



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para
detecção de troponinas cardíacas**

Aluna: Jéssica Guimarães Brussasco

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito-Madurro

UBERLÂNDIA- MG
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para
detecção de troponinas cardíacas**

Aluna: Jéssica Guimarães Brussasco

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)

UBERLÂNDIA- MG
2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B912
2024
Brussasco, Jéssica Guimarães, 1993-
Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para
a detecção de troponinas cardíacas [recurso eletrônico]
/ Jéssica Guimarães Brussasco. - 2024.

Orientador: João Marcos Madurro.

Coorientadora: Ana Graci Brito Madurro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.414>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Madurro, João Marcos, 1961-, (Orient.).
II. Madurro, Ana Graci Brito, 1967-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em
Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Vinte e dois de janeiro de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	14:50h	Hora de encerramento:	19:20h
Matrícula do Discente:	11923GBI005				
Nome do Discente:	Jéssica Guimarães Brussasco				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de troponinas cardíacas.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de produtos e processos baseados em nanobiotecnologia, sensores, materiais nanoestruturados e nanomagnéticos.				

Aos vinte e dois dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 14:50 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Resolução de nº06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Dr^a. Valéria Almeida Alves, Dr. Diego Leoni Franco, Dr. Matheus de Souza Gomes e Dr. João Marcos Madurro, orientador da candidata e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. João Marcos Madurro apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata:

APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **João Marcos Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 19:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Leoni Franco, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus de Souza Gomes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/01/2024, às 20:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valéria Almeida Alves, Usuário Externo**, em 23/01/2024, às 08:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Usuário Externo**, em 25/01/2024, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5014607** e o código CRC **B501E2AB**.

Dedico este trabalho às minhas sobrinhas, Yasmin e Beatriz, meus sinônimos de
afeto, cuidado e ternura.

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe, Maria Helena, por todo o carinho, suporte e exemplo, à minha irmã Érica pelo companheirismo e as minhas sobrinhas Yasmin e Beatriz, por serem minha fonte diária e inesgotável de alegria.

Agradeço ao meu esposo Vítor, pela parceria na vida, na realização deste projeto e por se fazer presente, mesmo na ausência.

Agradeço aos meus queridos amigos do Centro Espírita Luiz Gonzaga de Freitas, pelo acolhimento e por todas as lições.

Agradeço ao Pedro, meu melhor amigo, por ser conselheiro, guru, cúmplice, professor de assuntos variados, associado nº 1 de trabalho e parceiro de aventuras. É um orgulho, privilégio e honra ser sua amiga.

Agradeço ao meu amigo Luiz, rei do mev, fabricante da tinta de prata, pai adotivo das platinhas, companheiro diário de alegrias e frustrações no laboratório e colaborador ativo de todas as etapas desse projeto.

Agradeço a Day, a minha amiga mais sincera, honesta, incisiva e leal. É um prazer te chamar de amiga.

Agradeço ao José Manuel pela amizade, por todo o auxílio na confecção desta tese e pelas incontáveis vezes que ele me ajudou nos anos de mestrado e doutorado, presencialmente e à distância.

Agradeço ao professor João Marcos e a professora Ana Graci pela oportunidade, orientação e ensinamentos compartilhados.

Agradeço a todos os colegas que passaram pelo LAFIP/BIOSSENS nos anos de mestrado e doutorado pela convivência.

Agradeço ao Guilherme Fernandes, técnico do laboratório de física da UFU por realizar as análises de microscopia de força atômica.

Agradeço ao programa de pós-graduação e a Janaína, por toda a boa vontade, educação e presteza comigo.

Agradeço a banca pela participação, disponibilidade e sugestões para a melhoria do trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG pela concessão de bolsas de mestrado e doutorado e recursos disponibilizados.

SUMÁRIO

Apresentação	1
Capítulo 1 – Fundamentação Teórica	2
1.1 Infarto Agudo do Miocárdio	3
1.2 Troponinas Cardíacas	4
2. Biossensores	7
2.1 Definição	7
2.2 Imunossensores	8
2.2.1 Classificação dos imunossensores eletroquímicos de acordo com o tipo de transdutor eletroquímico	10
2.2.2 Classificação dos imunossensores eletroquímicos de acordo com o tipo de detecção	11
2.2.3 Imobilização de anticorpos por adsorção física	14
3. Grafeno e derivados	15
3.1 Óxido de Grafeno e Óxido de Grafeno Reduzido	15
3.2 Pontos quânticos de grafeno	18
4. Utilização de eletrodos de carbono em imunossensores	19
4.1 Eletrodos de carbono grafite	20
4.2 Eletrodos de carbono impresso	21
5. Proposta do trabalho	25
6. Referências	26
Capítulo 2 - Reduced Graphene Oxide and Graphene Quantum Dots nanomaterial: Application in an electrochemical immunosensor for cardiac troponin detection	34
Graphical Abstract	36
Highlights	36
Abstract	37
Resumo	37
1 Introduction	38
2 Materials and methods	39
2.1 Materials	39
2.2 Apparatus	39
2.3 Graphene nanomaterial production (rGO/GQD)	40
2.4 Immunosensor construction	40
2.5 cTnI detection in human serum samples	40
2.6 Electrochemical measurements and data presentation	40
2.7 Selectivity, regeneration, and shelf-life test	40
3 Results and Discussion	41
3.1 Characterization of GQD dispersion	41
3.2 Morphological analysis and electrochemical characterization of rGO/GQD nanomaterial	42
3.3 Morphological analysis of the biofunctionalization of the modified electrode	44
3.4 Figures of merit of the immunosensor	45
4 Conclusions	47
Acknowledgments	47
References	47
Capítulo 3 - Carbon Printed Circuit Board electrode for cardiac troponin T	

detection utilizing ninhydrin as immunocomplexation indicator	53
Graphical Abstract	55
Highlights	55
Abstract.....	56
Resumo.....	56
1 Introduction.....	57
2 Methodologies.....	58
2.1 Chemical, biomolecules and experimental apparatus.....	58
2.2 Carbon printed circuit board electrodes construction (C-PCBE).....	59
2.3 Characterization methods.....	60
2.4 C-PCBE cleaning and modification with graphene quantum dots (GQD).....	60
2.5 Immunosensor preparation and cTnT detection	60
2.6 Analytical parameters.....	60
3 Results and Discussion.....	61
3.1 C-PCBE development and characterization.....	61
3.2 Morphological analysis and electrochemical assays of the C-PCBE and C-PCBE/GQD electrodes.....	63
3.3 Biofunctionalization of the C-PCBE/GQD electrodes.....	64
3.4 Analytical performance of the immunosensor with ninhydrin application as immunocomplexation indicator	66
4 Conclusions.....	67
Acknowledgments.....	68
References.....	68
Supplemental Files	74
Anexos.....	77

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Liberação de troponinas cardíacas na corrente sanguínea após a ocorrência de um IAM. Traduzido de Pourali *et al.* (2021).....4

Figura 2. Localização das troponinas cardíacas agregadas ao filamento de tropomiosina e actina. Traduzido de Shave *et al.* (2010).....5

Figura 3. Comparação da cinética de liberação de biomarcadores cardíacos ao longo de um intervalo de tempo. Adaptado e traduzido de French; Whute (2004)..6

Figura 4. Componentes e esquema de funcionamento de um biossensor. Próprio autor, criado com BioRender.com (2023) 7

Figura 5. Estrutura básica de um anticorpo. Próprio autor, criado com BioRender.com (2023).....9

Figura 6. Representações gráficas das técnicas de voltametria. **A)** Voltamograma cíclico com a corrente elétrica em função do potencial. **B)** Voltamograma de pulso diferencial com a corrente elétrica em função do potencial. Próprio Autor,

(2023).....	11
Figura 7. Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo <i>label-based</i> . Próprio Autor, criado com BioRender.com (2023).....	12
Figura 8. Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo <i>label-free</i> . Próprio Autor, criado com BioRender.com (2023).....	13
Figura 9. Estrutura dos hexacianoferratos. A) Ferrocianeto de potássio. B) Ferricianeto de potássio. Próprio Autor (2023).....	13
Figura 10. Representação da molécula de ninidrina. Próprio autor (2023)	14
Figura 11. Representação de uma folha de grafeno. Próprio Autor (2023).....	15
Figura 12. Representação esquemática do Óxido de Grafeno. Próprio Autor (2023)	16
Figura 13. Estrutura do Óxido de Grafeno Reduzido. Próprio Autor (2023).....	17
Figura 14. Preparação de pontos quânticos de grafeno utilizando o ácido cítrico como precursor. Traduzido e adaptado de Naik; Sutradhar; Saha (2017).....	19
Figura 15. Montagem de eletrodos de grafite artesanais e célula eletroquímica. A1) Montagem e componentes dos eletrodos de grafite artesanais. A2) Eletrodo de grafite finalizado. A3) Base condutora metálica cilíndrica sem e com o eletrodo de grafite artesanal rosqueado. Adaptado de Segatto (2017). B1) Eletrodo auxiliar imerso em solução na célula eletrolítica. B2) Eletrodo de trabalho imerso em solução na célula eletrolítica. B3) Eletrodo de referência imerso em solução na célula eletrolítica. Adaptado de Rodovalho (2014).....	20,21
Figura 16. Etapas e componentes do método de serigrafia. A) Preparo da tela de poliéster com o design de interesse. B) Deposição da tinta condutiva de interesse na superfície do substrato. Adaptado de Paula (2013). C) Rodo de impressão manual. Disponível em < https://www.agesilk.com.br/tiras-e-rodos/rodo-aluminio-poliuretano-polypress-dureza-70-c-100-cm >. Acessado em setembro de 2023. D) Impressora semi-automática DEK 248. Disponível em < https://hgrinc.com/productDetail/Inspection/Used-Dek-Dek-248-cerd-Screen-Printer/06211340003/ >. Acessado em setembro de 2023.....	22
Figura 17. Projeto esquemático 3-D de uma placa de circuito impresso com multicamadas composta por quatro camadas de cobre (duas camadas internas), cinco camadas dielétricas e a camada de máscara superior e inferior. Traduzido de Shamkhalichenar; Bueche; Choi (2020).....	23

