



\* B R 1 0 2 0 2 3 0 0 5 3 5 2 A 2 \*

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023005352-1 A2

(22) Data do Depósito: 22/03/2023

(43) Data da Publicação Nacional:  
01/10/2024

(54) **Título:** ELETRODO, MÉTODO DE PREPARO DO ELETRODO, BIOSENSOR E USO DO BIOSENSOR

(51) **Int. Cl.:** C25D 5/48; C25D 7/00; C25D 11/00; H01L 31/0256.

(52) **CPC:** C25D 5/48; C25D 7/006; C25D 11/00; H01L 31/0256.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP.

(72) **Inventor(es):** OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR; JOSÉ LUIZ BOTT NETO; LORENZO ANTONIO BUSCAGLIA; SERGIO ANTONIO SPINOLA MACHADO; THIAGO SERAFIM MARTINS.

(57) **Resumo:** ELETRODO, MÉTODO DE PREPARO DO ELETRODO, BIOSENSOR E USO DO BIOSENSOR. A invenção teve como objetivo possibilitar a miniaturização de um sistema de biossensoriamento fotoeletroquímico de fácil operação e o emprego deste sistema no ponto de atendimento e no campo. Para isso, a tecnologia foi fabricada utilizando uma impressora 3D, uma fonte de luz (LED) de 3 W, um módulo relê para controlar a fonte de excitação e um eletrodo de carbono impresso. O eletrodo impresso foi revestido com átomos de níquel ancorados em nitreto de carbono grafítico, nanopartículas de dióxido de titânio e sal de aril diazônio preparado eletroquimicamente a partir do ácido paminobenzoico. O aril diazônio eletrodepositado sobre o material fotoativo levou a um aumento da resposta do fotocatalisador, com uma fotocorrente 3,1 vezes maior. Essa estratégia de funcionalização com o sal de aril diazônio também fornece grupos carboxílicos para ancorar biomoléculas por meio da reação da carbodiimida, além de uma atividade fotocatalítica que possibilita o uso do LED de 3 W.



## **ELETRODO, MÉTODO DE PREPARO DO ELETRODO, BIOSSENSOR E USO DO BIOSSENSOR**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[01] A presente invenção se insere no campo da eletroquímica. Mais especificamente, a presente invenção é relacionada a um dispositivo de detecção fotoeletroquímico miniaturizado com alto grau de sensibilidade.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[02] Para análises clínicas e ambientais, há requisitos rigorosos, incluindo a necessidade de dispositivos sensores de alta sensibilidade e especificidade, uma vez que devem ser capazes de detectar seletivamente concentrações de moléculas muito baixas. A detecção fotoeletroquímica pode atender a esses requisitos porque a fonte de luz de excitação e o sinal elétrico de saída são separados, permitindo assim um sinal de fundo muito pequeno e, conseqüentemente, um baixo limite de detecção. No entanto, o emprego de sensores fotoeletroquímicos em pontos de atendimento distantes de grandes centros urbanos é muito difícil ou mesmo inviável pois tais dispositivos tipicamente empregam fontes de irradiação grandes e de alta potência (100-500 W), além de um sistema Arduino. Estas características tornam tais sistemas grandes, pesados e de difícil manejo, implicando em uma dificuldade substancial de levá-los até comunidades mais isoladas.

### **ESTADO DA TÉCNICA**

[03] O artigo "A portable system for photoelectrochemical detection of lactate on TiO<sub>2</sub> nanoparticles and [Ni(salen)] polymeric film", de Bott-Neto et al, publicado em 30/06/2021, revela um sistema fotoeletroquímico portátil desenvolvido com eletrodos de carbono serigrafados (SPCEs) e um diodo emissor de luz (LED) de 3 W. O dispositivo com estrutura impressa em 3D foi aplicado para detecção de lactato em nanopartículas de TiO<sub>2</sub> modificadas com filme de polímero [Ni(salen)] (referido como TiO<sub>2</sub>@poli[Ni(salen)]). O revestimento do eletrodo com o polímero aumentou a sensibilidade do sensor fotoeletroquímico, resultando em uma faixa linear de 0,1 a 20 mmol L<sup>-1</sup> com um limite de detecção (LOD) de 88 µmol L<sup>-1</sup>. O sistema de detecção exibiu excelente estabilidade, reprodutibilidade e seletividade. Também foi

demonstrado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) in situ que o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o principal produto da fotoeletrooxidação de lactato sobre TiO<sub>2</sub>@poli[Ni(salen)]. O sistema portátil pode ser empregado com qualquer tipo de eletrodos modificados para funcionar como (bio)sensores fotoeletroanalíticos, especialmente para diagnósticos no local de atendimento.

[04] De forma resumida, Bott-Neto et al (2021) descrevem a construção de um dispositivo fotoeletroquímico portátil e compatível com eletrodos impressos que possibilita a realização de medidas fotoeletroquímicas dentro do campo de sensores e biossensores fotoeletroquímico. Contudo, a diferença fundamental entre o dispositivo descrito na anterioridade e a presente invenção é o eletrodo (sensor) desenvolvido. No artigo de Bott-Neto et al foi desenvolvido um sensor fotoeletroquímico operando sob irradiação de luz ultravioleta à base de TiO<sub>2</sub> e um filme polimérico de Ni-salen. Tal sensor foi desenvolvido para a detecção direta e seletiva de lactato.

[05] Por outro lado, a tecnologia a ser protegida pela presente invenção refere-se à construção de uma plataforma fotoeletroquímica operando sob irradiação por luz visível para a posterior construção de biossensores eletroquímicos, tais como imunossensores, genossensores, etc. Esta plataforma é composta por nanopartículas de TiO<sub>2</sub> revestidas com níquel-nitreto de carbono grafítico (Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>) e funcionalizadas com sal de aril diazônio preparado a partir do ácido p-aminobenzoico. A inserção dos dois últimos componentes melhora o desempenho fotocatalítico de TiO<sub>2</sub> na região do visível, necessário para o bom funcionamento do sensor. Além disso, a eletrodeposição seletiva do sal diazônio obtido a partir do p-aminobenzoico, garantiu que os grupos carboxílicos ficassem acessíveis para a posterior imobilização de biomoléculas de reconhecimento (por exemplo anticorpos e enzimas).

[06] O documento de patente US8389696 B2, intitulado "Polymerizable diazonium salts, process for the preparation thereof and uses thereof", publicado em 22/06/2010, refere-se a uma fotoconversão realizada por meio de complexos metálicos que se ligam a nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, ZnO ou ZrO<sub>2</sub> em que a

funcionalização eletroquímica com sais de diazônio permite obter polímeros enxertados na superfície, geralmente de silício. Foi realizada usando sais de diazônio comerciais que são tetrafluoroborato de 4-nitrofenildiazônio ou tetrafluoroborato de 4-bromofenildiazônio, e em que este método nunca foi descrito para a modificação de semicondutores de banda larga como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{SnO}$  e  $\text{ZrO}_2$ . Conforme reportado pelos autores, a quantidade de tipos de sais de aril diazônio disponível é limitada, pois muitos são instáveis à temperatura ambiente e difíceis de isolar (coluna 2, linhas 65-67). Além disso, cada tipo de sal fornecerá certamente filmes poliméricos de diferentes morfologias e com distintas propriedades físico-químicas, como por exemplo, diferentes valores de condutividade, capacidade e faixa de absorção de luz.

[07] Na presente invenção, como será explicado em detalhes adiante, é usado o ácido benzoico diazônio para funcionalizar o sensor. Este é preparado a partir da dissolução do p-aminobenzoico ácido em solução de ácido clorídrico. Então, o eletrodo modificado de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  revestidas com níquel-nitreto de carbono grafítico ( $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ ) foi imerso nesta solução para prosseguir com a eletrodeposição de moléculas individuais de ácido benzoico sobre o eletrodo. Diferente do documento US8389696 B2, no qual a intensidade de fotocorrente é muito baixa e ruidosa, o que inviabiliza a construção de biossensores fotoeletroquímicos. Por outro lado, a combinação dos elementos presente na invenção resulta em um sistema com alta performance sob irradiação de luz visível, possibilitando então a construção de biossensores fotoeletroquímicos. Isso foi possível, pois enquanto o compósito  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  exibe uma aumentada intensidade de fotocorrente em 1,6 vezes comparado ao  $\text{TiO}_2$ , a funcionalização de  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  resultou em um sistema 3,1 vezes mais fotoeletroativo em relação ao  $\text{TiO}_2$  puro.

[08] Mesmo uma combinação entre os documentos de anterioridade mencionados, Bott-Neto et al e US8389696 B2 não levaria à construção de um sistema de biossensoriamento fotoeletroquímico para a detecção de baixas concentrações de biomarcadores tumorais, como é o caso do PSA (Prostate-Specific Antigen, câncer de próstata), CA15-3 (cancer antigen 15-3, câncer de mama) e outros pois, em US8389696 B2, é proposto a preparação de filmes polímeros à base de sal

de aril diazônio que não exibem uma fotoatividade adequada para a preparação de biossensores fotoeletroquímicos.

[09] Dessa forma, não há no estado da técnica um dispositivo de biossensoriamento fotoeletroquímico de baixa potência, portátil, de alta eficiência e confiabilidade e de fácil utilização.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[010] A presente invenção revela em um primeiro aspecto, um eletrodo impresso revestido com um nanocompósito fotossensível e sal de aril diazônio, particularmente em que o nanocompósito é constituído por átomos de níquel ancorados em nitreto de carbono grafítico e nanopartículas de dióxido de titânio. Tal eletrodo é altamente sensível na detecção de biomarcadores com o uso de elementos de reconhecimento biológico (por exemplo, enzimas, anticorpos, oligonucleotídeos) quando exposto à luz, por exemplo, a luz de um diodo emissor de luz (LED) de baixa potência (1-3 W).

[011] Em um segundo aspecto da presente invenção, é revelado um dispositivo biossensor que utiliza o eletrodo impresso descrito no primeiro aspecto. Este dispositivo é portátil, de simples manuseio e de baixo custo para fazer análises quantitativas ou qualitativas descentralizadas, além de permitir a detecção de importantes biomarcadores com o uso de elementos de reconhecimento biológico (por exemplo, enzimas, anticorpos, oligonucleotídeos). Este dispositivo pode ser utilizado no monitoramento da saúde de pacientes, além de permitir análises de interesse ambiental, sendo passível de emprego em consultórios médicos, no campo e em qualquer outro local de análise.

[012] Em um terceiro aspecto da presente invenção, é revelado o uso do dispositivo descrito no segundo aspecto na detecção de antígeno prostático específico (PSA).

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[013] A presente invenção passará a ser descrita a seguir com referência às suas concretizações típicas e também com referência aos desenhos apensos, nos quais:

[014] A figura 1 é uma representação de uma estrutura genérica de um (a) alcanotiol e de um (b) sal de aril diazônio de acordo com a presente invenção;

[015] A figura 2 é uma representação de um procedimento de preparação dos imunossensores PEC de acordo com a presente invenção;

[016] A figura 3 é uma representação de um sistema portátil usado em experimentos de PEC de acordo com a presente invenção;

[017] A figura 4 é uma representação da preparação do Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e as principais unidades e grupos funcionais que formam nitretos de carbono poliméricos a base de heptazina de acordo com a presente invenção;

[018] A figura 5 é uma representação de padrões de XRD do TiO<sub>2</sub>, gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de acordo com a presente invenção;

[019] A figura 6 é uma representação de espectros de FTIR de (i) TiO<sub>2</sub>, (ii) gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, (iii) Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e (iv) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção;

[020] A figura 7 é uma representação do espectro de FTIR do gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de acordo com a presente invenção;

[021] A figura 8 é uma representação dos espectros de XPS de varredura ampla do (a) gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, (b) Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, (c) TiO<sub>2</sub> e (d) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção;

[022] A figura 9 é uma representação dos espectros de XPS de alta resolução desconvoluídos do C 1s para (a) gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e (b) Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, do N 1s para (c) gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e (d) Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, Ti 2p para (e) TiO<sub>2</sub>, e (f) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção;

[023] A figura 10 é uma representação de imagens de TEM do (a), (b), (c) Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e (d), (e), (f) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, e de imagens de mapeamento do Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para (b) Ni, (c) N e de mapeamento de Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> para (e) Ti, (f) Ni de acordo com a presente invenção;

[024] A figura 11 é uma representação de um gráfico de Kubelka-Munk ( $F(r)$ ) de acordo com a presente invenção;

[025] A figura 12 é uma representação de um gráfico de Tauc do  $(F(r)h\nu)^{1/2}$  versus energia do fóton para diferentes amostras de acordo com a presente invenção;

[026] A figura 13 é uma representação de curvas transientes de fotocorrente para (i)  $\text{TiO}_2$ , (ii)  $\text{gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , (iii)  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  e (iv)  $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  recordadas em solução de PBS (pH 7,4) com 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) de acordo com a presente invenção;

[027] A figura 14 é uma representação de espectros de EIS para os mesmos materiais e condições da figura 13;

[028] A figura 15 é uma representação de voltamogramas cíclicos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  para os eletrodos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  obtidos em 0,1 M de KCl com 5,0 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  para os mesmos materiais e condições da figura 13;

[029] A figura 16 é uma representação de um gráfico de Mott-Schottky para os mesmos materiais e condições da figura 13;

[030] A figura 17 é uma representação de espectros de EIS medidos em 0,1 M de KCl contendo 5,0 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  de acordo com a presente invenção;

[031] A figura 18 é uma representação de voltamogramas cíclicos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  de  $\text{gC}_3\text{N}_4$  e  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  medidos em 0,1 M de KCl contendo 5,0 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  de acordo com a presente invenção;

[032] A figura 19 é uma representação do mecanismo de fotodeteção de PSA sobre o fotocatalisador  $\text{Amb}/\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  sob irradiação de luz LED visível de acordo com a presente invenção;

[033] A figura 20 é uma representação da resposta PEC na presença de 0,1 M de AA para  $\text{TiO}_2$  a diferentes concentrações em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP) de acordo com a presente invenção;

