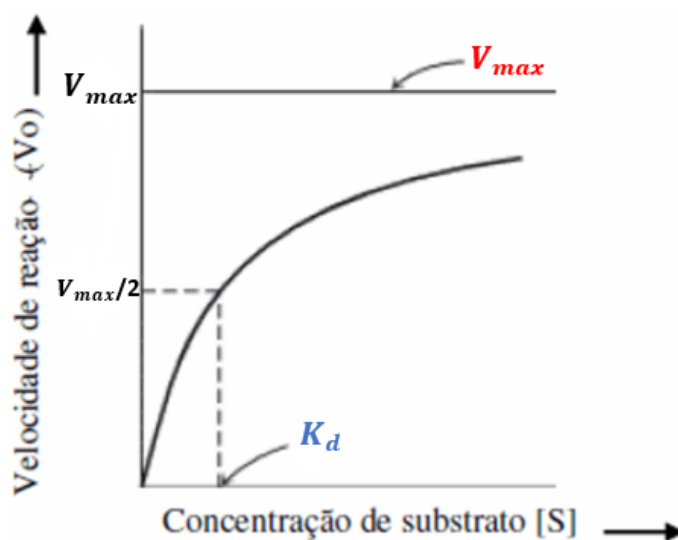


Figura 18-Cinética de *Michaelis-Menten*. Imagem adaptada de [154], por BioRender.com

Quando atinge a  $V_{max}$  visualiza-se uma região no gráfico denominada de platô, que determina que a partir daquela região, a enzima está saturada (moléculas da enzima estão todas ligadas ao substrato). Relativamente à constante de *Michaelis-Menten*, que corresponde a concentração de substrato sob a qual a velocidade de reação é igual a metade da velocidade máxima observada, quanto maior o seu valor, menor a afinidade de ligação entre a enzima e o substrato [155].

### 2.3.8. Tipos de amostra

Grande parte dos dispositivos de diagnóstico e monitorização dos valores de glúcoses são baseados em processos eletroquímicos, com deteção da glúcose através do sangue. Apesar desta conferir sensibilidade e confiabilidade, estes são invasivos e aumentam o risco de infeção.

Por forma a tentar minimizar os riscos associados e tornar os biossensores menos invasivos, surgem novas tecnologias que utilizam outros fluídos corporais que contêm glúcose [16]. Alguns dos fluídos corporais são facilmente acessíveis, sendo estes: a urina, o ISF, a saliva e as lágrimas. Na Tabela 3 é demonstrado os tipos de fluído recentemente utilizados com a respetiva faixa de deteção da glúcose.

Tabela 3-Concentração de glúcose para diferentes tipos de fluídos.

Tipo de fluído	Concentração glúcose (mmol/L)	Referência
Sangue	2-40 mmol/L	[156]
ISF	1,99-22,2 mmol/L	
Suor	0,01-1,11 mmol/L	
Saliva	0,008-1,77 mmol/L	
Urina	≥2,8 mmol/L	[157]

#### 2.3.8.1. Urina

A urina é um fluído não invasivo que historicamente dominou a monitorização dos valores de glúcose antes do desenvolvimento dos sensores de glúcose no sangue [158]. Este é composto por 95 % de água com fosfato, ureia, creatinina, proteínas, nitratos e outros sais dissolvidos como sódio e potássio [159]. A glúcose é encontrada na urina quando é excretada de níveis elevados de sangue, daí o facto deste fluído ser investigado para o diagnóstico da diabetes [160].

As principais vantagens da utilização da urina para diagnóstico da diabetes, são a facilidade de a obter em grandes quantidades, não ser invasivo, e de não exigir uma preparação complexa (tem uma menor concentração de proteínas e outros compostos com elevado peso molecular [159]).

Apesar das vantagens mencionadas, a avaliação da glicosúria apenas pode ser realizada em amostras de urina fresca, pois devido a alta carga bacteriana pode alterar os níveis de glúcose, sendo assim pouco sensível e precisa. Desta forma, pretende-se futuramente obter sensores de glúcose mais precisos para a urina

Atualmente, os sensores de urina são baseados em abordagens colorimétricas. Este tipo de abordagem utiliza dispositivos baseados em tiras colorimétricas com métodos enzimáticos e reagentes cromogénicos [161]. Em particular, estes testes de urina são positivos quando a concentração de glúcose é superior a 2,8 mmol/L.

Um dos exemplos de sensor de glúcose na urina, foi relatado por *M. Miyashita et al* [162], em que é utilizada a GOx para detetar a glúcose amperometricamente. Este biossensor fornece resultados em seis segundos, e tem uma faixa dinâmica de 0 a 2 mg/dL.

#### 2.3.8.2. ISF

O ISF é um líquido extracelular que envolve às células dos tecidos [160]. Este permite o transporte de nutrientes e produtos metabólicos finais entre o sangue e as células, podendo assim fornecer informações sobre o estado de saúde do paciente.

Um estudo realizado por *M. Satish K. Garg* [163], demonstrou a correlação entre o sangue e o ISF através de uma técnica de bolha sucção em oito pacientes com diabetes. Este estudo permitiu concluir que o ISF dérmico apresenta uma alta correlação com a glúcose (diferença de aproximadamente de 11 %).

Além disso, o ISF é facilmente acessível através da pele, sendo também um dos biofluidos mais abundantes, com aproximadamente 60 % do total de fluidos corporais.

Um dos primeiros exemplos de um biossensor comercial vestível e não invasivo, que utilizava o ISF para detetar a glucose, foi o *GlucoWatch*. Este dispositivo realizava medições da glucose no ISF em intervalos de 20 minutos até ao máximo de 12 horas. Apesar de ter sido um dispositivo promissor, este foi descontinuado em 2008 devido irritações na pele, aquecimento, e interrupção automática após a transpiração [164].

De forma a colmatar os problemas o *GlucoWatch*, foram desenvolvidos vários dispositivos, sendo um deles, uma plataforma flexível de deteção de glucose no ISF, baseada numa tatuagem não invasiva, com um tempo de operação de 8 horas [165]. Assim, a partir deste dispositivo podem ser desenvolvidos biossensores mais estáveis, precisos e com um maior conforto para o paciente.

### 2.3.8.3. Saliva

A saliva é um fluido complexo, que contém diversos analitos e vários biomarcadores sendo constituído por 99 % de água. Devido a sua constituição, fácil extração (não invasiva [166]), a saliva mostra-se uma excelente promessa para a deteção precoce, prognóstico e monitorização de várias patologias, nomeadamente da diabetes.

Vários estudos demonstram, que existe uma correlação positiva entre a glucose no sangue e glucose salivar [167]. Isto ocorre, porque as glândulas salivares apresentam uma boa vascularização, da qual a saliva é filtrada e processada. Devido ao facto de as glândulas salivares atuarem como filtros da glucose no sangue, na diabetes as concentrações de glucose na saliva aparecem consideravelmente alteradas [168].

Atualmente a investigação tem-se focado no desenvolvimento de métodos não invasivos para diagnosticar a diabetes através da saliva. Acessórios odontológicos intraorais são uma das opções de monitorização, sendo que um dente é um potencial agente para monitorização contínua, pois está permanentemente em contacto com a saliva.

*T. Arakawa et al* [169] desenvolveram um sensor descartável para aplicação na cavidade oral. O sensor era constituído por um eletrodo de prata e platina com a enzima GOx imobilizada por aprisionamento, e um transmissor sem fio. Este permitiu medir continuamente em tempo real a glucose na saliva artificial entre os 0,05-1,0 mmol/L.

Apesar da evolução científica e tecnológica, é necessário um maior investimento científico para tornar o diagnóstico da diabetes, através da saliva uma realidade.

### 2.3.8.4. Suor

O suor é um dos biofluidos corporais mais acessíveis, sendo responsável pela termorregulação do corpo humano [170]. Este biofluido é constituído por 99 % de água com cloreto de sódio, e contém diversas biomoléculas que permitem monitorizar estados saúde, como o ácido úrico, glucose, lactato, eletrólitos, entre outros [166].

Os sensores de suor são uma alternativa atraente, pois a produção do suor é contínua e é facilmente monitorizada de forma não invasiva, podendo ser estimulada em certos locais por iontoforese [171].

Alguns dos exemplos de dispositivos para deteção não invasiva, são plataformas como: pulseiras [172], óculos [173] e sensores flexíveis aderentes [174].

A deteção flexível é umas tecnologias mais promissoras [175]. Assim, sensores de suor vestíveis podem ser uma alternativa aos métodos convencionais, permitindo um melhor conforto aos pacientes, contudo está longe de ser uma alternativa comercial. Esta dificuldade advém ao facto de este a longo prazo poder ser afetado por fatores como: contaminação ambiental, biocompatibilidade, fornecimento de energia aos

sistemas, deixando assim de ser estável. Atualmente já existem alguns dispositivos, mas têm um tempo operacional curto, não permitindo assim uma monitorização contínua [176].

Relativamente a deteção de glucose para diagnóstico da diabetes, existe uma correlação ente a glicemia no suor e a glicemia no sangue, podendo este ser utilizado como substituição aos métodos convencionais. Y. Zhao *et al* [177], desenvolveram um biossensor de glucose têxtil vestível, com três elétrodos baseados em fibras de ouro elástica, que pode vir a ser uma aplicação promissora para um diagnóstico vestível.

## 2.4. Análise qualitativa dos materiais

### 2.4.1. Espectroscopia de Raman

Um dos principais desafios dos biossensores é a capacidade de detetar e identificar uma vasta variedade de toxinas em curtos espaços de tempo e em baixas concentrações. Assim, através de uma técnica analítica como a espectroscopia de Raman é possível atingir esse mesmo desafio, bem como caracterizar a superfície do biossensor e os mecanismos de deteção abrangidos.

Durante as últimas décadas a espectroscopia de Raman tem sido utilizada no estudo de amostras biológicas, fornecendo informações bioquímicas sobre as células (estrutura química, estrutura das moléculas, arranjos espaciais, entre outros).

Este tipo de análise é efetuado através de uma fonte laser que atinge uma determinada amostra, gerando luz com uma energia diferente da incidente (espalhamento inelástico/efeito de Raman). Especificamente, os fótons gerados pela luz laser incidem sobre a amostra e ao interagir com as suas moléculas, transferem energia sobre a forma vibracional. Através desta energia vibracional são gerados espectros, que são específicos para cada amostra, pois dependem da sua composição química. Deste modo é possível obter uma assinatura da composição química de cada material irradiado, ou seja, a sua impressão digital [178].

Os espectros de Raman são representados por um gráfico da intensidade espalhada em função da diferença entre os fótons incidentes e os espalhados. Na Figura 19 é possível observar que os espectros de Raman da frutose, da glucose, do mel S3 (frutose 24 % e glucose 21,1 %) e do mel S9 (frutose 39,4 % e glucose 32,1 %), diferem entre si, demonstrando assim que cada substância tem a sua impressão digital. Os picos visualizados em cada espectro são geralmente estreitos, podendo estar associados a uma ligação molecular específica [179].

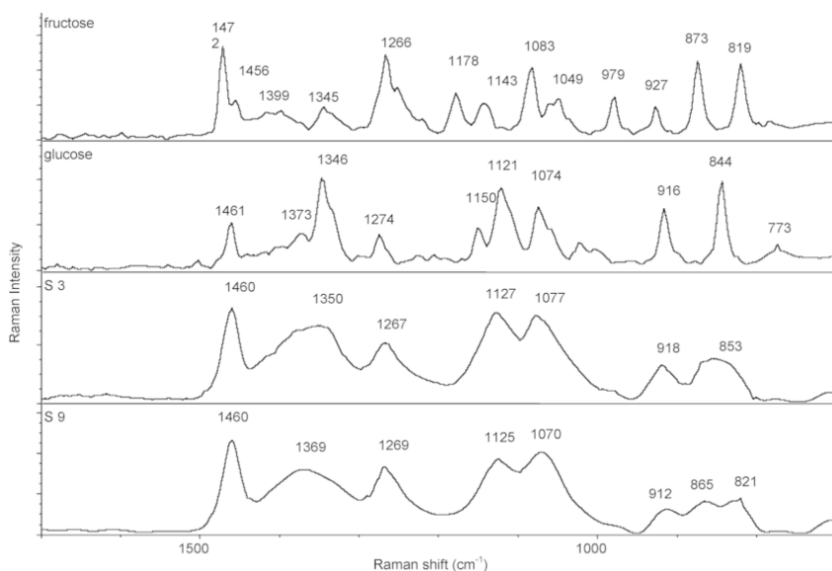


Figura 19-Espetros *de Raman* para quatro materiais diferentes (frutose, glucose, S3,S9)registrados com um laser de 532 nm [180].

## 2.4.2. TEM

A TEM é uma das tecnologias mais importantes na biologia celular desde a década de 1940 [181].Através da TEM é possível visualizar as amostras em escala anatômica, permitindo assim realizar estudos de morfologia celular, visualizando moléculas orgânicas, como DNA e outras proteínas [181].

Relativamente ao seu funcionamento, a TEM contém um conjunto de feixe de elétrões que é emitido em direção a uma amostra ultrafina (cerca de 60 a 90 nm), interagindo com esta enquanto a atravessa. Devido a interação entre os elétrões transmitidos na amostra, é formada uma imagem bidimensional numa chapa fotográfica ou numa imagem fluorescente [181]. O brilho de uma determinada área da imagem é proporcional ao número de elétrões que atravessou aquele ponto na amostra. Na Figura 20 pode-se visualizar o modo de funcionamento da TEM.

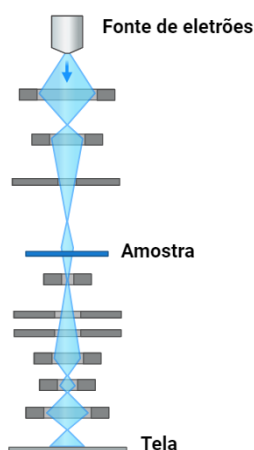


Figura 20- Esquema do modo de funcionamento da TEM. Imagem adaptada de [182] em *BioRender.com*



### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Ao longo deste capítulo estão descritos os equipamentos e reagentes, bem como os procedimentos experimentais adotados para a construção do sensor, através da imobilização da GOx na sua superfície.

#### 3.1. Material e Equipamento

As medições eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato/galvanostato *Metrohm Autolab* (Figura 21) (coordenado pelo software Nova 2.1). Os Au-SPEs foram adquiridos à *DROPSSENS* (DRP-C250AT) e são constituídos por um eletrodo de trabalho em ouro (diâmetro de 4 mm), um contra eletrodo em platina, um eletrodo de referência e contatos elétricos em prata.



Figura 21-Potenciostato/galvanostato *Metrohm Autolab* [183].

Os Au-SPEs foram colocadas numa caixa de comutação *DropSens* (DRP-DSC) (Figura 22), de forma a estabelecer a interface entre os contactos elétricos do Au-SPE e as ligações elétricas do potenciostato/galvanostato.



Figura 22- Caixa de comutação com Au-SPE inserido. Imagem adaptada de [184], por *BioRender.com*

Para a preparação das diferentes soluções, as medições com volume até 5 mL foram realizadas com recurso às micropipetas *ependorf* de volume ajustável (0,1-2,5  $\mu\text{L}$ , 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  e de 1000-5000  $\mu\text{L}$ ). Relativamente aos volumes superiores a 5 mL, as soluções foram preparadas com balões volumétricos (10 mL, 20 mL, 100 mL). A pesagem dos reagentes foi efetuada através de uma balança da marca *Mettler Toledo* (MS105DU), com uma precisão de  $\pm 0,0001$  g. Em alguns casos, devido à difícil dissolução dos reagentes, foi utilizado um agitador de líquidos de baixa tensão superficial da marca

*Fisherbrand*. Por forma a proceder à secagem da enzima GOx e à fixação do Bgr no eléctrodo de trabalho do Au-SPE, foi utilizada a estufa *P Selecta* a 37 °C.

Relativamente à análise qualitativa, foram obtidos espectros de *Raman* com auxílio de um espectroscópio DXR *Raman* da *Thermo Scientific* (acoplado com microscópio confocal e um laser de 532 nm), como se pode visualizar na Figura 23. A amostra foi atingida por um laser de potência de 15 mW, através de uma abertura de fenda de 25 µm.



Figura 23-DXR *Raman* da *Thermo Scientific* [185].

Para complementar a análise, foram adquiridas as imagens TEM num JEOL JEM 1400 TEM a 120 kV (Tóquio, Japão) e gravadas digitalmente com uma câmara digital CCD Orius 1100 W no HEMS (do inglês: *Histology and Electron Microscopy Service*) no i3S.

Na tabela 4 estão descritos todos os reagentes utilizados, bem como a sua origem comercial.

Tabela 4-Lista de reagentes utilizados e sua respetiva origem.

Reagentes	Origem
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	<i>Amresco</i>
Soro humano	<i>Cormay</i>
Creatinina	<i>Sigma</i>
Glutaraldeído	<i>Fluka</i>
Glucose (Dextrose monohidratada)	<i>Alfa Aesar</i>
GOx	<i>Sigma Aldrich</i>
Hexacianoferrato (II) de Potássio, (K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])	<i>Riedel-de-Haen</i>
Hexacianoferrato (III) de Potássio, (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ])	<i>Riedel-de-Haen</i>
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	<i>VWR</i>
Tiramina (Tir)	<i>Sigma</i>

### 3.1.1. Soluções

Para a realização do estudo eletroquímico foi necessária a preparação de algumas soluções, sendo que algumas destas, foram preparadas com água ultrapura purificada (proveniente do sistema Mili-Q). A solução de PBS (pH≈7,4) foi preparada com uma concentração de 100 mmol/L em água ultrapura. Relativamente à solução *redox* de ferro (concentração de 5 mmol/L), foi preparada combinando o

hexacianoferrato (II) de Potássio( $K_4[Fe(CN)_6]$ ) com o hexacianoferrato (III) de Potássio( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) em PBS. A solução da enzima GOx foi preparada em PBS, com uma concentração de 2 mg/mL.

Quanto às soluções reacionais de polimerização, foram preparadas duas soluções, uma com enzima (solução A) e uma solução controlo, sem enzima (solução B). Em ambas a soluções foi necessário preparar uma solução de 0,5 % glutaraldeído e uma de 10 mmol/L de Tir. A solução A foi preparada num frasco com 10  $\mu$ L de glutaraldeído, 40  $\mu$ L de Tir e 50  $\mu$ L de GOx. Para a solução B foram utilizados os mesmos volumes de glutaraldeído e de Tir (Figura 24).

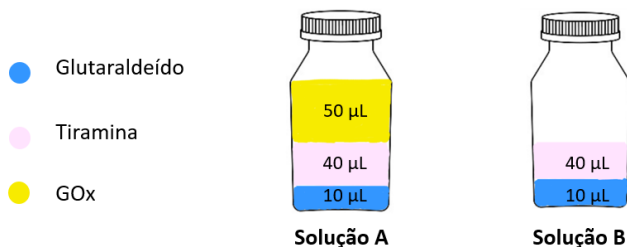


Figura 24-Representação das duas soluções reacionais de polimerização preparadas. A solução A contém glutaraldeído, Tir e GOx. A solução B apenas contém glutaraldeído e Tir. Imagem realizada em *BioRender.com*

Uma vez que foi realizado um estudo para averiguar a influência do reticulante glutaraldeído no desempenho do biossensor, foram preparadas duas soluções adicionais, uma com enzima e Tir (solução C), e um controlo sem enzima (solução D). Em suma, a solução C continha Tir e GOx (mesmas quantidades da solução A), e a solução D apenas Tir (Figura 25).

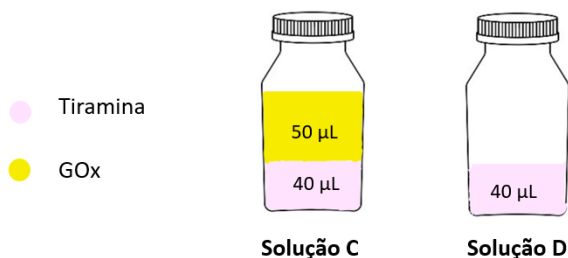


Figura 25-Representação das duas soluções reacionais de polimerização preparadas. A solução C contém Tir e GOx. A solução D contém apenas Tir. Imagem realizada em *BioRender.com*

Para a elaboração da reta de calibração, foram preparadas duas soluções padrão. A primeira continha 10 mL de glucose a 50,0 mmol/L (em PBS), sendo que a partir desta foram preparados oito padrões de diluição (0,05 mmol/L; 1,0 mmol/L; 2,5 mmol/L; 5,0 mmol/L; 10,0 mmol/L; 20,0 mmol/L; 30,0 mmol/L e 40,0 mmol/L) para um volume final de 2 mL (Figura 26). A segunda solução padrão foi preparada com 50  $\mu$ L de soro humano com 4950  $\mu$ L de PBS, e a partir desta foram preparados os mesmos padrões de diluição para um volume final de 2 mL.

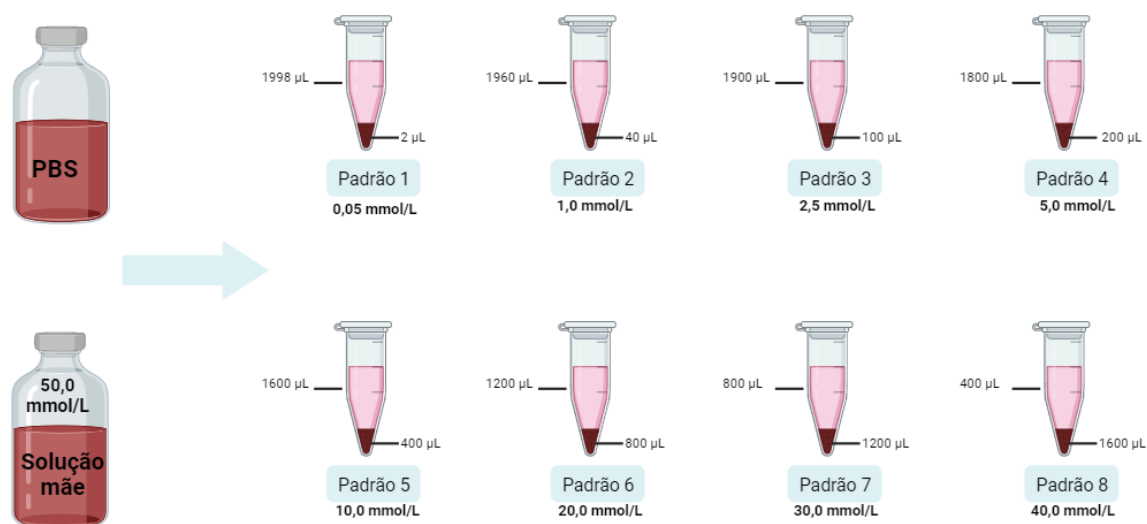


Figura 26-Representação dos oito padrões de diluição preparados para um volume final de 2 mL com as respectivas quantidades de solução mãe e de PBS. Imagem realizada em BioRender.com.

Relativamente ao estudo de seletividade, foram utilizados os seguintes compostos como potenciais interferentes presentes no soro: (i) creatinina (30 mg/mL), e (ii) BSA (37,6 mg/mL). Para este estudo apenas foram utilizadas as soluções de PBS (solução sem glucose), e a solução de 5 mmol/L de glucose com uma diluição de 1:10. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

## 3.2. Preparação dos elétrodos

Neste subcapítulo serão descritas as diferentes etapas para a construção do biossensor. Inicialmente, foi necessária a imobilização do Bgr na superfície do sensor, e posteriormente a imobilização da enzima GOx. Para a imobilização da enzima, foram aplicadas duas técnicas diferentes: a adsorção e a reticulação/aprisionamento.