Capítulo 2

Graphical Abstract.....36

Figure 1. (A) UV–vis absorption spectrum of GQD, insert the GQD suspension under UV light. (B) FTIR spectrum of GQD. (C) AFM topography image of GQD drop-casted onto the mica substrate. (D) SEM image of GQD.....41

Figure 2. Bare graphite electrode (A), graphite electrode modified with rGO (B), graphite electrode modified only with GQD (C) and graphite electrode modified with both rGO/GQD (D).....42

Figure 3. Cyclic voltammograms of graphite electrodes without modification (—), graphite electrodes modified with rGO alone (—), graphite electrodes modified with GQD (—), graphite electrodes modified with the nanomaterial rGO/GQD (—) and Anti-cTnI immobilized onto graphite electrodes modified with the nanomaterial (—) in KCl solution (0.10 mol/L) containing $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5.0 mmol/L), 50 mV/s.....43

Figure 4. SEM and DFM images of rGO/GQD electrode with: Anti-cTnI (A, E); Anti-cTnI/BSA (B, F); Anti-cTnI/BSA/sick patient serum (C, G), Anti-cTnI/BSA/health patient serum (D, H) Magnification factor of SEM images: 15×10^3 times.....44

Figure 5. (A) Differential pulse voltammograms of the immunosensor for different cTnI concentrations. (B) Calibration curve of the immunosensor. (C) Histogram showing the current (I) for healthy (H1 - H2) and sick (S1 - S4) patients serum samples. (D) Days of stability. (E) Regeneration. (F) cTnI and cTnT response. Electrolyte: KCl solution (0.1 mol. L^{-1}) containing $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mmol. L^{-1}). Modulation amplitude: 50 mV. Pulse interval: 0.2 s. Scan rate: 25 $mV.s^{-1}$ 45

Capítulo 3

Graphical Abstract.....55

Figure 1. (A) C-PCBE electrode without ink recover, (B) Carbon conductive ink recovers (C) Silver conductive ink recovers (D) C-PCBE electrode produced with the working area delimited with vinyl adhesive.....59

Figure 2. (A) SEM images in different magnifications of the C-PCB and C-PCBE electrode: before (I) and after (IV) the ink recover, (II) FR-4 board material, patterned conductive traces (III). (B) XRD crystallography data: C-PCB electrode before ink recover (I), C-PCB electrode after conductive silver ink recover (II), C-PCBE electrode after conductive carbon ink recover (III) Magnification factor of SEM images: AI, AIV= 25 times; AII, AIII = 2×10^3 times.....62

Figure 3. (A) DFM images of C-PCBE electrode (I) and C-PCBE/GQD electrode (II). (B) SEM images of C-PCBE electrode (I) and C-PCBE/GQD electrode,

magnification factor = 10.10^3 times. (C) Cyclic voltammograms of C-PCBE (—) C-PCBE/GQD (—) and C-PCBE/GQD/Anti-cTnT (—) in KCl solution (0.10 mol/L) containing $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5.0 mmol/L), scan rate 50 mV/s.....63

Figure 4. (A) DFM and (B)SEM images after stages of the biofunctionalization of the C-PCBE/GQD electrode: immobilization of the anti-cTnT (Fig 4A I, Fig 4B I), blocking step with glycine (Fig 4A II, Fig 4B II), and with an addition of serum samples from sick (Fig 4A III, Fig 4B III) and healthy (Fig 4A IV, Fig 4B IV) patients. Magnification factor of SEM images = 5.10^3 times.....65

Figure 5. (A) Differential pulse voltammograms of the immunosensor for six different cTnT concentrations in enriched human serum sample. Electrolyte: Phosphate Buffer (0.1 mol/L), potential scan from - 0.5 V to +0.3 V; scan rate 30 mV/s; modulation amplitude 60 mV; interval time 0.2 s. (B) Calibration curve of the immunosensor. (C) Bar charts showing the current response for different types of antigens (cTnI, CA 125, CRP, cTnT, and solution without cTnT). (D) Bar charts showing the current response obtained after 28 days Storage stability evaluation. (E) Reuse capacity. (F) Bar charts showing the current response obtained from healthy (H1–H2) and sick (S1–S4) patients samples analyses. Electrolyte: Phosphate Buffer (0.1 mol/L), scan rate 30 mV/s; modulation amplitude 60 mV; interval time 0.2 s.....66

SUPPLEMENTAL FILES.....74

Figure S 1: Design of the pcb board.....74

Figure S 2: CPCB-E electrode before (A) and after (B) the ink deposition.....74

Figure S 3: XRD patterns of JCPDS cards. (A) Metallic Copper.....75

(B) Tin.....75

(C) Silver.....76

(D) Carbon.....76

Lista de abreviaturas

Anti – cTnI – Anticorpo anti- troponina I
Anti – cTnT – Anticorpo anti-troponina T
CH₁, CH₂ e CH₃ – Domínios constantes da cadeia pesada de anticorpos
CK – Creatinoquinase
CK-MB - Creatinoquinase fração MB
CL - Domínio constante da cadeia leve de anticorpos
CRD - Regiões determinantes de complementariedade
DATASUS - Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ECI - Eletrodos de carbono impresso
ECG - Eletrodos de carbono grafite
Fc - Fragmento cristalizável
FR- 4 - *Flame retardant type four* IAM - Infarto agudo do miocárdio
LDH - Lactato desidrogenase
pH – potencial de Hidrogênio
pI – ponto isoelétrico (*isoelectric point*)
PCI - Placas de circuito impresso (*printed circuit board* – PCB)
PQG – Pontos quânticos de grafeno (*graphene quantum dots* - GQD's)
OG - Óxido de grafeno
OGr - Óxido de grafeno reduzido
TnCc - Troponina C (*cTnC*)
TnIc - Troponina I (*cTnI*)
TnTc - Troponina T (*cTnT*)
VH - Domínio variável da cadeia pesada de anticorpos
VL - Domínio variável da cadeia leve de anticorpos
VC - Voltametria cíclica
VPD – Voltametria de pulso diferencial RNA – Ácido Ribonucléico

Apresentação

O infarto agudo do miocárdio é uma das principais causas de mortalidade nacional e mundial. Caracterizado pela necrose dos cardiomiócitos após uma situação de isquemia, seguido da liberação de biomarcadores cardíacos na corrente sanguínea, o diagnóstico precoce e eficaz desta condição clínica é de suma importância para a sobrevivência do paciente.

No contexto de ferramentas diagnósticas aplicadas à detecção do infarto, os imunossensores eletroquímicos apresentam grande potencial de aplicação devido ao seu baixo custo de produção, fornecimento de respostas rápidas, facilidade operacional, especificidade, sensibilidade e possibilidade de miniaturização.

Dentre os biomarcadores cardíacos utilizados para diagnóstico precoce e evolução do quadro de infarto, destacam-se as troponinas, marcadores biológicos considerados padrão-ouro, graças a sua especificidade miocárdica, rápida liberação na corrente sanguínea e elevado tempo de alteração.

Assim sendo, neste trabalho dois imunossensores eletroquímicos foram desenvolvidos para a detecção de troponinas cardíacas, via imobilização por adsorção física de anticorpos anti-troponina T e anticorpos anti-troponina I na superfície de eletrodos de grafite modificados com nanomateriais derivados de grafeno, como óxido de grafeno reduzido e pontos quânticos de grafeno.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo 1). A tese foi dividida em **Capítulo 1: Fundamentação Teórica**; **Capítulo 2: Reduced Graphene Oxide and Graphene Quantum Dots nanomaterial: Application in an electrochemical immunosensor for cardiac troponin I detection** e **Capítulo 3: Carbon Printed Circuit Board electrode for cardiac troponin T detection utilizing ninhydrin as immunocomplexation indicator**, sendo os artigos referentes aos capítulos 2 e 3 ainda não publicados.

Capítulo 1: Fundamentação Teórica

1. Infarto Agudo do Miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM), é um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais razões de mortalidade nacional [1,2]. A realização de uma coleta de dados, no site do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), referente a um período de 10 anos (compreendido entre 2011 e 2021) acerca dos óbitos referentes ao IAM no Brasil, indica a ocorrência de 992.787 mortes nesse intervalo [3].