[034] A figura 21 é uma representação da resposta PEC na presença de 0,1 M de AA para eletrodos com  $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP) de acordo com a presente invenção;

[035] A figura 22 é uma representação da resposta PEC para  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  em diferentes condições em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP) de acordo com a presente invenção;

[036] A figura 23 é uma representação da fotocorrente de Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> para 1200 s com 0,1 M de AA em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP) de acordo com a presente invenção;

[037] A figura 24 é uma representação dos espectros de EIS registrados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-/3-</sup> de acordo com a presente invenção;

[038] A figura 25 é uma representação da resposta PEC do imunossensor obtido em solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível de acordo com a presente invenção;

[039] A figura 26 é uma representação da curva analítica para concentrações crescentes de 10<sup>-18</sup> a 10<sup>-8</sup> g mL<sup>-1</sup> de acordo com a presente invenção;

[040] A figura 27 é uma representação da estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor PEC em 10<sup>-9</sup> g mL<sup>-1</sup> de PSA de acordo com a presente invenção;

[041] A figura 28 é uma representação da seletividade do imunossensor PEC em solução de PBS contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível de acordo com a presente invenção;

[042] A figura 29 é uma representação de valores de recuperação de PSA para os imunossensores PEC incubados em solução de PBS contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível de acordo com a presente invenção;

[043] A figura 30 é uma representação explodida do sistema fotoeletroquímico de acordo com a presente invenção;

[044] A figura 31 é uma representação fechada do sistema fotoeletroquímico de acordo com a presente invenção.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[045] Modalidades específicas da presente divulgação são descritas abaixo. Em um esforço para fornecer uma descrição concisa dessas modalidades, todos os recursos de uma implementação real podem não ser descritos no relatório descritivo. Deve ser apreciado que no desenvolvimento de qualquer implementação real, como em qualquer projeto de engenharia ou design, inúmeras decisões específicas de implementação devem ser feitas para atingir os objetivos específicos dos

desenvolvedores, como conformidade com restrições relacionadas ao sistema e negócios, que pode variar de uma implementação para outra. Além disso, deve ser apreciado que tal esforço de desenvolvimento pode ser complexo e demorado, mas seria, no entanto, um empreendimento de rotina de design, e fabricação para aqueles de habilidade comum tendo o benefício desta divulgação.

[046] Um primeiro aspecto da invenção é relacionado a um eletrodo impresso modificado com um material fotoativo. Ao entrar em contato com uma amostra e sendo banhado por uma luz adequada, o eletrodo pode reagir com o analito de interesse, gerando uma fotocorrente. Isto pode indicar a presença de uma certa substância na amostra. Esta técnica é comumente utilizada no estado da técnica para auxiliar a detecção, por exemplo, de certos tipos de células cancerígenas.

[047] De acordo com a presente invenção, o referido eletrodo é preferencialmente fabricado a partir da técnica de serigrafia utilizando uma tinta condutora de carbono, embora esta não seja o único tipo de tinta e a única maneira de fabricação possível. O eletrodo é revestido com um nanocompósito fotossensível, constituído por átomos de níquel ancorados em nitreto de carbono gráfico, nanopartículas de dióxido de titânio, e um sal de aril diazônio. O sal de aril diazônio atua para fornecer grupos carboxílicos para ancorar biomoléculas e como agente amplificador da resposta de fotocorrente. A combinação destes materiais resultou em um eletrodo com atividade fotoeletrocatalítica e com alta sensibilidade. Detalhes da obtenção deste fotocatalisador serão fornecidos a seguir.

[048] A detecção fotoeletroquímica (PEC, *photoelectrochemical*) é uma maneira analítica recente e de rápido desenvolvimento para detectar moléculas, cujos princípios de trabalho envolvem as seguintes etapas: (i) um material fotoativo é irradiado com luz, promovendo elétrons da banda de valência (VB, *valence band*) para a banda de condução (CB, *conduction band*); (ii) elétrons ou buracos migram para a superfície do eletrodo na interface com o eletrólito, produzindo uma fotocorrente; (iii) analitos alvo interagem com o eletrodo, afetando a separação de cargas e/ou o processo de migração, alterando assim a fotocorrente gerada. Como a fonte de luz de excitação e o sinal elétrico de saída são separados, o sinal de fundo exibido pelos

sensores PEC é muito pequeno e o limite de detecção pode atingir um nível muito baixo.

[049] Os sensores PEC podem ser anódicos ou catódicos, dependendo se semicondutores tipo n ou tipo p são usados, respectivamente. Para sensores anódicos, o analito atua como um doador de elétrons para os buracos fotoogerados, e os elétrons fotoogerados são transferidos para o circuito externo, sob um potencial aplicado. Os sensores catódicos PEC operam de maneira contrária. A maioria dos sensores fotoeletroquímicos, incluindo imunossensores, genossensores e aptassensores, usam grandes fontes de irradiação de alta potência (100 a 500 W), o que impede sua miniaturização e dificulta seu uso em locais distantes de grandes centros urbanos. Como pequenos diodos emissores de luz (LEDs) oferecem baixa energia de irradiação, empregá-los em dispositivos PEC de alto desempenho requer materiais com alta atividade fotocatalítica.

[050] O semicondutor tipo n  $\text{TiO}_2$  é um candidato a tal material devido ao seu baixo custo, forte absorção de luz e inércia química, mas é limitado por causa de sua rápida recombinação de portadores de carga fotoogerados. Materiais com níveis de energia favoráveis à separação de carga podem acelerar a transferência de elétrons em reações PEC. Por exemplo, materiais à base de níquel (Ni) aumentam a atividade fotocatalítica e a estabilidade dos semicondutores. Além disso, a dopagem com Ni pode promover a absorção de luz pela introdução de estados de Ni 3D na lacuna, melhorando também a atividade fotocatalítica. Compósitos com nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  e filmes poliméricos são usados em sensores e biossensores fotoeletroquímicos pois suas estruturas porosas podem facilitar a penetração da luz e aumentar a intensidade coletada pelo fotoeletrocatalisador devido a múltiplas reflexões.

[051] Dentre as estratégias disponíveis para a funcionalização da superfície do eletrodo de modo a possibilitar a imobilização de um elemento de biorreconhecimento via ligação covalente, destacam-se o uso de monocamadas automontadas (SAMs, *self-assembled monolayers*) com alcanotóis e a redução de sais de aril diazônio, como visto na Figura 1, com a estrutura genérica de um alcanotiol em seu quadro a) e com a estrutura genérica de um sal de aril diazônio em seu quadro

b). R é o grupo funcional carboxílico ou amina. A funcionalização de superfícies metálicas como de ouro, platina, cobre e prata com SAMs a base de alcanotióis, dissulfetos dialquil e sulfetos é uma prática comum. A formação de SAM é geralmente alcançada imergindo o substrato metálico limpo em uma solução diluída de um tiol desejado, ao qual as funcionalidades do tiol adsorvem quimicamente sobre o metal, formando espontaneamente ligações S-metal. A natureza automontada da monocamada surge devido ao efeito hidrofóbico que impulsiona o alinhamento vertical espontâneo das estruturas de alcano, produzindo uma camada ordenada. A metodologia de redução de sais de aril diazônio é teoricamente aplicável à funcionalização covalente de qualquer superfície condutora. A funcionalização ocorre por meio da formação redutiva de um radical aril que, posteriormente, ataca a superfície do eletrodo; sendo assim, é um processo eletroquimicamente controlável. A maior limitação para o uso de sistemas SAM e de sais de aril diazônio em aplicações eletroquímicas é que eles são estáveis apenas em um intervalo limitado de potencial.

[052] Com base nas considerações acima, os inventores desenvolveram um eletrodo com atividade fotoeletroquímica melhorada por meio da utilização de sal de aril diazônio. Conforme será visto, este diferencial tem o efeito técnico de tornar o eletrodo com atividade fotoeletroquímica muito mais sensível do que os já conhecidos, permitindo fontes de luz e, conseqüentemente, de potência, muito menores que as normalmente utilizadas. O eletrodo com atividade fotoeletroquímica de acordo com a presente invenção é sensível o bastante para realizar detecção de certas substâncias sob uma fonte de luz, por exemplo, sob a luz de um LED da ordem de 1-3 W de potência. Os eletrodos fotossensíveis convencionais necessitam de uma fonte de luz de potência da ordem de 100-500 W.

[053] Será descrito a seguir um método preferencial de obtenção de um eletrodo biossensor de acordo com a presente invenção. Neste método preferencial, são utilizados átomos de níquel ancorados em nitreto de carbono grafítico ( $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ ) e nanopartículas de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ). No entanto, estas características não são limitativas. Outras partículas fotossensíveis (vanadato de bismuto ( $\text{BiVO}_4$ ), óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), sulfeto de cádmio ( $\text{CdS}$ ) e outras técnicas de ancoragem (eletroforese,

eletrodeposição, layer-by-layer) podem ser utilizadas sem se afastar do escopo da presente invenção.

[054] Exemplo de concretização

1. Preparação de uma plataforma de detecção Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>

[055] Uma quantidade de 1,0 a 3,0 de melamina, preferencialmente 1,0 g, é macerada com 10,0 g de NaCl e transferida para um cadinho de porcelana com tampa. O sistema é aquecido entre 500 e 700 °C por 4h, preferencialmente a 600 °C (5 °C min<sup>-1</sup>), em um forno sob atmosfera de ar e deixado resfriar até a temperatura ambiente. Um produto de coloração amarela é obtido e retirado do cadinho e disperso em uma quantidade de água suficiente para a solubilização completa do material, preferencialmente 100,0 mL de água, e então centrifugado entre 7.000 e 11.000 rpm por entre 5 e 30 minutos, preferencialmente a 10.000 rpm por 15 minutos. O procedimento de dispersão e centrifugação é repetido pelo menos mais quatro vezes, preferencialmente mais seis vezes. Em seguida, o material é seco preferencialmente a 60 °C por 24 horas, ou, alternativamente, a vácuo a 50 °C por 12h, ou até obtenção da secagem completa.

[056] Íons de níquel são então introduzidos na estrutura gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> pelo método de troca catiônica. Para isso, 0,1 g de gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> em 2,0 mL de água é esfoliado em banho ultrassônico por 10 min. Em seguida, 0,4 g de NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O são dissolvidos em 2,0 mL de água, de forma que a proporção entre os componentes 0,1 g de gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e de NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O seja no mínimo 1:1 (molar). Ambas as soluções são misturadas e mantidas sob agitação por 24 h ou até que o níquel seja incorporado no nitreto de carbono gráfico. O material é então lavado por centrifugação e seco preferencialmente a 60°C por 12 horas, ou, alternativamente, a vácuo a 50 °C por 12h, ou até obtenção da secagem completa. Por fim, compósitos Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> (x = 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% em peso de Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> em TiO<sub>2</sub>) são preparados por adsorção. Aliquotas de 5,0 mL de soluções contendo 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub> e quantidades apropriadas de Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> são preparadas, especificamente, as alíquotas contêm 0,3, 1,1, 2,5, 4,3, 6,7, 10, 15, ou 23,3 mg que equivalem respectivamente a 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% de Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> em relação TiO<sub>2</sub>. Outras combinações e quantidades podem ser possíveis para

as alíquotas sem se afastar do escopo aqui descrito. Por exemplo, é possível que todas as alíquotas sejam preparadas com 10% de Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> em relação TiO<sub>2</sub>. O material é então mantido sob agitação preferencialmente por 24h e seco a 60 °C, ou a vácuo a 50 °C por 12h, ou até obtenção da secagem completa.

[057] Em seguida, eletrodos são modificados via método *drop casting* como já bem descrito na técnica com entre 6,0 µL e 10 µL, preferencialmente 6,0 µL, de Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> (2,0 mg mL<sup>-1</sup> de TiO<sub>2</sub>) e secos sob vácuo à temperatura ambiente, isto é, 23 °C. Posteriormente, as superfícies dos eletrodos modificados são funcionalizadas via redução eletroquímica de um sal de aril diazônio (Amb). O sal de 4-carboxifenil diazônio pode ser preparado *in situ* misturando de 1 a 5 mM, preferencialmente 2,0 mM, de ácido p-aminobenzoico com 2,0 mM de NaNO<sub>2</sub> em 0,5 M de HCl e agitado durante 5 min à temperatura ambiente. De um a dez ciclos voltamétricos são registrados entre 0,2 e -0,6 V a 100 mV s<sup>-1</sup>, preferencialmente três ciclos voltamétricos. Os eletrodos são referidos como Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>.

[058] Os eletrodos Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção possuem um alto grau de sensibilidade, sendo capazes de detecções sob uma luz de LED de baixa potência (1 a 3 W), o que anteriormente não era possível. Isto é vantajoso pois a presente invenção dispensa fontes de potência de 100 a 500 W, como seria tipicamente requerido anteriormente pela técnica. Por conseguinte, dispositivos biossensores baseados no eletrodo Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção podem ter um tamanho reduzido e consumir muito menos energia, possibilitando transporte e manuseio facilitados. Por sua vez, isto possibilita o uso de dispositivos biossensores baseados no eletrodo Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, de acordo com a presente invenção, em pontos de atendimento afastados de grandes centros urbanos, por exemplo, em comunidades ribeirinhas.

[059] O eletrodo Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção é particularmente útil na detecção de antígeno prostático específico (PSA). Será descrito também um dispositivo biossensor utilizando o eletrodo Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção que é particularmente útil para detecção de PSA.