### 3.2.1. Construção dos elétrodos modificados à base de Bgr

Por forma a garantir o desenvolvimento de um biossensor biocompatível, foi utilizado um nanomaterial, o Bgr. Este nanomaterial foi produzido por esfoliação de grafite com baixo custo, na presença de compostos biológicos, como a proteína BSA. A proteína é usada para esfoliar a grafite, e a eficiência da esfoliação depende do sinal e da magnitude da carga da proteína. A BSA facilitou a esfoliação da grafite em água à temperatura ambiente, por meio da turbulência/força de cisalhamento gerada num liquidificador de cozinha [150].

Em concreto, o Bgr foi sintetizado a partir de uma suspensão de cristais de grafite (100 mg/mL) em 200 mL de água deionizada a pH 7,0, contendo a proteína (3,0 mg/mL). A suspensão foi submetida ao processo de cisalhamento num liquidificador durante 30 minutos. Foram recolhidas amostras a cada 5 minutos para proceder à análise da taxa de esfoliação, sendo que posteriormente, a sua mistura foi interrompida para evitar o seu superaquecimento (<30 °C). A extinção a 600 nm da suspensão com UV visível, foi utilizada para quantificar as concentrações de grafeno, após a remoção da grafite não esfoliada, separada por centrifugação a 1500 rpm durante 45 minutos. Todas as experiências de esfoliação foram efetuadas adicionando quantidades calculadas de grafite, BSA e água desionizada no liquidificador de cozinha à velocidade necessária da lâmina.

Para a construção do biossensor, depositou-se numa primeira fase, duas camadas de Bgr no eléctrodo de trabalho. Para tal, foram aplicados aproximadamente 5  $\mu\text{L}$  da suspensão duas vezes consecutivas na superfície do SPE. O eléctrodo ficou a incubar durante 4 horas a 37 °C na estufa.

O controlo da estabilidade do Bgr na superfície do eléctrodo foi efetuado pela técnica eletroquímica, CV. As leituras foram efetuadas em triplicado, com recurso a uma solução *redox* de ferro (5 mmol/L  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  e 5 mmol/L  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). É de salientar que as leituras realizadas com a solução *redox* de ferro, são constituídas por um conjunto de técnicas eletroquímicas:

- Técnica EIS (gama de frequência entre os 0.1-100 KHz e amplitude de 0,010 V)
- CV (3 ciclos com um potencial entre os -0,6-0,6 V e velocidade de varrimento de 50 mV/s)

### 3.2.2. Imobilização da GOx por adsorção

No processo de imobilização da enzima GOx por adsorção da mesma na superfície do Bgr, foram testados dois tempos de incubação, 12 horas (*overnight*) e 2 horas, respetivamente. Estes ensaios foram efetuados em triplicado. Nesta etapa, a enzima GOx foi incubada no topo da camada de Bgr (Figura 27). Para tal, o eléctrodo previamente modificado com Bgr foi incubado com duas camadas (5  $\mu\text{L}$ ) da solução da enzima e colocado a 37°C na estufa. Relativamente ao estudo com tempo de incubação de duas horas, a segunda camada foi colocada ao fim de uma hora, enquanto que no estudo *overnight* foi colocada ao fim de seis horas.

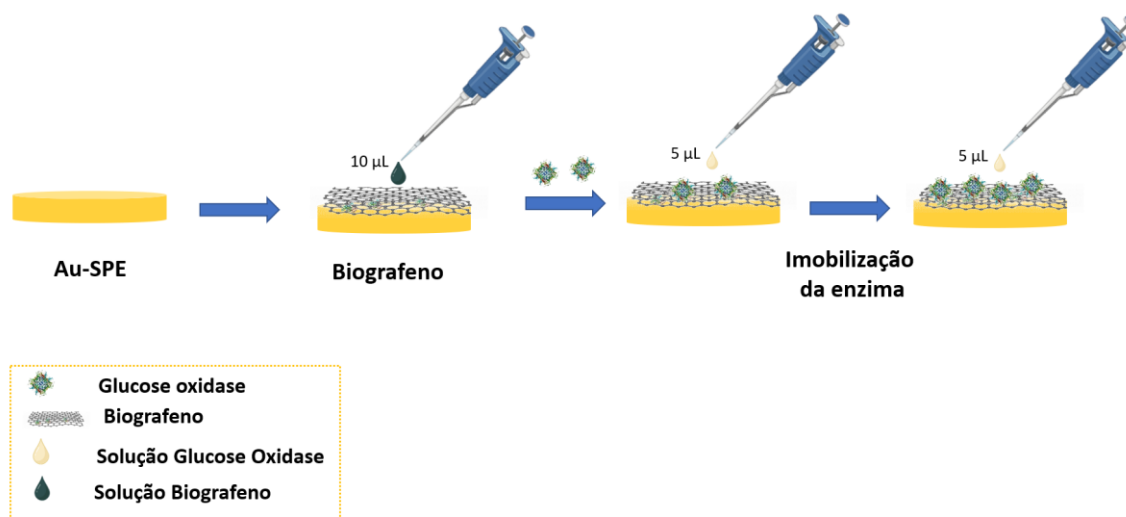


Figura 27- Procedimento experimental da imobilização do Bgr e da enzima GOx pelo método de adsorção na superfície do eléctrodo de trabalho do Au-SPE.

Conforme mencionado no subcapítulo "Preparação de Soluções", foram conduzidos dois estudos distintos. Em um deles a enzima foi encapsulada com Tir na presença de um agente reticulante, o glutaraldeído. Em outro estudo, a enzima foi encapsulada sem a presença de glutaraldeído. Essa abordagem visa esclarecer o impacto do glutaraldeído no desempenho do biossensor. Em ambos os estudos foram preparados triplicados e testados dois tempos de incubação diferentes, 2 e 12 horas, respetivamente.

Após a modificação da superfície do eléctrodo com Bgr, foram preparadas as respetivas soluções para cada estudo. No estudo com glutaraldeído, foram preparadas as soluções A e B mencionadas no subcapítulo "Preparação de Soluções". Posteriormente, incubou-se na superfície do eléctrodo de trabalho

previamente modificado, 10  $\mu\text{L}$  da solução A no eletrodo de trabalho. Em paralelo, foram preparadas soluções controlo com a mesma solução reacional sem a presença da enzima.

Posteriormente, os eletrodos foram submetidos a um processo de secagem a 4°C no refrigerador, inicialmente por um período de 2 horas, seguido de uma extensão para 12 horas. Em sequência, foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  de água destilada sobre a superfície dos eletrodos Au-SPEs, dando início ao processo de eletropolimerização da Tir. Este processo envolveu a variação de potencial entre -0,3 V e 1,6 V, a uma taxa constante de 50 mV/s. Para a obtenção das respostas de corrente, adotou-se a técnica amperométrica, na qual 100  $\mu\text{L}$  da solução foram cuidadosamente depositados na superfície do eletrodo (conforme ilustrado na Figura 28).

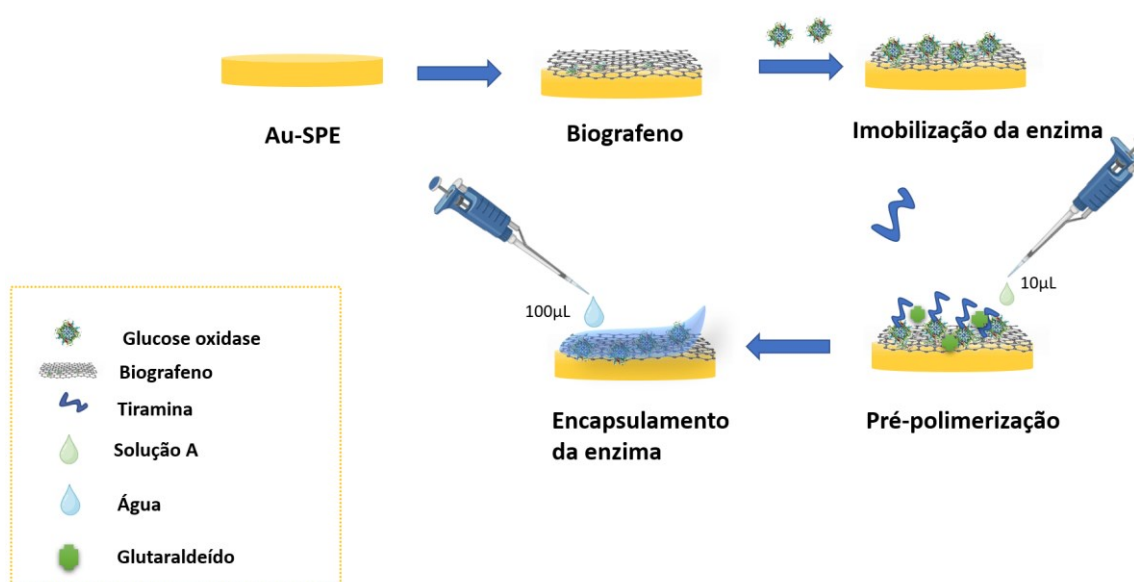


Figura 28-Procedimento experimental da imobilização do Bgr e da solução A , pelo método de aprisionamento na superfície do eletrodo de trabalho do Au-SPE. É também representado o processo de eletropolimerização com a colocação de 100  $\mu\text{L}$  de água.

Relativamente ao estudo “sem glutaraldeído”, a metodologia aplicada foi a mesma, apenas foram utilizadas soluções diferentes. Deste modo, foram colocados 10  $\mu\text{L}$  da solução C no eletrodo de trabalho do Au-SPE (Figura 29). Em paralelo foi preparado o eletrodo controlo sem a presença da enzima. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

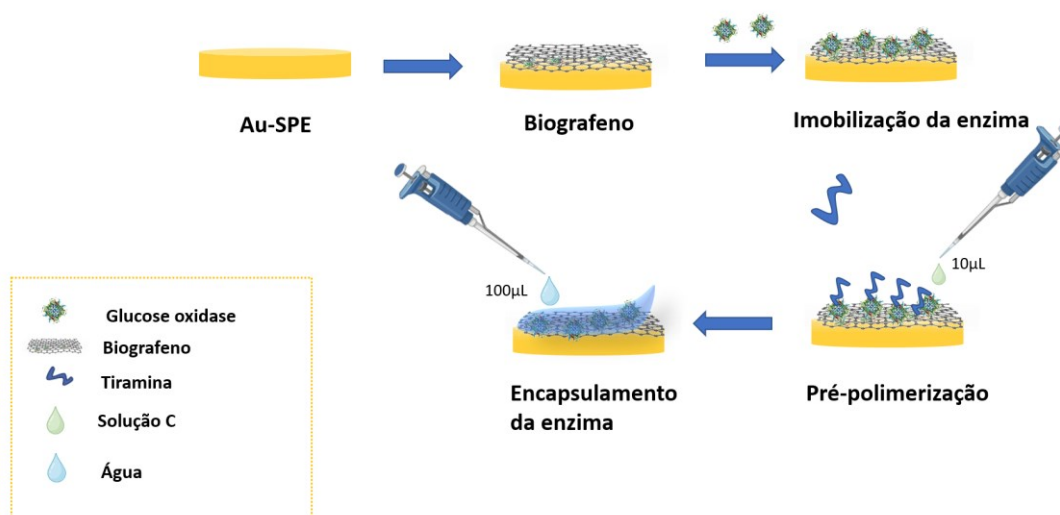


Figura 29- Procedimento experimental da imobilização do Bgr e da solução C, pelo método de aprisionamento na superfície do eletrodo de trabalho do Au-SPE. É também representado o processo de eletropolimerização com a colocação de 100 µL de água.

### 3.3. Procedimento eletroquímico

A caracterização dos eletrodos foi efetuada por CV em PBS. Para os ensaios de CV, o potencial foi varrido de 0,0-0,8 V com uma velocidade de 5 mV/s.

O desempenho analítico foi avaliado pelo traçado da reta de calibração com concentrações de glucose entre 0,05-50,0 mmol/L, preparada em PBS (pH 7,4). Foram adicionados cerca de 80 µL de cada padrão na superfície do eletrodo e o sinal eletroquímico foi monitorizado por CA. A corrente catalítica da oxidação da glucose foi monitorizada por CA, aplicando um potencial constante de 0,6 V, (potencial obtido através da análise da CV) durante 120 s. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

De forma a avaliar o impacto da interferência da matriz de soro na superfície do eletrodo, foram realizadas curvas de calibração em soro humano comercial diluído 100 vezes em PBS na mesma gama de concentração da calibração em tampão (0,05 e 50 mmol/L).

Um outro estudo foi o cálculo das percentagens de recuperação de amostras de soro sintético dopadas com glucose de concentrações de 0,5 e 5 mmol/L. O ensaio foi avaliado pela técnica CA aplicando um potencial de 0,6 V durante 120 s.

### 3.4. Análise do desempenho do biossensor

#### 3.4.1. Curva de calibração

##### 3.4.1.1. Tampão PBS

Após o desenvolvimento do biossensor, foi necessário avaliar o seu comportamento perante a presença da glucose. Desta forma, o método de cálculo utilizado foi a curva de calibração, permitindo assim

expressar a relação entre o sinal medido e as diferentes concentrações da solução de glucose (analito). Adicionalmente, através do declive da reta podem ser avaliados parâmetros de sensibilidade e qualidade de resposta.

Assim, para a construção da curva de calibração, foram utilizadas nove soluções de glucose com diferentes concentrações (padrões de diluição), tal como se pode visualizar na Tabela 5.

Tabela 5-Padrões de diluição preparados através da solução mãe e do PBS com a respetiva concentração final.

Padrão (preparado em PBS)	Concentração da glucose (mmol/L)
1	0,05
2	1,0
3	2,5
4	5,0
5	10,0
6	20,0
7	30,0
8	40,0
9 (solução mãe)	50,0

Inicialmente, adicionou-se 80  $\mu$ L do padrão de menor concentração de glucose (padrão 1) na superfície do eletrodo de trabalho, medindo-se a corrente gerada por CA (potencial aplicado de 0,6 V). Posteriormente, procedeu-se à limpeza da superfície do eletrodo com PBS. O mesmo procedimento foi aplicado para os sucessivos padrões de ordem crescente de concentração.

#### 3.4.1.2. Soro humano comercial diluído

O procedimento anterior foi repetido com soluções padrão de glucose (mesmas concentrações) preparadas em soro humano, (*Cormay serum*), diluído em PBS, após a imobilização da enzima por adsorção (2 horas). Assim, através da utilização de padrões de diluição com o soro humano, foi possível estudar o comportamento do sensor na matriz biológica, aproximando assim a resposta do sensor à realidade.

#### 3.4.2. Estudo da seletividade

Além de ser necessário que o biossensor tenha uma alta capacidade de deteção de glucose em várias concentrações, é crucial que seja altamente seletivo, ou seja, que não responda a outros compostos além da glucose. Portanto, é de suma importância realizar estudos em fluidos complexos, como o soro humano, para assegurar que o biossensor seja exclusivamente sensível à glucose.

O estudo de seletividade foi realizado utilizando a técnica de CA, na qual várias espécies potencialmente interferentes foram incubadas na superfície do biossensor. O método utilizado neste trabalho foi o das soluções separadas, onde a leitura do impacto de cada interferente foi avaliada individualmente. Foram então selecionadas espécies interferentes constituintes do soro, como a creatinina (30 mg/mL), e a BSA (37,6 mg/mL).

O sinal eletroquímico foi avaliado para uma concentração de 5 mmol/L (correspondente a 100 % do sinal) que serviu de referência para o cálculo da interferência de cada um dos compostos. Para o cálculo da % de interferência foi utilizada a seguinte Equação 5:

$$\%(interferência) = \frac{[sinal(glucose, 5 \text{ mmol/L}) - sinal(interf)]}{sinal(glucose, 5 \text{ mmol/L})} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

É de ressaltar que as concentrações de interferentes utilizadas, foram definidas de acordo com os níveis naturalmente presentes no soro humano [186]. Todavia, para efeitos de calibração os interferentes foram diluídos 10 vezes.

### 3.5. Análise qualitativa dos materiais

#### 3.5.1. Análise em Raman

Para proceder à análise do biossensor em *Raman*, foram preparadas as seguintes amostras: Au-SPE simples; Au-SPE com Bgr e AU-SPE com Bgr e enzima (adsorção). Os espectros de *Raman* foram obtidos, através de um microscópio confocal munido com um laser de excitação (especificações mencionadas na Tabela 6).

Tabela 6-Lista de especificações e respectivas configurações para obtenção de cada um dos espectros de Raman.

Especificações	Configuração
Potência	15 mW
<i>Aperture</i>	50 <i>slit</i>
<i>Photo-Bleach</i>	2 minutos

#### 3.5.2. Análise em TEM

O Bgr foi caracterizado em TEM utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 TEM, com transmissão a 120 kv.

Assim, foram preparados 10 µL da suspensão de Bgr para posterior colocação numa grelha de carbono. Após isso, uma *grade* de cobre foi colocada na superfície da gota do Bgr.

O excesso de amostra foi removido com uma almofada absorvente, para depois proceder à sua análise no microscópio. A TEM permitiu realizar uma análise morfológica do Bgr, bem como da distribuição e do tamanho das suas nanopartículas.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de desenvolvimento do biossensor para a detecção de glucose, foram exploradas duas abordagens distintas para ancorar a enzima na superfície do Au-SPE modificado com Bgr. Uma dessas metodologias envolveu a adsorção química da enzima, com durações de incubação de 2 e 12 horas, respetivamente. A segunda metodologia concentrou-se no encapsulamento da enzima dentro de uma matriz polimérica de politiramina, tanto com, como sem a utilização de um agente reticulante, o glutaraldeído. Em ambos os casos, um eléctrodo de controlo foi preparado sem a presença da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Por fim, procedeu-se à avaliação do desempenho do biossensor, assegurando a sua eficácia na detecção da glucose.

### 4.1. Fabricação do biossensor

Para padronizar a superfície do Au-SPE e a preparar para a imobilização do Bgr e subsequente ligação da enzima, foi essencial realizar uma ativação eletroquímica e controlar cuidadosamente cada uma das etapas do processo. Para isso, utilizou-se a técnica de CV para identificar os picos de oxidação e redução, bem como as suas respetivas intensidades de corrente. Desta forma, foi possível avaliar as modificações realizadas na superfície do Au-SPE.

Em resumo, todas as fases de síntese dos biossensores foram monitorizadas de forma rigorosa através da técnica de CV, incluindo leituras realizadas no Au-SPE sem qualquer tipo de modificação. Os resultados obtidos serão minuciosamente discutidos nas secções subsequentes.

#### 4.1.1. Imobilização da enzima por adsorção durante 2 horas

Numa primeira fase, a superfície do Au-SPE foi ativada através da técnica de CV, com uma solução *redox* de ferro (80  $\mu\text{L}$ ), numa gama de potencial de -0,6 a 0,6 V com um *scan rate* de 50 mV/s. Seguidamente, foi incubado no eléctrodo de trabalho 10  $\mu\text{L}$  de Bgr a 37 °C durante 4 horas. Por fim, foi utilizada a técnica de CV com as mesmas características para visualizar as diferenças entre o Au-SPE e o Au-SPE com Bgr.

Como se pode verificar pela Figura 30, os picos de oxidação e de redução do Au-SPE com Bgr, apresentam um menor valor de corrente que os do Au-SPE. Dado que o Bgr é produzido por exfoliação da grafite na presença de uma solução de proteína, a BSA [187] (permite separar as folhas de grafeno produzidas no processo de exfoliação da grafite), esta vai oferecer resistência à transferência de electrões levando assim à diminuição dos valores de corrente dos picos. Além disso, o facto da BSA ser uma proteína (regiões hidrofílicas e hidrofóbicas), permite que esta atue como um estabilizador anafílico para o grafeno e outros materiais [188]. Com base na informação anterior, a interação proteína-grafeno é promovida, criando assim um hospedeiro ideal para a imobilização enzimática [189].

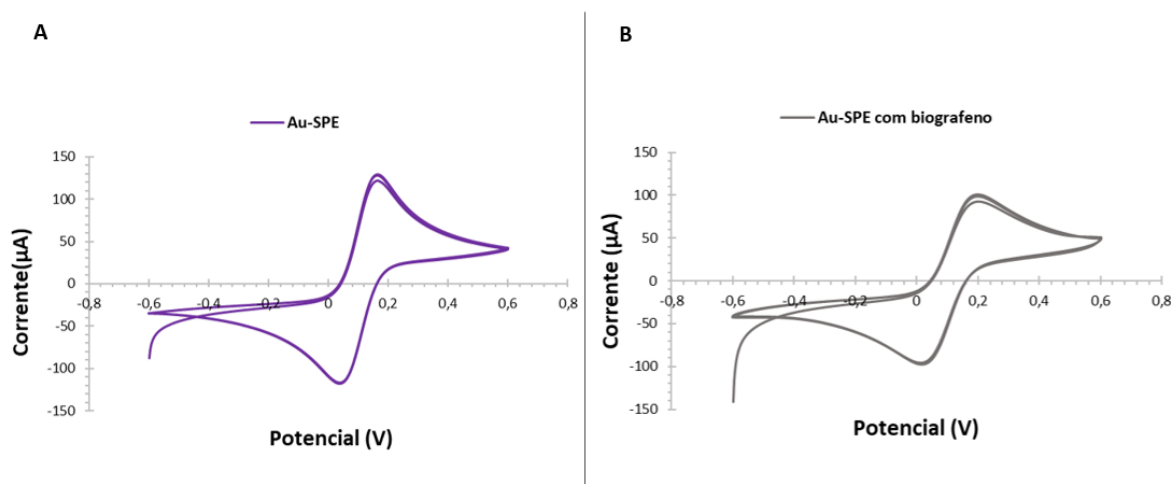


Figura 30-Resultados da leitura em solução *redox* de ferro após a imobilização da enzima durante 2 horas. (A) representa o gráfico de CV antes da imobilização do Bgr. (B) representa o gráfico CV depois da fixação do Bgr.

Numa segunda fase foi imobilizada no eletrodo de trabalho do Au-SPE 10  $\mu\text{L}$  da solução da enzima GOx a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Esta imobilização foi estabelecida através dos grupos amina livres presentes na BSA com os grupos carboxílicos da enzima, facilitando assim a sua interação. Para além disso, devido ao mecanismo de adsorção são estabelecidas interações físicas entre GOx e o Bgr, tais como: forças de *Van der Waals*, interações iónicas e ligações de hidrogénio [190]. É de salientar que a presença do Bgr permite que ocorra uma adsorção bem-sucedida da enzima devido à presença de grupos ativos específicos.

Após imobilização da GOx, foi utilizada a técnica de CV (potencial de 0 a 0,8 V com um *scan rate* de 50 mV/s), inicialmente com uma solução de PBS e posteriormente com uma solução de glucose 5 mmol/L.

O efeito eletrocatalítico deste biossensor na deteção de glucose foi analisado por meio de CV, e os resultados são apresentados na Figura 31. É evidente a presença de picos de oxidação a 0,6 V após a adição de glucose à superfície do sensor. A glucose é oxidada pela enzima GOx, e um dos produtos de reação é o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o qual é então oxidado na superfície do eletrodo modificado com Bgr e GOx a partir de  $\sim 0,6$  V.