O IAM é oriundo de uma situação isquêmica, ou seja, é a diminuição do fluxo sanguíneo coronariano que resulta na lesão e/ou morte celular por necrose das células musculares cardíacas, os cardiomiócitos. Dentre os sintomas frequentemente relatados pelos pacientes acometidos por esta doença coronariana, destacam-se a dor precordial (de caráter irradiante ou não), sudorese, arritmia cardíaca, náuseas, vômitos e falta de ar. Alguns fatores de risco estão associados a ocorrência do IAM, como histórico familiar, sedentarismo, hipertensão arterial, tabagismo, obesidade, diabetes *mellitus* e hipercolesterolemia [4,5].

O IAM é subdividido em cinco tipos, sendo o IAM tipo 1 relacionado a eventos ateroscleróticos, IAM tipo 2 associado a isquemia dos tecidos cardíacos e IAM tipo 3 atribuído a morte súbita do paciente, após a apresentação da sintomatologia clássica. Os IAM tipos 4 e 5 são correlacionados a intervenções cirúrgicas, sendo o tipo 4 subdividido em três categorias: a) derivado de intervenção coronariana percutânea, b) relacionado a trombose do *stent* e c) associado a angioplastia; ao passo que a ocorrência do IAM tipo 5 é prevalente em pessoas submetidas a cirurgia de revascularização miocárdica [6].

A lise dos cardiomiócitos é seguida da liberação de macromoléculas intracelulares e proteínas estruturais na corrente sanguínea. Em tais materiais extravasados decorrentes de lesão miocárdica podemos identificar e mensurar através de exames específicos os biomarcadores cardíacos que são em geral enzimas ou proteínas, tornando o diagnóstico e conduta terapêutica mais eficaz [5]. As troponinas cardíacas são os biomarcadores mais eficazes para detectar ataques cardíacos devido à sua alta especificidade para lesões no músculo cardíaco, liberação precoce e persistência prolongada na corrente sanguínea [4-

^{6]}. A Figura 1 ilustra e relaciona a liberação destas espécies após a incidência de um IAM.

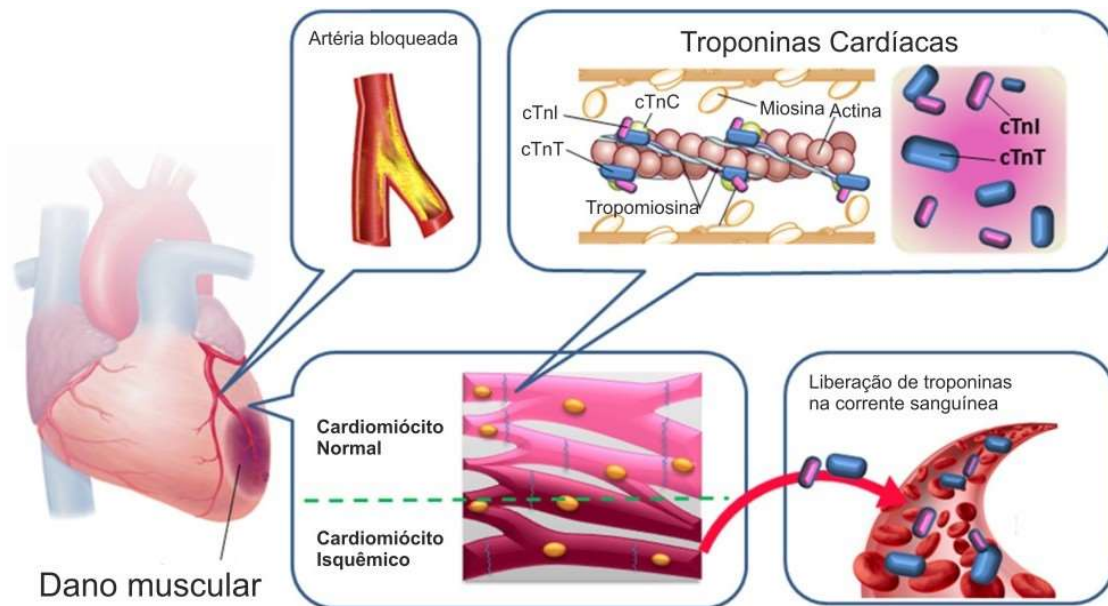


Figura 1. Liberação de troponinas cardíacas na corrente sanguínea após a ocorrência de um IAM. **Fonte:** Traduzido de ^[7].

A elevação dos níveis basais de troponinas cardíacas associada a observação de sintomas de angina é a base da definição de IAM, segundo a Quarta Definição Universal de Infarto Agudo do Miocárdio ^[6], documento que reúne as diretrizes mundiais mais recentes referentes a tal condição clínica.

1.1 Troponinas Cardíacas

As troponinas são um complexo proteico encontrado tanto no músculo cardíaco quanto no músculo esquelético subdivididas em três isoformas: troponina C (TnC), troponina I (TnI) e troponina T (TnT). Presentes no filamento fino do sarcômero do músculo estriado cardíaco, as troponinas regulam a interação da tropomiosina com a actina no processo contrátil além de controlarem as contrações cardíacas na presença ou ausência de cálcio ^[5,7] como ilustrado na Figura 2.

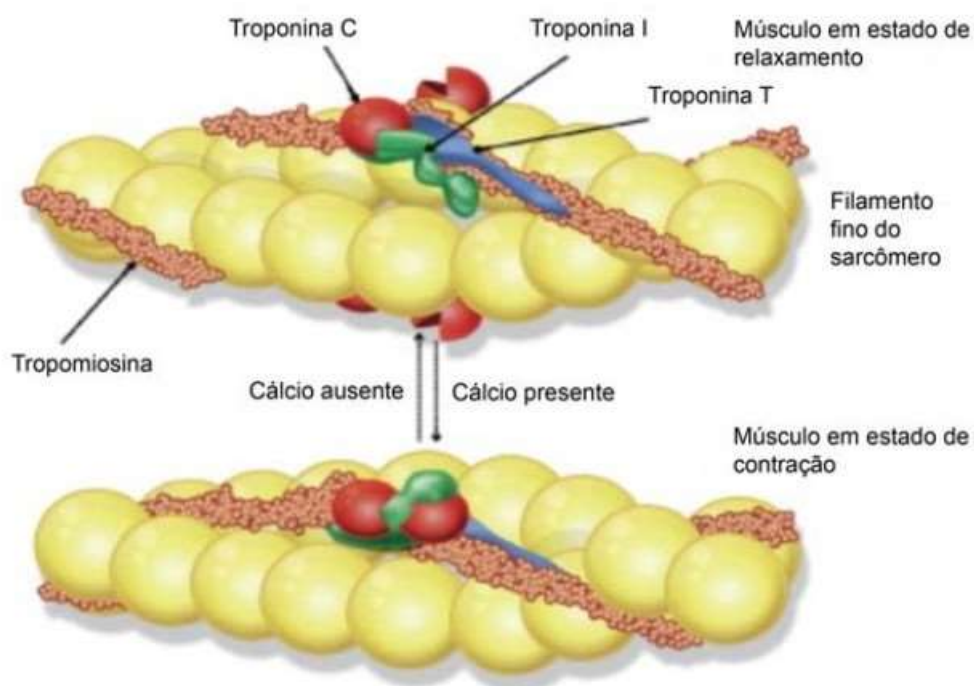


Figura 2. Localização das troponinas cardíacas agregadas ao filamento de tropomiosina e actina. **Fonte:** Traduzido de [8].

No diagnóstico de IAM, a TnCc não é utilizada, visto que sua isoforma cardíaca é idêntica à sua isoforma esquelética, logo emprega-se a TnIc ou a TnTc para tal finalidade. É válido ressaltar que a relevância clínica da TnIc e da TnTc são comparáveis, podendo ambas as subunidades serem utilizadas com alta eficácia e segurança na detecção de um episódio de IAM [5,7].

Os níveis basais de TnTc e TnIc elevam-se entre 4-6 horas após o início dos sintomas de IAM havendo um pico entre 12-24 horas, sendo que a TnTc permanece elevada por um período de 7 até 14 dias, enquanto a TnIc é normalizada após um período de 6 a 8 dias [9]. A Figura 3 indica a comparação da cinética de liberação das troponinas cardíacas T e I com outros biomarcadores cardíacos: mioglobina, creatinoquinase (CK), creatinoquinase fração MB (CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH), sendo possível a observação de que as troponinas cardíacas são as biomoléculas que apresentam maior tempo de alteração após a incidência de um IAM além de possuírem os picos de maior liberação [10,11].

