

ESTUDO DE MÉTODOS DE TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE EM SENSORES ELETROQUÍMICOS DE CARBONO/GRAFENO E AVALIAÇÃO DE APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS

F. L. Kadel^{1,2}, D. S. Moraes^{1,2,3}, B. F. Serafini^{2,3},
J. K. Moreira^{1,2,3}, T. S. Pastore^{2,3}, M. R. Meireles^{1,2,3}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
(felipe061603@gmail.com)

²Biosens Tech, São Leopoldo, Brasil

³Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Brasil

Os sensores eletroquímicos provêm o reconhecimento de um analito através de uma reação eletroquímica e possuem uma vasta gama de aplicações, incluindo análises na área da saúde e meio ambiente. Para otimizar seu desempenho, podem ser realizadas técnicas de modificação de superfície; entre estas, destaca-se o tratamento eletroquímico e o tratamento com plasma frio. Neste estudo, resalta-se o tratamento com plasma frio, sendo capaz de otimizar os parâmetros avaliados e com melhor estabilidade.

Palavras-chave: Sensores; Grafeno; Tratamento de Superfície; Plasma; Tratamento Eletroquímico.

INTRODUÇÃO

Os sensores eletroquímicos são dispositivos que combinam o reconhecimento de uma molécula alvo à transmissão de sinal elétrico vindo de uma reação eletroquímica (Xavier e Simões, 2016). Esses sensores possuem uma vasta gama de aplicações que incluem análises em áreas da saúde e meio ambiente. Uma alternativa para sua produção é a impressão por serigrafia, uma técnica de baixo custo com potencial de escalonamento e compatibilidade com diversos materiais (Taleat *et al.*, 2014). Os sensores de carbono produzidos neste processo são mais conhecidos como *screen printed carbon electrodes* (SCPEs) e possuem grande potencial de aplicação, substituindo o uso de metais nobres e agregando valor e acessibilidade ao produto.

Para isso é necessário que seu desempenho seja equiparável ao de sensores já existentes, gerando desafios para os eletrodos de carbono, que podem apresentar menor condutividade e precisão, quando comparados com eletrodos metálicos. Para que sua performance seja otimizada, uma série de técnicas podem ser realizadas visando aumentar o desempenho do sensor, sem comprometer as vantagens descritas (Nahirny *et al.*, 2020). Entre estas técnicas, destaca-se o tratamento eletroquímico e o tratamento baseado na utilização de plasma frio, que possuem o potencial de modificar a superfície do sensor, além de limpar as impurezas presentes nesta.

Os sensores eletroquímicos podem ter sua superfície ativada para melhorar seu desempenho (Mabbott, 1983). Isto pode ser atingido através do tratamento eletroquímico, que consiste na deposição de um eletrólito e aplicação de potencial elétrico para oxidação e/ou redução da superfície. Assim, o tratamento eletroquímico se destaca como um método de ativação de superfície, limpeza e modificação da mesma, mostrando-se uma alternativa rápida, eficiente e de baixo custo (Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2019).

Outro método de tratamento de superfície é o tratamento a base de plasma frio, que consiste na modificação da superfície aplicando um gás ionizado (frequentemente gás oxigênio) visando otimizar as propriedades superficiais e a biocompatibilidade, sem alterar as propriedades do material em *bulk*, viabilizando a aplicação do sensor em análises na área da saúde (Sasmazel *et al.*, 2021). Esta técnica tem como efeito a limpeza de contaminantes e promove a formação de grupos funcionais oxigenados na superfície do material tratado (Sasmazel *et al.*, 2021).

Diante do exposto, o presente trabalho visa explorar dois métodos de tratamento para sensores de carbono impressos por serigrafia: (I) tratamento eletroquímico e (II) tratamento de plasma frio com gás oxigênio, além de suas combinações, destacando as vantagens de cada uma das técnicas. Além disso, este estudo

avaliou o impacto e o potencial de aplicação do tratamento de superfície na imobilização de anticorpos na mesma.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Ácido Sulfúrico Concentrado e Cloreto de Potássio foram comprados da marca Química Moderna. Peróxido de Hidrogênio 35% PA foi comprado da marca Neon Comercial. Ferrocianeto de Potássio foi comprado da marca LabSynth. Os reagentes foram utilizados sem purificação prévia e as soluções foram produzidas com água ultrapura.

Fabricação dos sensores

Foram produzidos sensores com Carbono/Grafeno como material condutivo, empregado nos eletrodos de trabalho e contra-eletródo (WE e CE), e com Prata/Cloreto de Prata (Ag/AgCl) como material inerte empregado no eletrodo de referência (RE), como representado na Figura 1.

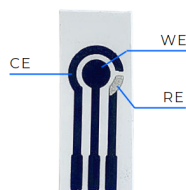


Figura 1. Registro fotográfico de um sensor produzido por impressão por serigrafia, com indicação de seus eletrodos.

Estes sensores foram manufaturados através do processo de impressão, utilizando uma máquina de serigrafia semi-automática Stencil Printer SPR45-VA com tela projetada para impressão de 40 sensores por vez em um substrato de PET (Tereftalato de Polietileno). Desta forma, o substrato foi fixado em uma mesa a vácuo e a tela foi posicionada sobre o substrato, como representado na Figura 2a. Em seguida foi realizada a transferência da pasta de carbono/grafeno para o substrato, com auxílio de espátula de poliuretano, como representado na Figura 2b. Para concluir a impressão dos eletrodos de carbono/grafeno, a matriz foi curada em estufa por 30 minutos a 130 °C. Então, repetiu-se este processo com outra tela para realizar a transferência da pasta de Prata/Cloreto de Prata (Ag/AgCl) visando à impressão do eletrodo de referência, como representado na Figura 2c. Por fim, a segunda camada foi curada em estufa por 10 minutos a 100 °C. Ambas telas aplicadas na produção dos eletrodos foram feitas de aço, com mesh de 250 µm e emulsão de 15 µm.