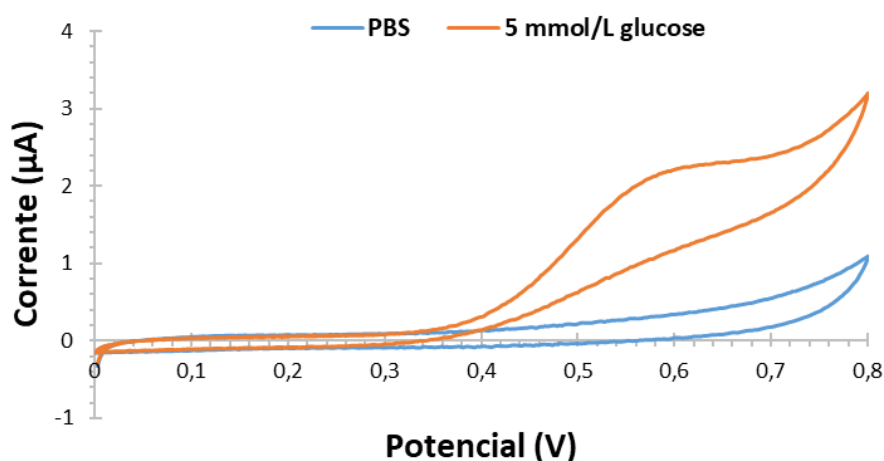


Figura 31- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s, para o método de adsorção da enzima durante 2 horas.

### 4.1.2. Imobilização da enzima por adsorção durante 12 horas

Em comparação com o método previamente mencionado, todos os procedimentos foram mantidos consistentes, exceto pelo aumento do tempo de incubação da enzima de 2 horas para 12 horas. Essa alteração foi realizada com o propósito de determinar qual período de incubação que proporcionaria uma resposta mais eficaz do biossensor.

Na Figura 32 são apresentados os resultados de CV quando o eletrodo foi incubado em tampão PBS e com uma solução de 5 mmol/L de glucose. Com a leitura em PBS não foram observados picos de oxidação, o que era esperado, uma vez que a enzima reconhece exclusivamente a glucose como substrato. No entanto, quando a glucose 5 mmol/L foi introduzida, notou-se a formação de um pico de oxidação a 0,6 V, embora com intensidade menor do que no protocolo de incubação da enzima durante 2 horas.

Esse comportamento pode parecer contraditório, uma vez que um tempo de incubação mais longo da enzima deveria teoricamente resultar em uma maior quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo e conseqüentemente numa maior capacidade de oxidação da glucose. No entanto, essa expectativa não se concretizou. Uma possível explicação para esse fenômeno, pode estar relacionada à formação de monocamadas não estruturadas na superfície do eletrodo, o que pode dificultar a chegada da glucose ao centro ativo (FAD) da enzima, resultando assim na redução da produção de elétrons, ou seja de corrente elétrica.

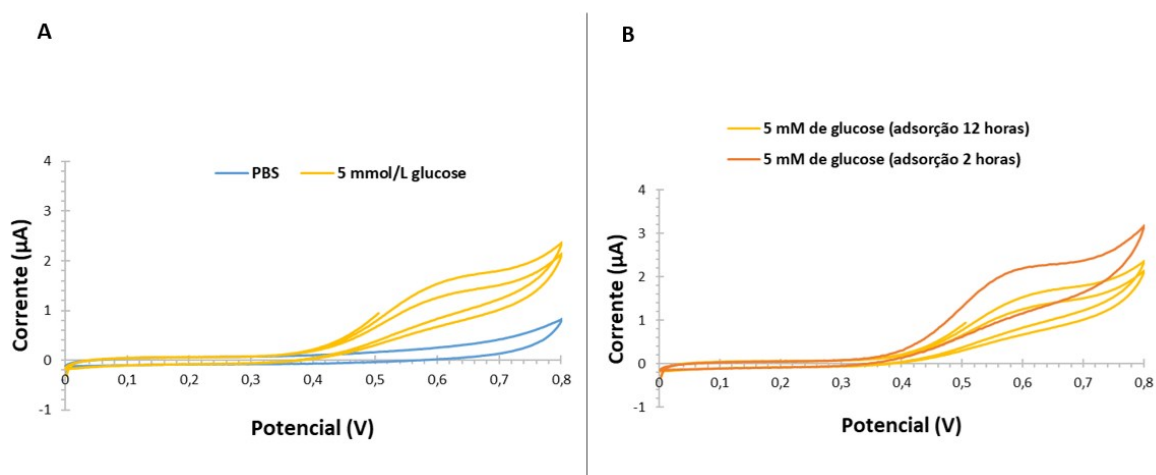


Figura 32- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s para os métodos de adsorção da enzima de 12 e 2 h respectivamente. (A) gráfico CV com solução tampão PBS e com solução de glucose de 5 mmol/L preparada em tampão PBS pH 7,2. (B) representa a comparação dos gráficos CV com uma solução de glucose de 5mmol/L, comparando os dois métodos de adsorção (2 horas e 12 horas).

### 4.1.3. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 2 horas

Contrariamente ao método de adsorção, o aprisionamento vai permitir que a enzima permaneça mais tempo ligada à superfície do Au-SPE. Este fenômeno ocorre porque a enzima não está diretamente ligada à superfície, mas sim aprisionada numa rede polimérica, que a retêm, tornando a sua difusão restrita [191]. Uma particularidade desta metodologia é a capacidade de aumentar a estabilização da

enzima e minimizar a sua lixiviação da superfície do eletrodo [191]. Desta forma, o glutaraldeído foi utilizado como agente de reticulação, possuindo grupos aldeídos reativos em ambas as extremidades, que permitem a ligação de superfícies aminadas (Figura 33). Especificamente, o grupo aldeído terminal interage com o grupo *amino* da superfície, enquanto o outro grupo, interage com o grupo amino da enzima [192].

Apesar das vantagens mencionadas sobre o glutaraldeído, este pode provocar modificações enzimáticas, que podem levar a alterações conformacionais da enzima, induzindo a sua perda de atividade [193].

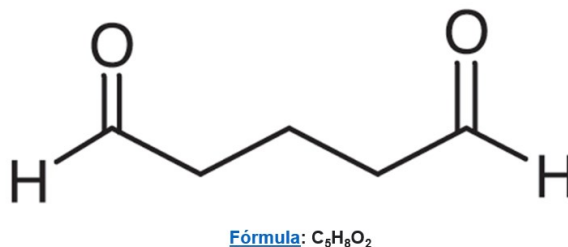


Figura 33- Estrutura molecular e respetiva fórmula química do glutaraldeído[194].

Além do glutaraldeído foi utilizada um monómero eletropolimerizável, a Tir. Este composto, é ideal para a fabricação de camadas enzimáticas, pois permite que este seja eletropolimerizado na superfície do eletrodo. Além de que tem a capacidade eliminar as interferências quando utilizado em amostras complexas, aumentando assim a sua reprodutibilidade.

Uma outra vantagem advém ao facto de ter o grupo amino separado do anel fenólico por dois grupos metileno (Figura 34), o que faz com que apenas seja a porção fenol a participar na polimerização [195]. Assim, a Tir tem a capacidade de se anexar covalentemente a molécula de (bio)reconhecimento através da uma formação de uma ligação peptídica de um grupo amino livre [196].

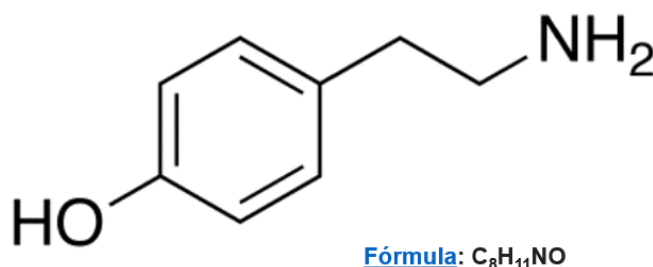


Figura 34-Estrutura molecular e fórmula química da Tir [197].

Assim como nos métodos anteriores, o Au-SPE foi ativado eletroquimicamente, e posteriormente o Bgr foi incubado, apresentando resultados semelhantes. Após a incubação do Bgr, uma solução contendo 10  $\mu$ L de GOx, 10  $\mu$ L de glutaraldeído e 40  $\mu$ L de Tir foi adicionada à superfície do eletrodo de trabalho, sendo mantida a 4°C no refrigerador por 2 horas.

Em seguida, aplicou-se a técnica de eletropolimerização por meio da CV para formação de uma rede polimérica de poliTir de forma a aprisionar a enzima na superfície do eletrodo. Nesse processo, 100  $\mu$ L

de água foram colocados na superfície do Au-SPE, e um potencial de -0,3 a 1,6 V foi aplicado. Isso resultou na ocorrência de processos de oxidação/redução, levando à formação da matriz polimérica desejada. Após a etapa de eletropolimerização, a técnica de CV foi utilizada para investigar as propriedades catalíticas da enzima na oxidação da glucose quando a mesma está encapsulada. As leituras de CV foram conduzidas dentro de um intervalo de potencial de 0,0 a 0,8 V, com uma velocidade de varredura de 10 mV/s.

Na Figura 35 apresenta-se os resultados do CV quando o eletrodo foi incubado em tampão PBS e em solução contendo glucose a 5 mmol/L. Nas leituras realizadas em PBS, não se observou a presença de picos de oxidação. Entretanto, quando a glucose 5 mmol/L foi introduzida, notou-se um aumento de corrente a partir de 0,5V sem se observar um pico definido tal como nos protocolos anteriores (2 horas).

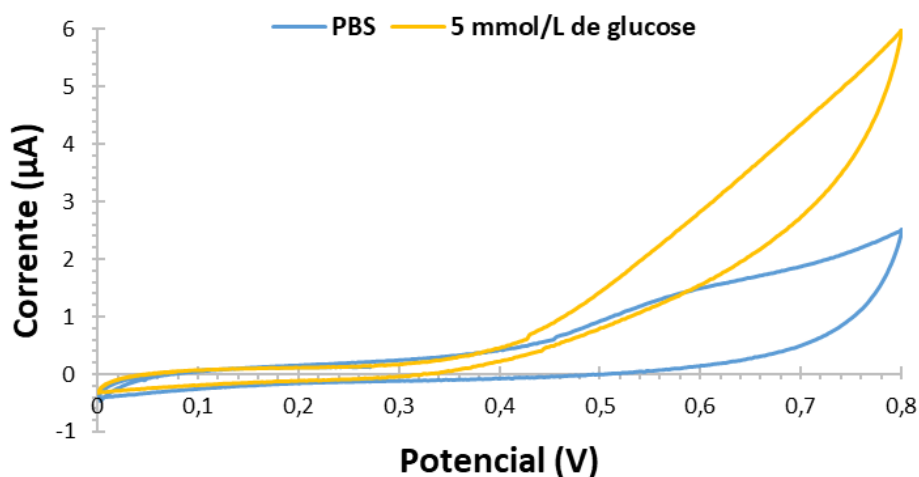


Figura 35- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s, para o método de aprisionamento com glutaraldeído e poliTir durante 2 horas.

Este comportamento poderá estar associado ao facto de a enzima não ficar diretamente exposta ao substrato tal como na metodologia anterior.

#### 4.1.4. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 12 horas

Relativamente ao método descrito anteriormente, foi realizado o mesmo procedimento experimental, tendo sido apenas alterado o tempo de incubação da solução (Tir, glutaraldeído e GOx) na superfície do eletrodo de 2 horas para 12 horas. A Figura 36 A, apresenta os resultados do CV após a incubação do eletrodo em duas condições: uma em tampão PBS e outra em uma solução contendo 5 mmol/L de glucose. Durante as medições realizadas no tampão PBS, não foi detetada a presença de picos de oxidação. Porém, ao introduzir 5 mmol/L de glucose, observou-se um aumento na corrente a partir de 0,5 V, embora não tenha sido identificado um pico distintivo, como nos ensaios de adsorção química. Este efeito foi notado após um período de incubação de 2 horas, com a solução de glucose de 5 mmol/L. No gráfico B da Figura 36, são comparados os valores de corrente para a solução de glucose de 5 mmol/L para o tempo de imobilização da solução de 12 e 2 horas, tendo-se verificado que os valores de corrente são ligeiramente mais elevados para o tempo de incubação mais extenso, sendo estas diferenças pouco significativas. Contrariamente ao método de adsorção em que com o tempo de incubação mais prolongado o valor de corrente diminuiu, neste caso aumenta. Isto se pode dever com o facto de que à

medida que o processo de polimerização se realiza, vai se formando uma matriz polimérica em torno da sua enzima (confina na sua estrutura), diminuindo assim a sua inativação, ou seja com um maior tempo de imobilização as ligações são reforçadas [198].

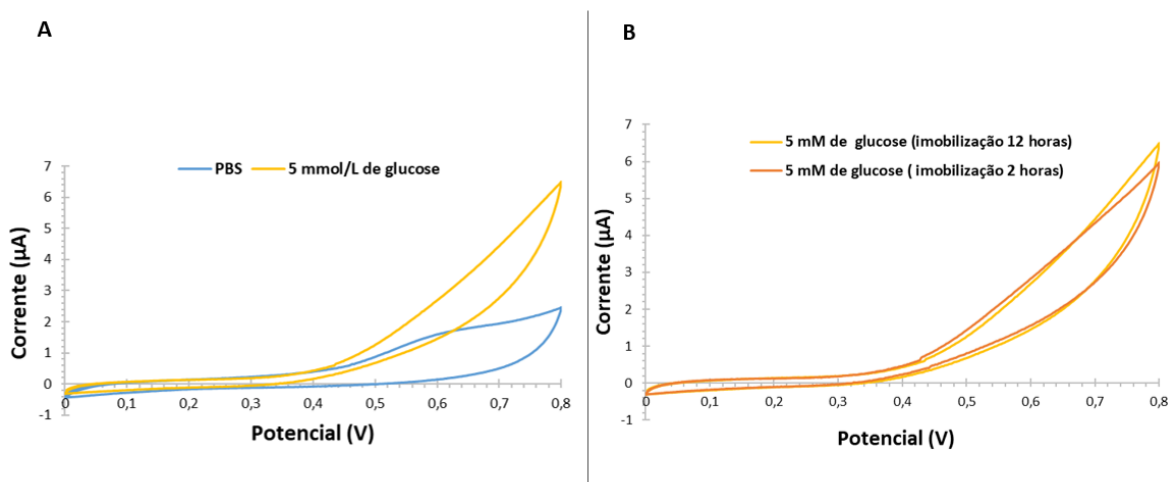


Figura 36-Resultados da leitura com dois padrões de diluição diferentes (0 mmol/L e 5 mmol/L) para o método de aprisionamento com glutaraldeído e poliTir durante 12 horas. (A) gráfico CV com solução PBS e com solução de glucose de 5 mmol/L. (B) representa a comparação entre os gráficos CV com uma solução de glucose de 5 mmol/L, comparando os métodos de aprisionamento para 2 horas e 12 horas.

#### 4.1.5. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir durante 2 horas

Com o objetivo de avaliar o potencial impacto do glutaraldeído na imobilização da enzima e no desempenho do biossensor, foi concebido um biossensor idêntico ao descrito na seção 4.1.4, com a exceção de que o glutaraldeído foi retirado. Em alternativa, foram aplicados apenas 10 µL de uma solução contendo 40 µL de Tir e 50 µL de GOx. Com base na Figura 37, pode-se concluir que a oxidação da glucose foi bastante discreta, pois não se evidencia a ocorrência de picos de oxidação em toda a faixa de potencial estudada. Observa-se apenas um leve aumento no valor da corrente, mas isso ocorre apenas para potenciais acima de 0,65 V. Este comportamento sugere que o glutaraldeído tem um efeito positivo na preservação da integridade e conformação da enzima, possivelmente através da formação de uma rede polimérica mais densamente reticulada.

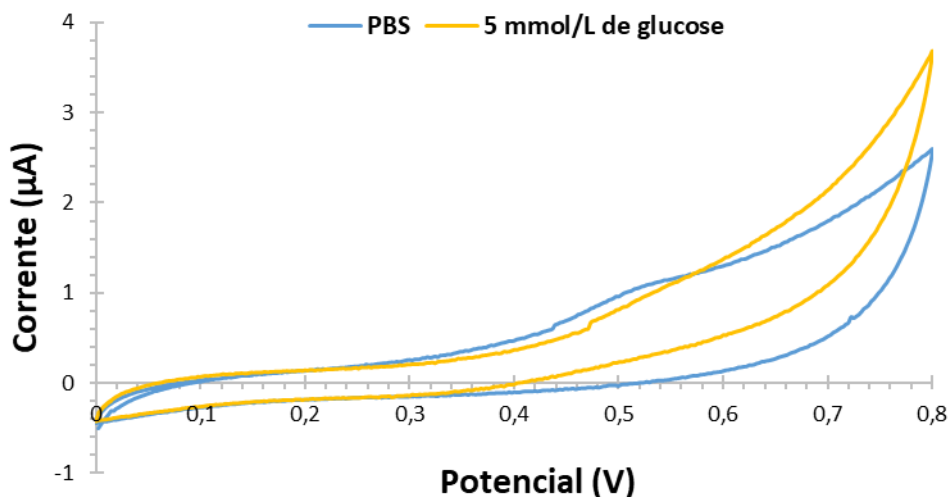


Figura 37- Voltamogramas conduzidos em tampão PBS com pH 7,4 (pontos azuis) e em glucose 5 mmol/L preparada em tampão PBS com pH 7,2 (pontos laranja) com uma taxa de varrimento de 50 mV/s, para o método de aprisionamento com Tir durante 2 horas.

#### 4.1.6. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir durante 12 horas

Em comparação com o método anterior, a única modificação realizada foi o aumento do tempo de imobilização de 2 para 12 horas. No Gráfico B da Figura 38, pode-se observar que, assim como no método anterior, em alguns potenciais, a corrente na solução de PBS é maior do que na solução contendo 5 mmol/L de glucose, enquanto, na faixa de potencial entre 0,6 V e 0,8 V ocorre o oposto. A diferença de corrente entre a solução de PBS e a solução de glucose 5 mmol/L é menor do que a observada no tempo de imobilização de 2 horas.

No que diz respeito ao Gráfico A da Figura 38, os valores de corrente para a solução de glucose 5 mmol/L são mais elevados no tempo de imobilização de 2 horas em comparação com o de 12 horas. Resumindo, pode-se concluir que, em ambos os tempos de interação da enzima com a solução de polimerização reacional, os resultados apresentam variações notáveis.

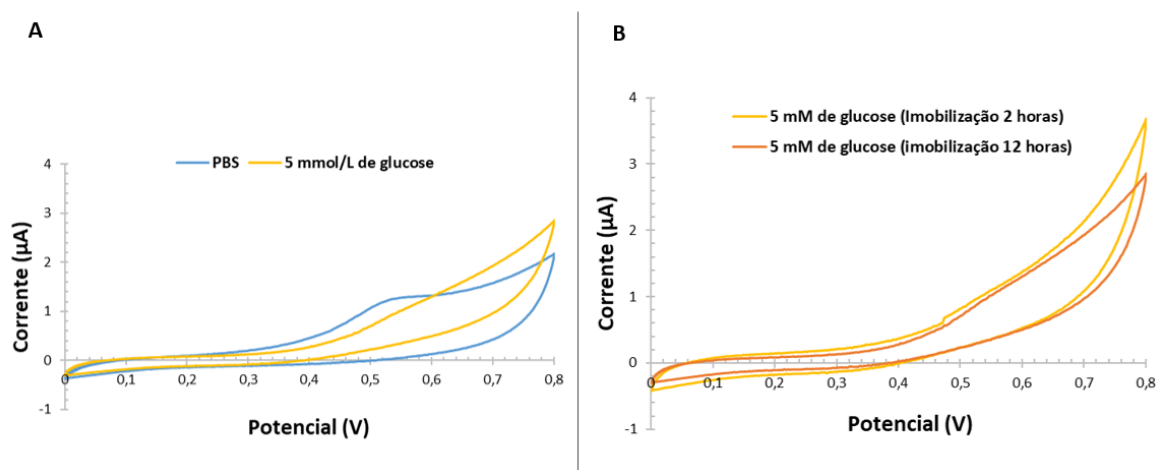


Figura 38-Resultados da leitura com dois padrões de diluição diferentes para o método de aprisionamento com Tir durante 12 horas. (A) gráfico CV com solução PBS e com solução de glucose de 5mmol/L. (B) representa a

comparação entre os gráficos CV com uma solução de glucose de 5 mmol/L para o método de aprisionamento com Tir durante 2 horas e 12 horas.

## 4.2. Avaliação do desempenho do biossensor

Neste capítulo é avaliado o desempenho do biossensor através de um conjunto de estudos. Em primeiro lugar foram realizadas calibrações em tampão PBS para todos os métodos mencionados anteriormente, por forma ao escolher o método com a melhor resposta linear e maior declive. Em segundo lugar, foram testados dois interferentes com características diferentes, por forma a avaliar a seletividade do biossensor. Posteriormente, foram avaliados o desempenho e o comportamento do biossensor num contexto mais aproximado do real, com recurso a um soro comercial, *Cormay*. Por fim, procedeu-se à caracterização dos materiais, que permitiu obter informações sobre as diferentes fases de síntese do biossensor a nível químico e estrutural.

### 4.2.1. Calibração em tampão

Nesta etapa foram construídas diferentes curvas de calibração para cada um dos métodos de imobilização, permitindo assim exprimir relação entre o sinal medido e a concentração de glucose, avaliando assim a capacidade de resposta do biossensor. Para a construção das curvas de calibração do método de adsorção foram utilizadas nove soluções de glucose com diferentes concentrações (0 mmol/L; 0,05 mmol/L; 1,0 mmol/L; 5,0 mmol/L; 10,0 mmol/L; 20,0 mmol/L; 30,0 mmol/L; 40,0 mmol/L e 50,0 mmol/L). Relativamente ao método de imobilização por aprisionamento foi utilizada mais uma solução de glucose com concentração de 2,5 mmol/L.

#### 4.2.1.1. Imobilização da enzima por adsorção durante 2 horas

Após a fabricação do biossensor foi utilizada a técnica de CA aplicando um potencial de 0,6 V durante 120 s. Posteriormente, foram colocadas sucessivamente na superfície do Au-SPE 80  $\mu$ L de cada uma das soluções de glucose, tendo-se iniciado pela solução de menor concentração (0 mmol/L; 0,05 mmol/L; 1 mmol/L; 5 mmol/L; 10 mmol/L; 20 mmol/L; 30 mmol/L; 40 mmol/L e 50 mmol/L).

Através da figura 39A, verifica-se que à medida que a concentração de glucose aumenta, que o valor de corrente também aumenta, havendo uma diferença significativa entre cada um dos valores de corrente das diferentes concentrações. Comparativamente com o eléctrodo controlo (chip sem enzima), na Figura 39 B, observa-se que os valores de corrente para as mesmas concentrações são mais baixos e a diferença de corrente entre os diversos padrões consecutivos são menores. Esta diferença deve-se à capacidade de reconhecimento da enzima GOx na presença da glucose.