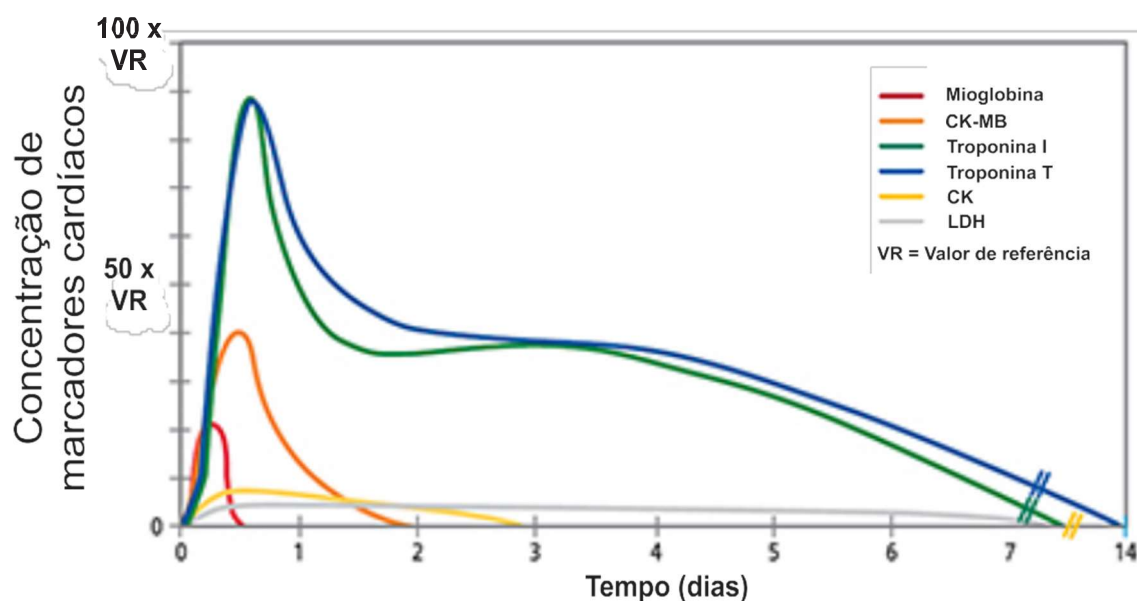


Figura 3. Comparação da cinética de liberação de biomarcadores cardíacos ao longo de um intervalo de tempo. **Fonte:** Adaptado e traduzido de ^[10].

A detecção e quantificação laboratorial das troponinas cardíacas usualmente é realizada através de imunoensaios, ensaios baseados na interação antígeno x anticorpo, sendo a formação do imunocomplexo analisada pelo comportamento de marcadores específicos adicionados ao sistema. A incorporação de uma espécie radioativa, como o iodo 125, dá origem ao radioimunoensaio, ao passo que ensaios de quimioluminescência utilizam espécies cromóforas e métodos imunoenzimáticos baseiam-se na aplicação de enzimas ao meio. Ambas as metodologias apresentam elevada eficácia, contudo são dispendiosas, de execução complicada, requerendo equipamentos de alto custo e operadores altamente especializados ^[12].

Nesse contexto, ressalta-se a possibilidade de emprego dos biossensores como ferramenta analítica de diagnóstico precoce de IAM, pois tais dispositivos aliam respostas sensíveis e precisas em tempo real a análises simplificadas, auxiliando no prognóstico do paciente ^[13].

2. Biossensores

2.1 Definição

Os biossensores são dispositivos analíticos capazes de detectar e converter eventos biológicos em respostas mensuráveis. Compostos por um elemento de reconhecimento biológico (também denominado biomolécula ou bioreceptor), um transdutor (responsável pela transformação do sinal biológico em um sinal analítico útil) e um sistema de conversão e visualização de dados, tais dispositivos fornecem informações rápidas e confiáveis ^[13]. Os componentes e o esquema de funcionamento de um biossensor são representados na Figura 4.

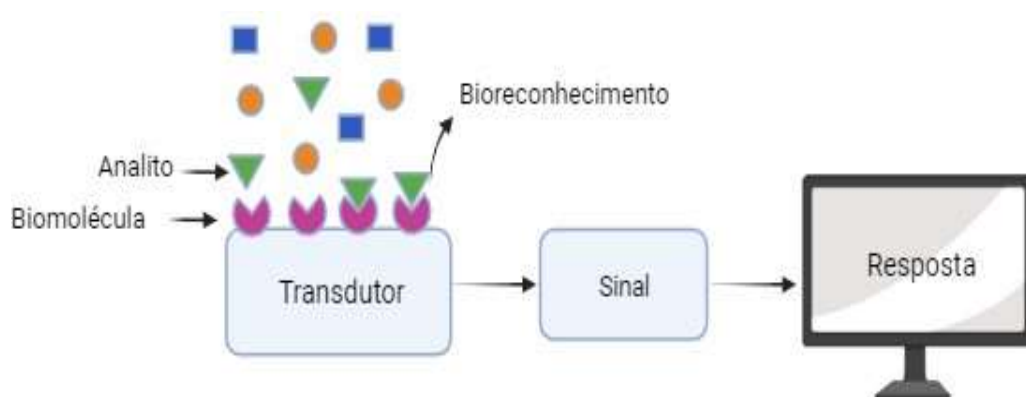


Figura 4. Componentes e esquema de funcionamento de um biossensor. **Fonte:** Próprio Autor, criado com BioRender.com

O tipo de biomolécula utilizado na construção de um biossensor indica sua nomenclatura assim como pode ser utilizado como critério de classificação, sendo assim, são denominados genossensores quando oligonucleotídeos de RNA ou DNA são utilizados, aptassensores quando aptâmeros são empregados (proteínas), biossensores enzimáticos quando enzimas são empregadas, biossensores celulares quando células são empregadas e imunossensores quando anticorpos (ou antígenos) são utilizados ^[14].

2.2 Imunossensores

Os imunossensores são dispositivos analíticos cujo princípio de funcionamento baseia-se na interação altamente específica entre antígeno e anticorpo, havendo a formação de um imunocomplexo. A ligação formada entre antígenos e anticorpos é constituída por forças não-covalentes, como forças de Van der Waals, atração eletrostática e ligação de hidrogênio, havendo a possibilidade de rompimento desta em situações específicas, como alteração do pH do meio, aplicação de soluções salinas supersaturadas e uso de detergentes [15,16].

Os anticorpos (também denominados imunoglobulinas) são respostas do sistema imune à presença de substâncias estranhas ao corpo, os antígenos, sendo constituídos por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas de polipeptídeos, organizadas em uma estrutura que se assemelha ao formato da letra "Y", conectadas por ligações de dissulfeto. Os componentes das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas diferem a respeito da quantidade de domínios constantes, na cadeia leve constam um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L) ao passo que na cadeia pesada três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) e um domínio variável (V_H) são encontrados [17].

Existem duas regiões de extrema importância na estrutura dos anticorpos, a porção denominada como Fragmento de Ligação ao Antígeno cuja abreviação, Fab, é derivada da expressão em inglês "*Antigen Binding Fragment*", composta pelos domínios variáveis e constantes das cadeias leves (V_L e C_L) e pesadas (C_L e C_{H1}), e a porção Fragmento cristalizável (Fc) composta pelas domínios constantes de ambas cadeias pesadas, sendo que cada região variável (V_H e V_L) possui regiões determinantes de complementariedade (CRD), sendo tais locais referentes a especificidade da interação antígeno-anticorpo [17], conforme a Figura 5.

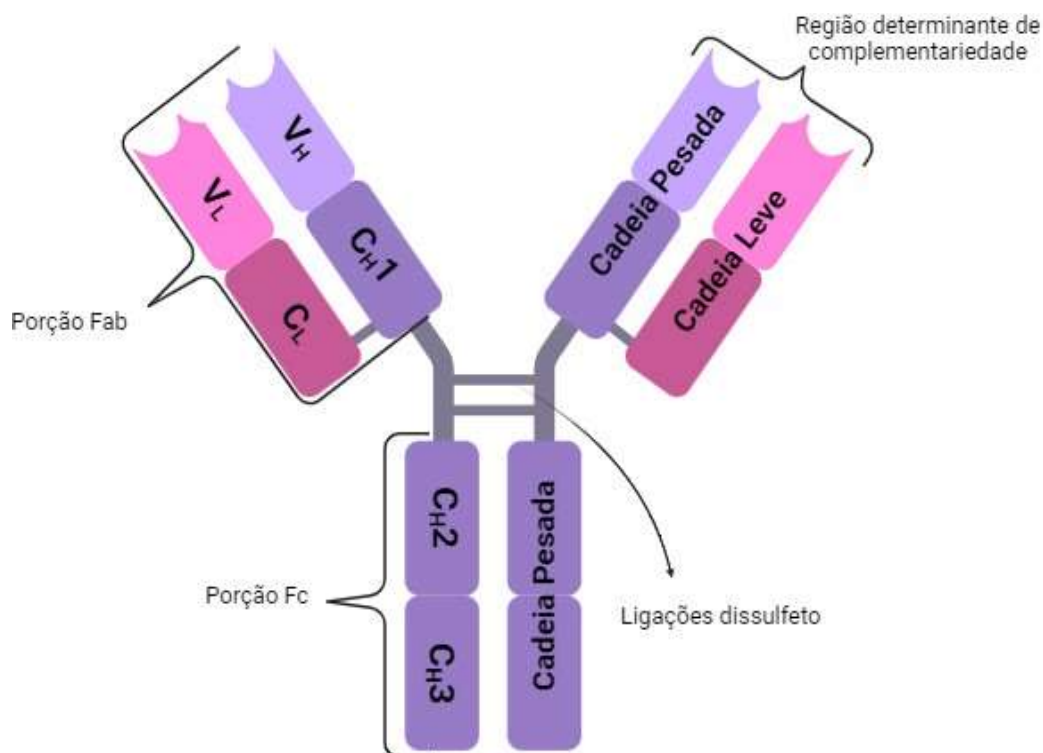


Figura 5. Estrutura básica de um anticorpo. **Fonte:** Próprio Autor, criado com BioRender.com

Diferentes tipos de transdutores podem ser empregados no desenvolvimento de imunossensores, tais como piezoelétricos (baseados na modificação da massa ocorrida devido à interação do analito com o bioreceptor, produzindo um sinal elétrico mensurável), ópticos (indicam a alteração de sinais ópticos após a interação antígeno/anticorpo), calorimétricos (analisa a variação de temperatura envolvida na reação de bioreconhecimento) e eletroquímicos (monitoram sinais elétricos de espécies eletroativas, através da aplicação de um potencial fixo ou variável ao longo do tempo, de maneira que a resposta de corrente observada é diferenciada antes e depois da imunocomplexação) [18,19] .