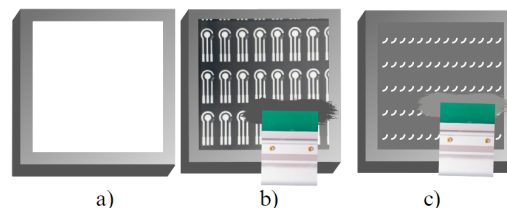


Figura 2. Representação gráfica do processo de produção de eletrodos por serigrafia.

Caracterização dos sensores e análise de dados

Para caracterização dos sensores e de suas propriedades físico-químicas e eletroquímicas, foi empregada a técnica de Voltametria Cíclica e o teste de ângulo de contato. Todas técnicas eletroquímicas, sejam de caracterização ou de tratamento, foram realizadas na região que compreende os eletrodos de referência, de trabalho e contra-eletródo, delimitada por um adesivo vinílico com 8 mm de diâmetro, com auxílio de um potenciostato portátil PalmSens, como representado na Figura 3. Vale notar que cada teste fez uso de sensores de um mesmo lote, de forma a reduzir a variabilidade entre os sensores avaliados.

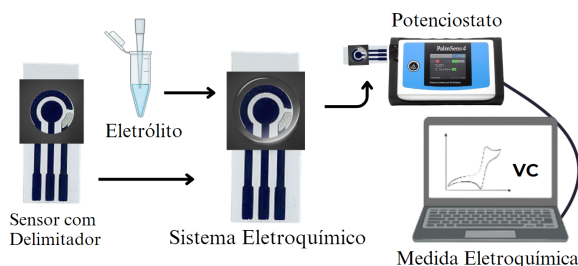


Figura 3. Representação gráfica simplificada do processo de medida eletroquímica.

A caracterização por Voltametria Cíclica (VC) foi realizada em um *range* de potencial elétrico entre -0,4 e 0,6V, numa velocidade de varredura de 100 mV/s. Foram realizados 10 ciclos em cada sensor, empregando 50 µL de Ferrocianeto de Potássio ($K_4Fe(CN)_6$) 10 mM em Cloreto de Potássio (KCl) 1 M, extraíndo os dados do quinto ciclo de cada sensor, no software PSTrace 5.9. Nesta técnica, avaliou-se os voltamogramas resposta, junto a dois parâmetros: a corrente de pico de oxidação (i_{pox}) e a variação de potencial de pico (ΔE), os quais são relacionados, respectivamente, à área eletroativa do sensor e à reversibilidade e eficiência na troca de cargas da reação de oxirredução do eletrólito (Paixão, 2020; Kissinger e Heineman, 1983). Desta forma, avaliou-se os resultados visando a uma maior corrente de pico de oxidação e a uma menor variação de potencial de pico.

Para análise dos dados extraídos na Voltametria Cíclica, foram realizados testes ANOVA (Análise de Variância), ANCOVA (Análise de Covariância), de

Tukey e de médias homocedásticas no software RStudio. Todos testes levaram em consideração um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), para verificar ou rejeitar a igualdade entre os parâmetros nas condições avaliadas.

O teste de ângulo de contato consiste em uma forma de avaliar a hidrofobicidade de uma superfície, considerando o ângulo de contato da água em relação a uma superfície plana. Assim, conforme aumenta a hidrofobicidade desta superfície, também aumenta o ângulo estabelecido com a água (Law, 2015). Neste teste, depositou-se 20 μL de água ultrapura na superfície do sensor e, com auxílio de uma caixa idealizada para teste de ângulo de contato (CITAC), fez-se o registro fotográfico em plano frontal, paralelamente à superfície plana, como representado na Figura 4. A quantificação do ângulo de contato foi feita através do software ImageJ.

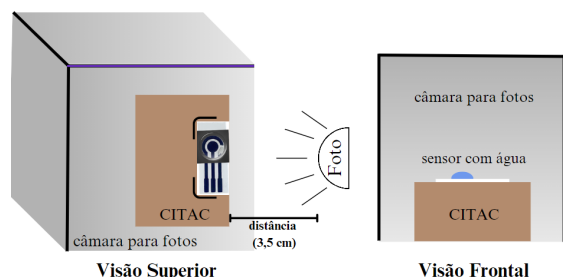


Figura 4. Representação gráfica do teste de ângulo de contato

Tratamento eletroquímico

Este experimento se fundamentou no estudo de Gonzalez-Sanchez *et al.* (2019), que obteve melhores resultados de tratamento eletroquímico (TE) empregando ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio. Para determinar o melhor método de tratamento em relação ao eletrólito empregado, testou-se três condições de tratamento eletroquímico: (I) empregando apenas ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M, (II) empregando apenas peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,1 M, e (III) empregando ambos tratamentos em sequência, de H_2SO_4 seguido de H_2O_2 . O tratamento empregando ácido sulfúrico fez uso de 50 μL desta solução, em um *range* de potencial elétrico de -0,3 a 2,0 V numa velocidade de 100 mV em 10 ciclos de Voltametria Cíclica, como apresentado anteriormente na Figura 3. Já o tratamento com peróxido de hidrogênio fez uso de 50 μL desta solução, em um *range* de potencial elétrico de -0,7 a 1,0 V numa velocidade de 10 mV em 25 ciclos de Voltametria Cíclica. Todos os três métodos foram testados em quintuplicata e para comparação estatística entre os métodos, utilizou-se os testes ANCOVA e de Tukey, considerando as condições iniciais de cada sensor como covariáveis.

Uma vez definido o eletrólito de tratamento, testou-se diferentes concentrações para otimizar o resultado do tratamento eletroquímico. Seguindo a mesma metodologia testada previamente, tratou-se sensores empregando o eletrólito em diferentes concentrações (0,25 M, 0,5 M e 0,75 M). Todas as três concentrações foram testadas em quintuplicata. Para comparação estatística entre os métodos, utilizou-se os testes ANCOVA e de Tukey, considerando as condições iniciais de cada sensor como covariáveis.