## 2. Preparação do eletrodo para PSA

[060] A Figura 2 ilustra a preparação de um biossensor para detecção de PSA utilizando o eletrodo biossensor Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção. Os eletrodos Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> foram incubados com 10,0 e 50,0 µL, preferencialmente com 15,0 µL, de agente de cross-linking N-(3-dimetilaminopropil)-N<sup>2</sup>-etilcarbodiimida cloridrato/hidroxisuccinimida (EDC/NHS), ambos entre 50,0 e 400,0 mM, preferencialmente a 100,0 mM, em água, por entre 30 e 60 min, preferencialmente 30 min, a 20°C, para ativar o grupo carboxílico do ácido benzoico eletrodepositado. Em seguida, 15,0 µL de anti-PSA entre 1,0 e 10,0 µg mL<sup>-1</sup>, preferencialmente 2,0 µg mL<sup>-1</sup>, são dispensados no eletrodo e incubados por 60 min a 20°C. Para bloquear sítios de ligação não específicos, 15,0 µL de solução de albumina de soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*) entre 1% e 3%, preferencialmente 1%, em peso em água são adicionados por entre 30 e 60 min, preferencialmente 30 min, a 20°C. Entre cada etapa de preparação, o eletrodo é lavado com solução de tampão fostafo salino (PBS, *phosphate buffered saline*). A detecção de PSA por técnica fotoeletroquímica (PEC, *photoelectrochemical*) é realizada usando medidas de cronoamperometria (CA) em um sistema portátil como o da Figura 3 com uma luz LED de 3W (410 nm; 350 mW cm<sup>-2</sup>) durante ciclos de irradiação ON/OFF de 20 s. Soluções de PSA (15,0 µL) em diferentes concentrações (de 10<sup>-18</sup> a 10<sup>-8</sup> g mL<sup>-1</sup>) são incubadas por 30 min a 20°C. As fotocorrentes são registradas em 100,0 µL de solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de ácido ascórbico (AA) a 0 V vs. potencial de circuito aberto (OCP, *open circuit potential*).

### 3. Detecção eletroquímica de PSA

[061] A combinação de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e aril diazônio aumenta a eficiência da coleta de luz visível e diminui a recombinação de portadores de carga, permitindo assim sua aplicação sob luz LED azul ( $\lambda = 410 \text{ nm}$ ). Os anticorpos são imobilizados covalentemente via grupos carboxílicos do sal de aril diazônio por EDC/NHS. Por meio de imunorreações, o PSA é reconhecido e capturado pelo anticorpo. Quando o LED é aceso, pares elétron-buraco são fotogerados na superfície do fotocatalisador, resultando na eletrooxidação do ácido ascórbico (AA). Assim, a mudança na fotocorrente induzida pela variação da concentração de PSA é detectada.

[062] O aril diazônio eletrodepositado sobre Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> diminui a recombinação de portadores de carga foto gerados, levando a um aumento de 3,1 vezes na fotocorrente em relação ao TiO<sub>2</sub> puro. Essa estratégia de funcionalização fornece grupos carboxílicos para ancorar anticorpos por meio da reação da carbodiimida, que pode ser estendida a qualquer outro tipo de biossensor. Sob condições ideais, o sensor fotoeletroquímico de acordo com a concretização preferencial da presente invenção é capaz de detectar PSA de 10<sup>-16</sup> a 10<sup>-8</sup> g mL<sup>-1</sup> com um limite de detecção de 0,06 fg mL<sup>-1</sup>. Isto permite a miniaturização de dispositivos e sistemas que o utilizem, com as vantagens já explicadas anteriormente.

[063] O mecanismo que ocasiona a maior sensibilidade é explicado a seguir tomando como exemplo a concretização preferencial do eletrodo biossensor Ab/Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>.

#### 4. Estrutura e morfologia

[064] A Figura 4 é a ilustração esquemática da preparação do Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e as principais unidades e grupos funcionais que formam nitretos de carbono poliméricos à base de heptazina. O compósito Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> foi preparado pela policondensação térmica da melamina na presença de NaCl, seguida da troca catiônica de sódio por níquel. Uma análise com espectroscopia de absorção atômica indicou a presença de 10,7% (RSD = 0,69%) de Ni no gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Os padrões de XRD de TiO<sub>2</sub>, gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> são mostrados na Figura 5. O pico de difração em  $\sim 2\theta = 14,2^\circ$  corresponde à periodicidade das unidades de heptazina. O outro pico largo em  $\sim 2\theta = 26,7^\circ$  é característico do plano de reflexão (002) do grafite em camadas. Após a incorporação de átomos únicos de Ni no gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, os picos de difração em  $2\theta = 26,6^\circ$  e  $2\theta = 28,8^\circ$  são quase completamente suprimidos por um pico intenso em  $2\theta = 28,2^\circ$ , indicando mudanças significativas no espaçamento interplanar (SAVATEEV, A.; PRONKIN, S.; WILLINGER, M. G.; ANTONIETTI, M.; DONTSOVA, D. Towards organic zeolites and inclusion catalysts: heptazine imide salts can exchange metal cations in the solid state. Chemistry - An Asian Journal, Weinheim, v. 12, n. 13, p. 1517–1522, 2017). A ausência de padrões de difração característicos de materiais à base de níquel (como NiO e Ni(OH)<sub>2</sub>) confirma a formação de uma única estrutura de átomo de Ni. O padrão de

XDR do TiO<sub>2</sub> comercial na Figura 5 pode ser indexado principalmente à fase anatase, cujo tamanho médio de cristalito (calculado usando a equação de Scherrer) é de 20 nm ( $2\theta = 25,4^\circ$ ). Sinais fracos devido à fase rutilo também foram observados.

[065] A Figura 6 mostra os espectros de FTIR do TiO<sub>2</sub>, gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>. O TiO<sub>2</sub> apresenta uma banda larga em torno de 710 cm<sup>-1</sup> atribuída ao alongamento Ti-O-Ti, enquanto as bandas em 3400 e 1360 cm<sup>-1</sup> são devidas a espécies de OH adsorvidas. Para o gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> várias bandas fortes são observadas entre 1650 e 1200 cm<sup>-1</sup>, correspondendo ao estiramento heterocíclico típico de  $\nu(\text{C-NH-C})$  e  $\nu(\text{C=N})$  (TIAN, Y.; ZHOU, F.; ZHAN, S.; YANG, Y.; LIU, Y.; HE, Q. Mechanisms on the sterilization performance of fluorocarbon resin composite coatings enhanced by g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, Dordrecht, v. 27, n. 1, p. 353–362, 2017). A banda em 803 cm<sup>-1</sup> é característica do modo de respiração do anel da triazina (KRIVTSOV, I.; MITORAJ, D.; ADLER, C.; ILKAEVA, M.; SARDO, M.; MAFRA, L.; NEUMANN, C.; TURCHANIN, A.; LI, C.; DIETZEK, B.; LEITER, R.; BISKUPEK, J.; KAISER, U.; IM, C.; KIRCHHOFF, B.; JACOB, T.; BERANEK, R. Water-soluble polymeric carbon nitride colloidal nanoparticles for highly selective quasi-homogeneous photocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, Weinheim, v. 59, n. 1, p. 487–495, 2020). Após a incorporação do níquel, um pequeno deslocamento foi observado nas bandas de 1580, 1398 e 1319 cm<sup>-1</sup> a 1585, 1412 e 1323 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses deslocamentos indicam que a coordenação do níquel ocorre nas unidades de heptazina (Figura 7, Espectro de FTIR do gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>). O fotocatalisador Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> (curva iv da Figura 6) apresenta as principais características do Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e do TiO<sub>2</sub>. Além disso, o deslocamento de 710 para 625 cm<sup>-1</sup> sugere a formação de uma heterojunção entre Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e TiO<sub>2</sub>.

[066] A composição química e o estado de oxidação dos compósitos foram investigados por espectroscopia de fotoelétrons de raios X. Os espectros de XPS de varredura ampla são vistos na Figura 8, onde a curva (a) corresponde a gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, a curva (b) corresponde a Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, a curva (c) corresponde a TiO<sub>2</sub> e a curva (d) corresponde a Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>. Os espectros confirmam a troca catiônica de sódio por níquel. Além

disso,  $gC_3N_4$ ,  $Ni-gC_3N_4$  e  $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$  também exibem picos característicos de C 1s, N 1s, Ti 2p e O 1s. Os sinais de O 1s e C 1s em todas as amostras são devidos à contaminação carbonácea adventícia.

[067] Para o  $gC_3N_4$  no quadro a) da Figura 9, o sinal C 1s do  $gC_3N_4$  consiste em três contribuições em 284,5, 286,6 e 287,7 eV que correspondem a grupos C-C/C=C, C-O (ambos de contaminação adventícia externa ou produtos de degradação parcial) e N-C=N no anel heterocíclico, respectivamente. Como mostrado no quadro b) da Figura 9, o espectro do C 1s do  $Ni-gC_3N_4$  exibiu um perfil semelhante ao do  $gC_3N_4$ . No entanto, houve uma mudança na energia de ligação devido à interação entre as espécies de  $gC_3N_4$  e Ni. Os quadros c) e d) da Figura 9 mostram respectivamente os espectros de  $gC_3N_4$  e  $Ni-gC_3N_4$  na região de energia do N 1s. Ambos os espectros são consistentes com uma estrutura baseada em heptazina com contribuições de ligações N-C=N (398,3 eV, N piridínico) e (C)3-N (399,2 eV, N grafítico) no anel heterocíclico. Contribuições também são observadas em 397, 400,6 e 403,5 eV atribuídas a átomos de nitrogênio desprotonados, ligações -NH/NH<sub>2</sub> (devido à condensação parcial ou polimerização incompleta), e excitação do elétron  $\pi$  nos grupos ciano, respectivamente. Há também uma mudança na energia de ligação do  $Ni-gC_3N_4$  em comparação com  $gC_3N_4$ . Os quadros e) e f) da Figura 9 exibem respectivamente os espectros XPS do Ti 2p para  $TiO_2$  e  $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ . O  $TiO_2$  exibe dois picos em 458,5 e 464,3 eV característicos de  $Ti^{4+}$ , enquanto  $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$  exibe dois picos adicionais em 456,9 e 462,7 eV atribuídos a  $Ti^{3+}$ , o que provavelmente é devido à redução de  $Ti^{4+}$  durante a formação da heterojunção. Isso pode ser benéfico do ponto de vista fotocatalítico, uma vez que quantidades específicas de  $Ti^{3+}$  podem suprimir a recombinação de portadores de carga.

[068] A morfologia do  $Ni-gC_3N_4$  e  $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$  é avaliada com as imagens de TEM na Figura 10. O  $Ni-gC_3N_4$  é formado por algumas camadas que se sobrepõem para gerar a parte mais escura da imagem no quadro a) da Figura 10. O mapeamento elementar confirma a distribuição uniforme do átomo de níquel, quadro b) da Figura 10, e nitrogênio, no quadro c) da Figura 10. Os quadros d), e) e f) da Figura 10 mostram as imagens e o mapeamento elementar do composto  $Ni_{10}-gC_3N_4/TiO_2$ , na

qual o mapeamento para Ti, quadro e) da Figura 10, e Ni, quadro f) da Figura 10, é uma evidência clara de que Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> está bem distribuído junto ao TiO<sub>2</sub>.

### 5. Propriedades fotoeletroquímicas

[069] A Figura 11 mostra o gráfico de Kubelka-Munk ( $F(r)$ ) obtido a partir de espectros UV-vis no modo de refletância difusa. A borda de absorção do compósito Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> exibiu um desvio para o vermelho em comparação com o TiO<sub>2</sub> comercial, indicando que a heterojunção de Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e TiO<sub>2</sub> aumenta significativamente a absorção de luz visível. Além disso, a incorporação de níquel na estrutura do gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> não altera muito a borda de absorção. O mesmo é observado ao comparar gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> e Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> (não mostrado aqui). As energias de band gap para transição indireta foram calculadas a partir do gráfico de Tauc da função Kubelka-Munk usando  $[F(r)hv]^{1/2} = k(hv - E_g)$ , na qual  $F(r)$  é a função de Kubelka-Munk,  $h$  é a constante de Plank,  $k$  é uma constante relacionada ao material, e  $hv$  é a energia do fóton. Como mostrado na Figura 12, os valores de band gap para TiO<sub>2</sub>, gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, e Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> foram estimados como 3.23, 2.75, e 2.76 eV, respectivamente.

[070] Fazendo referência agora às Figuras 13-16, a resposta PEC dos materiais foi avaliada medindo-se as curvas de fotocorrente transiente, onde (i) TiO<sub>2</sub>, (ii) gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, (iii) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> e (iv) Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, recordadas em solução de PBS (pH 7,4) com 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível (410 nm). As fotocorrentes na Figura 13 para os compósitos gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> e Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> são 1,3 e 1,6 vezes o valor do TiO<sub>2</sub>. O eletrodo Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> é 3,1 vezes mais fotoeletroativo, indicando que a funcionalização da superfície com aril diazônio pode gerar mais fotoelétrons e diminuir a recombinação de portadores de carga. A Figura 14 ilustra Espectros de EIS (linhas contínuas correspondem ao fit usando o circuito de Randles). Os gráficos de Nyquist foram usados para determinar a resistência à transferência de carga (R<sub>ct</sub>) ajustando os dados ao modelo de circuito de Randles. O R<sub>ct</sub> é 7,85 kΩ, 10,12 kΩ e 7,83 kΩ para TiO<sub>2</sub>, gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> e Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, respectivamente. O aumento da fotocorrente para Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> em comparação com gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> deve estar associado à diminuição de R<sub>ct</sub>, uma vez que os band gaps para gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (2,75 eV) e Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (2,76 eV) sejam muito próximos. A

Figura 15 ilustra voltamogramas cíclicos a  $50 \text{ mV s}^{-1}$  para os eletrodos de  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ ,  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  obtidos em  $0,1 \text{ M}$  de  $\text{KCl}$  com  $5,0 \text{ mM}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ . A figura 16 ilustra o Gráfico de Mott-Schottky.

[071] Além disso, como visto nas Figuras 17 e 18, a  $R_{ct}$  para  $\text{gC}_3\text{N}_4$  e  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  são  $10,10 \text{ k}\Omega$  e  $8,47 \text{ k}\Omega$ , indicando também um aumento na condutividade de  $\text{gC}_3\text{N}_4$  após a inserção de níquel, onde a Figura 17 representa espectros de EIS e a Figura 18 representa os voltamogramas cíclicos registrados em  $0,1 \text{ M}$  de  $\text{KCl}$  contendo  $5,0 \text{ mM}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , conforme na Figura 15. A Figura 18 mostra correntes ligeiramente mais altas para  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  do que para os eletrodos  $\text{TiO}_2$  ou  $\text{gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , o que sugere que o eletrodo  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  tem uma área de superfície maior. Esta característica deve ser favorável para o desempenho do imunossensor PEC.