Os imunossensores eletroquímicos destacam-se devido a sua elevada seletividade e especificidade, preço atrativo, rapidez nas análises e possibilidade de miniaturização, visando aplicações *point-of-care*, ou seja, análises realizadas em tempo real, no local em que o paciente se encontra, dispensando um aparato laboratorial rebuscado [20].

2.2.1 Classificação dos imunossensores eletroquímicos de acordo com o tipo de transdutor eletroquímico

Os imunossensores eletroquímicos podem ser divididos em relação ao tipo de grandeza elétrica analisada, sendo assim, 5 tipos clássicos são encontrados na literatura: impedimétricos (analisam a impedância do sistema, baseando-se na observação da resistência à transferência de carga), potenciométricos (expressam a mudança do potencial), condutimétricos (medem a alteração na condutância de soluções eletrolíticas) amperométricos (indicam as mudanças de corrente elétrica perante um potencial constante) e voltamétricos (demonstram a corrente elétrica gerada a partir da variação do potencial ao longo de um intervalo de tempo) ^[18-21] .

Nos imunossensores voltamétricos, os processos de oxirredução que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho (eletrodo onde ocorrem as reações de interesse) fornecem uma resposta de corrente elétrica proporcional à concentração do analito de interesse. A corrente obtida, que flui entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (também denominado contra eletrodo) é medida como resposta à variação do potencial aplicado no eletrodo de trabalho, sendo este comparado em relação ao potencial fixo de um eletrodo de referência (eletrodo cujo potencial deve ser estável e não polarizável) ^[21-23].

Diferentes técnicas voltamétricas são originadas mediante a variação dos sinais de excitação (funções potencial/tempo) aplicados no eletrodo de trabalho, tais como voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria cíclica (VC) ^[24].

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica amplamente utilizada para investigação dos processos de oxirredução ocorridos na superfície do eletrodo de trabalho, sendo possível também o estudo de seu perfil eletroativo. Durante a sua execução, realiza-se uma varredura linear de potencial nos sentidos direto (regiões anódicas, positivas) e indireto (regiões catódicas, negativas), havendo a medida da corrente gerada em função do potencial aplicado, resultando em um gráfico que expressa picos catódicos e anódicos inversos,, correspondentes às semi- reações de redução e oxidação das espécies envolvidas ^[24- 27] como indicado na Figura 6 A.

Na técnica de VPD, dois pulsos de potencial em função do tempo são aplicados, de modo que a medida de corrente é realizada antes e após a aplicação destes. Essa mediação dividida em dois momentos resulta na subtração da corrente capacitiva (oriunda do carregamento da dupla camada elétrica) e conseqüentemente, na ampliação da corrente faradaica (derivada dos processos redox na interface eletrodo-solução), sendo esse o grande diferencial dessa técnica, que gera um gráfico de forma gaussiana (Figura 6 B), cuja concentração da espécie que oxida (ou reduz) é diretamente proporcional à altura do pico [24-27].

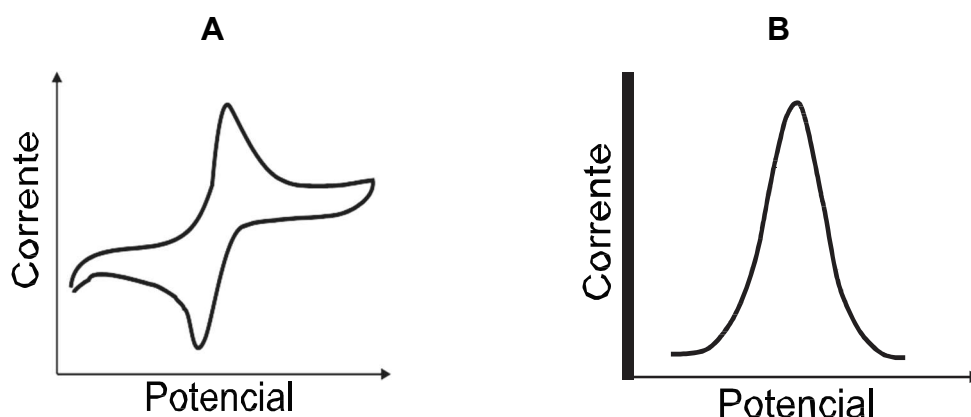


Figura 6. Representações gráficas das técnicas de voltametria. **A)** Voltamograma cíclico com a corrente elétrica em função do potencial. **B)** Voltamograma de pulso diferencial com a corrente elétrica em função do potencial. **Fonte:** Próprio Autor.

2.2.2 Classificação dos imunossensores eletroquímicos de acordo com o tipo de detecção

A formação do imunocomplexo pode ser monitorada por duas abordagens diferentes, denominadas *label-free* (sem marcação) ou *label-based* (com marcação). Os imunossensores eletroquímicos do tipo *label-based* utilizam anticorpos ou antígenos secundários, agregados a enzimas, moléculas cromóforas, espécies fluorescentes, resultando na formação de um ensaio tipo sanduíche, caracterizado pela utilização de um anticorpo primário (imobilizado na superfície do transdutor), que após incubado com o antígeno ou com a amostra em análise, recebe um segundo anticorpo conjugado com marcadores específicos, cuja geração de sinal eletroquímico será proporcional a concentração do antígeno [18-21], como ilustrado na Figura 7.

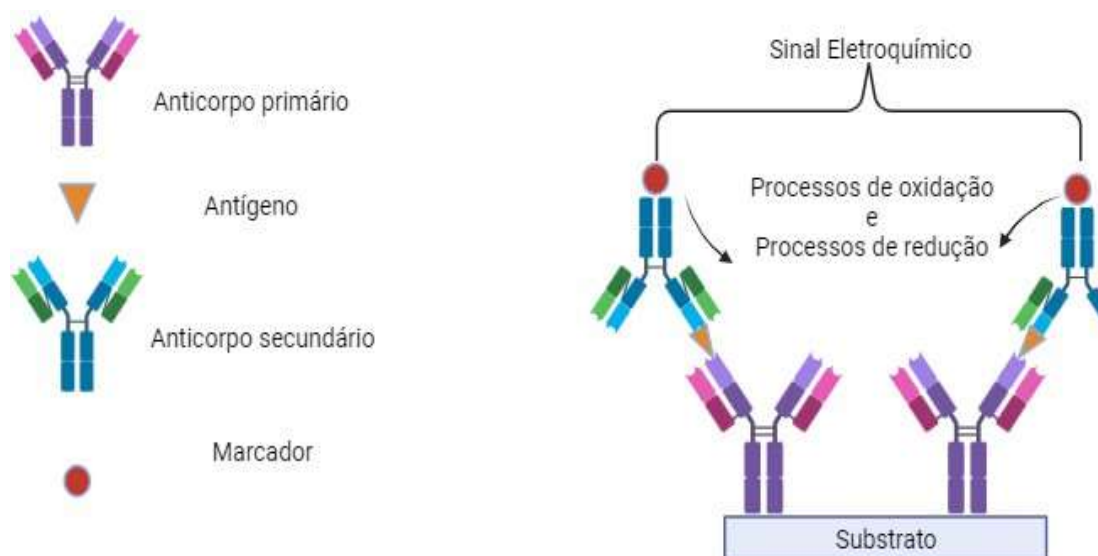


Figura 7. Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo *label-based*. **Fonte:** Próprio Autor, criado com BioRender.com

Ensaio tipo sanduíche são métodos morosos, de execução complexa e preço relativamente elevado pois envolvem a realização de várias etapas em conjunto com a manipulação de reagentes potencialmente perigosos, necessitando de aparato experimental complexo e mão-de-obra qualificada [20,21].

Imunossensores eletroquímicos *label-free* (Figura 8) monitoram a formação do imunocomplexo, a interação antígeno x anticorpo, porém como estas biomoléculas não apresentam natureza condutiva, é de praxe a utilização de mediadores eletroquímicos, sondas redox, ou seja, espécies eletroativas que possuem caráter de oxidação e/ou redução, cujo sinal de corrente seja suficientemente mensurável, que após o biorreconhecimento, sofrerão alterações em sua transferência de elétrons [19- 21, 28].