Após isso, avaliou-se o impacto da velocidade de varredura aplicada no tratamento, visando determinar qual a melhor velocidade a ser empregada. Para isso, testou-se três velocidades, sendo elas 50 mV/s, 100 mV/s e 200 mV/s, seguindo a mesma metodologia testada previamente, empregando o eletrólito definido na concentração ideal. Este experimento foi realizado em sextuplicata e para comparação estatística entre os métodos, utilizou-se o teste ANCOVA, considerando as condições iniciais de cada sensor como covariáveis.

Por último, visou-se comparar o desempenho do tratamento eletroquímico ao longo do tempo e seu tempo de validade. Este experimento foi realizado em quintuplicata com 25 sensores de um mesmo lote, seguindo a metodologia descrita anteriormente, empregando o eletrólito definido, na concentração ideal e na velocidade de varredura determinada previamente, e caracterizando os sensores por Voltametria Cíclica nos tempos: imediatamente após o tratamento, 2 dias após o tratamento, 7 dias após o tratamento, 14 dias após o tratamento e 30 dias após o tratamento. Neste experimento, comparou-se os resultados do tratamento ao longo do tempo pelo teste ANOVA.

Tratamento com plasma frio

Este experimento se fundamentou nos estudos de Haiber *et al.* (2003) que explorou o tratamento de plasma e seus parâmetros, *i. e.* tempo, pressão e potência, e de Lim e Lee (2004), cuja metodologia serviu como base a este experimento.

Visando estabelecer a melhor condição com plasma frio de gás oxigênio, foi utilizado o equipamento Plasma ETCH, com potência de 100W e pressão de 100 mTorr em três diferentes tempos de exposição: (I) 2 min., (II) 5 min. e (III) 10 min. As condições foram analisadas em quintuplicata por Voltametria Cíclica e teste de ângulo de contato, e comparadas estatisticamente por testes ANOVA.

Combinação dos tratamentos

Visando combinar os efeitos de ambos tratamentos de superfície avaliados neste estudo, realizou-se testes complementares combinando ambos em sequência.

Em quintuplicata, um lote de sensores foi tratado com as quatro seguintes condições: (I) apenas com tratamento eletroquímico; (II) apenas com plasma frio; (III) com tratamento eletroquímico seguido de plasma frio e (IV) com plasma frio seguido de tratamento eletroquímico. Para comparação entre as condições, caracterizou-se os sensores através de Voltametria Cíclica e teste de ângulo de contato, empregando testes ANOVA para comparação estatística. Além disso, os melhores resultados deste teste foram caracterizados novamente em 48 horas para avaliar o seu desempenho após dois dias armazenados, comparando seus parâmetros pelo teste de médias homocedásticas.

Imobilização do complexo anticorpo-antígeno

O complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ab) foi formado em um microtubo com proporção de 1:1 e incubado a 4 °C *overnight*. A imobilização foi realizada através do processo de *drop casting* de 20 µL no eletrodo de trabalho e secagem na estufa a 37 °C por 1 h. Após este período, foi realizada a medida por Voltametria Cíclica. A imobilização foi realizada em quintuplicata estando tanto o Ag quanto o Ab diluídos de 1:1000 em sensores com e sem a aplicação do tratamento escolhido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamento eletroquímico

Ao testar os diferentes métodos de tratamento eletroquímico destacados por Gonzalez-Sanchez *et al.* (2019), foi possível observar que todos os métodos otimizaram os parâmetros avaliados e aumentaram a homogeneidade de seus voltamogramas, como observado na figura 5.

Nesta figura pode-se observar os voltamogramas das caracterizações antes e após o tratamento, onde os gráficos pretos representam o quinto ciclo das caracterizações pré-tratamento e os gráficos coloridos representam o quinto ciclo das caracterizações pós-tratamento, desta forma evidenciando seu impacto nos parâmetros avaliados. Na Figura 5, encontram-se os voltamogramas referentes ao tratamento com peróxido de hidrogênio em a), os

referentes à sequência de tratamentos em b), e ao tratamento com ácido sulfúrico em c), desta forma, evidenciando a comparação entre os métodos. Ao analisar os resultados observou-se que o método empregando a sequência de tratamentos foi o que mais otimizou os parâmetros avaliados, dentre os tratamentos eletroquímicos, pois apresentou a maior média de i_{pox} (0,319 mA), aumentando a média inicial em 82,98%, e a menor média de ΔE (0,23 V), reduzindo a média inicial em 52,13%, como pode ser observado nas tabelas 1 e 2. Esse dado vai ao encontro dos achados de Gonzalez-Sanchez *et al.* (2019) que também descreve a sequência de tratamentos com H_2SO_4 seguido de H_2O_2 como a mais promissora na otimização de sensores eletroquímicos de carbono.

Tabela 1. Dados das correntes de pico de oxidação em mA nos métodos avaliados.

Método	Média	Desvio	Aumento
H_2SO_4	0,315	0,02	46,11%
H_2O_2	0,236	0,06	35,94%
Sequência	0,319	0,02	82,98%

Tabela 2. Dados das variações dos potenciais de pico em V nos métodos avaliados.

Método	Média	Desvio	Redução
H_2SO_4	0,25	0,02	20,63%
H_2O_2	0,31	0,07	27,65%
Sequência	0,23	0,03	52,13%

Ademais, ao analisar os resultados deste experimento, o teste ANCOVA evidenciou que existe uma diferença significativa entre os métodos testados, em relação à i_{pox} ($F=8.0226$; $P=0.0100$) e ao ΔE ($F=4.8036$; $P=0.0381$). Então, comparou-se os métodos através do teste de Tukey, que revelou não existir diferença significativa entre o tratamento com H_2SO_4 e o tratamento de duas etapas como é representado nas figuras 6 e 7, geradas pelo teste.