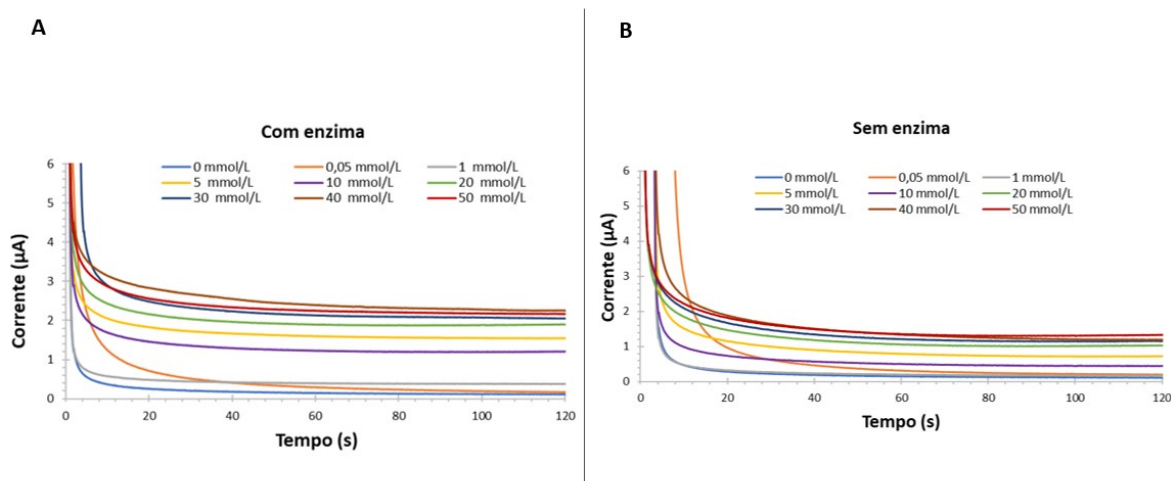


Figura 39. Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima na superfície do eléctrodo de trabalho para o método de adsorção de 2 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L.

Após a obtenção dos gráficos de CA, foram seleccionados os valores de corrente para o minuto 60 para cada uma das concentrações, por forma a obter as respetivas curvas de calibração.

Na Figura 40 encontra-se representada a reta de calibração e as respetivas barras de erro dos triplicados do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima (controlo). O declive do chip com enzima é igual a 1,784, enquanto para o chip sem enzima é de 0,2679, o que permitiu concluir que o chip com enzima tinha um valor superior, sendo assim mais sensível. Relativamente ao valor de  $R^2$ , este é mais elevado para o chip com enzima (0,9939), sendo que para o chip sem enzima este revelou-se menor (0,9149). A gama linear de deteção de glucose foi entre as concentrações de 1 mmol/L a 40 mmol/L.

Relativamente ao desvio padrão, este foi inferior a 10,7 % no chip com enzima, e inferior a 5,1 % no chip sem enzima.

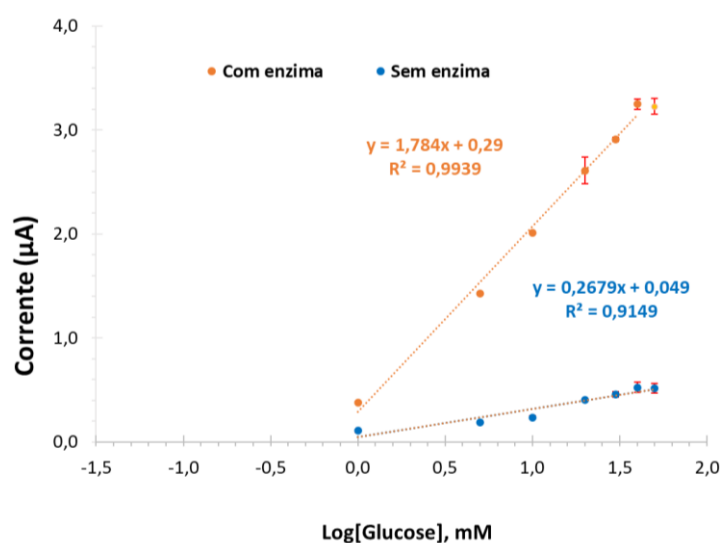


Figura 40- Retas de calibração com as respetivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima (pontos laranjas) e do chip sem enzima (pontos azuis), para o método de adsorção de 2 horas.

Posteriormente, por forma a estudar a cinética enzimática, foi aplicada a equação de *Michaelis-Menten*, que permitiu explicar o comportamento da enzima quando se liga ao substrato [199]. Desta forma, foi utilizado um modelo de isotérmica de *Langmuir* (Equação 6) em que  $I_S$  era a corrente normalizada (em  $\mu\text{A}$ ),  $S$  a concentração de glucose (em  $\text{mmol/L}$ ) e  $I_{max}$  a corrente máxima atingida (em  $\mu\text{A}$ ). A constante de dissociação aparente ( $K_D$ ) e a capacidade máxima de ligação ( $V_{max}$ ) foram calculadas a partir destes dados. A  $K_D$  foi a concentração de glucose necessária para fornecer metade da resposta máxima produzida pelo biossensor.

$$I_S = \frac{I_{max}}{1 + K_D/[S]} \quad \text{Equação 6}$$

Através do gráfico da Figura 41 foi possível obter os valores de  $B_{max}$  e de  $K_D$ . Relativamente ao Au-SPE com enzima os valores foram,  $V_{max}=3.15$  e  $K_D=5$ . Para o Au-SPE sem enzima, foram  $V_{max}=0.45$ , mas o valor de  $K_D$  não foi possível de calcular devido à variação pouco significativa do sinal.

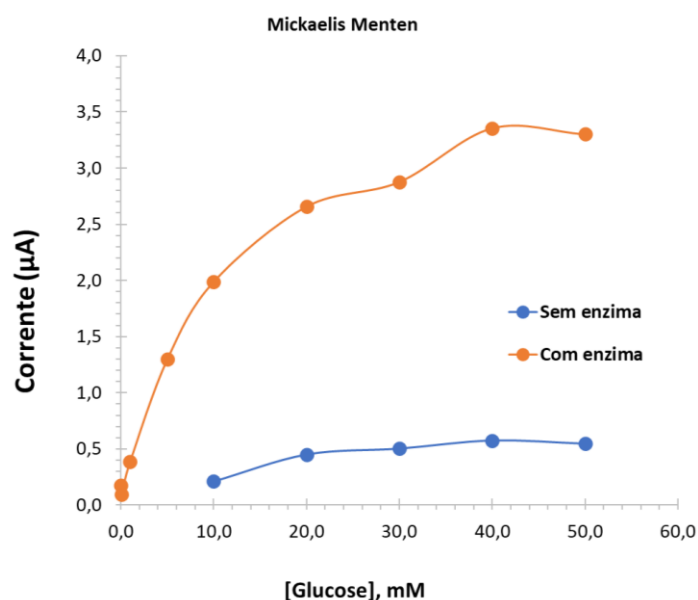


Figura 41-Gráfico da cinética de *Michaelis-Menten* do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de adsorção de 2 horas.

#### 4.2.1.2. Imobilização da enzima por adsorção durante 12 horas

Por forma a perceber a implicação do tempo de incubação na resposta do biossensor, foi aplicada a mesma metodologia experimental para um tempo de 12 horas. Na figura 42 são visualizados os gráficos de CA gerados para nove padrões de diluição, verificando-se que existe um maior espaçamento entre as diferentes concentrações para o chip com enzima do que para o chip sem enzima. Isto demonstra, que a presença da GOx é fundamental para a oxidação da glucose e subsequente eletrooxidação do  $H_2O_2$ , formado na superfície do eletrodo a 0,6 V.

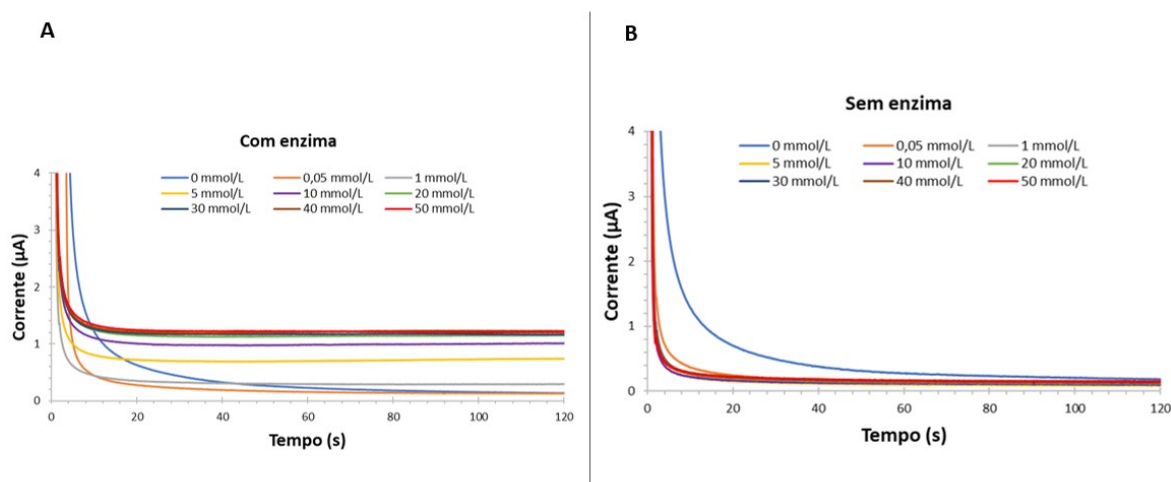


Figura 42- Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima na superfície do eletrodo de trabalho para o método de adsorção de 12 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L. (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L.

Pela análise das retas de calibração, foi demonstrado que o chip com enzima apresenta um declive e superior ao do chip sem enzima, tendo 0,6397, e 0,0560 respetivamente (Figura 43). Os valores de  $R^2$  são semelhantes, sendo de 0,9886 para o chip com enzima, e 0,9795 para o chip sem enzima. A gama de resposta linear do chip com enzima foi de 1 mmol/L a 30 mmol/L, mais estreita do que no caso da imobilização da enzima de 2 horas cuja gama situou-se entre 1 mmol/L a 40 mmol/L. O desvio padrão associado ao chip com enzima e sem enzima foi de 3 % e 2 %, respetivamente.

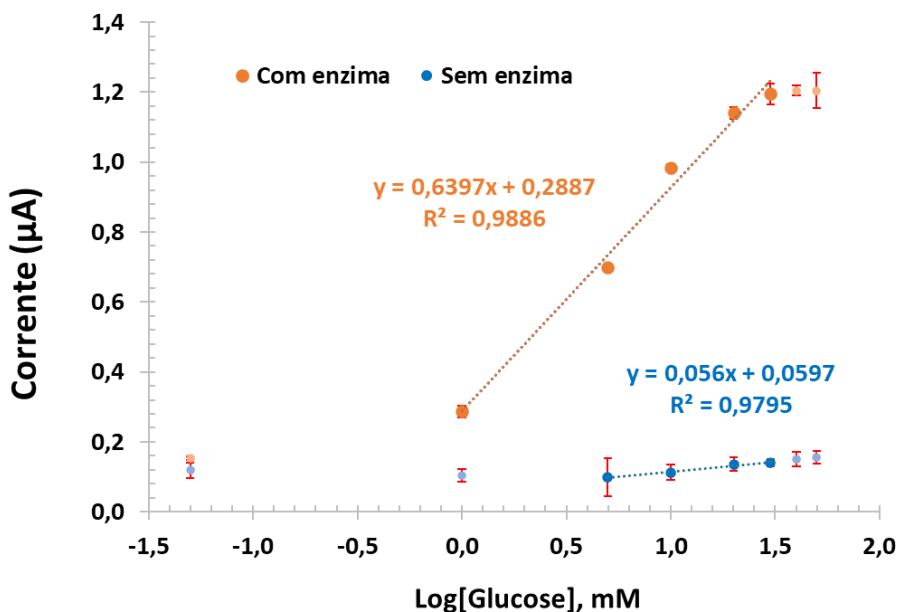


Figura 43- Retas de calibração com as respetivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de adsorção de 12 horas.

Comparando o declive de ambas as metodologias, o declive neste estudo é cerca de 37 % inferior ao estudo anterior, evidenciando que o aumento de tempo de incubação da enzima não é benéfico para o desempenho do biossensor.

No que se refere da afinidade da enzima à glucose (Figura 44), o chip com enzima revelou um valor de  $K_D = 3,7$ , enquanto no chip sem enzima esse valor não foi possível de ser calculado devido a variação pouco significativa do sinal. Por outro lado, o número máximo de locais de ligação ao substrato, foram iguais a  $V_{max} = 1,22$  para o chip com enzima, e  $V_{max} = 0,16$  para o chip sem enzima.

Quando comparados os valores de  $K_D$  e Au-SPE deste ensaio com o anterior verifica-se que os resultados são coerentes com o resultado da calibração. Com a imobilização de 2h obtém-se uma velocidade máxima superior, no valor de 3,15. Apesar deste valor ( $V_{max}$ ) ser superior ao do presente método, o valor de  $K_D$  é ligeiramente superior, tendo um valor de 5, o que revela que a afinidade é ligeiramente menor (quanto menor o valor de  $K_D$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato, e vice-versa). Portanto, o  $K_D$  é um indicador da eficiência da enzima na catálise da reação em relação à concentração do substrato.

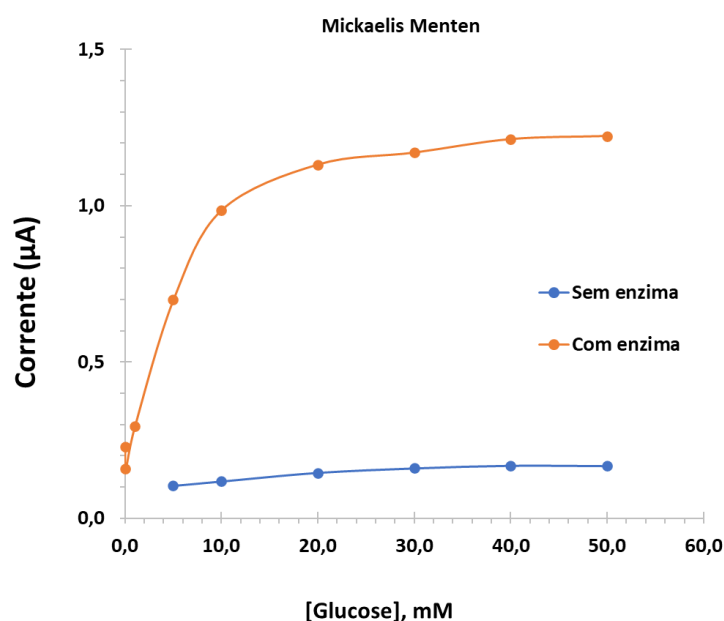


Figura 44-Gráfico da cinética de *Michaelis-Menten* do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de adsorção de 12 horas.

#### 4.2.1.3. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 2 horas

Assim como no método de adsorção, após a fabricação do biossensor, foi aplicada a técnica de CA com o mesmo potencial e intervalo de tempo. Sucessivamente, depositou-se 80 µL de cada uma das soluções de glucose na superfície do Au-SPE, começando com a solução de menor concentração (0 mmol/L) e seguindo com incrementos de concentração (0,05 mmol/L; 1,0 mmol/L; 2,5 mmol/L; 5,0 mmol/L; 10,0 mmol/L; 20,0 mmol/L; 30,0 mmol/L; 40,0 mmol/L e 50,0 mmol/L).

Em relação aos dados previamente obtidos pela técnica de CA, observa-se que para ambos os chips, a diferença entre os vários padrões de diluição é menor, resultando em curvas de calibração mais próximas umas das outras (conforme ilustrado na Figura 45).

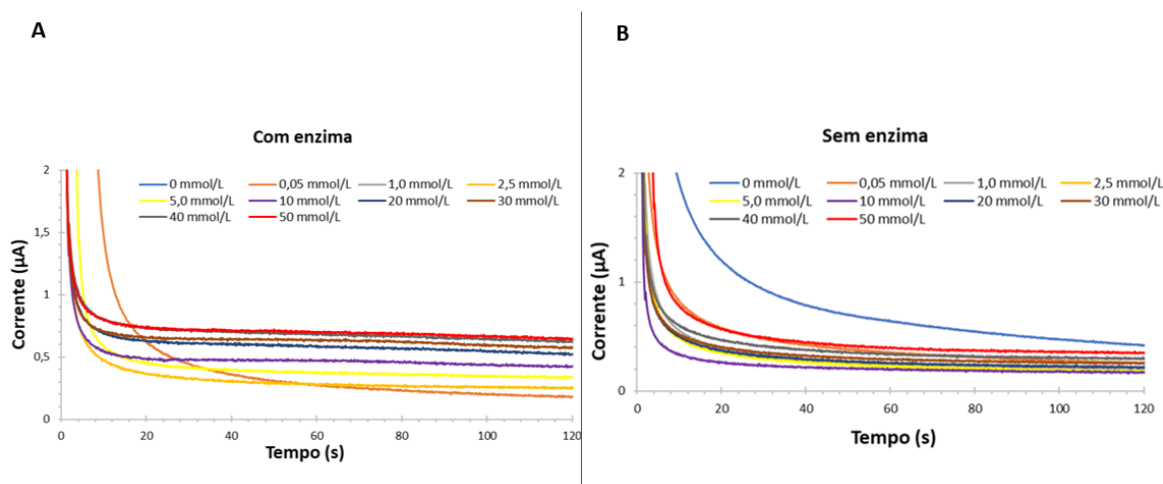


Figura 45-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com glutaraldeído e Tir na superfície do eletrodo de trabalho durante 2 horas (A) cronoamperograma do Au-SPE com enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do Au-SPE sem enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L- 50 mmol/L.

No que concerne às retas de calibração, verificou-se que os valores de declive para ambos os chips eram aproximados um do outro, sendo de 0,3165 para o chip com enzima e de 0,2731 para o chip sem enzima (Figura 46). Estes dados permitiram concluir que o chip com enzima não é tão sensível, como os do método por adsorção. Os valores de  $R^2$  obtidos foram de 0,9945 (com enzima) e 0,9249 (sem enzima). A gama de resposta do chip com enzima situa-se entre os 2,5 mmol/L- 50 mmol/L. O desvio padrão para o chip com enzima e o chip sem enzima, foi inferior a 2 % e a 3 %, respetivamente.

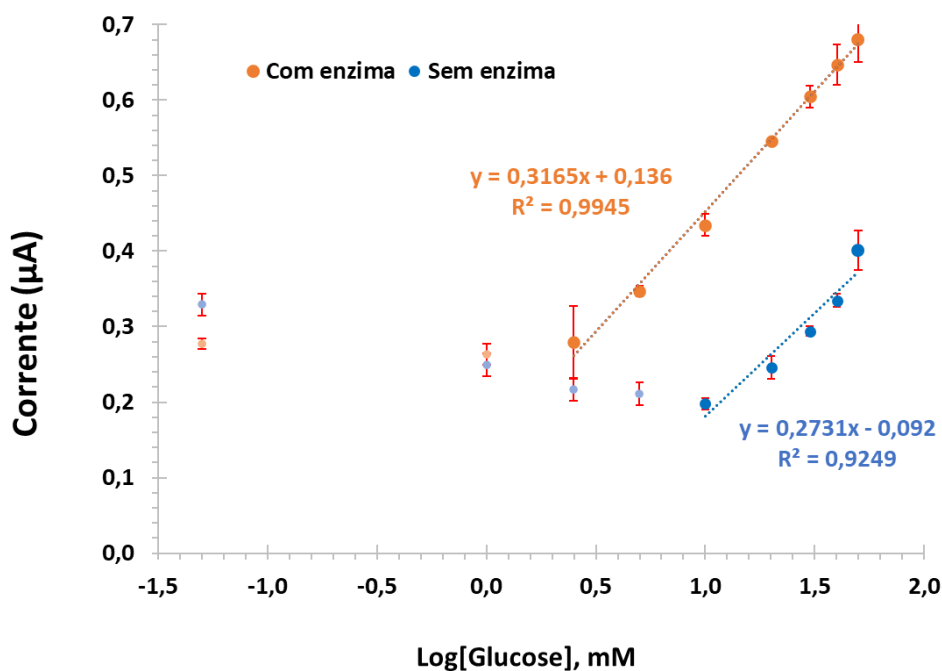


Figura 46- Retas de calibração com as respetivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 2 horas.

Os valores obtidos para o  $K_D$  e  $V_{max}$  do Au-SPE com enzima, foram de 4, e 0,64, respetivamente. Tal como nos métodos anteriores não foi possível determinar o  $K_D$  do Au-SPE sem enzima, e o valor de  $B_{max}$  foi de 0,43 (Figura 47).

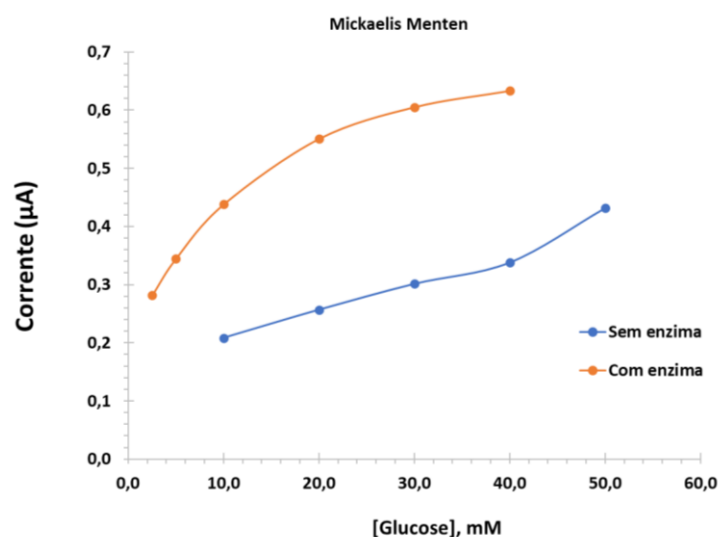


Figura 47-Gráfico da cinética de *Michaelis-Menten* do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com poliTir e glutaraldeído durante 2 horas.

Quando se compara o  $K_D$  e  $V_{max}$  deste ensaio com o método de adsorção a 2 horas, verifica-se que os resultados são coerentes com o resultado da calibração. Relativamente ao valor de  $K_D$  do método de adsorção de 2 horas, este foi superior ( $K_D = 5$ ), significando que a afinidade é ligeiramente menor uma vez que quanto menor o valor de  $K_D$ , maior a afinidade da enzima pelo substrato. No entanto o valor da  $V_{max}$  no ensaio de adsorção por 2 h é 80 % superior ao ensaio apresentado nesta seção, indicando que velocidade máxima que a enzima pode atingir quando todos os sítios ativos estão saturados com substrato é muito superior.

#### 4.2.1.4. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 12 horas

A metodologia aplicada neste método foi a mesma, tendo sido alterado o tempo de imobilização para 12 horas, por forma a analisar se a capacidade de ligação da enzima ao substrato aumentava.

No decurso da análise das curvas de calibração para ambos os chips, verificou-se que existe um maior espaçamento entre as concentrações de glucose no chip com enzima (Figura 48). A gama de resposta do chip com enzima foi de 1 mmol/L a 10 mmol/L.