#### 6. Possível mecanismo

[072] O potencial de banda plana ( $E_{FB}$ ) do  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  foi determinado a partir do gráfico de Mott-Schottky, no qual foi observado uma inclinação positiva (linha vermelha na Figura 16), típica de semicondutores do tipo n. O potencial da banda de condução ( $E_{CB}$ ) é próximo ( $0,1 - 0,2 \text{ V}$  mais negativo) a  $E_{FB}$  (LI, X.; YU, J.; LOW, J.; FANG, Y.; XIAO, J.; CHEN, X. Engineering heterogeneous semiconductors for solar water splitting. Journal of Materials Chemistry A, Milton, v. 3, n. 6, p. 2485–2534, 2015), para semicondutores do tipo n. Assumindo que  $E_{CB}$  é  $0,2 \text{ V}$  mais negativa do que  $E_{FB}$ , o  $E_{CB}$  e  $E_{VB}$  podem ser calculados tomando como referência o eletrodo normal de hidrogênio (NHE) a  $\text{pH } 7,0$  a partir das seguintes equações:

$$E_{CB(\text{NHE}, \text{pH } 7)} = E_{FB(\text{Ag}/\text{AgCl}, \text{pH } 6,9)} + E^0_{(\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl})} - 0,059(7 - 6,9) - 0,2 \quad (1)$$

$$E_{VB} = E_{BC} + E_g \quad (2)$$

[073] na qual  $E^0_{(\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl})}$  é  $0,199 \text{ V}$ . Os valores de  $E_{FB}$  para  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  e  $\text{TiO}_2$  a partir da intersecção com o eixo x são  $-1,14$  e  $-0,50 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl sat. KCl}$ ). Assim,  $E_{CB}$  (e ' $E_{VB}$ ') para  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  e  $\text{TiO}_2$  são aproximadamente  $-1,15$  (' $1,61 \text{ V}$ ') e  $-0,51 \text{ V}$  (' $2,72 \text{ V}$ ') versus NHE a  $\text{pH } 7$ , respectivamente. Em adição, o orbital HOMO do ácido p-aminobenzoico não ligado está  $1,3 \text{ eV}$  acima do topo da banda de valência do  $\text{TiO}_2$ , com um gap HOMO-LUMO de  $3,4 \text{ eV}$ . Conforme indicado na Figura 19

(Mecanismo de fotodeteção de PSA sobre o fotocatalisador Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> sob irradiação de luz LED visível), a posição da banda de condução do Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> é mais negativa do que para TiO<sub>2</sub>, permitindo assim a transferência de elétrons da banda de condução do Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para a banda de condução do TiO<sub>2</sub> sob irradiação de luz LED visível. Além disso, os elétrons são fotoexcitados diretamente do orbital HOMO do ácido paminobenzoico para a banda de condução do TiO<sub>2</sub>, resultando em uma forte resposta de fotocorrente. O Amb pode ser regenerado por transferência de volta do elétron fotoexcitado ou mesmo pela reação com o ácido ascórbico doador de elétrons. Buracos foto gerados em TiO<sub>2</sub>, Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> podem ser aprisionados pelo ácido ascórbico, diminuindo a recombinação de pares buraco-elétron fotoinduzidos. De acordo com as análises acima, um possível mecanismo para as alterações da fotocorrente do imunossensor pode ser descrito pelas seguintes equações:



### 7. Otimização da plataforma de detecção

[074] As figuras 54a-d mostram a resposta PEC na presença de 0,1 M de AA para: 54a) TiO<sub>2</sub> a diferentes concentrações, 54b) eletrodos com Nix-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>, 54c) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> e Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> onde (1) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> sem AA, (2) Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> com 0,1 M de AA, (3) Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> com 0,05 M de AA, (4) Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> com 0,1 M de AA e (5) Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> com 0,2 M de AA; e 54d) Fotocorrente de Amb/Ni<sub>10</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> para 1200 s com 0,1 M de AA. Todos os experimentos foram registrados em solução de PBS (pH 7,4) a 0 V (vs. OCP). A imobilização de (bio)moléculas (anticorpos, bloqueadores, etc.) é conhecida por afetar negativamente a resposta PEC. Portanto, vários parâmetros foram otimizados para melhorar a sensibilidade, incluindo a concentração de TiO<sub>2</sub>, a razão de massa entre Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e TiO<sub>2</sub> e a concentração de AA. A Figura 20 mostra os resultados dos SPCEs

modificados apenas com NPs de  $\text{TiO}_2$  registrados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de AA. A intensidade da fotocorrente aumentou 47% quando o eletrodo foi modificado com 6,0  $\mu\text{L}$  de solução contendo 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$  de  $\text{TiO}_2$  em comparação com uma solução contendo apenas 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em contraste, a fotocorrente diminuiu à medida que a concentração aumentou de 2,0 para 4,0  $\text{mg mL}^{-1}$ .

[075] A incorporação de  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  melhora significativamente a resposta PEC, conforme mostrado na Figura 21. A fotocorrente em PBS contendo 0,1 M de AA aumentou com a concentração de  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  em  $\text{TiO}_2$  de 3 a 10  $\cong$  20%, e então diminuiu abruptamente em concentrações mais altas. Portanto,  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  é mais adequado para fabricar o imunossensor PEC. A incorporação de AA causa um aumento de 8,5 vezes na fotocorrente para  $\text{Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  na Figura 22 devido à diminuição na recombinação dos portadores de carga. Para  $\text{Amb/Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , as fotocorrentes atingem um máximo com 0,1 M de AA, que foi a concentração selecionada para os estudos subsequentes. As medidas de fotocorrente com ciclos de irradiação de 1200 s confirmam a estabilidade da plataforma de detecção (Figura 23).

#### 8. Análise do imunossensor PEC para PSA

[076] Voltamos a atenção agora para as Figuras 24 a 27, onde a Figura 24 ilustra espectros de EIS registrados em solução de PBS (pH 7,4) contendo 5,0 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  (as linhas contínuas correspondem ao ajuste usando o circuito de Randles), a Figura 25 ilustra a resposta PEC do imunossensor obtido em solução de PBS (pH 7,4) contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível (410 nm), a Figura 26 ilustra a Curva analítica para concentrações crescentes de  $10^{-18}$  a  $10^{-8}$   $\text{g mL}^{-1}$ ; ( $n = 5$ ), e a Figura 27 ilustra a estabilidade e reprodutibilidade do imunossensor PEC em  $10^{-9}$   $\text{g mL}^{-1}$  de PSA. A construção da plataforma imunossensora foi monitorada com medições de EIS em solução de PBS contendo 5,0 mM de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ . A  $R_{ct}$  determinada a partir do gráfico de Nyquist na Figura 24 é 51,69  $\text{k}\Omega$  para o eletrodo  $\text{Ab/Amb/Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , sendo consideravelmente maior do que para  $\text{Amb/Ni}_{10}\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$  (32,54  $\text{k}\Omega$ ). Portanto, a imobilização dos

anticorpos foi bem-sucedida. A Rct também aumentou após o bloqueio da superfície com BSA (56,29 k $\Omega$ ) e após incubação com  $10^{-9}$  g mL $^{-1}$  de PSA (64,90 k $\Omega$ ). A Figura 25 mostra a resposta do imunossensor PEC sob condições ideais. O sinal da fotocorrente diminui com o aumento da concentração de PSA de  $10^{-18}$  a  $10^{-8}$  g mL $^{-1}$ , provavelmente devido ao bloqueio parcial da difusão do doador de elétrons (AA neste caso). A fotocorrente varia linearmente com o log da concentração de PSA na Figura 26, de acordo com a equação  $I[\text{nA}] = 114,9 - 20,9 \log \text{CPSA} [\text{g mL}^{-1}]$  ( $r = 0,982$ ,  $n = 5$ ), na qual C é a concentração de PSA e I é a fotocorrente. O limite de detecção (LOD) foi estimado em  $0,06 \text{ fg mL}^{-1}$  ( $S/N = 3$ ), o menor relatado na literatura até o momento.

[077] Além disso, este imunossensor possui uma faixa linear mais ampla em comparação com outros semelhantes na literatura (ver Tabela 1 a seguir). O dispositivo PEC combina a alta sensibilidade da detecção fotoeletroquímica com a portabilidade e operação amigável de um sistema impresso em 3D, o que o torna mais próximo de uma aplicação no local de atendimento do que os dispositivos existentes.

Tabela 1

Método de detecção	Faixa linear (g mL $^{-1}$ )	LOD (g mL $^{-1}$ )	Ref.
DPV	$1,0 \times 10^{-11} - 1,2 \times 10^{-9}$	$3,0 \times 10^{-12}$	(ZHANG <i>et al.</i> , 2021a)
ECL	$1,0 \times 10^{-14} - 5,0 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-15}$	(LIU <i>et al.</i> , 2021b)
PEC	$1,0 \times 10^{-14} - 1,0 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-15}$	(LIU <i>et al.</i> , 2021a)
Fluorescência	$1,0 \times 10^{-12} - 1,0 \times 10^{-8}$	$7,3 \times 10^{-13}$	(ZHOU <i>et al.</i> , 2021)
PEC	$5,0 \times 10^{-12} - 5,0 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-12}$	(SHI <i>et al.</i> , 2019)
SWV	$1,0 \times 10^{-11} - 5,0 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-12}$	(ZHAO <i>et al.</i> , 2021a)
Fluorescência	$5,0 \times 10^{-14} - 5,0 \times 10^{-8}$	$2,7 \times 10^{-14}$	(YAO <i>et al.</i> , 2019)
PEC	$1,0 \times 10^{-12} - 5,0 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-13}$	(ZHU <i>et al.</i> , 2021)
SERS	$1,0 \times 10^{-11} - 1,0 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-11}$	(GAO <i>et al.</i> , 2019)
FET	$1,0 \times 10^{-15} - 1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-15}$	(ZHANG <i>et al.</i> , 2021b)
PEC	$1,0 \times 10^{-12} - 2,0 \times 10^{-8}$	$6,0 \times 10^{-13}$	(CAO <i>et al.</i> , 2020)
ECL	$1,0 \times 10^{-10} - 2,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-10}$	(WANG <i>et al.</i> , 2016)
PL	$1,0 \times 10^{-12} - 1,0 \times 10^{-8}$	$6,4 \times 10^{-13}$	(YIN <i>et al.</i> , 2021b)
CL	$1,0 \times 10^{-10} - 1,0 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-14}$	(ZHAO <i>et al.</i> , 2021b)
PEC	$1,0 \times 10^{-16} - 1,0 \times 10^{-8}$	$6,0 \times 10^{-17}$	Este trabalho

[078] Onde:

- LOD - limite de detecção;
- DPV - voltametria de pulso diferencial;

- ECL - eletroquimioluminescência;
- PEC - fotoeletroquímica;
- SWV - voltametria de onda quadrada;
- SERS - espalhamento raman;
- FET - transistor de efeito de campo;
- PL - luminescência persistente;
- CL - quimioluminescência.

[079] E onde:

- ZHANG et al, 2021a): PSA Detection Electrochemical Immunosensor Based on MOF-235 Nanomaterial Adsorption Aggregation Signal Amplification Strategy. *Microchemical Journal*, v. 171, p. 106870. 2021;
- LIU et al., 2021b: Ultrasensitive prostate specific antigen monitoring based on electrochemiluminescent immunesystem with synergistic signal amplification effect of resonance energy transfer coupling with K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dual coreactants. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Lausanne, v. 899, p. 115697, 2021;
- LIU et al., 2021a): Ultrasensitive photoelectrochemical immunosensor based on a g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/SnS<sub>2</sub> nanocomposite for prostate-specific antigen detection. *Microchemical Journal*, Amsterdam, v. 168, p. 106337, 2021;
- ZHOU et al., 2021: Proximity binding induced nucleic acid cascade amplification strategy for ultrasensitive homogeneous detection of PSA. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 1186, p. 339123, 2021;
- SHI et al., 2019: Wide-spectrum-responsive paper-supported photoelectrochemical sensing platform based on black phosphorus-sensitized TiO<sub>2</sub>. *ACS Applied Materials & Interfaces*, Washington, v. 11, p. 41062, 2019;
- ZHAO et al., 2021a: Signal-on electrochemical aptasensors with different target-induced conformations for prostate specific antigen detection. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 1152, p. 338282, 2021;

- YAO et al., 2019: Polydopamine nanoparticle-based multicolor proximity immunoassays for ultrasensitive, multiplexed analysis of proteins using isothermal quadratic amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Lausanne, v. 282, p. 626, 2019;
- ZHU et al., 2021: A label-free photoelectrochemical immunosensor for prostate specific antigen detection based on Ag<sub>2</sub>S sensitized Ag/AgBr/BiOBr heterojunction by in-situ growth method. *Bioelectrochemistry*, Lausanne, v. 142, p. 107928, 2021;
- GAO et al., 2019: SERS-based pump-free microfluidic chip for highly sensitive immunoassay of prostate-specific antigen biomarkers. *ACS Sensors*, Washington, v. 4, p. 938, 2019;
- ZHANG et al., 2021b: DNA-Based Functionalization of Two-Dimensional MoS<sub>2</sub> FET Biosensor for Ultrasensitive Detection of PSA. *Applied Surface Science*, v. 548, p. 149169, 2021;
- CAO et al., 2020: A ternary CdS@Au-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> heterojunction-based photoelectrochemical immunosensor for prostate specific antigen detection using graphene oxide-CuS as tags for signal amplification. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 1106, p. 183, 2020;
- WANG et al., 2016: Spatial-resolved electrochemiluminescence ratiometry based on bipolar electrode for bioanalysis. *Biosensors and Bioelectronics*, Kidlington, v. 86, p. 683, 2016;
- YIN et al., 2021b: Persistent luminescence nanorods-based autofluorescence-free biosensor for prostate-specific antigen detection. *Talanta*, Amsterdam, v. 233, p. 122563, 2021;
- ZHAO et al., 2021b: A novel chemiluminescence imaging immunosensor for prostate specific antigen detection based on a multiple signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, Kidlington, v. 171, p. 112729, 2021.