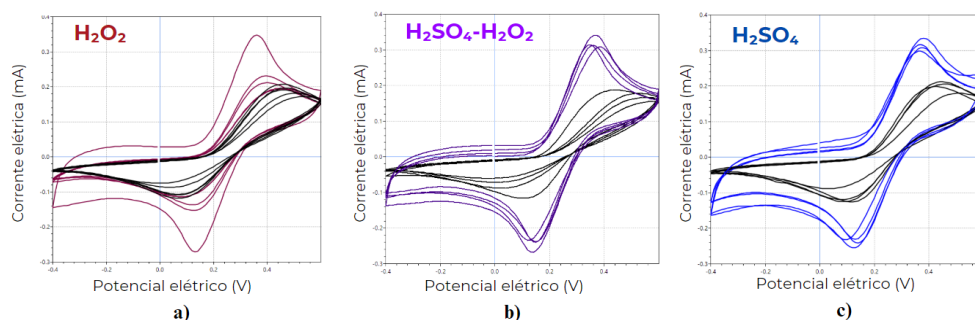


Figura 5. Voltamogramas dos diferentes métodos de tratamento eletroquímico.

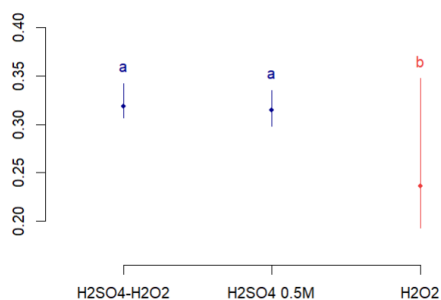


Figura 6. Teste de Tukey para comparação das correntes de pico de oxidação dos métodos avaliados.

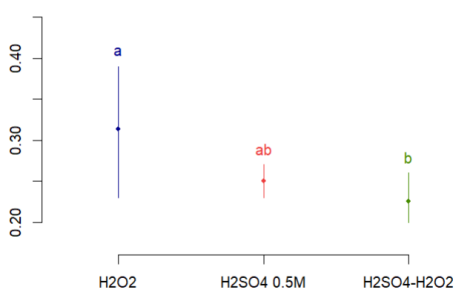


Figura 7. Teste de Tukey para comparação das variações de potenciais de pico dos métodos avaliados.

Diante das comparações do teste de Tukey, visou-se explorar mais sobre o tratamento com ácido sulfúrico, analisando o impacto de variáveis sobre os resultados de tratamento. O primeiro parâmetro analisado foi o efeito da concentração do ácido, onde a concentração de 0,5M apresentou uma maior média de corrente de pico de oxidação. No entanto, a mesma também apresentou a maior média de ΔE , como observado nas tabelas 3 e 4. Ao mesmo tempo, o menor ΔE foi com a condição de 0,25 M, que apresentou uma i_{pox} média intermediária.

Tabela 3. Dados das correntes de pico de oxidação em mA nas concentrações avaliadas.

Concentração	Média	Desvio
0,25 M	0,246	0,02
0,5 M	0,315	0,02
0,75 M	0,242	0,02

Tabela 4. Dados das variações dos potenciais de pico em V nas concentrações avaliadas.

Concentração	Média	Desvio
0,25 M	0,22	0,02
0,5 M	0,25	0,02
0,75 M	0,24	0,01

Para a análise destes dados, o teste ANCOVA apresentou uma diferença significativa entre as concentrações do H_2SO_4 testadas em relação à i_{pox} ($F=14,419$; $P=0,0016$). No entanto, o mesmo teste revelou que não existe diferença significativa entre as concentrações do eletrólito em relação ao ΔE ($F=2,9752$; $P=0,1019$). Diante da diferença na média da i_{pox} dos tratamentos, foi necessário realizar o teste complementar de Tukey para descobrir qual concentração mais otimiza este parâmetro. Assim, atestou-se que a condição usando ácido sulfúrico 0,5 M foi a única que diferiu das demais, como representado na Figura 8, gerada pelo teste. Por isso, a concentração de 0,5 mol/L mostra-se como a mais apropriada para o tratamento eletroquímico.

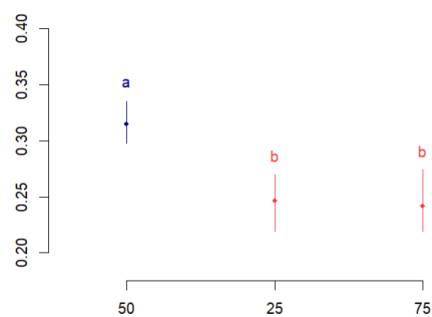


Figura 8. Teste de Tukey para comparação das correntes de pico de oxidação nas concentrações avaliadas.

Em seguida, analisando o efeito da velocidade de varredura no desempenho do tratamento eletroquímico, nota-se que as três velocidades geram resultados relativamente próximos. Quanto à i_{pox} , a velocidade de 50 mV/s apresenta a maior média (0,284 mA), mesmo apresentando o maior ΔE (0,33 V), como pode ser visto nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Dados das correntes de pico de oxidação em mA nas velocidades avaliadas.

Velocidade	Média	Desvio
50 mV/s	0,284	0,03
100 mV/s	0,261	0,03
200 mV/s	0,259	0,01

Tabela 6. Dados das variações dos potenciais de pico em V nas velocidades avaliadas.

Velocidade	Média	Desvio
50 mV/s	0,33	0,06
100 mV/s	0,28	0,02
200 mV/s	0,28	0,03

Realizando o teste ANCOVA, foi possível verificar a igualdade dos tratamentos, uma vez que seus dados não apresentaram diferença significativa tanto em suas i_{pox} ($F=1,765$; $P=0,2072$), quanto em seus ΔE ($F=2,9022$; $P=0,0882$). Portanto, a variação entre as velocidades de varredura testadas não causa efeito significativo aos parâmetros aqui avaliados. Para a avaliação da validade do tratamento, utilizou-se a velocidade de 100 mV/s.