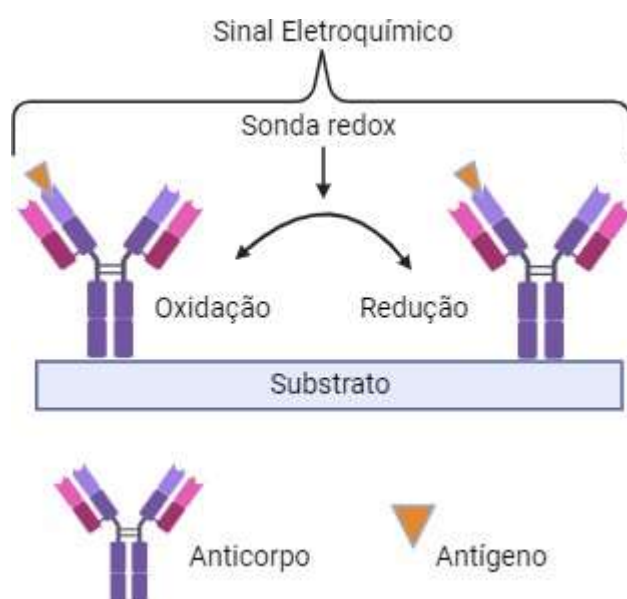


Figura 8. Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico do tipo *label-free*.
Fonte: Próprio Autor, criado com BioRender.com

Nesse aspecto, o sistema composto por ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]$) apresenta-se como a sonda redox mais comumente utilizada graças a sua estabilidade, facilidade de preparação, preço acessível e alta disponibilidade no mercado. Ambos são substâncias inorgânicas, denominadas complexos de coordenação, apresentando geometria octaédrica e pertencentes a classe dos hexacianoferratos ^[29], cujas estruturas estão indicadas na Figura 9.

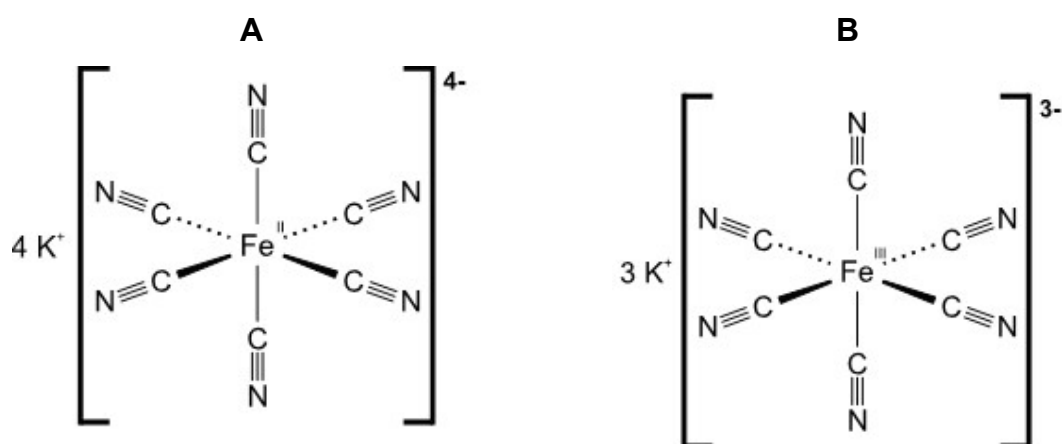


Figura 9. Estrutura dos hexacianoferratos. A) Ferrocianeto de potássio. B) Ferricianeto de potássio. **Fonte:** Próprio Autor,

Além dos mediadores eletroativos, a utilização de outras substâncias que também indiquem a ocorrência do evento de imunocomplexação por mecanismos distintos mostra-se como uma opção interessante. Nesse aspecto, destaca-se a utilização da ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona, $C_9H_6O_4$, Figura 10).

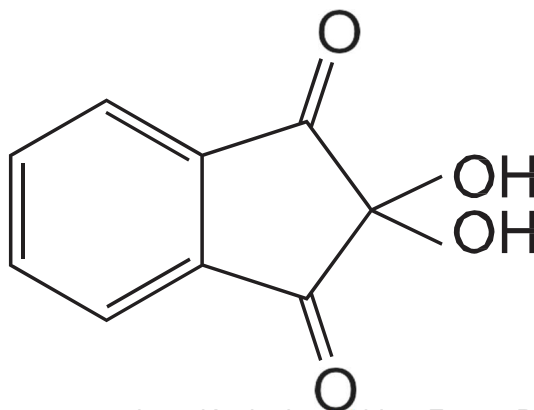


Figura 10. Representação da molécula de ninidrina. **Fonte:** Próprio Autor.

A ninidrina é uma substância orgânica de massa molecular 178.12 g/mol, normalmente empregada para análise de aminoácidos devido à sua interação com grupamentos amino livres em proteínas e peptídeos, havendo a produção de um composto denominado púrpura de Ruhemann ^[30].

A maioria da literatura disponível menciona a aplicação da ninidrina em biossensores apenas em seu viés tradicional, voltado exclusivamente para a identificação de aminoácidos ^[31-33], Brito-Madurro e colaboradores empregaram a ninidrina como indicador de hibridação na construção de um genossensor eletroquímico para detecção de *Candida Auris*, um fungo patógeno nosocomial^[34], porém, até o presente momento, o uso da ninidrina como indicador de imunocomplexação em imunossensores eletroquímicos, um dos temas abordados posteriormente neste trabalho, não foi reportado.

2.2.3 Imobilização de anticorpos por adsorção física

A imobilização eficaz do anticorpo (ou antígeno) na superfície de um eletrodo é um fator decisivo para um bom desempenho dos imunossensores eletroquímicos, visto que a biomolécula é imobilizada diretamente na superfície do transdutor, logo intenciona-se ao máximo a manutenção de sua atividade e evitar sua lixiviação ^[35,36].

O método de adsorção física de biorreceptores destaca-se pela sua simplicidade, aliando baixo custo de produção e rapidez de execução. A biomolécula é colocada em contato com a superfície do eletrodo e mantém-se adsorvida fisicamente através de interações não covalentes, como ligação de hidrogênio, interações π - π , forças atrativas de Van der Waals e interações eletrostáticas e hidrofóbicas [35,36].

Para auxiliar na adsorção com orientação correta da biomolécula e em diversos outros parâmetros, a superfície do eletrodo de trabalho pode ser modificada com algum nanomaterial, especialmente os oriundos do grafeno visto que com a sua aplicação, dispositivos mais sensíveis são produzidos, havendo uma melhoria de seu desempenho analítico [37-40].

3. Grafeno e derivados

3.1 Óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido

O grafeno é um alótropo carbonáceo que apresenta hibridização do tipo sp^2 , formando entre si ligações do tipo σ (que determinam as propriedades mecânicas e elásticas do grafeno) e ligações tipo π (responsáveis pelas propriedades ópticas e elétricas já que os elétrons estão mais fracamente ligados aos átomos, logo, conseguem se mover por toda estrutura cristalina) resultando assim na formação de uma monocamada plana, ligadas covalentemente em uma configuração hexagonal, semelhante a um favo de mel [41-43], conforme indicado na Figura 11.

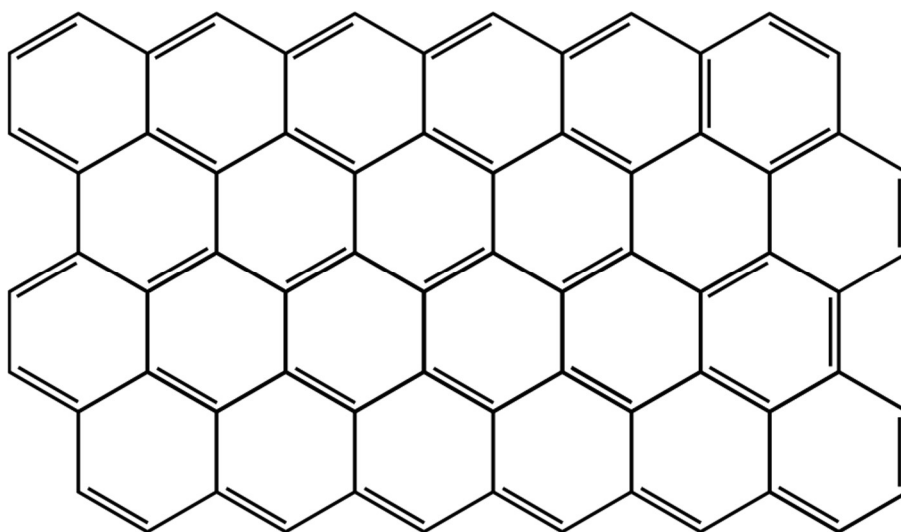


Figura 11. Representação de uma folha de grafeno. **Fonte:** Próprio Autor.

Apresentando propriedades extremamente interessantes, como elevada área superficial, excelente condutividade eletrônica, biocompatibilidade e facilidade de funcionalização o grafeno é um nanomaterial com características extremamente interessantes para aplicação em biossensores [43].