## 9. Reprodutibilidade e estabilidade

[080] A reprodutibilidade e estabilidade do imunossensor PEC foram testadas com medições para detectar  $10^{-9}$  g mL<sup>-1</sup> de PSA. A Figura 27 mostra os resultados em que a reprodutibilidade foi demonstrada obtendo um desvio padrão relativo (RSD) de 3,1% nas medidas de fotocorrente usando 5 eletrodos diferentes. Para os testes de estabilidade, as fotocorrentes registradas sob irradiação durante os ciclos ON/OFF de 20 s tiveram um desvio padrão de 0,8%.

#### 10. Análise de amostra real e estudo de especificidade

[081] Fazemos referência agora às Figuras 28 e 29, onde a Figura 28 representa a seletividade do imunossensor PEC: 10,0 ng mL<sup>-1</sup> PSA, 1,0 ng mL<sup>-1</sup> proteínas (CA15-3, p54, BSA) e 100,0 ng mL<sup>-1</sup> para os outros interferentes (KCl, NaCl, vitamina D3, ácido úrico). A mistura contém todos os elementos mencionados. A Figura 29 ilustra os valores de recuperação de PSA para os imunossensores PEC incubados com 10,0, 1,0 e 0,1 ng mL<sup>-1</sup> de PSA em amostras de soro humano diluídas. (n = 4). Todos os experimentos foram registrados em solução de PBS contendo 0,1 M de AA a 0 V (vs. OCP) sob irradiação de luz LED visível. Para estudar a especificidade do imunossensor PEC, 1,0 ng mL<sup>-1</sup> de proteínas (CA15-3, p54, BSA), 100,0 ng mL<sup>-1</sup> para os demais interferentes (KCl, NaCl, Vitamin D3, ácido úrico) e sua mistura foram selecionados como potenciais interferentes na determinação do PSA. A Figura 28 mostra que a resposta de fotocorrente desses interferentes é comparável ao valor encontrado para a amostra em branco. Além disso, a mistura apresentou valores de fotocorrente comparáveis ao PSA puro. O possível uso do imunossensor PEC na prática clínica foi avaliado pela dosagem da concentração de PSA em amostras diluídas de soro humano. O soro humano foi diluído em solução de PBS (1:100, v/v) e contaminado com concentrações conhecidas de PSA. As concentrações de PSA calculadas a partir da curva analítica e outros parâmetros estão resumidas na Figura 29. A recuperação para o imunossensor PEC variou entre 97,3% e 105,2%, com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 4,1%. Esses resultados satisfatórios confirmam a potencial aplicação no diagnóstico clínico.

#### 11. Conclusões

[082] O desafio de fabricar imunossensores fotoeletroquímicos (PEC) passíveis de miniaturização e aplicação em diagnóstico no local de atendimento foi abordado aqui. Foi produzido um dispositivo PEC miniaturizado impressos em 3D com eletrodos serigrafados para detectar PSA sob irradiação de luz LED visível. A alta sensibilidade e seletividade do imunossensor foi atribuída à heterojunção entre Ni-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub> e TiO<sub>2</sub>. De especial relevância é que o TiO<sub>2</sub> foi funcionalizado com sal de aril diazônio eletrodepositado, que serviu tanto para aumentar a fotoatividade quanto para ancorar os anticorpos anti-PSA. A sinergia obtida ao combinar esses três materiais permitiu uma maior separação dos portadores de carga e uma diminuição da recombinação de carga, aumentando assim a estabilidade e a fotocorrente em relação ao TiO<sub>2</sub> puro. O imunossensor PEC foi capaz de detectar PSA em amostras de soro humano em uma ampla faixa de concentração, de 10<sup>-16</sup> a 10<sup>-8</sup> g mL<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 0,06 fg mL<sup>-1</sup>, o menor valor conhecido até o momento. É significativo que a plataforma PEC possa ser estendida a qualquer outro tipo de biossensor, pois outros elementos de biorreconhecimento podem ser imobilizados com a mesma estratégia. Além disso, a sensibilidade de tais dispositivos PEC pode ser aumentada pelo estudo de outras sondas e fotocatalisadores.

[083] Um segundo aspecto da invenção é referente a um dispositivo biossensor fotoeletroquímico miniaturizado utilizando o eletrodo biossensor Ab/Amb/Ni<sub>x</sub>-gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> de acordo com a presente invenção. O dispositivo, de acordo com a presente invenção, possui uma alta sensibilidade por conta do biossensor aqui descrito, permitindo o uso de uma fonte de luz com potência reduzida (de 1 a 3W) e sua miniaturização. Vantajosamente, o dispositivo fotoeletroquímico de acordo com a presente invenção possui um custo reduzido e pode ser facilmente transportado para pontos de atendimento distantes de grandes centros urbanos, atuando como um imunossensor.

[084] Com referência à Figura 30, é ilustrada uma concretização exemplificativa do dispositivo de acordo com o segundo aspecto da invenção. O dispositivo 100 compreende um suporte mecânico e um circuito elétrico que inclui um módulo de relé programável 101 para controlar os ciclos ON/OFF do LED 103. A

fotocorrente é gerada no sensor 102 e flui por meio de um circuito impresso flexível (FPC, flexible printed circuit) 104 e um ou mais, preferencialmente três, conectores banana 105 para o potenciostato. O módulo de relé é alimentado por uma fonte 106 de baixa tensão DC, por exemplo, 12 V, e o LED é alimentado por um driver comercial 107. Como mencionado anteriormente, a alta sensibilidade do biossensor da presente invenção requer que o driver 107 tenha apenas de 1 a 3 W de potência. O suporte mecânico contém cinco peças: (i) uma base 108 projetada para segurar o módulo de relé 101 e os conectores banana 105; (ii) um deslizador 109 para segurar o sensor 102 horizontalmente no conector FPC 104; (iii) um teto 110 para posicionar o LED 103 uma distância, preferencialmente 0,5 mm, acima do sensor; (iv) uma ponta 111 para dar sustentação a um elemento de fixação 112, o elemento de fixação 112 fixando o LED 103 sob o teto 110; e (v) uma tampa 113 para envolver o LED 103 e sensor 102 a fim de bloquear e impedir que luz externa interfira na detecção.

[085] A Figura 31 mostra o dispositivo 100 em sua configuração fechada, com o item 114 em detalhe.

[086] O dispositivo 100 possui tamanho e peso reduzidos, facilitando seu transporte e armazenamento. Por exemplo, as dimensões externas do dispositivo 100 podem ser tão pequenas quanto 96 mm de largura, 122 mm de profundidade e 36 mm de altura. Estas dimensões permitem que o dispositivo 100 caiba na mão de um adulto, como visto anteriormente na Figura 3. O design permite que o dispositivo 100 seja facilmente desmontado para a troca do LED 103 e do sensor 102. Os componentes estruturais podem ser fabricados a partir de qualquer material considerado adequado, tais como plásticos ou resinas.

[087] O dispositivo 100 é portátil e vantajosamente permite a rápida troca do LED, possibilitando que este seja escolhido de acordo com as propriedades do fotocatalisador empregado. Isto é extremamente vantajoso, visto que alguns comprimentos de onda (por exemplo, na região UV) podem ser prejudiciais para as biomoléculas, afetando negativamente o desempenho do biossensor.

[088] Um terceiro aspecto da invenção se refere ao uso do dispositivo 100 na detecção de PSA. Como relatado anteriormente, o eletrodo fotoeletroquímico da

presente invenção e o dispositivo 100 que o utiliza são particularmente efetivos na detecção de PSA. Uma amostra de sangue humano (1  $\mu$ L) é coletada e diluída em 99  $\mu$ L PBS contendo 0,1 M AA. Esta solução é depositada no eletrodo 102 com o dispositivo 100 em sua configuração aberta. O dispositivo 100 então tem a tampa fechada e é acionado. Se houver alteração na fotocorrente a partir do eletrodo 102, conclui-se que foi detectada a presença de PSA na amostra.

[089] Com isso, nesta invenção demonstramos a portabilidade de um dispositivo fotoeletroquímico miniaturizado e seu possível uso como dispositivo biossensor em análises clínicas e ambientais descentralizadas. Isso é possível devido à alta atividade do fotocatalisador aqui desenvolvido, que possibilita a construção de um biossensor que opera com fonte de irradiação de baixa potência (1-3W).

[090] Embora os aspectos da presente divulgação possam ser suscetíveis a várias modificações e formas alternativas, modalidades específicas foram mostradas a título de exemplo nos desenhos e foram descritas em detalhes neste documento. Mas deve ser entendido que a invenção não se destina a ser limitada às formas particulares divulgadas. Em vez disso, a invenção deve cobrir todas as modificações, equivalentes e alternativas que caem dentro do escopo da invenção, conforme definido pelas seguintes reivindicações anexas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Eletrodo, caracterizado pelo fato de que é revestido com partículas fotossensíveis e sal de aril diazônio.

2. Eletrodo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as partículas fotossensíveis são preferencialmente átomos de níquel ancorados em nitreto de carbono grafítico e nanopartículas de dióxido de titânio.

3. Eletrodo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que o sal de aril diazônio é preparado eletroquimicamente a partir de ácido p-aminobenzoico.

4. Método de preparo do eletrodo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a - macerar de 1,0 a 3,0 g de melamina com 10,0 g de NaCl;

b - transferir a melamina macerada para um recipiente com tampa;

c - aquecer o recipiente em um forno sob atmosfera de ar entre 500 e 700 °C por 4h;

d - deixar o recipiente resfriar até a temperatura ambiente;

e - retirar o produto de recipiente;

f – dispersar o produto em uma quantidade de água suficiente para a sua solubilização completa e, depois, centrifugá-lo entre 7.000 e 11.000 rpm por entre 5 e 30 minutos;

g - repetir a etapa f pelo menos mais quatro vezes;

h - secar o produto até que se obtenha uma secagem completa;

i – introduzir íons de níquel  $\text{gC}_3\text{N}_4$  pelo método de troca catiônica mediante esfoliar 0,1 g de  $\text{gC}_3\text{N}_4$  em 2,0 mL de água em banho ultrassônico por 10 min e, em seguida, dissolver 0,4 g de  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em 2,0 mL de água, então misturar ambas estas soluções e mantê-las sob agitação até que o níquel seja incorporado no nitreto de carbono grafítico;

j – lavar o produto obtido na etapa i por centrifugação e secá-lo até que se obtenha uma secagem completa;

k – preparar por adsorção compósitos  $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , onde  $x = 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70\%$  em peso de  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$  em  $\text{TiO}_2$ ;

l – preparar uma ou mais alíquotas de 5,0 mL de soluções contendo 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de  $\text{TiO}_2$ , cada uma das uma ou mais alíquotas contendo qualquer um entre 0,3, 1,1, 2,5, 4,3, 6,7, 10, 15, ou 23,3 mg de  $\text{Ni-gC}_3\text{N}_4$ ;

m – manter o material obtido na etapa l sob agitação por 24h e seco a 60 °C;

n – modificar eletrodos impressos de carbono via método *drop casting* com entre 6,0 µL a 10,0 µL de  $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de  $\text{TiO}_2$ , e secos sob vácuo a 23 °C; e

o – funcionalizar as superfícies dos eletrodos via redução eletroquímica de um sal de aril diazônio.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que na etapa a 1,0 mg de melamina é macerada.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que na etapa c o recipiente é aquecido a 600 °C (5 °C min<sup>-1</sup>).

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que na etapa f o produto é disperso em 100,0 mL de água e, depois, centrifugado a 10.000 rpm por 15 min.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7, caracterizado pelo fato de que a etapa f é repetida por um total de 6 vezes.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, caracterizado pelo fato de que na etapa h o produto é seco a vácuo a 50 °C por 12h.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, caracterizado pelo fato de que na etapa h o produto é seco a 60 °C por 24h.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 10, caracterizado pelo fato de que na etapa i as soluções são mantidas sob agitação por 24 h.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11, caracterizado pelo fato de que na etapa j o produto é seco a vácuo a 50 °C por 12h.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 11, caracterizado pelo fato de que na etapa j o produto é seco a 60 °C por 24h.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 13, caracterizado pelo fato de que na etapa m o material é seco a vácuo a 50 °C por 12h.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 13, caracterizado pelo fato de que na etapa m o material é seco a 60 °C por 24h.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 15, caracterizado pelo fato de que na etapa n os eletrodos são modificados via *drop casting* com 6,0 µL de  $\text{Ni}_x\text{-gC}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ , 2,0 mg mL<sup>-1</sup> de  $\text{TiO}_2$ .

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 16, caracterizado pelo fato de que o sal de aril diazônio é um sal 4-carboxifenil diazônio preparado misturando de 1 a 5 mM de ácido p-aminobenzoico com 2,0 mM de  $\text{NaNO}_2$  em 0,5 M de HCl e agitado durante 5 min à temperatura ambiente.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o sal de aril diazônio é preparado misturando 2 mM de ácido p-aminobenzoico.

19. Biossensor, caracterizado pelo fato de que compreende:

uma fonte (106);

um driver (107);

um LED (103);

uma tampa (113), a tampa definindo uma câmara escura; e

o eletrodo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

20. Uso do biossensor conforme definido na reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que é utilizado na detecção de antígeno prostático específico (PSA) a partir de uma amostra.