Por último, confirmou-se que o desempenho do tratamento eletroquímico se manteve estável ao longo do tempo. Nota-se que as i_{pox} no tempo 0 e no tempo 30 dias são iguais e que o ΔE médio não aumenta durante este intervalo de tempo, como apresentado nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Dados das correntes de pico de oxidação em mA nos dias avaliados.

Dias	Média	Desvio
0	0,356	0,02
2	0,348	0,01
7	0,348	0,02
14	0,338	0,01
30	0,356	0,03

Tabela 8. Dados das variações dos potenciais de pico em V nos dias avaliados.

Dias	Média	Desvio
0	0,32	0,04
2	0,31	0,02
7	0,30	0,02
14	0,30	0,02
30	0,30	0,02

O teste ANOVA revelou que, ao longo dos 30 dias não houve redução significativa na i_{pox} ($F=0,0547$; $P=0,8172$) e nem aumento no ΔE ($F=1,362$; $P=0,2551$). Portanto, o tratamento pode passar 30 dias sem prejuízos em seu desempenho.

Diante do exposto, é possível notar que o tratamento eletroquímico otimiza as propriedades do sensor eletroquímico de carbono/grafeno, uma vez que aumenta sua corrente de pico de oxidação e reduz sua variação de potencial de pico. Este efeito ocorre aumentando a área eletroativa através da limpeza e da oxidação da superfície, como reportado pelo estudo de Gonzalez-Sanchez *et al.* (2019) e está diretamente relacionado ao aumento na corrente de pico de oxidação através da equação de Randles-Sevcik (Paixão, 2020). O mesmo estudo de

Gonzalez-Sanchez *et al.* destaca que o tratamento empregando ácido sulfúrico 0,5 M é o que apresenta o processo oxidativo mais intenso por ter a maior concentração de oxigênio atômico em espectroscopia de fotoelétrons (XPS), quando comparado com os outros métodos testados pelo mesmo. Assim, o aumento observado na área eletroativa do sensor pode ser explicado pela introdução de grupos funcionais oxigenados na morfologia do eletrodo, o que corrobora a troca de cargas em sua interface, assim esclarecendo o impacto do tratamento neste e nos demais parâmetros avaliados.

Tratamento com plasma frio

No experimento para avaliar o tempo do plasma frio, baseado nos estudos de Lim e Lee (2004), foram testados três diferentes tempos considerando uma potência de 100W a 100 mTorr de pressão. Os resultados destas condições de tempo de exposição estão representados nos voltamogramas na Figura 9, onde os gráficos em verde, laranja e azul, apresentam respectivamente as condições de 10, 5 e 2 minutos de exposição.

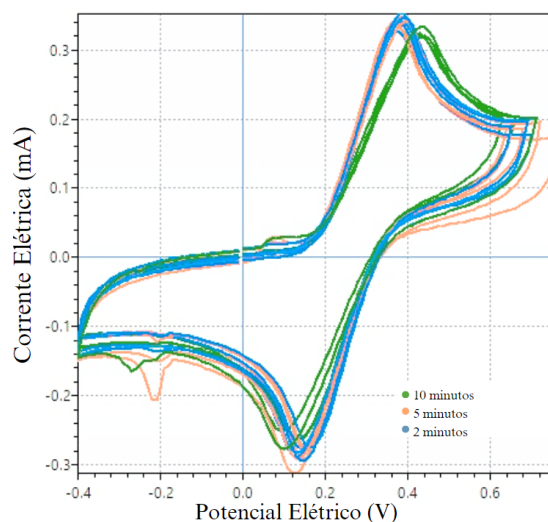


Figura 9. Compilado de voltamogramas das condições de tratamento de plasma frio.

Conforme a Figura 9, observa-se que existe homogeneidade intragrupo para cada condição e pouca variação entre as condições, especialmente quanto à sua corrente de pico de oxidação. Já os valores de ΔE médio para as condições de 2, 5 e 10 minutos foram de 0,320 V, 0,317 V e 0,296 V, respectivamente, evidenciando pouca variabilidade das condições na caracterização eletroquímica.

A partir do teste de ângulo de contato, verificou-se que todas as condições de exposição ao plasma frio aumentaram a hidrofiliabilidade do sistema, com uma relação direta entre o tempo de exposição e a redução na hidrofobicidade. A medida em ângulo para cada

uma das condições de exposição foi de $73,5 \pm 24,9^\circ$ para o sensor sem tratamento, $35,6 \pm 8,7^\circ$ para o sensor exposto por 2 min, $26,5 \pm 8,7^\circ$ para o sensor exposto por 5 min, e $10,1 \pm 6,8^\circ$ para o sensor exposto por 10 min ao tratamento com plasma frio.

Além disso, a exposição prolongada do sensor ao plasma frio (10 min) levou ao desprendimento do material condutivo do sensor como representado na Figura 10, podendo impactar nas medidas eletroquímicas. Portanto, a condição de 10 minutos foi desconsiderada para aplicação prática. Então, foi realizado um teste estatístico T para determinar qual a melhor condição de plasma frio, considerando o ângulo de contato após os tempos de 2 e 5 minutos de exposição. O teste não mostrou significância estatística entre as duas condições ($T=1,28$; $P=0,248$).



Figura 10. Registro fotográfico da degradação do sensor no tratamento de plasma frio de 10 minutos.

A utilização de plasma frio de oxigênio para aumentar a adesão de reagentes na superfície de sensores possui potencial para escalonamento, pois pode ser realizada em uma única etapa para matrizes inteiras serigrafadas. As modificações geradas pelo plasma frio na morfologia do sensor impactam em sua hidrofobicidade, condutividade elétrica e biocompatibilidade, através da oxidação de superfícies e limpeza de interferentes. Os dados obtidos no presente estudo reforçam as referências Haiber *et al.* (2003) e Lim e Lee (2004), que demonstram o plasma frio como uma alternativa na otimização de sensores de carbono/grafeno.