A utilização do óxido de grafite para a produção de grafeno é largamente empregada devido ao seu alto rendimento reacional e custo de síntese relativamente reduzido [44]. O óxido de grafite é facilmente obtido empregando-se a metodologia de Hummers, metodologia essa baseada na utilização de ácidos concentrados e agentes oxidantes fortes, cuja finalidade é diminuir as forças de Van der Waals entre as camadas de grafite, resultando na expansão do seu plano basal, além da inserção de grupos funcionais oxigenados que aumentam seu caráter hidrofílico. Uma vez que o óxido de grafite é esfoliado em meio aquoso, ocorrerá a separação de suas folhas, produzindo-se o material denominado óxido de grafeno (OG), cuja representação está indicada na Figura 12[45,-47].

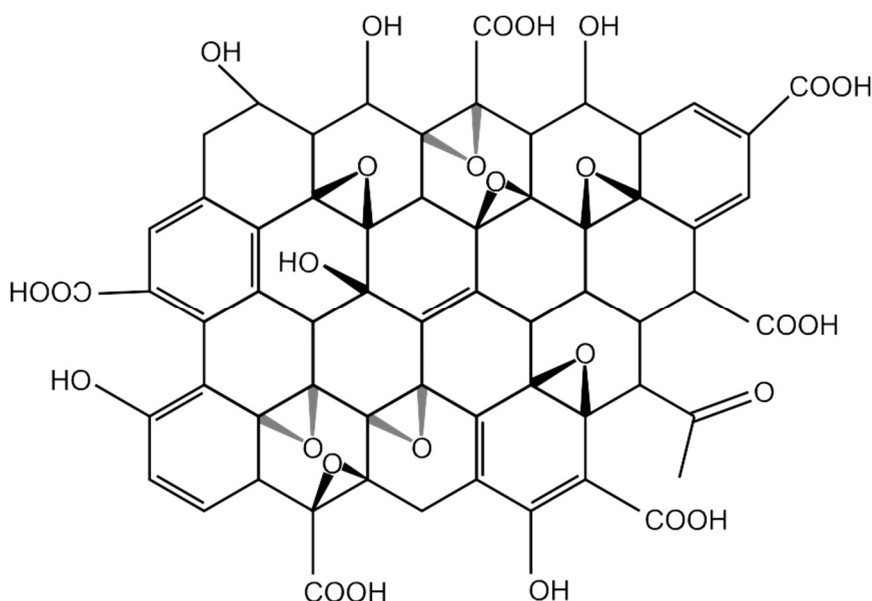


Figura 12. Representação do óxido de grafeno. **Fonte:** Próprio Autor.

A presença dos grupos oxigenados no OG promove sua capacidade de dispersão aquosa porém reduz significativamente sua condutividade eletrônica, visto que tais espécies majoritariamente realizam ligações do tipo sp^3 , rompendo a rede anteriormente cristalina do grafeno e distorcendo sua nuvem de elétrons π , tornando-se então necessária a redução química ou eletroquímica deste material, para diminuir a fração dessas espécies oxigenadas, a fim de restaurar

sua condutividade produzindo-se então o material óxido de grafeno reduzido (OGr) ^[48-51] , cuja representação está indicada na Figura 13.

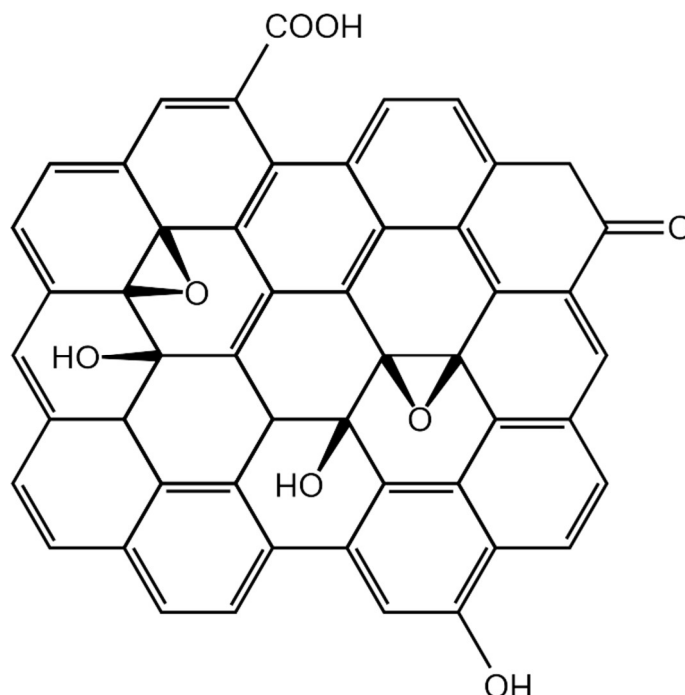


Figura 13. Estrutura do Óxido de Grafeno Reduzido. **Fonte:** Próprio Autor.

A redução eletroquímica do OGr apresenta praticidade e rapidez de execução, uma vez que é realizada diretamente na superfície do eletrodo, além de dispensar o uso de reagentes redutores fortes e solventes tóxicos empregados na redução química ^[44]

Na redução eletroquímica do OG, normalmente é empregado como eletrólito suporte uma solução de tampão fosfato, sendo necessário atenção ao tempo e potencial de redução aplicados, pois quanto mais negativo o potencial, maior será a taxa de redução do OG. Geralmente, valores mais negativos que - 1,5 V não são aplicados, pois podem levar a evolução de bolhas de gás hidrogênio (oriundos da redução da água), criando uma barreira física que impede as folhas de OG de se aproximarem do eletrodo de trabalho para completar o processo de redução eletroquímica. Certos grupos funcionais como os epóxi e hidroxilas, geralmente reduzidos em valores mais negativos que - 1,5 V, permanecem na estrutura, ao passo que a redução das carbonilas, que ocorre no potencial de -1,3 V, podem deixar defeitos no plano ^[52,53].

3.2 Pontos quânticos de grafeno

Os pontos quânticos de grafeno (PQG) são folhas de grafeno de tamanho inferior a 100 nm, que apresentam elevada área superficial, propriedades ópticas, inércia química, estabilidade, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e ótima condutividade elétrica, devido a suas propriedades de efeito de borda e confinamento quântico [54,55].

A sistemática de produção dos PQG é dividida em dois grupos, denominados *top-down* e *bottom-up*. O método *top-down* consiste na decomposição e esfoliação de materiais base para obtenção do grafeno, como grafite, fibras de carbono e negro de fumo; todavia são metodologias lentas, de execução complicada e potencialmente perigosas para o operador, pois envolvem a manipulação de agentes oxidantes fortes, ácidos concentrados e utilização de temperatura elevada. O método *bottom-up* destaca-se devido a sua simplicidade de execução, pois ao mesmo tempo que não necessita de um aparato laboratorial rebuscado, utiliza processos simplificados de decomposição térmica, como a pirólise, e emprega precursores moleculares de baixo custo, especialmente ácidos fracos como o ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) [54-56].

Quando aquecido acima de sua temperatura de fusão ($153^{\circ}C$), o ácido cítrico se decompõe, sendo o íon hidrônio o catalisador desta reação, ocorrendo processos de desidratação e descarboxilação e resultando na formação de vários intermediários, como as formas cis e trans do ácido aconítico ($C_6H_6O_6$) e ácido citracônico ($C_5H_6O_4$) que seguem caminhos reacionais que conduzem à aromatização, havendo a formação de aglomerados aromáticos via condensação aldólica e cicloadição.

A partir do momento que a concentração destes aglomerados atinge um ponto crítico de supersaturação, a formação de *clusters* concêntricos (com domínios sp^2) é observada, seguida de nova condensação e nucleação que dará origem aos PQG (Figura 14), por fim incorpora-se ao meio reacional um agente de dispersão, geralmente hidróxido de sódio (NaOH), responsável pela estabilização dos PQG em solução e manutenção do pH a longo prazo [57,58].

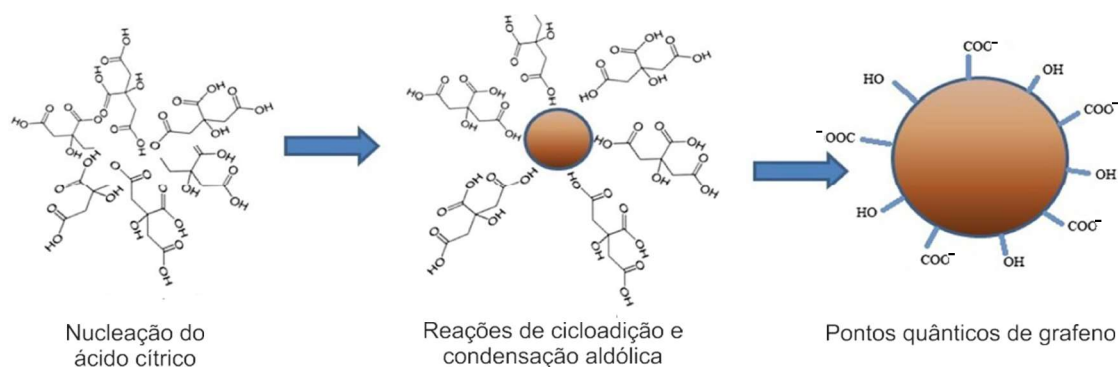


Figura 14. Preparação de pontos quânticos de grafeno utilizando o ácido cítrico como precursor. **Fonte:** Traduzido e adaptado de [58].