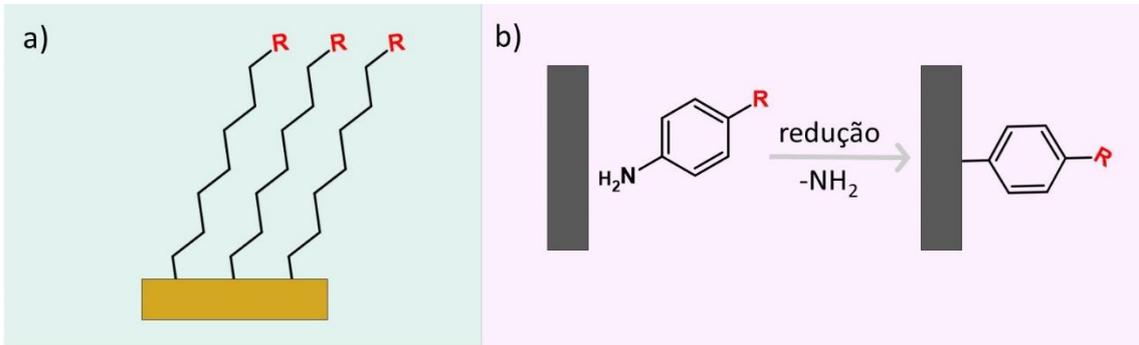


Figura 1

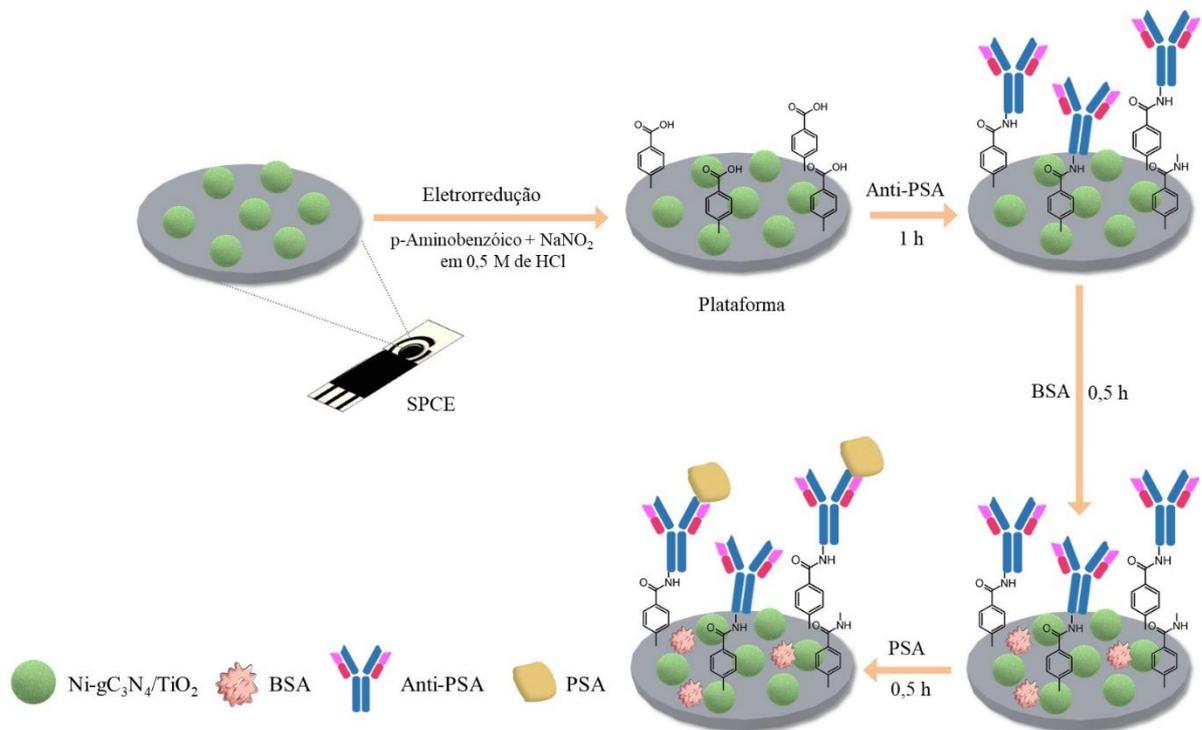


Figura 2

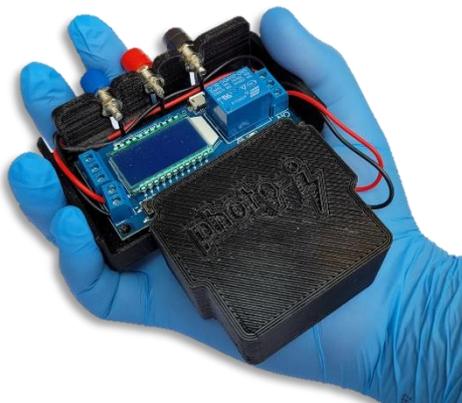


Figura 3

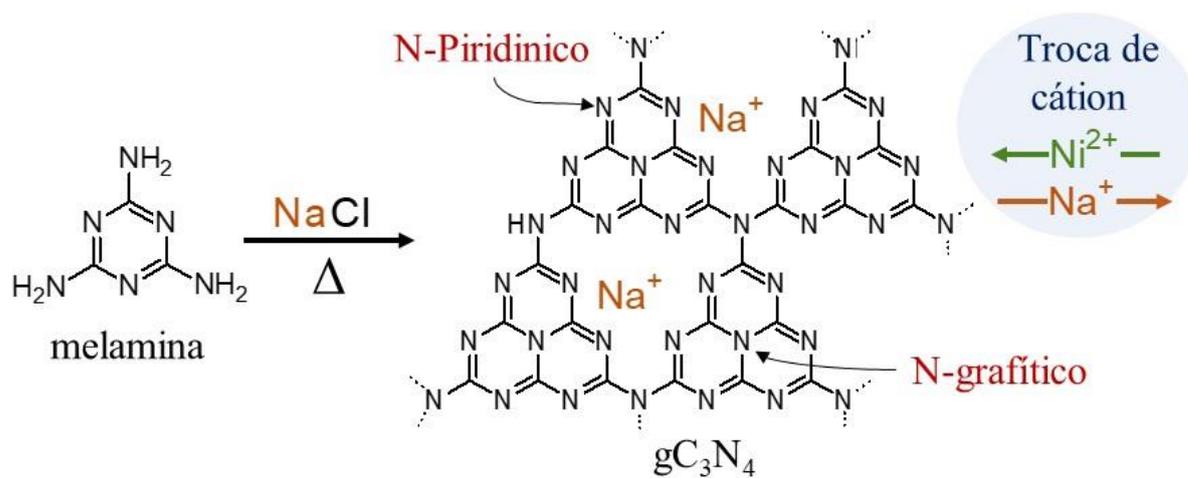


Figura 4

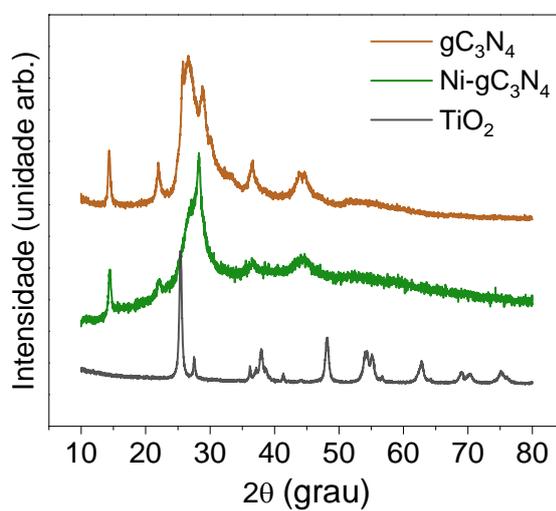
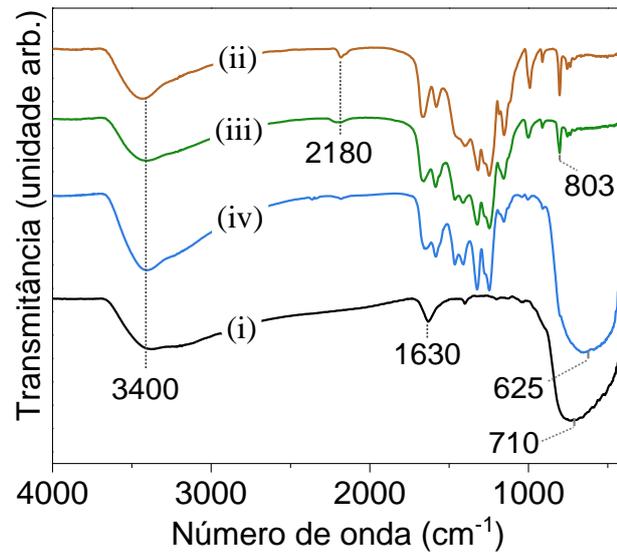
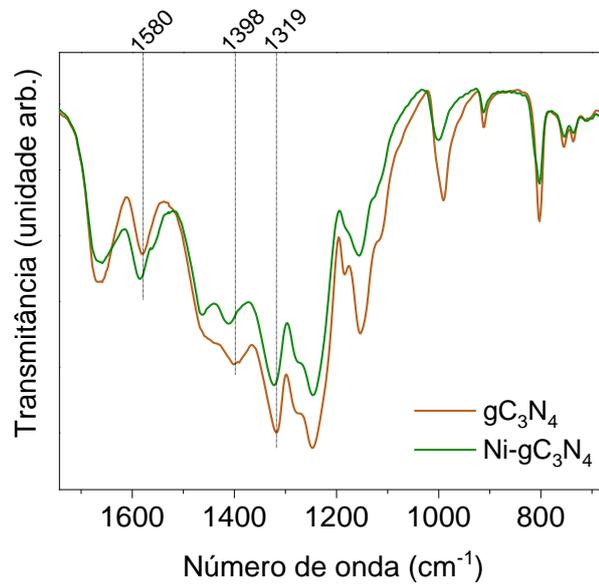
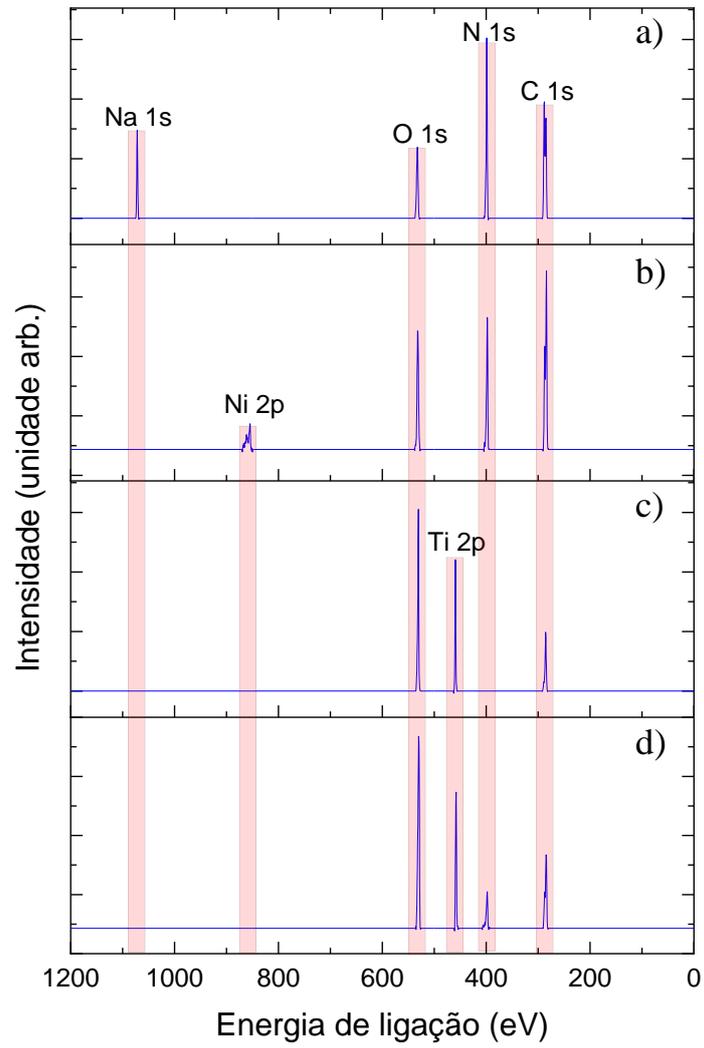
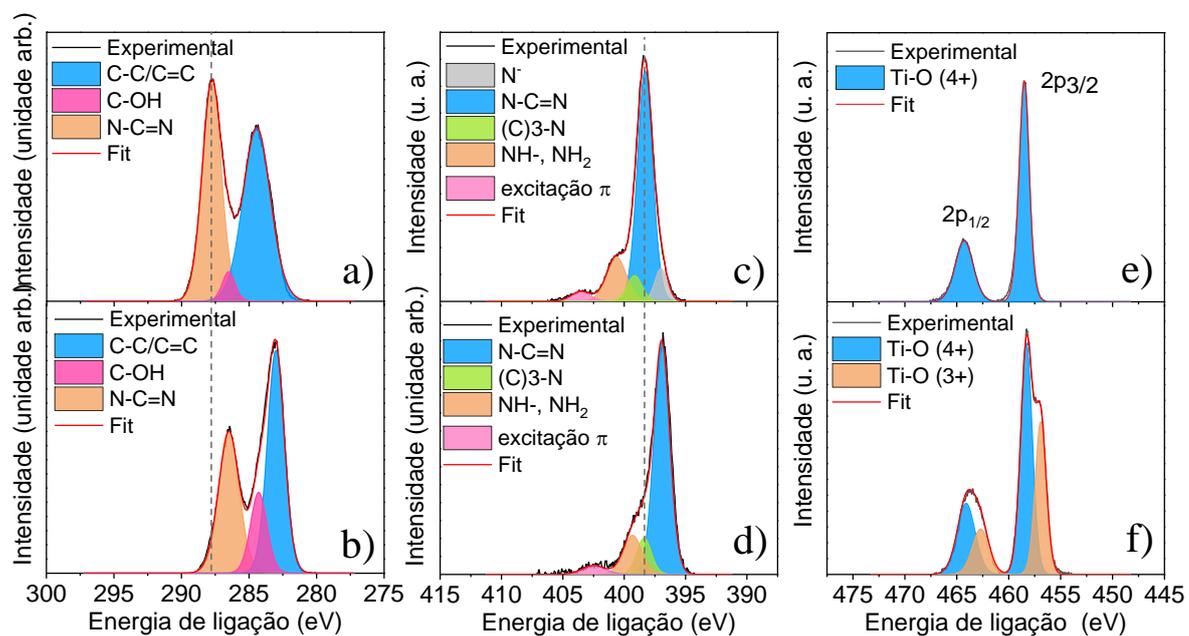