Combinação do plasma frio com tratamento eletroquímico

Por último, ao comparar o tratamento eletroquímico, o tratamento com plasma frio e suas combinações, destaca-se os resultados promissores do tratamento eletroquímico seguido de plasma frio. Esta condição apresentou a maior média de i_{pox} , como visto na tabela 9. Ao mesmo tempo, observou-se, também, um destaque do tratamento de plasma frio em seu ΔE , como visto na tabela 10, e na redução do ângulo de contato, como visto na tabela 11. Este efeito se dá pela redução de hidrofobicidade causada pelo plasma

frio através da oxidação da superfície; um processo que aparenta não ser tão intenso nos outros métodos avaliados.

Tabela 9. Dados das correntes de pico de oxidação em mA nos tratamentos avaliados.

Tratamento	Média	Desvio
Eletroquímico	0,183	0,15
Plasma frio	0,235	0,06
Eletroquímico e plasma	0,241	0,13
Plasma e eletroquímico	0,246	0,08

Tabela 10. Dados das variações dos potenciais de pico em V nos tratamentos avaliados.

Tratamento	Média	Desvio
Eletroquímico	0,28	0,03
Plasma frio	0,22	0,02
Eletroquímico e plasma frio	0,26	0,03
Plasma frio e eletroquímico	0,39	0,05

Tabela 11. Dados do teste de ângulo de contato nos tratamentos avaliados.

Tratamento	Média	Desvio
Eletroquímico	70.29	6.78
Plasma frio	29.31	6.39
Eletroquímico e plasma frio	44.59	8.40
Plasma frio e eletroquímico	49.55	7.10

Na Figura 11, estão compilados estes voltamogramas para sua comparação e estão separados por cor, onde: os voltamogramas de sensores que passaram por tratamento de plasma frio estão em roxo; por tratamento eletroquímico em verde; por plasma frio seguido de tratamento eletroquímico em vermelho, por tratamento eletroquímico seguido de plasma frio em azul e sem tratamento em preto. Nesta figura, nota-se a diferença entre os voltamogramas combinando ambas técnicas, evidenciando que a ordem aplicada na sequência tem efeito no resultado final.

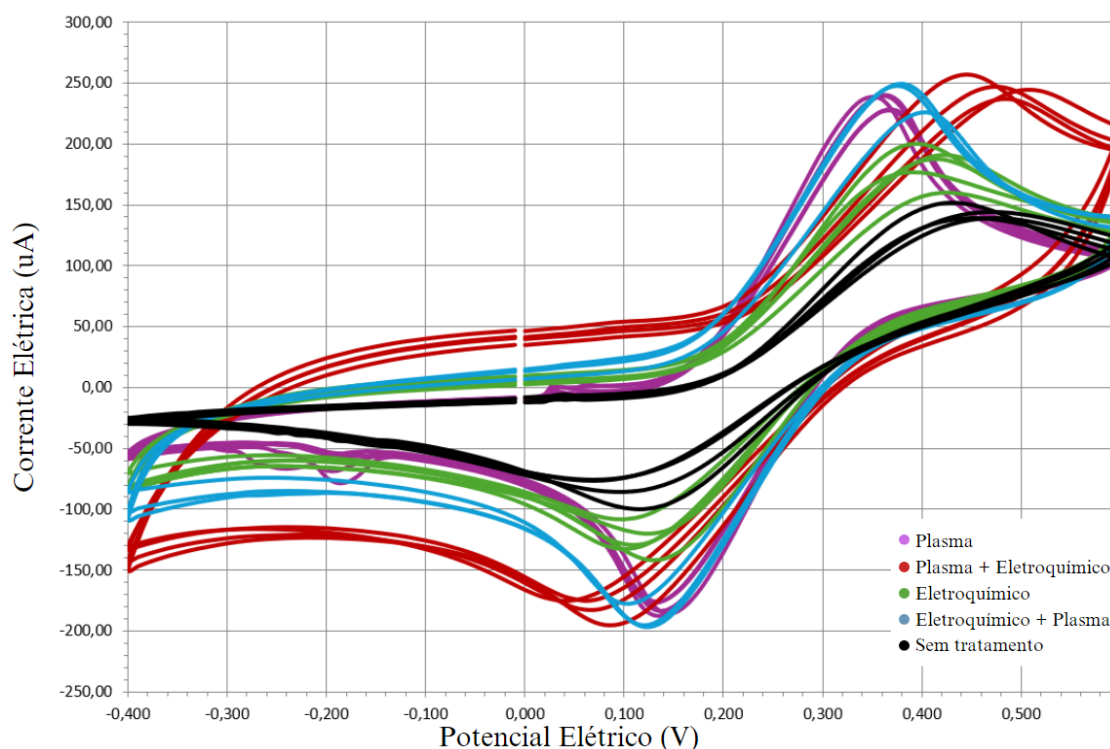


Figura 11. Compilado dos voltamogramas dos diferentes métodos de tratamento de superfície.

Ao realizar a análise estatística destes parâmetros, o teste ANOVA rejeitou a igualdade dos métodos pela diferença significativa entre eles, tanto na i_{pox} ($F=31.203$; $P=3.3E-06$), quanto no ΔE ($F=25.088$; $P=1.1E-05$); resultados que vão ao encontro dos apresentados em seus voltamogramas.

Portanto, aplicou-se o teste de Tukey para comparação entre os métodos, gerando as figuras 12 e 13. Desta forma, observa-se que o tratamento eletroquímico, quando empregado sozinho, não apresenta uma i_{pox} tão acentuada quanto os demais métodos. Além disso, o tratamento eletroquímico com tratamento de plasma frio subsequente apresenta maior ΔE . Diante disso, destaca-se o tratamento de plasma frio, empregado sozinho ou subsequente ao tratamento eletroquímico. Estes métodos se mostraram como os mais capazes de otimizar os parâmetros avaliados.