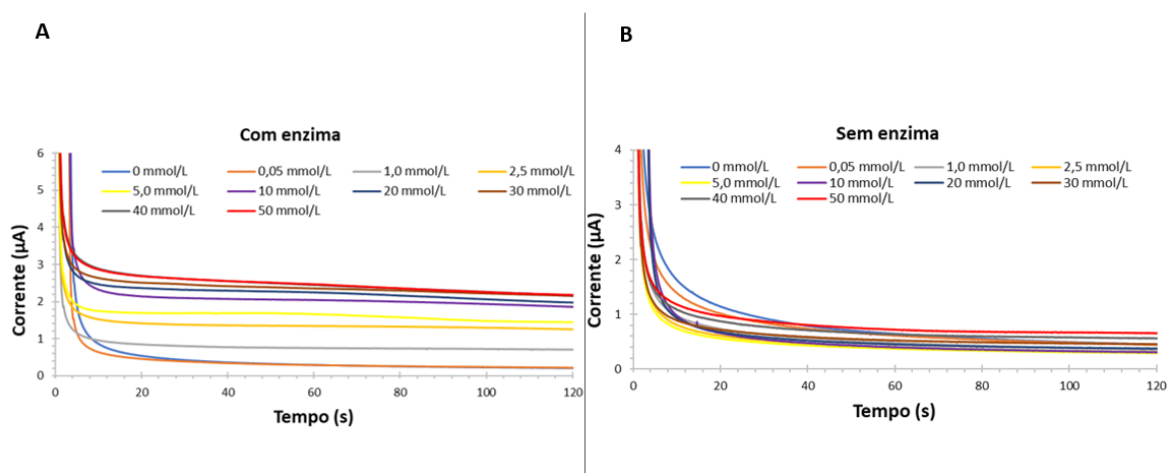


Figura 48-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com glutaraldeído e poliTir na superfície do elétrodo de trabalho durante 12 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L.

Mediante as retas de calibração representadas na Figura 49, para o chip com enzima o declive foi de 1,3258 e  $R^2 = 0,9924$ , e para o chip sem enzima foi de 0,6155 e  $R^2 = 0,9669$ . Os desvios padrões para o Au-SPE com enzima foram inferiores a 17 %, e para o chip sem enzima inferior a 3 %. A gama de resposta do chip com enzima vai de 10 mmol/L-50 mmol/L.

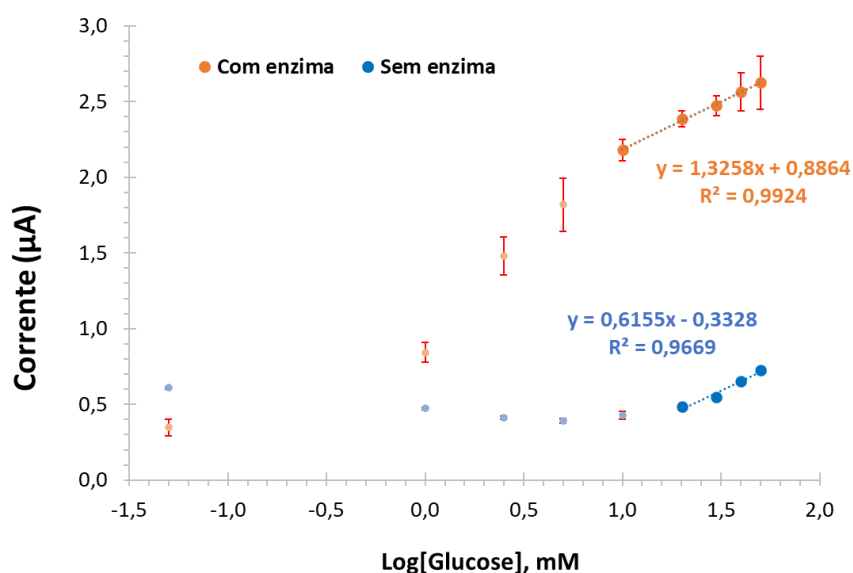


Figura 49- Retas de calibração com as respetivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliTir e glutaraldeído durante 12 horas.

Pela equação *Michaelis Menten*, foram retirados os valores de  $K_D$  e  $V_{max}$  (Figura 50). Para o Au-SPE com enzima o  $K_D = 1,5$  e  $V_{max} = 2,55$ , e para o Au-SPE sem enzima  $V_{max} = 0,72$ , sendo que para  $K_D$  não foi obtido o valor (justificação anteriormente mencionada).

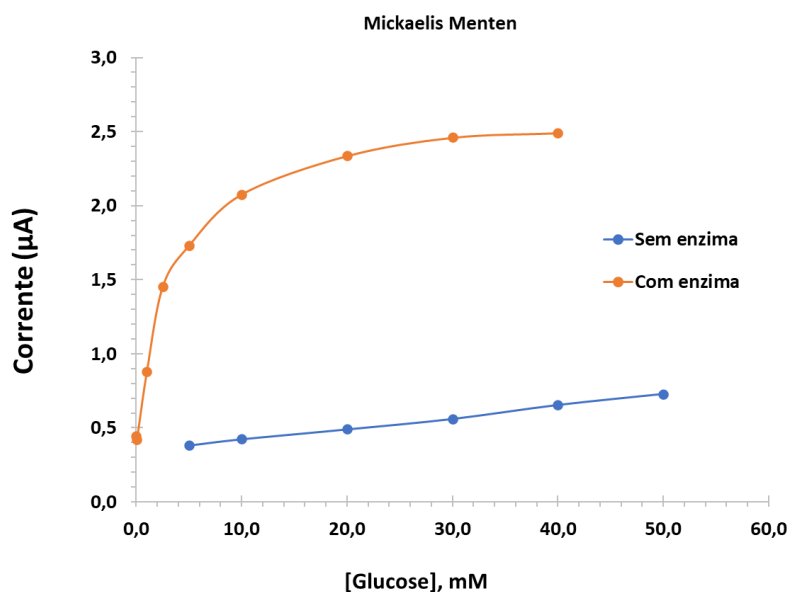


Figura 50-Gráfico da cinética de *Michaelis-Menten* para o Au-SPE com enzima e para o Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com Tir e glutaraldeído durante 12 horas.

Comparando estes resultados com o procedimento análogo, com a reação de interação da enzima com solução reacional durante 2 horas onde os valores obtidos para o  $K_D$  e  $V_{max}$  do SPE com enzima, foram de 4,0 e 0,64, respectivamente, pode-se concluir que neste ensaio de 12 horas o eletrodo mostrou uma velocidade máxima superior e que a enzima apresenta uma maior afinidade para o substrato, pois o valor é inferior (1,5).

#### 4.2.1.5. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir durante 2 horas

A presente abordagem segue a mesma linha da seção anterior, com uma exceção crucial: a ausência de glutaraldeído na solução reacional de polimerização. É importante salientar que a exclusão deste composto teve um impacto significativo.

A análise da Figura 51 revela que ao contrário das expectativas, o biossensor demonstrou uma sensibilidade mais elevada nesta configuração, evidenciando um declive consideravelmente superior em comparação com a metodologia anterior. No entanto, é interessante observar que nesta abordagem, o eletrodo controle exibe um declive semelhante ao eletrodo que incorpora a enzima. Isso implica que a interação entre a enzima e o substrato não é o principal impulsionador do mecanismo de oxidação da

glucose e da eletrooxidação do  $H_2O_2$ . Esta análise indicou que esta metodologia poderia apresentar baixa especificidade.

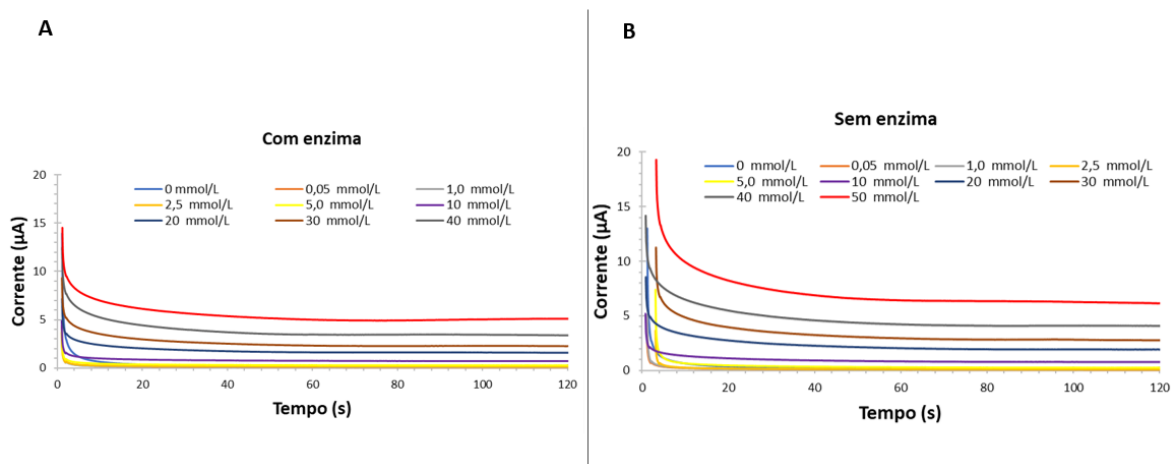


Figura 51-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir na superfície do eletrodo de trabalho durante 2 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L- 50 mmol/L.

Através da Figura 52 verifica-se que não há um comportamento linear para ambos os chips, não sendo assim possível identificar o valor do declive e do  $R^2$ .

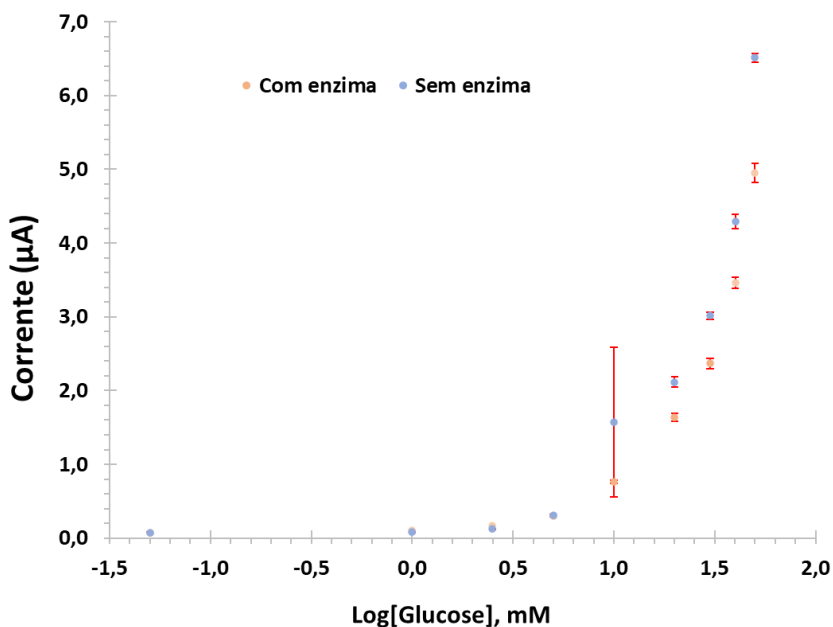


Figura 52- Retas de calibração com as respectivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliTir durante 2 horas.

Nesta metodologia tanto o biossensor com enzima como o controle não apresentam um comportamento de acordo com a cinética de *Michaelis-Menten* (Figura 53). Relativamente aos outros gráficos de *Michaelis-Menten*, verificou-se que neste método, apesar de haver um aumento inicial de corrente para as soluções de glucose com baixas concentrações, estas não estabilizaram num patamar plano (*platô*) para as altas concentrações do substrato (glucose). Desta forma, as moléculas da enzima não se conseguiram ligar ao substrato.

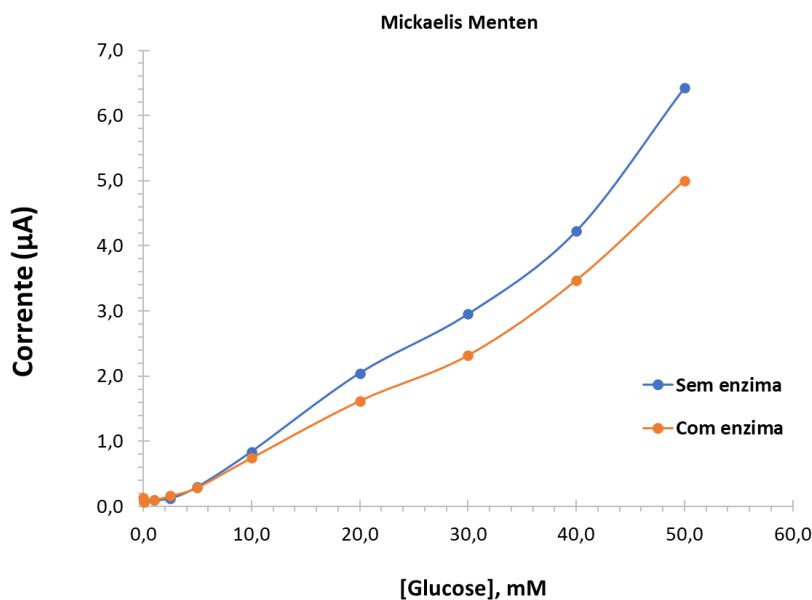


Figura 53-Gráfico da cinética de *Michaelis-Menten* do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com poliTir durante 2 horas.

#### 4.2.1.6. Imobilização da enzima por aprisionamento com poliTir durante 12 horas

Nesta etapa foi apenas alterado o tempo de imobilização para 12 horas, de maneira a compreender a influência da Tir ao longo do tempo.

No decurso da análise da Figura 54 B, verifica-se que há uma relação proporcional entre a corrente e a concentração da solução de glicose numa gama muito estreita, o que pode estar relacionado com a dificuldade da glicose aceder ao centro ativo da enzima (FAD), devido à presença do polímero em torno da enzima GOx.

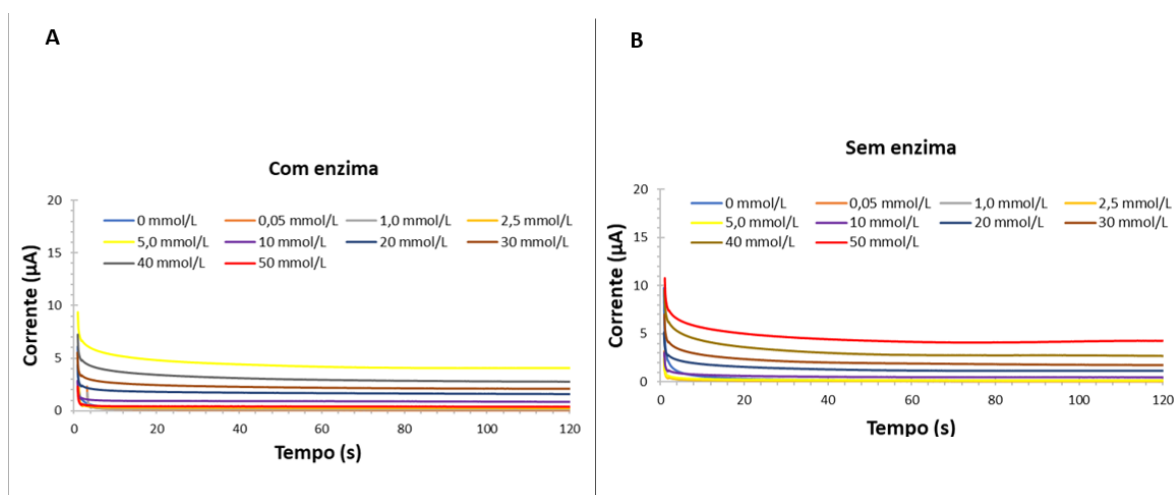


Figura 54-Cronoamperogramas obtidos após a imobilização da enzima por aprisionamento com Tir na superfície do eléctrodo de trabalho durante 12 horas (A) cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) cronoamperograma do chip sem enzima para as soluções de glicose de 0 mmol/L-50 mmol/L.

Tal como no método anterior, não foi possível identificar o valor de declive e de  $R^2$  de ambos os chips, pois estes exibem um comportamento exponencial aquando da colocação das diferentes concentrações da solução de glucose (Figura 55).

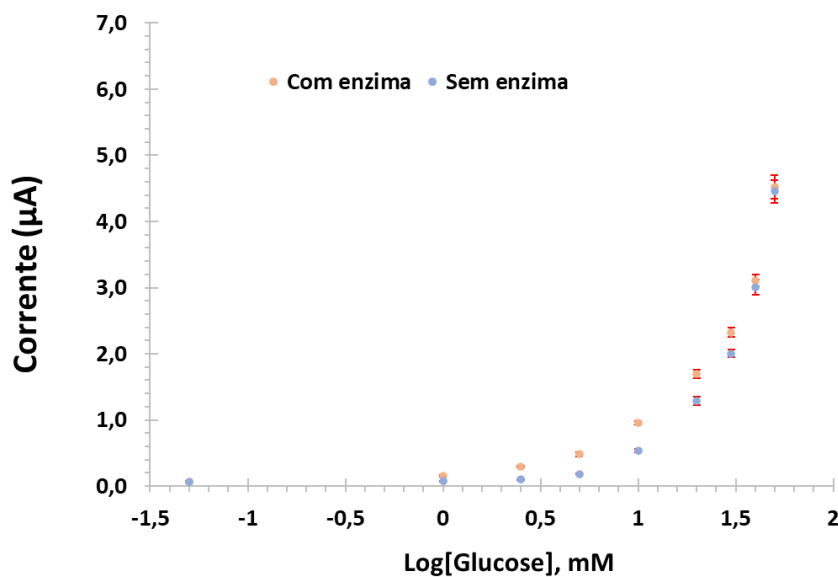


Figura 55- Retas de calibração com as respetivas barras de erro dos triplicados do chip com enzima e do chip sem enzima, para o método de aprisionamento com poliTir durante 12 horas.

Tal como o método anterior, não foi possível obter dados referentes à cinética de *Michaelis-Menten*. Pela análise da Figura 56, denotou-se que o comportamento de cinética da enzima foi o mesmo, ou seja, não houve estabilização da corrente para nenhuma das concentrações de glucose.

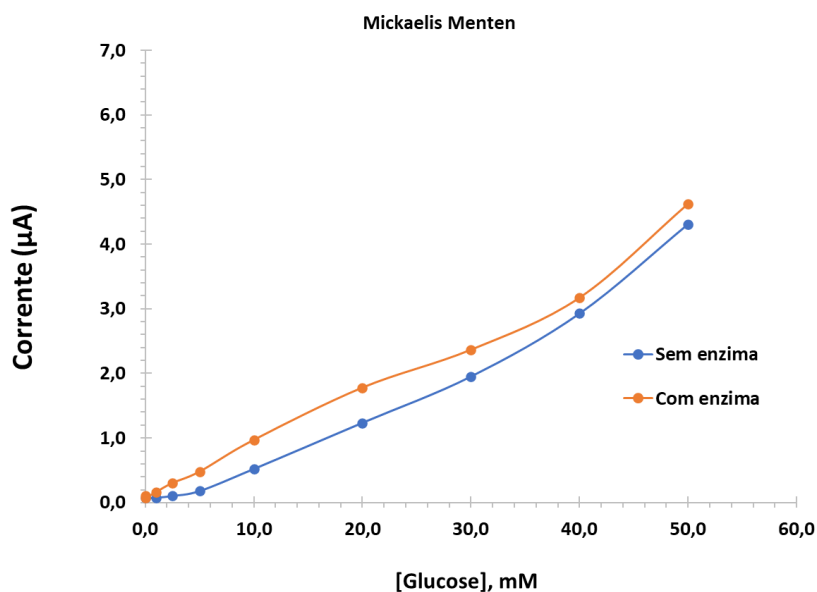


Figura 56-Gráfico da cinética de *Michaelis-Menten* do Au-SPE com enzima e do Au-SPE sem enzima, para o método de imobilização da enzima com Tir durante 12 horas.

#### 4.2.1.7. Comparação entre estudos

Após a recolha e processamento dos dados de cada um dos métodos de imobilização, procedeu-se à sua análise com o objetivo de determinar qual método seria o mais apropriado para desenvolver um biossensor sensível, rápido e seletivo. Esta análise orientou a seleção do método mais promissor a ser testado com soro, avaliando seis parâmetros diferentes: (1) Limite Inferior Resposta Linear (LIRL); (2) Limite Superior Resposta Linear (LSRL); (3) Declive; (4)  $R^2$ ; (5)  $K_D$ ; (6)  $V_{max}$ . Primeiramente, foi realizada uma análise comparativa dos dois métodos de adsorção utilizando os dados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Comparação entre os dados obtidos da reta de calibração e da cinética de *Michaelis-Menten* para os dois métodos de adsorção (2 horas e 12 horas).

Parâmetros analíticos	Adsorção 2 horas	Adsorção 12 horas
LIRL (mmol/L)	1,0	1,0
LSRL (mmol/L)	40	30
Declive ( $\mu\text{A}/\text{dec}[\text{glucose, mmol/L}]$ )	1,784	0,6397
$R^2$	0,9939	0,9886
$V_{max}$ ( $\mu\text{A}$ )	3,15	1,22
$K_D$ (mmol/L)	5	3,7

Apesar da afinidade da enzima com o substrato ser menor para o método de adsorção de 12 horas, foi selecionado o método de adsorção de 2 horas, pois apresenta um maior declive e velocidade enzimática, bem como uma gama de resposta mais alargada.

É de salientar que os valores de  $K_D$  não dependem da quantidade de enzima que está presente na superfície do biossensor, ao contrário da variável  $V_{max}$ , que quanto mais enzima estiver presente na sua superfície maior é a velocidade de reação

Em segundo lugar, foram analisados os dados do método de aprisionamento com glutaraldeído e poli Tir (Tabela 8).

Tabela 8-Comparação entre os dados obtidos da reta de calibração e da cinética de *Michaelis-Menten* para os dois métodos de aprisionamento com glutaraldeído e poli Tir (2 horas e 12 horas).

Dados	Aprisionamento 2 horas	Aprisionamento 12 horas
LIRL (mmol/L)	2,5	10
LSRL (mmol/L)	50	50
Declive ( $\mu\text{A}/\text{dec}[\text{glucose, mmol/L}]$ )	0,3165	1,3258
$R^2$	0,9945	0,9924
$V_{max}$ ( $\mu\text{A}$ )	0,64	2,55
$K_D$ (mmol/L)	4	1,5

Através da análise dos dados referenciados na Tabela 8, o método que apresentou melhores resultados foi o do aprisionamento de 12 horas, que comparativamente ao outro método, apesar de ter um limite inferior de resposta superior, o valor de  $K_D$  é inferior, e o declive maior. Isto demonstra, que a enzima apresenta uma elevada afinidade ao substrato, bem como uma maior velocidade enzimática.

Relativamente aos resultados demonstrados nos dois métodos de imobilização com enzima e Tir, não foi obter possível obter os valores de declive devido a não linearidade dos valores de corrente. Além

disso, estes não apresentaram comportamento de *Michaelis-Menten*, pelo que assim sendo não foram “selecionados” para prosseguir o estudo.

Por fim foram comparados os dois métodos com melhores resultados, para posteriormente realizar o estudo em soro (Tabela 9). O método selecionado foi a de adsorção de 2 horas, pois apresenta um maior gama de resposta, declive e de  $V_{max}$ . Apesar do método de aprisionamento de 12 horas com glutaraldeído e poliTir, apresentar um valor de afinidade da enzima com a glucose maior, e um menor LIRL, este tem um menor declive (que é sinónimo de menor sensibilidade), e um valor de  $V_{max}$  mais baixo. Ademais, o método de adsorção de 2 horas tem uma metodologia experimental mais simples, rápida e barata.

Tabela 9-Comparação entre os dados obtidos da reta de calibração e da cinética de *Michaelis-Menten* para os dois melhores métodos (adsorção 2 horas e aprisionamento com Tir e glutaraldeído 12 horas).