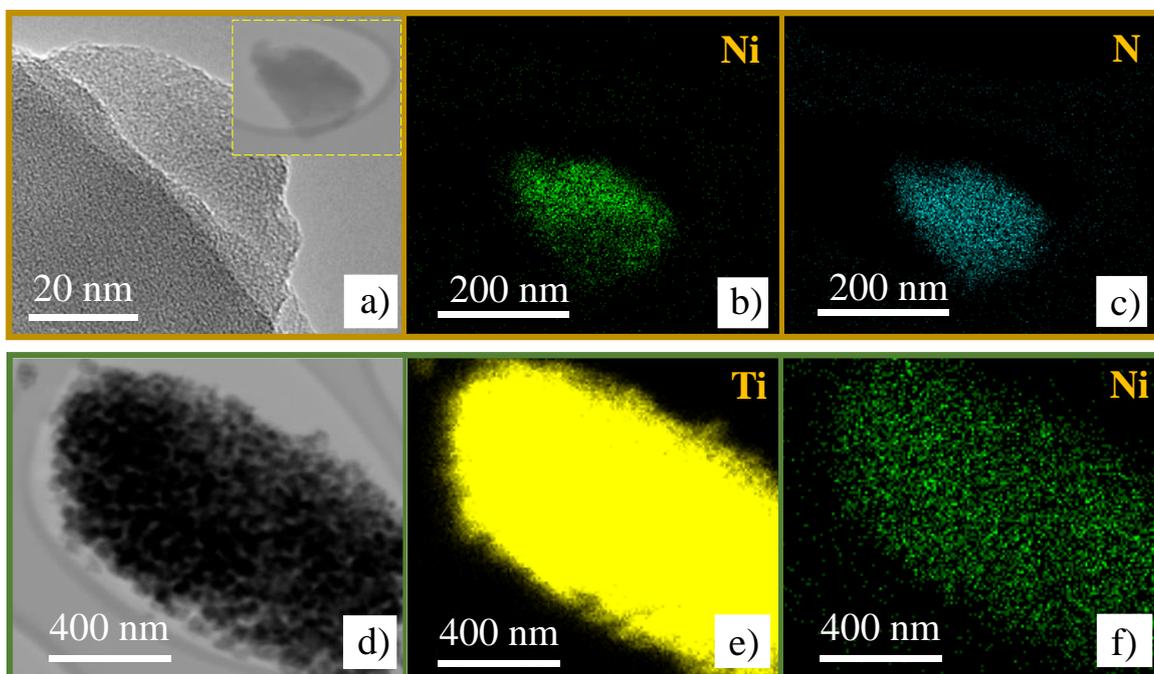
Figura 5

**Figura 6****Figura 7**

**Figura 8**



Figuras 9



Figuras 10

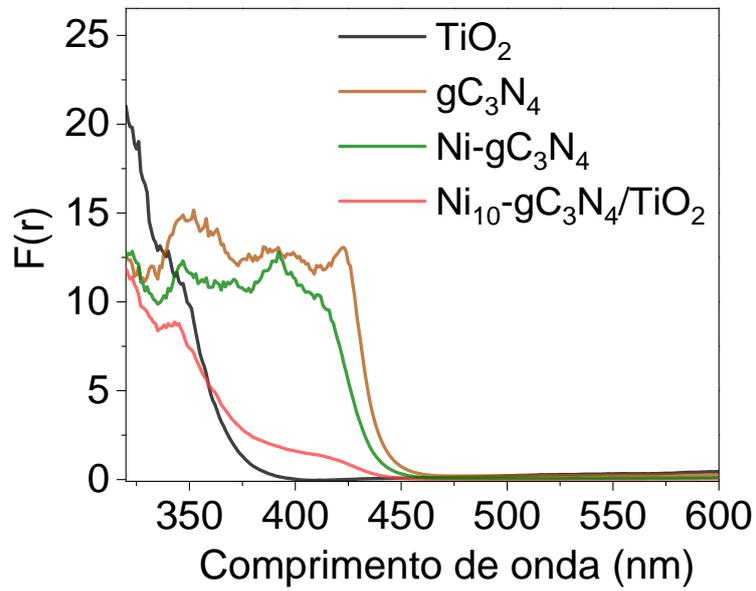


Figura 11

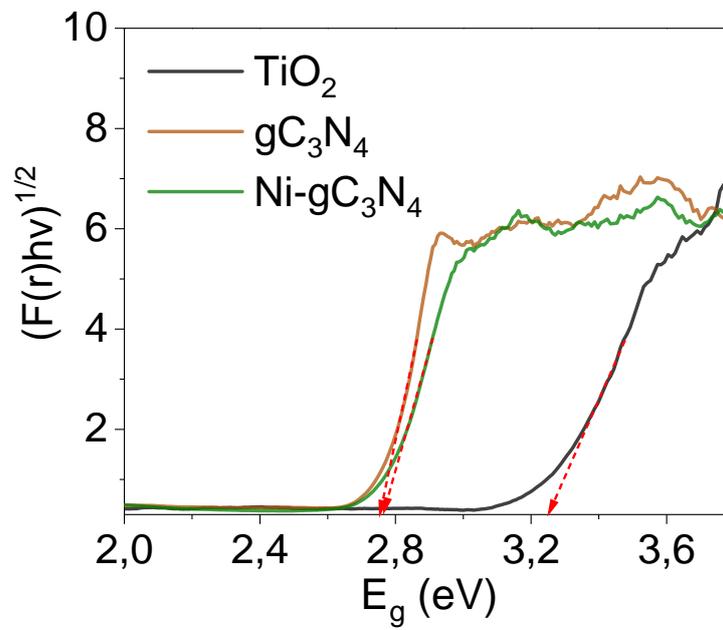


Figura 12

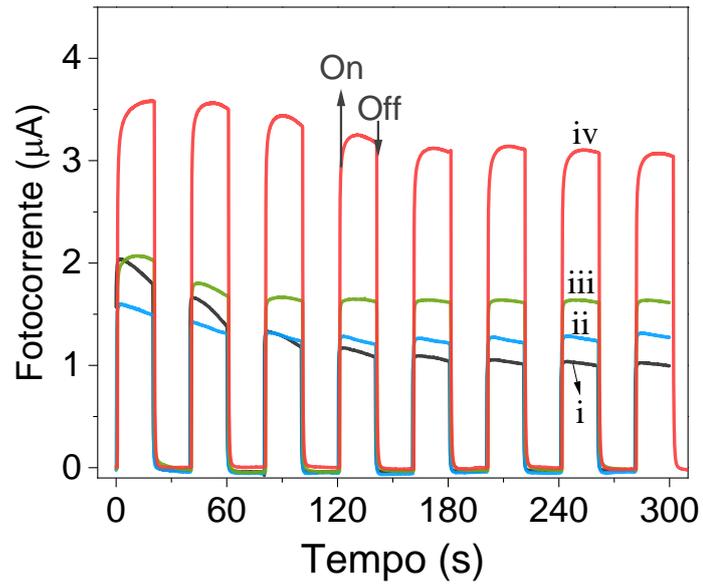


Figura 13

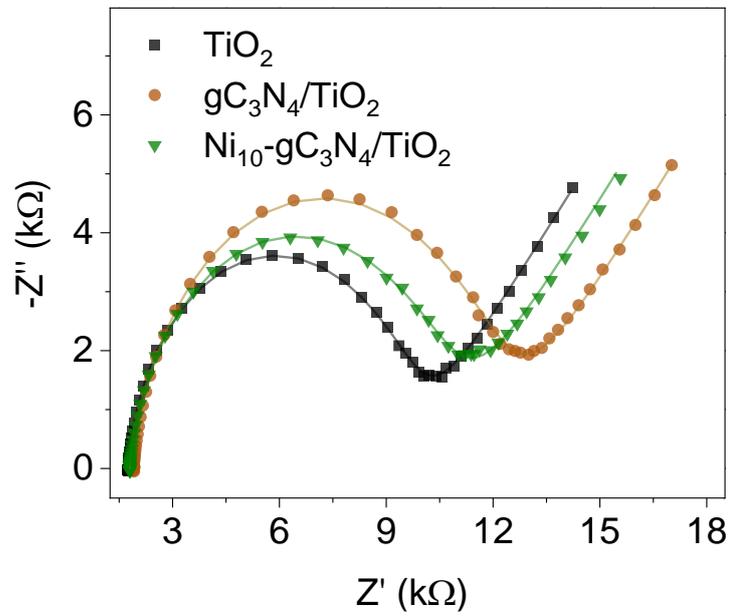


Figura 14

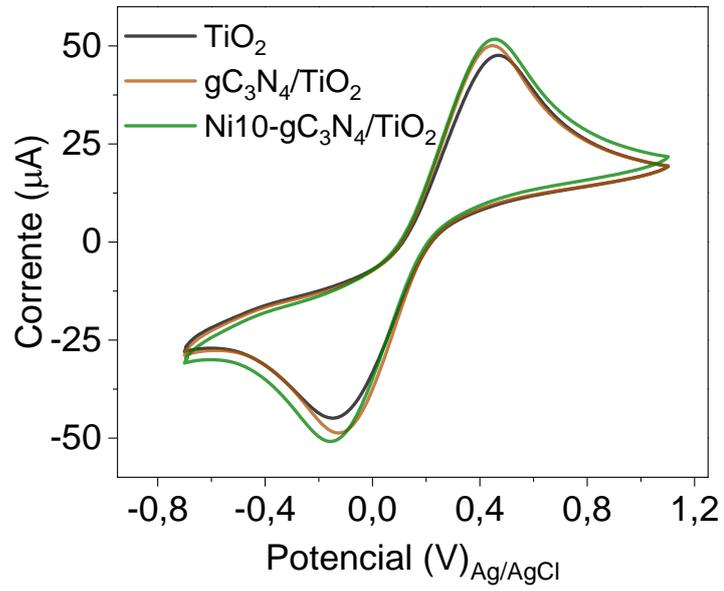


Figura 15

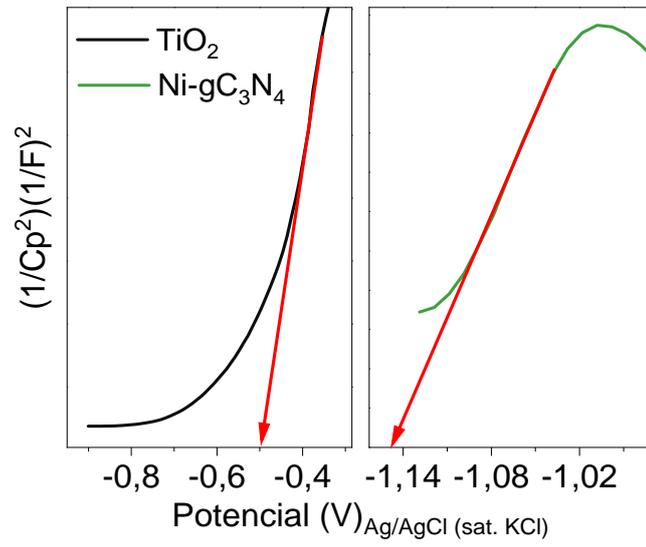


Figura 16

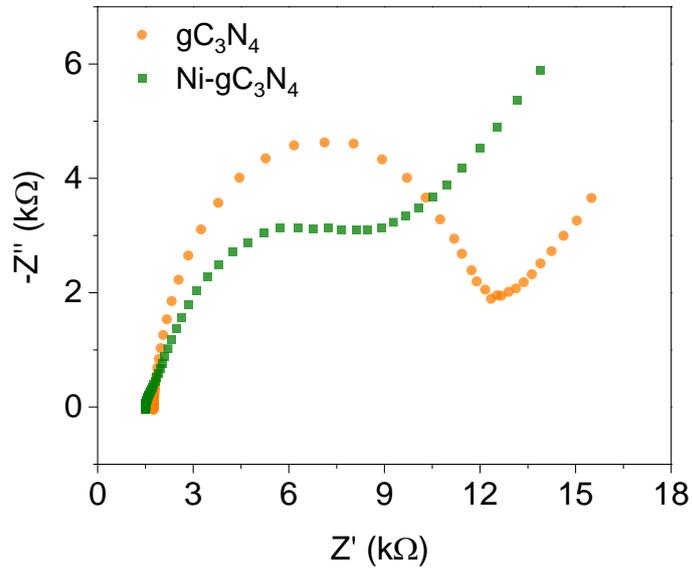


Figura 17

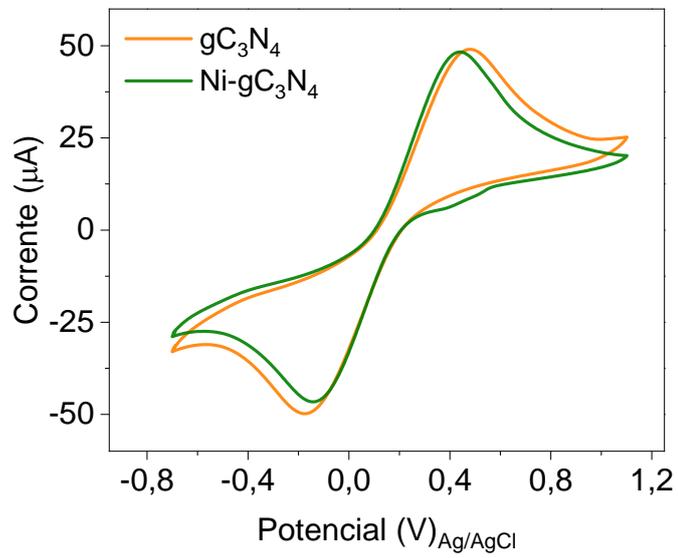


Figura 18

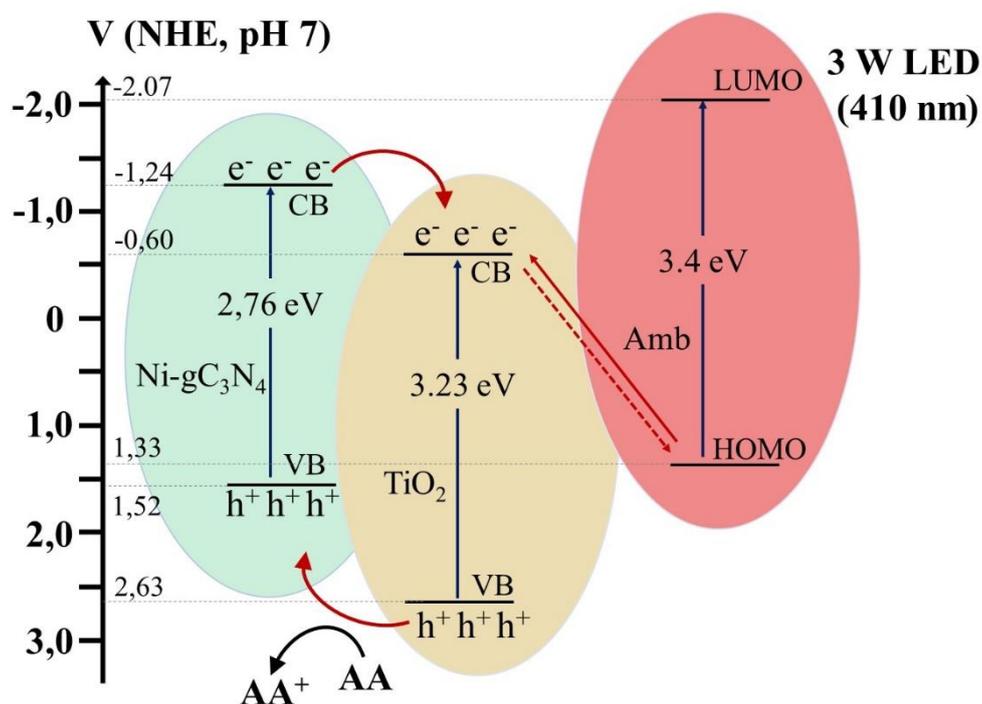


Figura 19

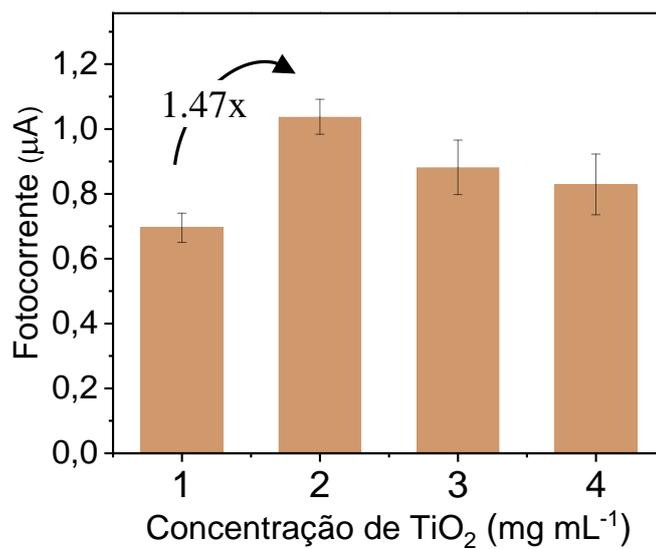


Figura 20

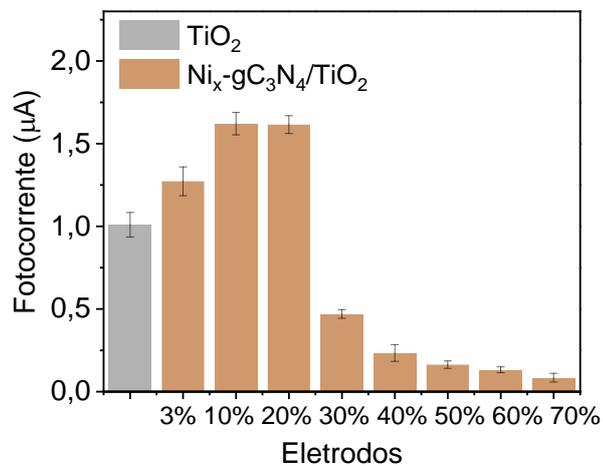


Figura 21

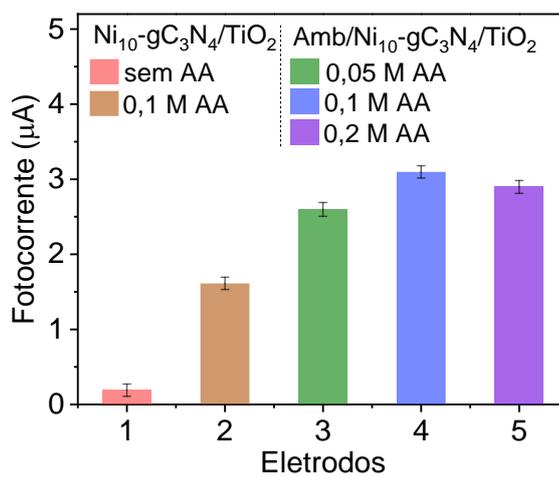


Figura 22

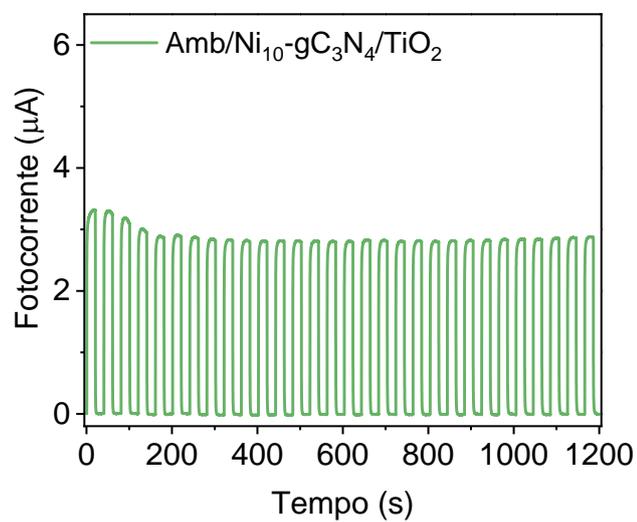
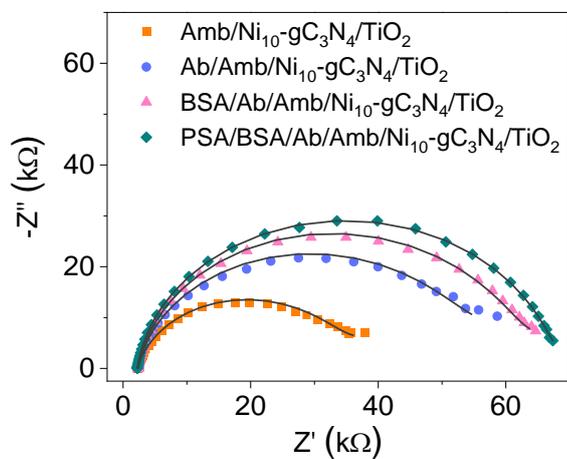
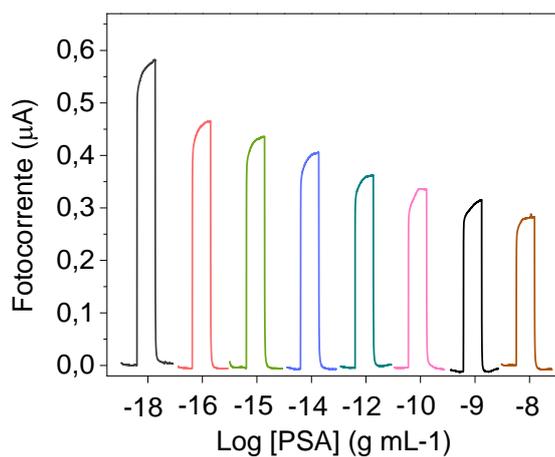


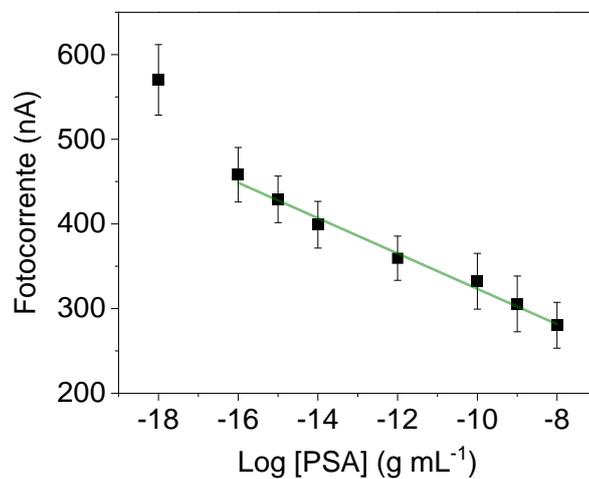
Figura 23



**Figura 24**



**Figura 25**



**Figura 26**

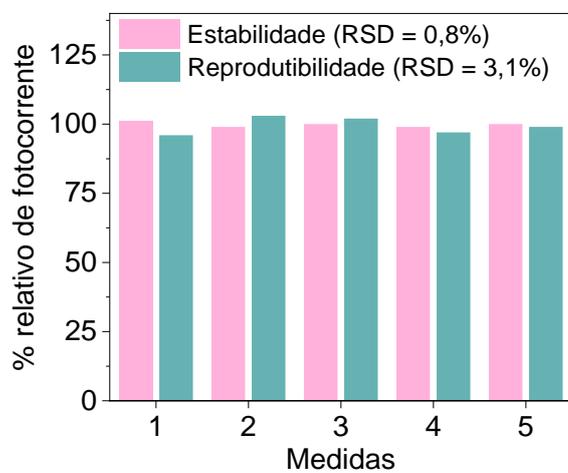


Figura 27

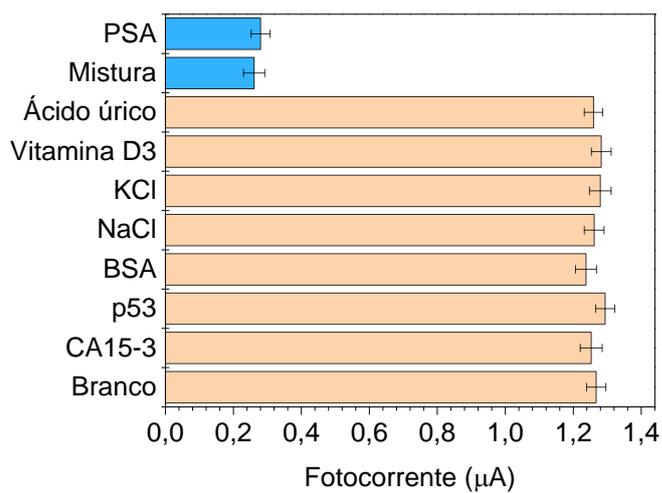


Figura 28

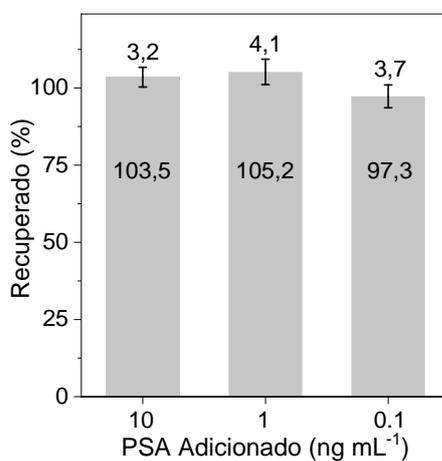


Figura 29

100