Diante disso, os dois métodos destacados foram testados novamente após 48 horas. Como observado nas figuras 14 e 15 (voltamogramas imediatamente após o tratamento em azul e os voltamogramas após 48 horas em vermelho), o tratamento apenas com plasma frio no intervalo de tempo avaliado demonstrou estabilidade, no entanto, o mesmo não foi possível para o tratamento eletroquímico seguido pelo tratamento com plasma frio.

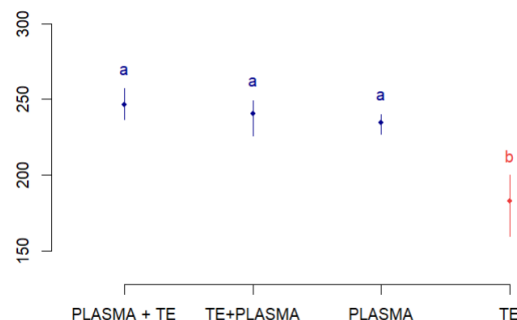


Figura 12. Teste de Tukey para comparação das correntes de pico de oxidação nos métodos avaliados.

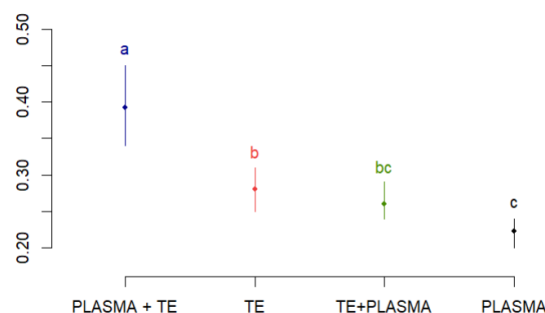


Figura 13. Teste de Tukey para comparação das variações de potenciais de pico nos métodos avaliados.

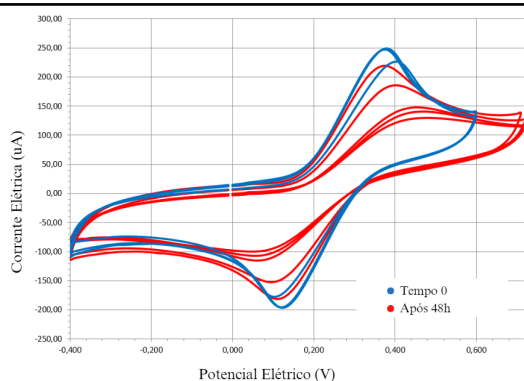


Figura 14. Voltamogramas de sensores tratados com tratamento eletroquímico seguido de plasma frio após 0 e 48 horas.

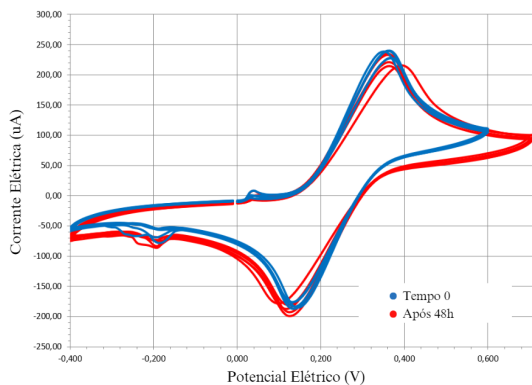


Figura 15. Voltamogramas de sensores tratados apenas com plasma frio após 0 e 48 horas.

Tabela 12. Dados das correntes de pico de oxidação em mA nos tempos avaliados.

Tratamento	Média	Desvio
Plasma frio	0,235	0,06
Plasma 48h	0,224	0,10
Eletroquímico e plasma frio	0,241	0,13
Eletroquímico e plasma 48h	0,164	0,37

Tabela 13. Dados das variações dos potenciais de pico em V nos tempos avaliados.

Tratamento	Média	Desvio
Plasma frio	0,22	0,02
Plasma 48h	0,25	0,03
Eletroquímico e plasma frio	0,26	0,03
Eletroquímico e plasma 48h	0,34	0,06

O teste de médias não rejeitou a estabilidade de ambos métodos em suas i_{pox} ($P_{\text{PLASMA}}=0.856$; $P_{\text{TE+PLASMA}}=0.391$) e em seus ΔE ($P_{\text{PLASMA}}=0.346$; $P_{\text{TE+PLASMA}}=0.061$). Embora os testes estatísticos não diferenciem estes tratamentos, a estabilidade de cada um é evidenciada visualmente nos voltamogramas das figuras 14 e 15 e descritivamente nas tabelas 12 e 13.

Diante disso, observa-se uma maior estabilidade no tratamento de plasma frio em sensores que não passaram por tratamento eletroquímico. Em trabalhos futuros, esta técnica deverá ser avaliada em maiores intervalos de tempo, de forma a atestar com mais precisão e acurácia o seu tempo de validade.

Imobilização de anticorpo

A partir da técnica aplicada de *drop casting* sobre o eletrodo de trabalho seguida de VC conforme os padrões estabelecidos na metodologia, obteve-se o seguintes voltamogramas:

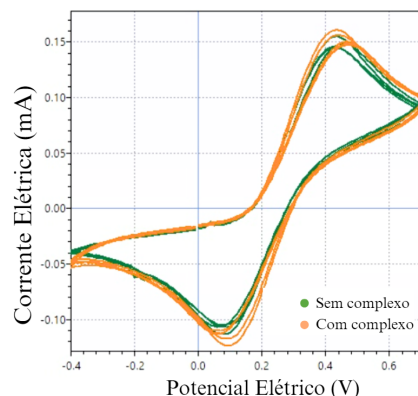


Figura 16. Voltamogramas de sensores sem tratamento, com e sem o complexo Ag-Ab.