Dados	Adsorção 2 horas	Aprisionamento 12 horas
LIRL (mmol/L)	1,0	10
LSRL (mmol/L)	40	50
Declive ( $\mu\text{A}/\text{dec}[\text{glucose, mmol/L}]$ )	1,784	1,3258
$R^2$	0,9939	0,9924
$V_{max}$ ( $\mu\text{A}$ )	3,15	2,55
$K_D$ (mmol/L)	5	1,5

#### 4.2.2. Estudo da seletividade

Com o objetivo de avaliar a seletividade do biossensor e diminuir o surgimento de falsos positivos, perante a presença da glucose em diferentes concentrações, foram testados dois potenciais interferentes que estão presentes no soro, sendo eles a creatinina e a BSA.

Tal como foi referido no capítulo três, foram utilizadas concentrações equivalentes às presentes no soro. Assim sendo, foram utilizadas 30 mg/mL de creatinina, e 37,6 mg/mL de BSA. Estas soluções foram preparadas em PBS, e diluídas 10 vezes.

Por conseguinte, a percentagem de interferência foi avaliada com duas soluções diferentes. Inicialmente com uma solução de PBS (neutra), e posteriormente com uma solução de 5 mmol/L do respetivo interferente.

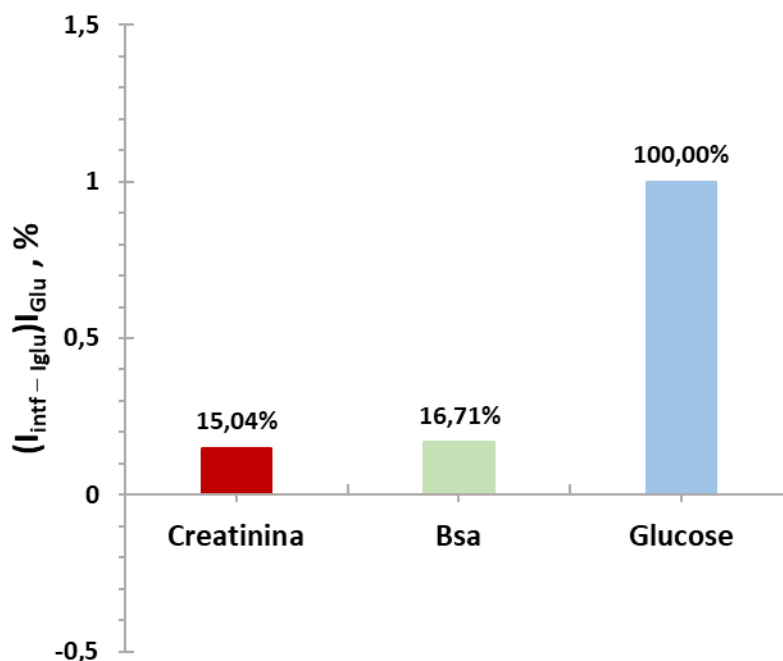


Figura 57-Gráfico representativo dos resultados do teste de seletividade para as espécies interferentes, creatinina e BSA.

No decurso da análise da Figura 57, foram identificadas as variações de cada um dos interferentes em relação à glucose. A creatinina e a BSA apresentaram um baixo impacto, sendo este de 15,04 % e 16,71 %, respetivamente. Desta forma, concluiu-se que independentemente de terem sido testados apenas dois interferentes, que este biossensor é seletivo para detetar a glucose.

### 4.2.3. Aplicação em soro

Após a escolha do método de imobilização (adsorção 2 horas) que conferia mais sensibilidade e seletividade ao biossensor, este foi testado com soro *Cormay*, avaliando a sua capacidade de reconhecer a glucose numa solução mais aproximado do “real”.

A metodologia utilizada foi a mesma, tendo apenas sido substituída a solução tampão PBS, por uma solução de 4950  $\mu\text{L}$  de PBS com 50  $\mu\text{L}$  de *Cormay*.

Na figura 58 A, são observadas curvas de calibração para as diferentes concentrações de glucose com soro, tendo se verificado que existe um aumento da corrente a medida que essa aumenta. Relativamente a reta de calibração, o declive foi de 1,9124, e o  $R^2=0,9995$ . A gama de deteção foi entre 1 mmol/L- 10 mmol/L.

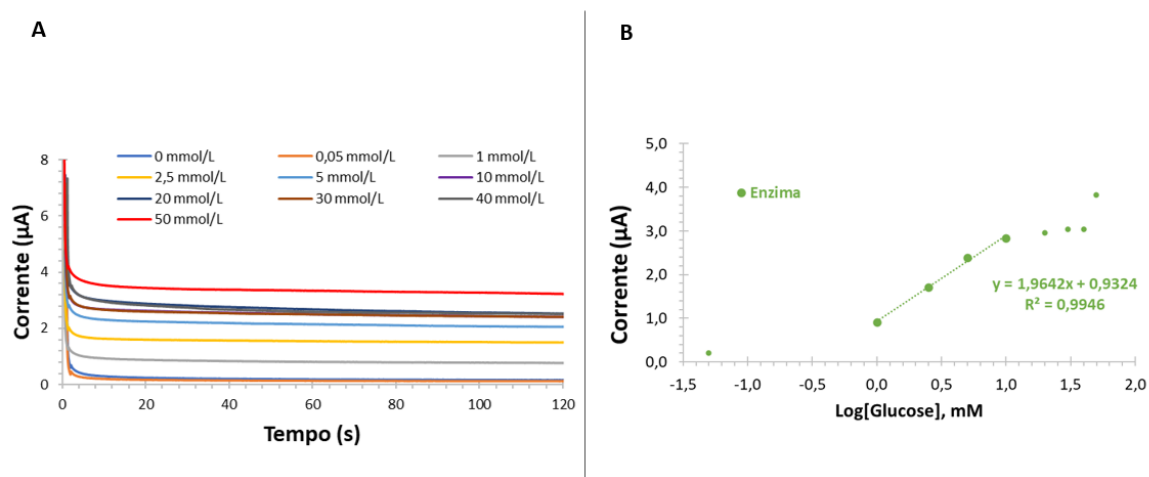


Figura 58-Resultados relativos ao método de adsorção de 2 horas com soro *Cormay* (A) cronoamperograma cronoamperograma do chip com enzima para as soluções de glucose de 0 mmol/L-50 mmol/L (B) reta de calibração e respetiva equação para o chip com enzima.

O método de adição padrão foi utilizado para determinar os níveis de glucose em amostras de soro diluído, com concentrações variando de 1,0 a 5,0 mmol/L de glucose. Estes ensaios foram realizados em triplicado, através de medições de CA. Foi observada uma excelente concordância entre as quantidades de glucose adicionadas e as quantidades encontradas, com recuperações variando de 87 % a 98 %, respetivamente. O desvio padrão relativo obtido para os ensaios reproduzidos foi inferior a 5,8 %, enquanto que para os ensaios repetidos foi inferior a 5 %, reforçando a notável precisão dessa nova abordagem.

Tabela 10- Erros associados as soluções de glucose de concentração de 1,0 mmol/L, 2,5 mmol/L, 5,0 mmol/L e 10,0 mmol/L para um estudo triplicado.

Concentração (mmol/L)	Erro (%) amostra 1	(%) Recuperação	Erro (%) amostra 2	(%) Recuperação
1,0	5,0	95,0	-10,0	90,0
2,5	-2,0	98,0	10,0	90,0
5,0	-13,0	87,0	4,0	96,0

Assim, verificou-se que o erro de maior máximo foi de 13 %, demonstrando assim a sua capacidade de detetar glucose, mesmo com a interferência de outros compostos presentes no soro.

#### 4.2.4. Caracterização físico-química em *Raman*

A espectroscopia de *Raman*, é utilizada diversas vezes para caracterizar o Bgr e o grafeno, dado que estes materiais são constituídos essencialmente por carbono simétrico ligado a  $sp^2$ , que é representado com bastante detalhe no espetro de *Raman* [200]. Assim, através da análise dos espetros, as amostras são identificadas estruturalmente com base nas suas características vibracionais (impressões digitais [201]).

Através desta técnica podem ser obtidos três picos diferentes, que são característicos para cada amostra. Estes são: o pico alusivo à banda D, que está relacionado com o desarranjo estrutural das moléculas; o pico referente à banda G, que representa a ligação dupla de carbono, e o pico relativo à banda 2D, que faz parte das frequências mais elevadas do prolongamento da banda G.

Em relação à banda D, esta é conhecida como a banda de defeito, sendo o resultado de um processo vibracional de *fónons* próximos do ponto K na zona de *Brillouin* em redor de  $1330 \text{ cm}^{-1}$  [202]. A

intensidade desta banda ( $1290\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$  [203]) é diretamente proporcional ao número de defeitos na amostra, exibindo assim o comportamento dispersivo [200].

A banda G é o modo primário no grafeno e na grafite, representando a configuração planar do carbono com ligações  $sp^2$  que constituem o grafeno. Esta coincide com o *fônon* localizado centrado na zona *Brillouin* em torno de  $1580\text{ cm}^{-1}$  [204]. É de ressaltar que esta banda pode ajudar a determinar a espessura da camada de grafeno, sendo que a medida que esta aumenta, esta desloca-se para uma posição de energia mais baixa (abrandamento das ligações [200]). Assim, através desta banda é possível representar o grau de cristalinidade das amostras [204]

A razão de intensidade entre os picos D e G, é denominada de  $I_D/I_G$ , sendo que é um agente caracterizador para determinação dos defeitos estruturais criados nos materiais nanoestruturados de carbono [205]. Desta forma, uma relação de  $I_D/I_G$  crescente, revela graus crescentes de desordem nos materiais [206], enquanto se esta for decrescente, está associada a estruturas mais cristalinas [204].

Para proceder a análise de espectroscopia de *Raman*, foram preparados os seguintes materiais:

- Au-SPE;
- Au-SPE com Bgr;
- Au-SPE com Bgr e enzima.

Posteriormente à análise de cada um dos materiais individualmente, foram analisados os seus espectros e identificadas as intensidades do pico D e pico G, bem como foi calculada a relação de  $I_D/I_G$ . Após a análise individual de cada um dos materiais, foram comparados os valores de intensidade de cada uma das bandas e a sua relação.

Através da análise dos espectros de cada amostra (Figura 59), foram identificados os picos das bandas G ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) e D ( $1300\text{ cm}^{-1}$ ), e as respectivas intensidades e relação (Tabela 11). A relação entre as bandas permitiu determinar o grau de pureza e de modificação química [207].

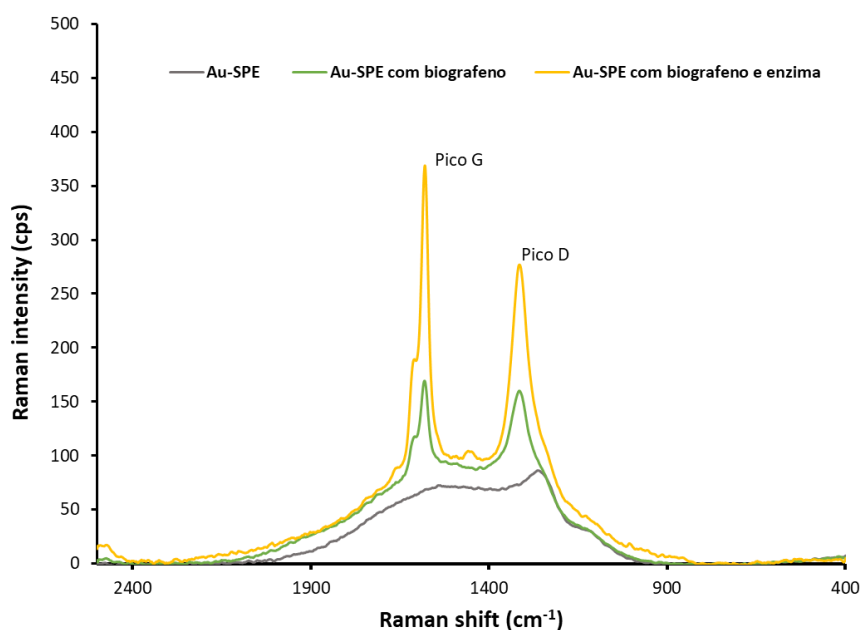


Figura 59-Gráfico com os espectros resultantes da análise de *Raman* para os diferentes materiais imobilizados na superfície do Au-SPE.

Tabela 11- Valores das Bandas D e G e respectivo índice ID/IG, obtidos pela análise de *Raman* para os diferentes materiais utilizados.

Materiais	Banda D	Banda G	ID/IG
Au-SPE	86,641	72,349	1,198
Au-SPE com Bgr	160,802	169,224	0,950
Au-SPE com Bgr e enzima	276,25	368,72	0,749

A partir das intensidades adquiridas pela análise dos espectros, foram comparados os diferentes materiais entre si. Em relação ao Au-SPE e ao Au-SPE com Bgr, a relação de ID/IG é inferior na presença do Bgr (0,950), demonstrando assim que tem um número menor de defeitos estruturais. Estes resultados são esperados, uma vez que a superfície de ouro do eletrodo é à base de uma tinta, e adicionalmente, os defeitos em espectros *Raman* de grafeno são geralmente menores do que em ouro devido à estrutura cristalina altamente ordenada do grafeno e à sensibilidade da técnica *Raman* à estrutura atômica e simetria molecular. Em contraste, o ouro, sendo um metal com estrutura atômica menos regular, é mais propenso a impurezas e desordem, resultando em espectros *Raman* com maior presença de defeitos [208].

Relativamente aos espectros do Au-SPE e o Au-SPE com Bgr e enzima, verificou-se que houve uma diminuição na relação de ID/IG de 1,98 para 0,749. Mais uma vez, isto indicou que os defeitos diminuíram, havendo um aumento de cristalinidade, que foi estimulado pelas ligações entre a enzima e os grupos amino e carboxílico da BSA presente no Bgr (ligações *van der Waals*) [209].

#### 4.2.5. TEM

A caracterização morfológica do Bgr foi realizada através da técnica de microscópio de eletrodo de transmissão, TEM. As imagens foram representadas com uma ampliação inicial de 100,000 x, tendo posteriormente sido aumentada para 200,000 x, para uma melhor visualização da estrutura do Bgr.

Na Figura 60(A), foram visualizadas as folhas de grafite que constituem o Bgr. Estas foram identificadas através da presença de manchas escuras, que são resultado do empilhamento coletivo das folhas de grafeno [210].

Relativamente à imagem da Figura 60 (B), foram observadas com maior pormenor as nanopartículas constituintes do Bgr. A análise desta imagem permitiu apontar que este material era policristalino, devido a presença de zonas porosas (regiões a branco), e de as partículas estarem orientadas em diferentes direções [210].

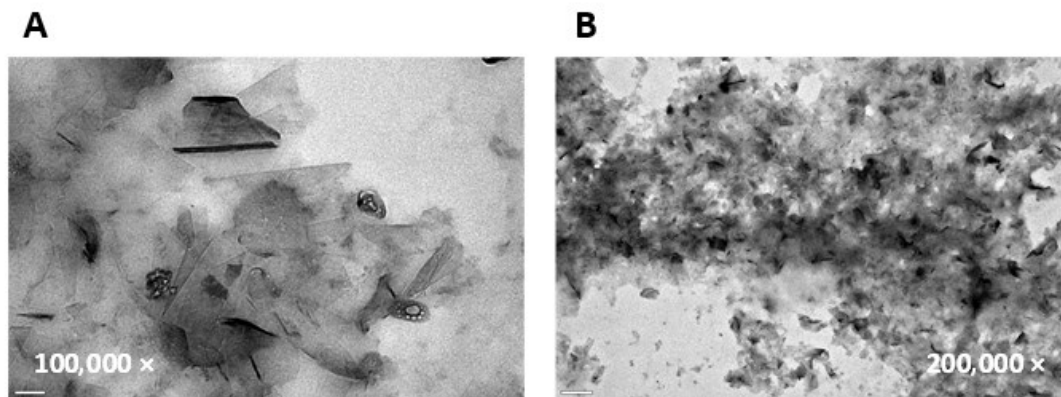


Figura 60-Resultados relativos à análise por TEM do Bgr (A) Imagem TEM do Bgr com uma ampliação de 100,000 x (B) Imagem TEM do Bgr com uma ampliação de 200,000 x.





## 5. CONCLUSÃO

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões deste trabalho, bem como são abordadas possíveis investigações futuras para melhorar a capacidade/funcionamento deste biossensor.

### 5.1. Conclusões finais

Nos últimos anos o número de diabéticos tem vindo a aumentar, pelo que se torna urgente desenvolver estratégias mais eficientes e eficazes para o diagnóstico da diabetes. Assim, através do diagnóstico precoce da diabetes é reduzido o número de comorbidades a esta associadas, aumentando a qualidade de vida do paciente.

Apesar de existirem diferentes dispositivos / técnicas de diagnóstico e monitorização da diabetes, muitos deles não apresentam praticidade e simplicidade para o paciente, levando a que este descuide a sua saúde. Além disso, a gama de oferta deste tipo de dispositivos ainda é muito limitada, estando aliada a um elevado custo.

Assim sendo, por forma a tornar o diagnóstico da diabetes mais prático, simples e barato, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico, que face às técnicas convencionais, consegue colmatar os problemas associados aos limites de deteção e estabilidade.

O presente estudo focou-se no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico enzimático para a deteção da glucose, através da utilização de Au-SPEs com a incorporação de um nanomaterial biocompatível (Bgr) e posterior imobilização da enzima GOx.

Relativamente às técnicas experimentais adotadas neste trabalho, foram aplicados dois métodos de imobilização da enzima GOx, a adsorção e o aprisionamento (com glutaraldeído e sem glutaraldeído), e testados, em cada um deles, dois tempos de incubação diferentes (2 horas e 12 horas). Em cada um dos métodos o Bgr foi inicialmente imobilizado na superfície do eléctrodo do trabalho, com posterior incubação da enzima na sua superfície. Posteriormente, foi aplicada a técnica de voltametria cíclica para identificação do pico de oxidação, que ocorreu para um potencial de 0,6 V. Após a identificação do pico de oxidação, foi empregue a técnica de cronoamperometria com um potencial de 0,6 V durante 120 s, com soluções de glucose com diferentes concentrações, tendo-se verificado que havia uma relação proporcional entre a concentração das soluções de glucose e a corrente. Através da análise dos cronoamperogramas, foram construídas as retas de calibração que permitiram identificar a gama de resposta do biossensor e a sua sensibilidade. A cinética enzimática foi também avaliada pelo método de *Michaelis-Menten*, que forneceu informações como: afinidade da enzima ao substrato ( $K_D$ ) e a região a partir da qual a enzima vai ficar saturada ( $V_{max}$ ).

Após a análise dos cronoamperogramas, voltamogramas e o gráfico de *Michaelis-Menten* gerados, verificou-se que o método de adsorção da GOx durante 2 horas, apresentava uma maior gama de resposta com um LIRL mais baixo, um maior declive (sinónimo de maior sensibilidade), e um valor de  $V_{max}$  mais elevado. Ademais, este método face ao método de aprisionamento é experimentalmente mais simples, rápido e de menor custo. Com a identificação do melhor método de imobilização da enzima, este foi testado em soro comercial e com dois compostos (interferentes) presentes no soro humano, avaliando assim a sua capacidade de resposta numa matriz biológica, aproximando a sua aplicação à “realidade”. Apesar da gama de resposta do biossensor em soro comercial ter sido baixa, este apresentou um elevado declive, apresentando sensibilidade, mesmo estando em contacto com possíveis substâncias interferentes.

Complementarmente ao estudo experimental efetuado, foram aplicadas as técnicas de espectroscopia de *Raman* e de TEM, que permitiram comprovar as modificações efetuadas na superfície do biossensor bem como para determinar a estrutura cristalina do biografeno, respetivamente.

Concluindo, o biossensor desenvolvido é funcional, tendo como principais características a sua seletividade, sensibilidade perante a presença da glucose e simplicidade. Desta forma, a abordagem adotada neste estudo pode vir a ser aplicada futuramente para desenvolvimento de biossensores miniaturizados, baratos e precisos.

## 5.2. Limitações e investigação futura

As principais limitações do biossensor desenvolvido estão relacionadas com a cinética enzimática, pois verificou-se que a capacidade de ligação da enzima ao substrato era menor no método de adsorção do que no de aprisionamento com glutaraldeído e tiramina durante 12 horas. Este facto deve-se às ligações que são estabelecidas entre a enzima e o substrato, que são fracas, levando a que após sucessivas medições dos níveis de glucose, possa ocorrer a dessorção da enzima. Assim, de forma a tentar tornar o biossensor mais reprodutível e aumentar a sua capacidade de resposta, pretende-se aplicar a mesma metodologia utilizando o nanomaterial *Prussian Blue*. Este nanomaterial vai permitir que o pico de oxidação ocorra para um potencial mais baixo, tornando assim o biossensor mais sensível. Uma outra estratégia a adotar futuramente é a monitorização contínua dos valores de glucose no fluído intersticial com recurso a microagulhas modificadas com materiais condutores.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W. H. Organization, “Diabetes.” [https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1) (accessed Sep. 23, 2023).
- [2] A. M. Egan and S. F. Dinneen, “What is diabetes?,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 47, no. 1, pp. 1–4, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.10.002>.
- [3] E. F. Brutsaert, “Complicações do Diabetes mellitus - Distúrbios hormonais e metabólicos - Manual MSD Versão Saúde para a Família.” <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/disturbios-hormonais-e-metabolicos/diabetes-mellitus-dm-e-disturbios-do-metabolismo-da-glicose-no-sangue/complicacoes-do-diabetes-mellitus> (accessed Sep. 23, 2023).
- [4] M. Vučić Lovrenčić, V. Radišić Biljak, S. Božičević, E. Pape-Medvidović, and S. Ljubić, “Validation of Point-of-Care Glucose Testing for Diagnosis of Type 2 Diabetes,” *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2013, p. 206309, 2013, doi: [10.1155/2013/206309](https://doi.org/10.1155/2013/206309).
- [5] H. Hadžović *et al.*, “Use of Biosensors in Diabetes Monitoring: Medical and Economic Aspects,” in *CMBEBIH 2019*, 2020, pp. 761–768.
- [6] H. Sun *et al.*, “IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 183, p. 109119, 2022, doi: [10.1016/j.diabres.2021.109119](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119).
- [7] I. D. Federation, “Diabetes Facets and Figures.” <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/> (accessed Sep. 24, 2023).
- [8] S. N. de Saúde, “79 mil novos casos de Diabetes registados no SNS no último ano - INEM.” <https://www.inem.pt/2022/12/02/79-mil-novos-casos-de-diabetes-registados-no-sns-no-ultimo-ano/> (accessed Sep. 24, 2023).
- [9] I. D. Federation, “Portugal diabetes report 2000 — 2045.” <https://diabetesatlas.org/data/en/country/159/pt.html> (accessed Sep. 24, 2023).
- [10] D. Glovaci, W. Fan, and N. D. Wong, “Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease,” *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 21, no. 4, p. 21, 2019, doi: [10.1007/s11886-019-1107-y](https://doi.org/10.1007/s11886-019-1107-y).
- [11] E. F. Brutsaert, “Diabetes mellitus (DM) - Distúrbios endócrinos e metabólicos - Manuais MSD edição para profissionais,” 2022. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/disturbios-endocrinos-e-metabolicos/diabetes-mellitus-e-disturbios-do-metabolismo-de-carboidratos/diabetes-melito-dm> (accessed Sep. 24, 2023).
- [12] D. P. Pereira, “Conheça os tipos de diabetes.” <https://www.lusiadas.pt/blog/doencas/doencas-cronicas/conheca-tipos-diabetes> (accessed Sep. 24, 2023).
- [13] M. D. P. Carolina Solis-Herrera, MD, Curtis Triplitt, PharmD, Charles Reasner, M.D., Ralph A DeFronzo, M.D., and Eugenio Cersosimo, “Classification of Diabetes Mellitus,” Inc, Ed. 2018.
- [14] M. M. S. Lara A. Friel (university of Texas Health Medical School at Houston, “Diabetes mellitus na gestação - Ginecologia e obstetrícia - Manuais MSD edição para profissionais,” 2022. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/ginecologia-e-obstetrícia/gestacao-complicada-por-doencas/diabetes-mellitus-na-gestacao> (accessed Sep. 24, 2023).
- [15] World Health Organization, “Diabetes.” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed Sep. 24, 2023).
- [16] Z. Peng *et al.*, “Blood glucose sensors and recent advances: A review,” *J. Innov. Opt. Health Sci.*, vol. 15, no. 2, 2022, doi: [10.1142/S1793545822300038](https://doi.org/10.1142/S1793545822300038).
- [17] T. J. Lyons and A. Basu, “Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers,” *Transl. Res.*, vol. 159, no. 4, pp. 303–312, 2012, doi:

- <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.009>.
- [18] W. Z. Gan, V. Ramachandran, C. S. Y. Lim, and R. Y. Koh, “Omics-based biomarkers in the diagnosis of diabetes,” *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, vol. 31, no. 2, p. 20190120, 2020, doi: doi:10.1515/jbcpp-2019-0120.
- [19] M. S. García-Gutiérrez, F. Navarrete, F. Sala, A. Gasparyan, A. Austrich-Olivares, and J. Manzanares, “Biomarkers in Psychiatry: Concept, Definition, Types and Relevance to the Clinical Reality,” *Front. Psychiatry*, vol. 11, no. May, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3389/fpsyt.2020.00432.
- [20] Roche, “O que são biomarcadores? | Roche.” <https://www.corporate.roche.pt/pt/inovacao-e-desenvolvimento0/ensaios-clinicos/ensaios-clinicos-para-profissionais-de-saude/o-que-sao-biomarcadores-.html> (accessed Sep. 24, 2023).
- [21] G. Kaiafa *et al.*, “Is HbA1c an ideal biomarker of well-controlled diabetes?,” *Postgrad. Med. J.*, vol. 97, no. 1148, pp. 380–383, 2020, doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138756.
- [22] R. M. Bookchin and P. M. Gallop, “Structure of hemoglobin A1c: Nature of the N-terminal  $\beta$  chain blocking group,” *Biochem. Biophys. Res. Communications.*, vol. 32, no. 1, pp. 86–93, 1968, doi: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90430-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90430-0).
- [23] “Hemoglobina Glicada: Aliada ao diagnóstico da Diabetes.” <https://www.biosalli.com.br/post/hemoglobina-glicada-aliada-ao-diagnostico-da-diabetes> (accessed Sep. 24, 2023).
- [24] Direção-Geral da Saúde, “Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus,” *Norma da Direção Geral da Saúde*, pp. 1–13, 2011.
- [25] B. Dorcely *et al.*, “Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications,” *Diabetes, Metab. Syndr. Obes.*, vol. 10, pp. 345–361, 2017, doi: 10.2147/DMSO.S100074.
- [26] H. Malmström, G. Walldius, V. Grill, I. Jungner, S. Gudbjörnsdóttir, and N. Hammar/Lar, “Fructosamine is a useful indicator of hyperglycaemia and glucose control in clinical and epidemiological studies - Cross-sectional and longitudinal experience from the AMORIS cohort,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0111463.
- [27] N. Furusyo and J. Hayashi, “Glycated albumin and diabetes mellitus,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 12, pp. 5509–5514, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.010>.
- [28] W.-C. Wu *et al.*, “Serum Glycated Albumin to Guide the Diagnosis of Diabetes Mellitus,” *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0146780.
- [29] S. M. Kosecki, P. T. Rodgers, and M. B. Adams, “Glycemic Monitoring in Diabetics with Sickle Cell Plus  $\beta$ -Thalassemia Hemoglobinopathy,” *Ann. Pharmacother.*, vol. 39, no. 9, pp. 1557–1560, Sep. 2005, doi: 10.1345/aph.1G010.
- [30] A. E. Achari and S. K. Jain, “Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, 2017, doi: 10.3390/ijms18061321.
- [31] A. G. Tabák *et al.*, “Adiponectin trajectories before type 2 diabetes diagnosis: Whitehall II study,” *Diabetes Care*, vol. 35, no. 12, pp. 2540–2547, 2012, doi: 10.2337/dc11-2263.
- [32] K. J. Mather *et al.*, “Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the diabetes prevention program,” *Diabetes*, vol. 57, no. 4, pp. 980–986, 2008, doi: 10.2337/db07-1419.
- [33] M. ; Migala, Marta ; Chalubińska-Fendler, Justyna ; Zielińska, “1,5-Anidroglicitol como marcador de hiperglicemia aguda em eventos cardiovasculares,” vol. 18. .
- [34] T. Yamanouchi and Y. Akanuma, “Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): New clinical marker for glycemic control,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 24, pp. S261–S268, 1994, doi: [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(94\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0168-8227(94)90259-3).

- [35] L. U. Pagan, M. Gatto, P. F. Martinez, K. Okoshi, and M. P. Okoshi, “Biomarkers in Cardiovascular Disease: The Role of Fetuin-A,” *Arq. Bras. Cardiol.*, vol. 118, no. 1, pp. 22–23, 2022, doi: 10.36660/abc.20210980.
- [36] A. Birukov, E. Polemiti, S. Jäger, N. Stefan, and M. B. Schulze, “Fetuin-A and risk of diabetes-related vascular complications: a prospective study,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 21, no. 1, p. 6, 2022, doi: 10.1186/s12933-021-01439-8.
- [37] W. Villena Gonzales, A. T. Mobashsher, and A. Abbosh, “The Progress of Glucose Monitoring—A Review of Invasive to Minimally and Non-Invasive Techniques, Devices and Sensors,” *Sensors*, vol. 19, no. 4, 2019, doi: 10.3390/s19040800.
- [38] P. Rossetti, J. Bondia, J. Vehí, and C. G. Fanelli, “Estimating Plasma Glucose from Interstitial Glucose: The Issue of Calibration Algorithms in Commercial Continuous Glucose Monitoring Devices,” *Sensors*, vol. 10, no. 12, pp. 10936–10952, 2010, doi: 10.3390/s101210936.
- [39] N. S. Oliver, C. Toumazou, A. E. G. Cass, and D. G. Johnston, “Glucose sensors: a review of current and emerging technology,” *Diabet. Med.*, vol. 26, no. 3, pp. 197–210, 2009, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02642.x>.
- [40] Lin, A. V. (2015). Direct ELISA. *Methods in Molecular Biology*, 1318, 61–67. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_6).
- [41] L. G. Johnsen, P. B. Skou, B. Khakimov, and R. Bro, “Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1503, pp. 57–64, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.052>.
- [42] M. L. Di Gioia *et al.*, “Quantitative analysis of human salivary glucose by gas chromatography–mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B*, vol. 801, no. 2, pp. 355–358, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.024>.
- [43] J. Hagvik, “Glucose measurement: Time for a gold standard,” *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 1, no. 2, pp. 169–172, 2007, doi: 10.1177/193229680700100205.
- [44] E. Andreis, K. Kullmer, and M. Appel, “Application of the reference method Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry (ID/GC/MS) to establish metrological traceability for calibration and control of blood glucose test systems,” *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 8, no. 3, pp. 508–515, 2014, doi: 10.1177/1932296814523886.
- [45] L. Dong *et al.*, “Green synthesis of platinum nanoclusters using lentinan for sensitively colorimetric detection of glucose,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 172, pp. 289–298, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.049.
- [46] Thermo Fisher Scientific, “Glucose Colorimetric Detection Kit.” [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EIAGLUC?gclid=CjwKCAjw9J2iBhBPEiwAErwpeZZD2wt6qsoKPGLC7CvifZEoy23nP2ChZfcEa9aJ2bLAahkhq\\_BUIBoC4DcQAvD\\_BwE&ef\\_id=CjwKCAjw9J2iBhBPEiwAErwpeZZD2wt6qsoKPGLC7CvifZEoy23nP2ChZfcEa9aJ2bLAahkhq\\_BUIBoC4DcQAvD\\_Bw](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EIAGLUC?gclid=CjwKCAjw9J2iBhBPEiwAErwpeZZD2wt6qsoKPGLC7CvifZEoy23nP2ChZfcEa9aJ2bLAahkhq_BUIBoC4DcQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjw9J2iBhBPEiwAErwpeZZD2wt6qsoKPGLC7CvifZEoy23nP2ChZfcEa9aJ2bLAahkhq_BUIBoC4DcQAvD_Bw) (accessed Sep. 24, 2023).
- [47] L. Tang, S. J. Chang, C.-J. Chen, and J.-T. Liu, “Non-Invasive Blood Glucose Monitoring Technology: A Review,” *Sensors*, vol. 20, no. 23, 2020, doi: 10.3390/s20236925.
- [48] ACCU-CHEK, “System de Accu-Check instant.” <https://www.accu-chek.pt/instant-forward> (accessed Sep. 24, 2023).
- [49] J. & Johnson, “LifeScan Launches ONETOUCH® SelectSimple™ Blood Glucose Monitor With Audio Alerts.” <https://www.jnj.com/media-center/press-releases/lifescan-launches-onetouch-selectsimple-blood-glucose-monitor-with-audio-alerts> (accessed Sep. 24, 2023).
- [50] Abbott, “Sistema de Monitorização da Glicose - FreeStyle Libre | Abbott.” <https://www.freestyle.abbott/pt-pt/home.html> (accessed Sep. 24, 2023).
- [51] A. Lusa, “Lançado em Portugal medidor de glicose sem picadas nos dedos - Sociedade - RTP Madeira - RTP,” 2016. Accessed: Sep. 24, 2023. [Online]. Available:

- [https://www.rtp.pt/madeira/sociedade/lancado-em-portugal-medidor-de-glicose-sem-picadas-nos-dedos\\_4566](https://www.rtp.pt/madeira/sociedade/lancado-em-portugal-medidor-de-glicose-sem-picadas-nos-dedos_4566).
- [52] S. Y. Georg Thieme Verlag, “O Sistema Ulm Zucker Uhr e suas consequências,” vol. 26. .
- [53] D. Rodbard, “Continuous Glucose Monitoring: A Review of Successes, Challenges, and Opportunities,” *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 18, no. S2, pp. S23–S213, 2016, doi: 10.1089/dia.2015.0417.
- [54] H. Lane, Jennifer E.; Arrepios, Joseph P.; Zisser, “Continous glucose monitors–Current status and future developments,” vol. 20. .
- [55] L. Heinemann and A. Stuhr, “Self-measurement of blood glucose and continuous glucose monitoring - Is there only one future?,” *Eur. Endocrinol.*, vol. 14, no. 2, pp. 24–29, 2018, doi: 10.17925/EE.2018.14.2.24.
- [56] G. Freckmann, “Basics and use of continuous glucose monitoring (CGM) in diabetes therapy,” *J. Lab. Med.*, vol. 44, no. 2, pp. 71–79, 2020, doi: 10.1515/labmed-2019-0189.
- [57] P. Trucillo, “Discrete and Continuous Glucose Monitoring Systems: The Point of View of a Patient Affected by Type-1 Diabetes,” *Processes*, vol. 10, no. 12, 2022, doi: 10.3390/pr10122706.
- [58] P. Mehrotra, “Biosensors and their applications – A review,” *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- [59] J. D. Newman and A. P. F. Turner, “Home blood glucose biosensors: a commercial perspective,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. 12, pp. 2435–2453, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.012>.
- [60] A. Haleem, M. Javaid, R. P. Singh, R. Suman, and S. Rab, “Biosensors applications in medical field: A brief review,” *Sensors Int.*, vol. 2, p. 100100, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>.
- [61] Wang, J. (2001). Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges. *Electroanalysis*. Wiley-VCH Verlag. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200108\)](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200108)).
- [62] Narayanaswamy, R., & Wolfbeis, O. S. (2006). *Chemical Sensors and Biosensors Methods and Applications Optical Sensors Industrial Environmental and Diagnostic Applications. Techniques* (Vol. 4, p. 251).
- [63] M.-S. Steiner, A. Duerkop, and O. S. Wolfbeis, “Optical methods for sensing glucose,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 9, pp. 4805–4839, 2011, doi: 10.1039/C1CS15063D.
- [64] P. E. Amador Salomão, “Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão,” *Res. Soc. Dev.*, vol. 7, no. 3, p. e1373282, 2018, doi: 10.17648/rsd-v7i3.282.
- [65] I. Ahmed *et al.*, “Recent advances in optical sensors for continuous glucose monitoring,” *Sens. Diagn.*, vol. 1, no. 6, pp. 1098–1125, 2022, doi: 10.1039/D1SD00030F.
- [66] D. Yang *et al.*, “Glucose Sensing Using Surface-Enhanced Raman-Mode Constraining,” *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 24, pp. 14269–14278, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03420.
- [67] J. T. Olesberg, L. Liu, V. Van Zee, and M. A. Arnold, “In Vivo Near-Infrared Spectroscopy of Rat Skin Tissue with Varying Blood Glucose Levels,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 1, pp. 215–223, Jan. 2006, doi: 10.1021/ac051036i.
- [68] J. Chen, M. A. Arnold, and G. W. Small, “Comparison of Combination and First Overtone Spectral Regions for Near-Infrared Calibration Models for Glucose and Other Biomolecules in Aqueous Solutions,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 18, pp. 5405–5413, 2004, doi: 10.1021/ac0498056.
- [69] S. Yu, L. Ding, H. Lin, W. Wu, and J. Huang, “A novel optical fiber glucose biosensor based on carbon quantum dots-glucose oxidase/cellulose acetate complex sensitive film,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 146, p. 111760, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111760>.
- [70] D. Dey and T. Goswami, “Optical biosensors: A revolution towards quantum nanoscale

- electronics device fabrication,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/348218.
- [71] H. O. Kaya, A. E. Cetin, M. Azimzadeh, and S. N. Topkaya, “Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 882, p. 114989, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114989>.
- [72] P. Bhattarai and S. Hameed, “Basics of biosensors and nanobiosensors,” *Nanobiosensors From Des. to Appl.*, pp. 1–22, 2020, doi: 10.1002/9783527345137.ch1.
- [73] H. Li, X. Liu, L. Li, X. Mu, R. Genov, and A. J. Mason, “CMOS Electrochemical Instrumentation for Biosensor Microsystems: A Review,” *Sensors*, vol. 17, no. 1, 2017, doi: 10.3390/s17010074.
- [74] Metrohm, “Screen-Printed Gold Electrode (Aux.:Au; Ref.:Ag) / Ink AT |.” <https://www.metrohm.com/en/products/2/20at/220at.html> (accessed Sep. 24, 2023).
- [75] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, “Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures,” *Sensors*, vol. 8, no. 3, pp. 1400–1458, 2008, doi: 10.3390/s80314000.
- [76] A. Chaubey and B. D. Malhotra, “Mediated biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 17, no. 6, pp. 441–456, 2002, doi: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X).
- [77] E. Muthusankar, S. M. Wabaidur, Z. A. Alothman, M. R. Johan, V. K. Ponnusamy, and D. Ragupathy, “Fabrication of amperometric sensor for glucose detection based on phosphotungstic acid–assisted PDPA/ZnO nanohybrid composite,” *Ionics (Kiel)*, vol. 26, no. 12, pp. 6341–6349, 2020, doi: 10.1007/s11581-020-03740-0.
- [78] W. Zhang, C. Liu, X. Zou, H. Zhang, and X. Xu, “Micrometer-scale light-addressable potentiometric sensor on an optical fiber for biological glucose determination,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1123, pp. 36–43, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.008>.
- [79] I. Rassas *et al.*, “Highly Sensitive Voltametric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Encapsulated in a Chitosan/Kappa-Carrageenan/Gold Nanoparticle Bionanocomposite,” *Sensors*, vol. 19, no. 1, 2019, doi: 10.3390/s19010154.
- [80] Y. Ito *et al.*, “Third generation impedimetric sensor employing direct electron transfer type glucose dehydrogenase,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 129, pp. 189–197, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.018>.
- [81] S. Chevion, M. A. Roberts, and M. Chevion, “The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 28, no. 6, pp. 860–870, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00178-7).
- [82] P. Daubinger, J. Kieninger, T. Unmüßig, and G. A. Urban, “Electrochemical characteristics of nanostructured platinum electrodes-A cyclic voltammetry study,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 18, pp. 8392–8399, 2014, doi: 10.1039/c4cp00342j.
- [83] K. Promsuwan *et al.*, “Novel biosensor platform for glucose monitoring via smartphone based on battery-less NFC potentiostat,” *Talanta*, vol. 256, p. 124266, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124266>.
- [84] R. Bi, X. Ma, K. Miao, P. Ma, and Q. Wang, “Enzymatic biosensor based on dendritic gold nanostructure and enzyme precipitation coating for glucose sensing and detection,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 162, p. 110132, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110132>.
- [85] Z. Cao *et al.*, “Rapid Quantitative Detection of Live Escherichia coli Based on Chronoamperometry,” *Biosensors*, vol. 12, no. 10, 2022, doi: 10.3390/bios12100845.
- [86] Rogers, J. A., Maznev, A. A., Banet, M. J., & Nelson, K. A. (2000). Optical generation and characterization of acoustic waves in thin films: Fundamentals and applications. *Annual Review of Materials Science*, 30, 117–157].
- [87] C. N. Kotanen, F. G. Moussy, S. Carrara, and A. Guiseppi-Elie, “Implantable enzyme

- amperometric biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 35, no. 1, pp. 14–26, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.03.016>.
- [88] T. Sridara, J. Upan, G. Saianand, A. Tuantranont, C. Karuwan, and J. Jakmunee, “Non-Enzymatic Amperometric Glucose Sensor Based on Carbon Nanodots and Copper Oxide Nanocomposites Electrode,” *Sensors*, vol. 20, no. 3, 2020, doi: 10.3390/s20030808.
- [89] A. D. Daud *et al.*, “An effective metal-organic framework-based electrochemical non-enzymatic glucose sensor,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 921, p. 116676, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2022.116676>.
- [90] H. Karimi-Maleh *et al.*, “A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 184, p. 113252, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113252>.
- [91] A. Singh *et al.*, “Recent Advances in Electrochemical Biosensors: Applications, Challenges, and Future Scope,” *Biosensors*, vol. 11, no. 9, 2021, doi: 10.3390/bios11090336.
- [92] R. Maalouf, H. Chebib, Y. Saikali, O. Vittori, M. Sigaud, and N. Jaffrezic-Renault, “Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion® and a methyl viologen modified glassy carbon electrode,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 11, pp. 2682–2688, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.11.003>.
- [93] E. B. Bahadır and M. K. Sezgentürk, “A review on impedimetric biosensors,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 248–262, 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.942456.
- [94] C. Chai and S. W. Oh, “Electrochemical impedimetric biosensors for food safety,” *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 29, no. 7, pp. 879–887, 2020, doi: 10.1007/s10068-020-00776-w.
- [95] A. Silva, “Estudo do comportamento eletroquímico do nióbio sob carregamentos e descarregamento de hidrogênio,” *Univ. Fed. do Paraná, Curitiba*, 2007.
- [96] E. B. Bahadır and M. K. Sezgentürk, “Electrochemical biosensors for hormone analyses,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 68, pp. 62–71, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.054>.
- [97] C. Boukharouba *et al.*, “Dendritic Cu(OH)<sub>2</sub> nanostructures decorated pencil graphite electrode as a highly sensitive and selective impedimetric non-enzymatic glucose sensor in real human serum blood samples,” *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, vol. 153, no. 2, pp. 171–181, 2022, doi: 10.1007/s00706-021-02883-8.
- [98] A. K. Singh, N. Jaiswal, I. Tiwari, M. Ahmad, and S. R. P. Silva, “Electrochemical biosensors based on in situ grown carbon nanotubes on gold microelectrode array fabricated on glass substrate for glucose determination,” *Microchim. Acta*, vol. 190, no. 2, p. 55, 2023, doi: 10.1007/s00604-022-05626-6.
- [99] M. A. Morales and J. M. Halpern, “Guide to Selecting a Biorecognition Element for Biosensors,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 29, no. 10, pp. 3231–3239, 2018, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592.
- [100] L. Moreira Gonçalves, “Electropolymerized molecularly imprinted polymers: perceptions based on recent literature for soon-to-be world-class scientists,” *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 25, p. 100640, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.09.007>.
- [101] Y. Cheng *et al.*, “The construction of molecularly imprinted electrochemical biosensor for selective glucose sensing based on the synergistic enzyme-enzyme mimic catalytic system,” *Talanta*, vol. 242, p. 123279, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123279>.
- [102] H. Wu, W. Zheng, Y. Jiang, J. Xu, and F. Qiu, “Construction of a selective non-enzymatic electrochemical sensor based on hollow nickel nanospheres/carbon dots–chitosan and molecularly imprinted polymer film for the detection of glucose,” *New J. Chem.*, vol. 45, no. 46, pp. 21676–21683, 2021, doi: 10.1039/D1NJ03864H.
- [103] S. Ding *et al.*, “Integrating ionic liquids with molecular imprinting technology for biorecognition and biosensing: A review,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 149, no. October 2019, p. 111830, 2020, doi:

- 10.1016/j.bios.2019.111830.
- [104] G. Ştefan, O. Hosu, K. De Wael, M. J. Lobo-Castañón, and C. Cristea, “Aptamers in biomedicine: Selection strategies and recent advances,” *Electrochim. Acta*, vol. 376, p. 137994, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.137994>.
- [105] Q. Zhu, G. Liu, and M. Kai, “DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases,” *Molecules*, vol. 20, no. 12, pp. 20979–20997, 2015, doi: 10.3390/molecules201219739.
- [106] J. Zhou *et al.*, “Cell-Specific RNA Aptamer against Human CCR5 Specifically Targets HIV-1 Susceptible Cells and Inhibits HIV-1 Infectivity,” *Chem. Biol.*, vol. 22, no. 3, pp. 379–390, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.005>.
- [107] I. Bazin, S. A. Tria, A. Hayat, and J.-L. Marty, “New biorecognition molecules in biosensors for the detection of toxins,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 87, pp. 285–298, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.083>.
- [108] S. Liu, Z. Shen, L. Deng, and G. Liu, “Smartphone assisted portable biochip for non-invasive simultaneous monitoring of glucose and insulin towards precise diagnosis of prediabetes/diabetes,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 209, p. 114251, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114251>.
- [109] A. Futane, V. Narayanamurthy, P. Jadhav, and A. Srinivasan, “Aptamer-based rapid diagnosis for point-of-care application,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 27, no. 2, p. 15, 2023, doi: 10.1007/s10404-022-02622-3.
- [110] A. Shahbaz, N. Hussain, A. Intisar, M. Bilal, and H. M. N. Iqbal, “Immobilized Enzymes-Based Biosensing Cues for Strengthening Biocatalysis and Biorecognition,” *Catal. Letters*, vol. 152, no. 9, pp. 2637–2649, 2022, doi: 10.1007/s10562-021-03866-4.
- [111] O. Amor-Gutiérrez, E. Costa-Rama, and M. T. Fernández-Abedul, “Paper-Based Enzymatic Electrochemical Sensors for Glucose Determination,” *Sensors*, vol. 22, no. 16, 2022, doi: 10.3390/s22166232.
- [112] C. M. Wong, K. H. Wong, and X. D. Chen, “Glucose oxidase: Natural occurrence, function, properties and industrial applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 78, no. 6, pp. 927–938, 2008, doi: 10.1007/s00253-008-1407-4.
- [113] V. Osuna, A. Vega-Rios, E. A. Zaragoza-Contreras, I. A. Estrada-Moreno, and R. B. Dominguez, “Progress of Polyaniline Glucose Sensors for Diabetes Mellitus Management Utilizing Enzymatic and Non-Enzymatic Detection,” *Biosensors*, vol. 12, no. 3, 2022, doi: 10.3390/bios12030137.
- [114] M. H. Hassan, C. Vyas, B. Grieve, and P. Bartolo, “Recent Advances in Enzymatic and Non-Enzymatic Electrochemical Glucose Sensing,” *Sensors*, vol. 21, no. 14, 2021, doi: 10.3390/s21144672.
- [115] I. Jeerapan, J. R. Sempionatto, J.-M. You, and J. Wang, “Enzymatic glucose/oxygen biofuel cells: Use of oxygen-rich cathodes for operation under severe oxygen-deficit conditions,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 122, pp. 284–289, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.063>.
- [116] N. German, A. Popov, A. Ramanavicius, and A. Ramanaviciene, “Development and Practical Application of Glucose Biosensor Based on Dendritic Gold Nanostructures Modified by Conducting Polymers,” *Biosensors*, vol. 12, no. 8, 2022, doi: 10.3390/bios12080641.
- [117] J. Chen, A. Nilghaz, X. Chen, S. Liu, and J. Tian, “Direct Electrochemical Detection of Glucose on PEDOT Functionalized Screen-Printed Electrodes,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 169, no. 8, p. 87502, 2022, doi: 10.1149/1945-7111/ac8378.
- [118] S. H. Baek *et al.*, “Cu-nanoflower decorated gold nanoparticles-graphene oxide nanofiber as electrochemical biosensor for glucose detection,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 107, p. 110273, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110273>.