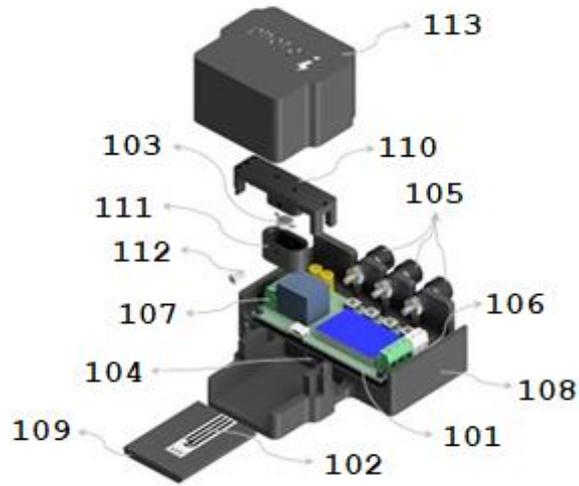


Figura 30

100

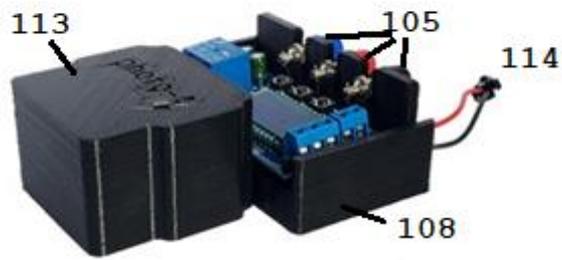


Figura 31

## **RESUMO**

### **ELETRODO, MÉTODO DE PREPARO DO ELETRODO, BIOSENSOR E USO DO BIOSENSOR**

A invenção teve como objetivo possibilitar a miniaturização de um sistema de biossensoriamento fotoeletroquímico de fácil operação e o emprego deste sistema no ponto de atendimento e no campo. Para isso, a tecnologia foi fabricada utilizando uma impressora 3D, uma fonte de luz (LED) de 3 W, um módulo relê para controlar a fonte de excitação e um eletrodo de carbono impresso. O eletrodo impresso foi revestido com átomos de níquel ancorados em nitreto de carbono grafítico, nanopartículas de dióxido de titânio e sal de aril diazônio preparado eletroquimicamente a partir do ácido p-aminobenzoico. O aril diazônio eletrodepositado sobre o material fotoativo levou a um aumento da resposta do fotocatalisador, com uma fotocorrente 3,1 vezes maior. Essa estratégia de funcionalização com o sal de aril diazônio também fornece grupos carboxílicos para ancorar biomoléculas por meio da reação da carbodiimida, além de uma atividade fotocatalítica que possibilita o uso do LED de 3 W.