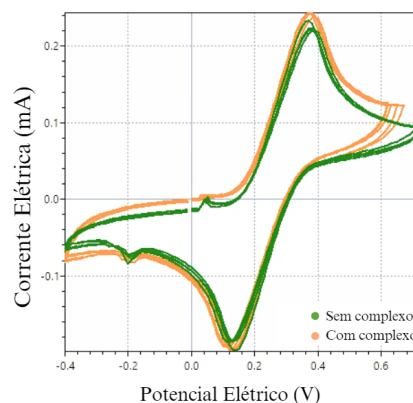


Figura 17. Voltamogramas de sensores tratados com plasma frio, com e sem o complexo Ag-Ab.

Embora seja perceptível a mudança na qualidade do sensor em termos de sensibilidade e estabilidade, não foi percebida diferença significativa nos parâmetros para os sensores onde foi depositado o complexo

Ag-Ab com relação a suas respectivas medidas de branco, como visto nas figuras 16 e 17. Isso se repetiu tanto para a condição com plasma frio, quanto para a condição sem tratamento.

Conforme as propriedades que levam a formação do complexo, como as ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas entre o Ag e o Ab, os autores acreditam que outro tipo de medida eletroquímica seria mais adequada. A redução da área superficial do sensor causada pela presença do complexo pode ser detectável através de uma medida que leve em consideração a resistividade gerada na superfície. Neste sentido, uma medida impedimétrica como a Espectroscopia de Impedância pode ser mais apropriada, pois leva em consideração os fatores citados acima.

Além disso, anticorpos são estruturas proteicas que possuem uma extremidade amino e uma carboxiterminal, conforme a sua síntese biológica de polimerização de aminoácidos. Desta forma, a sua interação com a superfície do sensor depende de grupos funcionais que permitam a sua imobilização/fixação e transmissão de cargas; neste sentido, diferentes métodos vêm sendo aplicados. Nanopartículas de ouro (AuNP) possuem vantagens na sua aplicação em sensores, como biocompatibilidade, alta condutividade e potencial de funcionalização com agentes compatíveis com os bioreceptores. Considerando a limpeza e modificação gerada pelo plasma frio, essa técnica tem potencial para melhorar a adsorção de nanopartículas na superfície do sensor. Assim, as AuNPs tornam-se uma alternativa promissora, podendo ser adsorvidas no sensor após funcionalização com agentes de grupo amina ou carboxila para acoplamento de Ab.

Desta forma, sugere-se que o estudo continue através da avaliação da imobilização do Ag-Ab com diferentes padrões de medidas eletroquímicas e aplicação de AuNPs funcionalizadas para melhorar a condutividade e adesão, levando em consideração o aprimoramento do sensor a partir do plasma frio.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode se afirmar que o tratamento eletroquímico, bem como o tratamento de plasma frio, têm potencial de otimizar as propriedades do sensor de carbono/grafeno, sendo ambas técnicas efetivas, rápidas e de baixo custo. Ademais, destaca-se o tratamento com plasma frio, por ter apresentado maiores correntes de pico de oxidação junto com menores variações de potencial de pico e por ser um processo com maior potencial de escalonamento. Esta técnica promove um intenso processo de oxidação e limpeza da superfície, reduzindo significativamente a hidrofobicidade da mesma. Este mostrou boa estabilidade ao longo de

48h, mas ainda há de ser explorado em maiores intervalos. No entanto, não foram percebidos efeitos do plasma frio na detecção do Ag-Ab na superfície do sensor, o que pode representar uma falha no processo de imobilização, visto que também não foram observadas diferenças significativas nos sensores onde não houve tratamento. Os autores destacam que o plasma frio pode ser combinado com a deposição de AuNPs na superfície do sensor, um processo que aumenta a condutividade e permite o acoplamento de bioreceptores. Neste sentido, o trabalho terá andamento em próximos estudos que irão avaliar o acoplamento de anticorpos em AuNPs, bem como a deposição destas nos sensores com e sem tratamento.

REFERÊNCIAS

- GONZALEZ-SANCHEZ, M. I., et al. Electrochemical performance of activated screen printed carbon electrodes for hydrogen peroxide and phenol derivatives sensing. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 839, p. 75-82, Abril 2019.
- HAIBER, S. et al. Characterization of the uppermost layer of plasma-treated carbon nanotubes. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 3-7, p. 811-815, Março 2003.
- KISSINGER, Peter e HEINEMAN, William. Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 702-706, Setembro 1983.
- LAW, Kock-Yee. Water-surface interactions and definitions for hydrophilicity, hydrophobicity and superhydrophobicity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 8, Julho 2015.
- LIM, Kyung-Bum; LEE, Duck-Chool. Surface modification of glass and glass fibres by plasma surface treatment. **Surface and Interface Analysis**, v. 36, n. 3, p. 254-258, Março 2004.
- MABBOTT, Gary A. An Introduction to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 9, p. 697-701, Setembro 1983.
- NAHIRNY, Everaldo Pedrosa et al. Improvement in the performance of an electrochemical sensor for ethanol determination by chemical treatment of graphite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 877, Setembro 2020.
- PAIXÃO, Thiago, R. L. C. Measuring electrochemical surface area of nanomaterials versus Randles-Ševčík equation. **ChemElectroChem**, v. 7, n. 16, Junho 2020.
- SASMAZEL, Hilal Turkoglu et al. Atmospheric Pressure Plasma Surface Treatment of Polymers and Influence on Cell Cultivation. **Molecules**, v. 26, n. 6 p. 1665, 2021.
- TALEAT, Zahra et al. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013). **Microchimica Acta**, v. 181, p. 865-891, abril 2014.
- XAVIER, M. G.; SIMÕES, F. R. Electrochemical Sensors. In: ROZ, Alessandra L. Da et al. (org.). **Nanoscience and its Applications**. Elsevier, 2016. p. 155-177.