- [119] K. Jayakumar, R. Bennett, and D. Leech, "Electrochemical glucose biosensor based on an osmium redox polymer and glucose oxidase grafted to carbon nanotubes: A design-of-experiments optimisation of current density and stability," *Electrochim. Acta*, vol. 371, p. 137845, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.137845>.
- [120] W.-Y. Jeon *et al.*, "A stable glucose sensor with direct electron transfer, based on glucose dehydrogenase and chitosan hydro bonded multi-walled carbon nanotubes," *Biochem. Eng. J.*, vol. 187, p. 108589, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108589>.
- [121] Q. Mei *et al.*, "Electrospinning of highly dispersed Ni/CoO carbon nanofiber and its application in glucose electrochemical sensor," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 847, p. 113075, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.04.035>.
- [122] D. S. Kim *et al.*, "Development of GO/Co/Chitosan-Based Nano-Biosensor for Real-Time Detection of D-Glucose," *Biosensors*, vol. 12, no. 7, 2022, doi: 10.3390/bios12070464.
- [123] M.-H. Lin, S. Gupta, C. Chang, C.-Y. Lee, and N.-H. Tai, "Carbon nanotubes/polyethylenimine/glucose oxidase as a non-invasive electrochemical biosensor performs high sensitivity for detecting glucose in saliva," *Microchem. J.*, vol. 180, p. 107547, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107547>.
- [124] E. H. Yoo and S. Y. Lee, "Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice," *Sensors*, vol. 10, no. 5, pp. 4558–4576, 2010, doi: 10.3390/s100504558.
- [125] V. B. Juska and M. E. Pemble, "A Critical Review of Electrochemical Glucose Sensing: Evolution of Biosensor Platforms Based on Advanced Nanosystems," *Sensors*, vol. 20, no. 21, 2020, doi: 10.3390/s20216013.
- [126] J. Wang, J. Liu, L. Chen, and F. Lu, "Highly Selective Membrane-Free, Mediator-Free Glucose Biosensor," *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 21, pp. 3600–3603, 1994, doi: 10.1021/ac00093a011.
- [127] K. K. T. I. M. S. H. S. Seiya TSUJIMURA Shinki KOJIMA and H. OMURA, "Novel FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-Insensitive Glucose Biosensor," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 70, no. 3, pp. 654–659, 2006, doi: 10.1271/bbb.70.654.
- [128] A. Heller and B. Feldman, "Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 7, pp. 2482–2505, 2008, doi: 10.1021/cr068069y.
- [129] A. Heller and B. Feldman, "Electrochemistry in Diabetes Management," *Acc. Chem. Res.*, vol. 43, no. 7, pp. 963–973, 2010, doi: 10.1021/ar9002015.
- [130] P. Rafighi, M. Tavahodi, and B. Haghghi, "Fabrication of a third-generation glucose biosensor using graphene-polyethyleneimine-gold nanoparticles hybrid," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 232, pp. 454–461, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.03.147>.
- [131] V. B. Juska and M. E. Pemble, "A dual-enzyme micro-band array biosensor based on the electrodeposition of carbon nanotubes embedded in chitosan and nanostructured Au-foams on microfabricated gold band electrodes," *Analyst*, vol. 145, no. 2, pp. 402–414, 2020, doi: 10.1039/C9AN01664C.
- [132] A. K. M. Kafi, S. Alim, R. Jose, and M. M. Yusoff, "Fabrication of a glucose oxidase/multiporous tin-oxide nanofiber film on Prussian blue–modified gold electrode for biosensing," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 852, p. 113550, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.113550>.
- [133] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 489–511, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.
- [134] W. Lipińska, K. Grochowska, and K. Siuzdak, "Enzyme immobilization on gold nanoparticles for electrochemical glucose biosensors," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 5, 2021, doi: 10.3390/nano11051156.
- [135] B.-W. Park, D.-Y. Yoon, and D.-S. Kim, "Recent progress in bio-sensing techniques with

- encapsulated enzymes,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 1, pp. 1–10, 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.033>.
- [136] R. B. Bhatia, C. J. Brinker, A. K. Gupta, and A. K. Singh, “Aqueous Sol–Gel Process for Protein Encapsulation,” *Chem. Mater.*, vol. 12, no. 8, pp. 2434–2441, 2000, doi: [10.1021/cm000260f](https://doi.org/10.1021/cm000260f).
- [137] W. Lipińska, K. Siuzdak, J. Karczewski, A. Dołęga, and K. Grochowska, “Electrochemical glucose sensor based on the glucose oxidase entrapped in chitosan immobilized onto laser-processed Au-Ti electrode,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 330, p. 129409, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129409>.
- [138] M. L. Cacicedo *et al.*, “Chapter 7 - Immobilized Enzymes and Their Applications,” in *Advances in Enzyme Technology*, R. S. Singh, R. R. Singhania, A. Pandey, and C. Larroche, Eds. Elsevier, 2019, pp. 169–200.
- [139] A. V. Bounegru and C. Apetrei, “Tyrosinase Immobilization Strategies for the Development of Electrochemical Biosensors—A Review,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 4, 2023, doi: [10.3390/nano13040760](https://doi.org/10.3390/nano13040760).
- [140] L. Dal Magro, P. F. Hertz, R. Fernandez-Lafuente, M. P. Klein, and R. C. Rodrigues, “Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 32, pp. 27242–27251, 2016, doi: [10.1039/C6RA03940E](https://doi.org/10.1039/C6RA03940E).
- [141] S. D. Minter, “Estabilização e imobilização enzimática: Métodos e protocolos.” .
- [142] İ. Polatoğlu and L. Aydın, “A new design strategy with stochastic optimization on the preparation of magnetite cross-linked tyrosinase aggregates (MCLTA),” *Process Biochem.*, vol. 99, pp. 131–138, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.019>.
- [143] B. Tan and F. Baycan, “A new donor-acceptor conjugated polymer-gold nanoparticles biocomposite materials for enzymatic determination of glucose,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 210, p. 123066, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123066>.
- [144] V. L. Colvin, “The potential environmental impact of engineered nanomaterials,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 10, pp. 1166–1170, Oct. 2003, doi: [10.1038/nbt875](https://doi.org/10.1038/nbt875).
- [145] I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, D. Y. Kucherenko, O. V. Soldatkina, and S. V. Dzyadevych, “Advances in nanomaterial application in enzyme-based electrochemical biosensors: a review,” *Nanoscale Adv.*, vol. 1, no. 12, pp. 4560–4577, 2019, doi: [10.1039/c9na00491b](https://doi.org/10.1039/c9na00491b).
- [146] X. Wu, F. Mu, Y. Wang, and H. Zhao, “Graphene and Graphene-Based Nanomaterials for DNA Detection: A Review,” *Molecules*, vol. 23, no. 8, 2018, doi: [10.3390/molecules23082050](https://doi.org/10.3390/molecules23082050).
- [147] X. Wu, F. Mu, Y. Wang, and H. Zhao, “Graphene and graphene-based nanomaterials for DNA detection: A review,” *Molecules*, vol. 23, no. 9, 2018, doi: [10.3390/molecules23082050](https://doi.org/10.3390/molecules23082050).
- [148] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, and J. H. Lee, “Recent advances in graphene-based biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 12, pp. 4637–4648, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.039>.
- [149] F. Wang, L. Liu, and W. J. Li\*, “Graphene-Based Glucose Sensors: A Brief Review,” *IEEE Trans. Nanobioscience*, vol. 14, no. 8, pp. 818–834, 2015, doi: [10.1109/TNB.2015.2475338](https://doi.org/10.1109/TNB.2015.2475338).
- [150] C. K. A Pattammol/Lattel, “Química de cozinha 101: produção multigrama de biogrfeno de alta qualidade num liquidificador com proteínas comestíveis,” vol. 25. .
- [151] V. L. Michaelis and M. L. Maud Menten, “The Kinetics of Invertase Action,” *J. Chem. Soc.*, no. February, pp. 333–369, 1913.
- [152] I. Schmitz and S. Mühlen, “An innate immune sensor wandering around – NOD1 promotes cell migration via non-canonical signaling,” *FEBS J.*, vol. n/a, no. n/a, doi: <https://doi.org/10.1111/febs.16952>.

- [153] S. Schnell, “Validity of the Michaelis–Menten equation – steady-state or reactant stationary assumption: that is the question,” *FEBS J.*, vol. 281, no. 2, pp. 464–472, 2014, doi: <https://doi.org/10.1111/febs.12564>.
- [154] B. (UFMG), “Questão gráfico Michaelis Menten,” 2009. <https://www.teccconcursos.com.br/questoes/740974> (accessed Sep. 24, 2023).
- [155] F. T. C. Moreira, R. A. F. Dutra, J. P. Noronha, and M. G. F. Sales, “Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 56, pp. 217–222, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.052>.
- [156] H. Lee, Y. J. Hong, S. Baik, T. Hyeon, and D.-H. Kim, “Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 8, p. 1701150, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.201701150>.
- [157] Z. Zhang, Z. Chen, F. Cheng, Y. Zhang, and L. Chen, “Highly sensitive on-site detection of glucose in human urine with naked eye based on enzymatic-like reaction mediated etching of gold nanorods,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 89, pp. 932–936, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.090>.
- [158] W. Zhang, Y. Du, and M. L. Wang, “On-chip highly sensitive saliva glucose sensing using multilayer films composed of single-walled carbon nanotubes, gold nanoparticles, and glucose oxidase,” *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 4, pp. 96–102, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.04.006>.
- [159] B. Senf, W.-H. Yeo, and J.-H. Kim, “Recent Advances in Portable Biosensors for Biomarker Detection in Body Fluids,” *Biosensors*, vol. 10, no. 9, 2020, doi: 10.3390/bios10090127.
- [160] D. Bruen, C. Delaney, L. Florea, and D. Diamond, “Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 8, 2017, doi: 10.3390/s17081866.
- [161] M. Oyaert and J. R. Delanghe, “Semiquantitative, fully automated urine test strip analysis,” *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 33, no. 5, p. e22870, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/jcla.22870>.
- [162] M. Miyashita, N. Ito, S. Ikeda, T. Murayama, K. Oguma, and J. Kimura, “Development of urine glucose meter based on micro-planer amperometric biosensor and its clinical application for self-monitoring of urine glucose,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1336–1340, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.072>.
- [163] M. Satish K. Garg, “Comparison of Glucose Concentration in Interstitial Fluid, and Capillary and Venous Blood During Rapid Changes in Blood Glucose Levels,” in *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2001.
- [164] M. J. Tierney, J. A. Tamada, R. O. Potts, L. Jovanovic, and S. Garg, “Clinical evaluation of the GlucoWatch® biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 9, pp. 621–629, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00189-0).
- [165] E. la Paz, A. Barfidokht, S. Rios, C. Brown, E. Chao, and J. Wang, “Extended Noninvasive Glucose Monitoring in the Interstitial Fluid Using an Epidermal Biosensing Patch,” *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 37, pp. 12767–12775, 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02887.
- [166] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, and Y. Wen, “Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 102, pp. 123–146, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- [167] S. Gupta, S. V. Sandhu, H. Bansal, and D. Sharma, “Comparison of salivary and serum glucose levels in diabetic patients,” *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 9, no. 1, pp. 91–96, 2015, doi: 10.1177/1932296814552673.
- [168] D. D. de Perière, D. Hillaire-Buys, R. Gross, R. Puech, and S. Arancibia, “Increases in concentrations of somatostatin- and insulin-like immunoreactivities in submandibular salivary gland of diabetic rats: effect of insulin treatment,” *Acta Endocrinol.*, vol. 120, no. 6, pp. 790–794,

- 1989, doi: 10.1530/acta.0.1200790.
- [169] T. Arakawa *et al.*, “Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 84, pp. 106–111, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.12.014>.
- [170] P. Pirovano, A. Shinde, P. White, G. Wallace, M. McCaul, and D. Diamond, “Real-time Analysis of Electrolytes in Sweat Through a Wearable Sensing Platform,” *Proceedings*, vol. 15, no. 1, 2019, doi: 10.3390/proceedings2019015014.
- [171] J. Heikenfeld, “Cover Picture: (Electroanalysis 6/2016),” *Electroanalysis*, vol. 28, no. 6, p. 1147, 2016, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201680601>.
- [172] A. J. Bandodkar *et al.*, “Soft. stretchable high power density electronic skin-based biofuel cells for scavenging energy from human sweat,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 10, no. 7, pp. 1581–1589, 2017, doi: 10.1039/C7EE00865A.
- [173] J. R. Sempionatto *et al.*, “Eyeglasses based wireless electrolyte and metabolite sensor platform,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 10, pp. 1834–1842, 2017, doi: 10.1039/C7LC00192D.
- [174] A. Abellán-Llobregat *et al.*, “A stretchable and screen-printed electrochemical sensor for glucose determination in human perspiration,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 91, pp. 885–891, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.01.058>.
- [175] T. R. Ray *et al.*, “Bio-Integrated Wearable Systems: A Comprehensive Review,” *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 8, pp. 5461–5533, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00573.
- [176] P. Yang, G. Wei, A. Liu, F. Huo, and Z. Zhang, “A review of sampling, energy supply and intelligent monitoring for long-term sweat sensors,” *npj Flex. Electron.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1038/s41528-022-00165-9.
- [177] Y. Zhao *et al.*, “Highly Stretchable and Strain-Insensitive Fiber-Based Wearable Electrochemical Biosensor to Monitor Glucose in the Sweat,” *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 10, pp. 6569–6576, May 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00152.
- [178] I. Notingher, “Raman spectroscopy cell-based biosensors,” *Sensors*, vol. 7, no. 8, pp. 1343–1358, 2007, doi: 10.3390/s7081343.
- [179] S. R. Zanyar Movasaghi and I. U. Rehman, “Raman Spectroscopy of Biological Tissues,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 42, no. 5, pp. 493–541, 2007, doi: 10.1080/05704920701551530.
- [180] A. Batsoulis *et al.*, “FT-Raman Spectroscopic Simultaneous Determination of Fructose and Glucose in Honey,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, pp. 207–210, 2005, doi: 10.1021/jf048793m.
- [181] M. Winey, J. B. Meehl, E. T. O’Toole, and T. H. Giddings, “Conventional transmission electron microscopy,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 319–323, 2014, doi: 10.1091/mbc.E12-12-0863.
- [182] S. Pennycook *et al.*, “6 Scanning Transmission Electron Microscopy for Nanostructure Characterization,” *Scanning Microsc. Nanotechnol. Tech. Appl.*, vol. 2, 2006, doi: 10.1007/978-0-387-39620-0\_6.
- [183] Metrohm, “Autolab PGSTAT302N.” [https://www.metrohm.com/pt\\_br/products/a/ut30/aut302n\\_s.html](https://www.metrohm.com/pt_br/products/a/ut30/aut302n_s.html) (accessed Sep. 25, 2023).
- [184] Metrohm, “Boxed connector for screen-printed electrodes | Metrohm.” <https://www.metrohm.com/en/products/d/sc4m/dsc4mmol/L.html> (accessed Sep. 24, 2023).
- [185] T. Fisher, “DXR3 Raman Microscope.” <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAADGABFFAHCMAPB> (accessed Sep. 24, 2023).
- [186] C. Valero-Vidal and A. Muñoz, “Influence of protein adsorption on corrosion of biomedical alloys,” *Bio-Tribocorrosion Biomater. Med. Implant.*, pp. 187–219, 2013, doi: 10.1533/9780857098603.2.187.

- [187] Merck, “Albumin from Bovine Serum.” <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-media-preparation/albumin-from-bovine-serum> (accessed Sep. 24, 2023).
- [188] M. B. L. P. Päivi Laaksonen Dr., Markku Kainlauri, Timo Laaksonen Dr., Andrey Shchepetov Dr., Hua Jiang Dr., Jouni Ahopelto Prof., “Interfacial Engineering by Proteins: Exfoliation and Functionalization of Graphene by Hydrophobins,” in *Angewandte*, 2010.
- [189] C. Alatzoglou *et al.*, “Development of a Multi-Enzymatic Biocatalytic System through Immobilization on High Quality Few-Layer bio-Graphene,” *Nanomaterials*, vol. 13, no. 1, 2023, doi: 10.3390/nano13010127.
- [190] T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, “Enzyme immobilization by adsorption: A review,” *Adsorption*, vol. 20, no. 5–6, pp. 801–821, 2014, doi: 10.1007/s10450-014-9623-y.
- [191] H. H. Nguyen and M. Kim, “An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization,” *Appl. Sci. Converg. Technol.*, vol. 26, no. 6, pp. 157–163, 2017, doi: 10.5757/asct.2017.26.6.157.
- [192] J. Lović *et al.*, “Glucose Sensing Using Glucose Oxidase-Glutaraldehyde-Cysteine Modified Gold Electrode,” *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 12, no. 7, pp. 5806–5817, 2017, doi: <https://doi.org/10.20964/2017.07.65>.
- [193] D. Brady and J. Jordaan, “Advances in enzyme immobilization,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 31, no. 11, pp. 1639–1650, 2009, doi: 10.1007/s10529-009-0076-4.
- [194] TCI, “Glutaraldehyde 111-30-8 | Tokyo Chemical Industry (India) Pvt. Ltd.” <https://www.tcichemicals.com/IN/en/p/G0068> (accessed Sep. 24, 2023).
- [195] F. Shang, J. D. Glennon, and J. H. T. Luong, “Glucose Oxidase Entrapment in an Electropolymerized Poly(tyramine) Film with Sulfobutylether- $\beta$ -Cyclodextrin on Platinum Nanoparticle Modified Boron-Doped Diamond Electrode,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 51, pp. 20258–20263, 2008, doi: 10.1021/jp807482a.
- [196] M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, and D. Barnett, “Electrodeposited polytyramine as an immobilization matrix for enzyme biosensors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 13, no. 9, pp. 953–962, 1998, doi: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(98\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00033-5).
- [197] TCI, “Tyramine 51-67-2 | Tokyo Chemical Industry (India) Pvt. Ltd.” <https://www.tcichemicals.com/IN/en/p/A0302> (accessed Sep. 24, 2023).
- [198] I. L. Furlani, B. S. Amaral, R. V. Oliveira, and Q. B. Cassa, “Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis,” *Quim. Nova*, vol. 43, no. 4, pp. 463–473, 2020, doi: 10.21577/0100-4042.20170525.
- [199] B. Srinivasan, “A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond,” *FEBS J.*, vol. 289, no. 20, pp. 6086–6098, 2022, doi: <https://doi.org/10.1111/febs.16124>.
- [200] Hodkiewicz J., “Characterizing Graphene with Raman Spectroscopy,” *Thermo Fish. Sci.*, pp. 1–4, 2010, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD Documents/Application & Technical Notes/Molecular Spectroscopy/Raman/Raman Instruments/D19505~.pdf>.
- [201] P. Rostron, S. Gaber, and D. Gaber, “Raman Spectroscopy , Review,” no. September, 2016.
- [202] F. T. C. Moreira, S. Sharma, R. A. F. Dutra, J. P. C. Noronha, A. E. G. Cass, and M. G. F. Sales, “Detection of cardiac biomarker proteins using a disposable based on a molecularly imprinted polymer grafted onto graphite,” *Microchim. Acta*, vol. 182, no. 5, pp. 975–983, 2015, doi: 10.1007/s00604-014-1409-0.
- [203] M. Burghard, “Electronic and vibrational properties of chemically modified single-wall carbon nanotubes,” *Surf. Sci. Rep.*, vol. 58, no. 1, pp. 1–109, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.07.001>.
- [204] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, and A. Jorio, “Raman spectroscopy of carbon nanotubes,” *Phys. Rep.*, vol. 409, no. 2, pp. 47–99, 2005, doi:

- <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2004.10.006>.
- [205] A. R. Vatankhah, M. A. Hosseini, and S. Malekie, “The characterization of gamma-irradiated carbon-nanostructured materials carried out using a multi-analytical approach including Raman spectroscopy,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 488, pp. 671–680, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.05.294>.
- [206] R. S. Gomes, B. A. Gomez-Rodríguez, R. Fernandes, M. G. F. Sales, F. T. C. Moreira, and R. F. Dutra, “Plastic Antibody of Polypyrrole/Multiwall Carbon Nanotubes on Screen-Printed Electrodes for Cystatin C Detection,” *Biosensors*, vol. 11, no. 6, 2021, doi: 10.3390/bios11060175.
- [207] S. C. Ribeiro, R. Fernandes, F. T. C. Moreira, and M. G. F. Sales, “Potentiometric Biosensor Based on Artificial Antibodies for an Alzheimer Biomarker Detection,” *Appl. Sci.*, vol. 12, no. 7, 2022, doi: 10.3390/app12073625.
- [208] L. M. Malard, M. A. Pimenta, G. Dresselhaus, and M. S. Dresselhaus, “Raman spectroscopy in graphene,” *Phys. Rep.*, vol. 473, no. 5, pp. 51–87, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2009.02.003>.
- [209] S. F. Prazeres, F. Zapata, N. Canilho, A. Pasc, C. García-Ruiz, and G. Montalvo, “Probing the confinement of  $\beta$ -galactosidase into meso-macro porous silica by Raman spectroscopy,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 278, pp. 149–155, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.11.032>.
- [210] M. T. Safian, P. B. Raja, C. Y. Shen, and M. N. Mohamad Ibrahim, “A novel preparation of bio-based graphene from oil palm biomass as a fluid loss additive in water-based drilling fluid,” *Geoenergy Sci. Eng.*, vol. 231, p. 212321, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.geoen.2023.212321>.