No que concerne a utilização de PQG em imunossensores eletroquímicos, destaca-se sua elevada área superficial, sua boa condutividade elétrica e a presença de grupos funcionais hidroxílicos, carboxílicos, carbonílicos e epóxi presentes nas extremidades, fornecendo assim sítios ativos para a incorporação de biomoléculas [54].

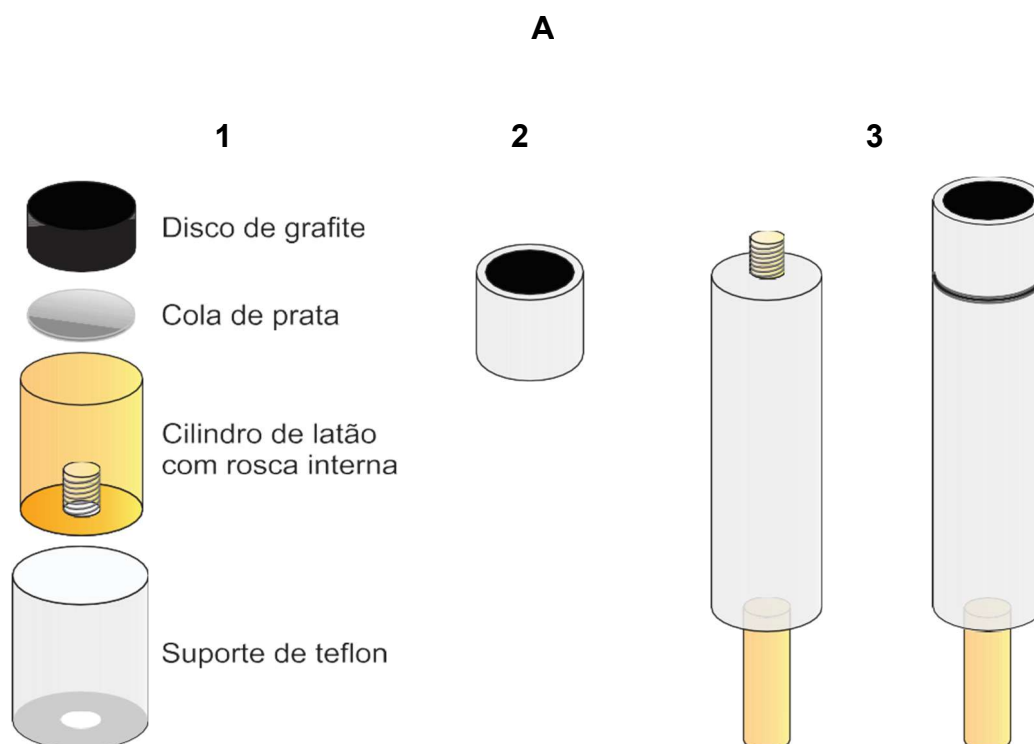
4. Utilização de eletrodos de carbono em imunossensores

Na obtenção de imunossensores, diversos tipos de eletrodos podem ser empregados, contudo, os eletrodos de carbono são largamente utilizados devido a sua estabilidade de corrente, simplicidade de operação, robustez, baixa corrente residual, ampla janela de potencial, preço acessível, biocompatibilidade e elevada condutividade elétrica e inércia, permitindo sua modificação com uma vasta gama de materiais [59,60].

A respeito dos diversos tipos de tipos de eletrodos de carbono, a saber: carbono vítreo monolítico (composto por um emaranhado de fibras de carbono não grafilizável, denominado estrutura turbostrática, apresentando micro e mesoporos ao longo de sua extensão) carbono vítreo reticulado (análogo ao carbono vítreo monolítico, possui maior densidade porosa), pasta de carbono (obtido através da combinação em proporções adequadas de algum material carbonáceo em pó com aglutinante), carbono grafite (discos de grafite de elevada pureza aderidos a uma superfície metálica) e eletrodos impressos de carbono (formados pela deposição de tintas condutoras de carbono em substratos inertes), destacam-se os dois últimos citados [61-63].

4.1 Eletrodos de carbono grafite

Dentre as diferentes possibilidades de fabricação, os eletrodos de carbono grafite (ECG) utilizados no desenvolvimento deste trabalho são constituídos de discos de grafite de altíssimo grau de pureza (adquiridos comercialmente, Alfa Aesar) aderidos a uma superfície metálica com a utilização de uma cola condutiva, sendo a superfície metálica encaixada posteriormente em uma base de polipropileno ^[64], conforme indicado na Figura 15 A1, sendo o ECG finalizado representado na Figura 15 A2. Apresentando excelente resistência a impactos, robustez e custo reduzido de produção por serem produzidos artesanalmente, os ECG permitem a reutilização do aparato, visto que após a remoção da cola condutiva e do disco de grafite, o suporte metálico está apto para receber novos eletrodos em sua superfície. Para a utilização deste tipo de eletrodo é necessário que ele seja rosqueado em uma base condutora metálica cilíndrica (Figura 15 A3), necessitando na utilização de uma célula eletroquímica (Figura 15 B), juntamente com um eletrodo de referência (Figura 15 B1) e um eletrodo auxiliar (Figura 15 B3) ^[65].



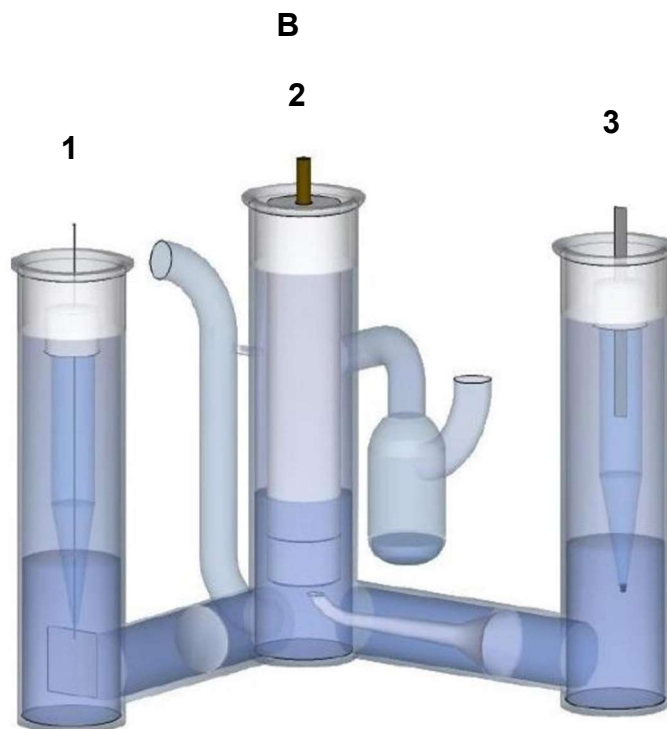


Figura 15. Montagem de eletrodos de grafite artesanais e célula eletroquímica. **A1)** Montagem e componentes dos eletrodos de grafite artesanais. **A2)** Eletrodo de grafite finalizado. **A3)** Base condutora metálica cilíndrica sem e com o eletrodo de grafite artesanal rosqueado. **B1)** Eletrodo auxiliar imerso em solução na célula eletrolítica. **B2)** Eletrodo de trabalho imerso em solução na célula eletrolítica. **B3)** Eletrodo de referência imerso em solução na célula eletrolítica. **Fonte:** **A)** Adaptado de [64]. **B)** Adaptado de [65].

4.2 Eletrodos de carbono impresso

Os eletrodos de carbono impresso (ECI) são produzidos pela deposição de um filme de carbono sobre uma superfície inerte através da técnica de serigrafia (também denominada *silk-screen*), cuja metodologia consiste na utilização de telas de poliéster, modificadas com o design de interesse. O preparo dessas telas é feito através da aplicação de uma emulsão fotossensível sobre sua superfície, juntamente com a incorporação de uma folha transparente que contenha o desenho do eletrodo (denominado fotolito) e exposição do sistema à uma fonte de luz UV, promovendo assim a polimerização, secagem e adesão da emulsão, contudo, a emulsão não transpassa a parte impressa do fotolito, resultando em um molde vazado impresso na tela [66, 67] (Figura 16 A).

No procedimento de impressão dos eletrodos, após o substrato escolhido estar fixado na tela de serigrafia, na superfície desta são adicionadas as tintas condutivas de interesse, e um rodo de impressão, (Figura 16 B) é pressionado ao longo de sua extensão realizando a deposição das tintas na camada superior

do substrato. O rodo de impressão pode ser manual (Figura 16 C) ou pneumático, compondo o corpo de impressoras semiautomáticas (Figura 16 D). Finalizada a deposição de tintas, encaminha-se o substrato à temperatura e tempo adequados para secagem, cura e adesão das tintas [66,67].

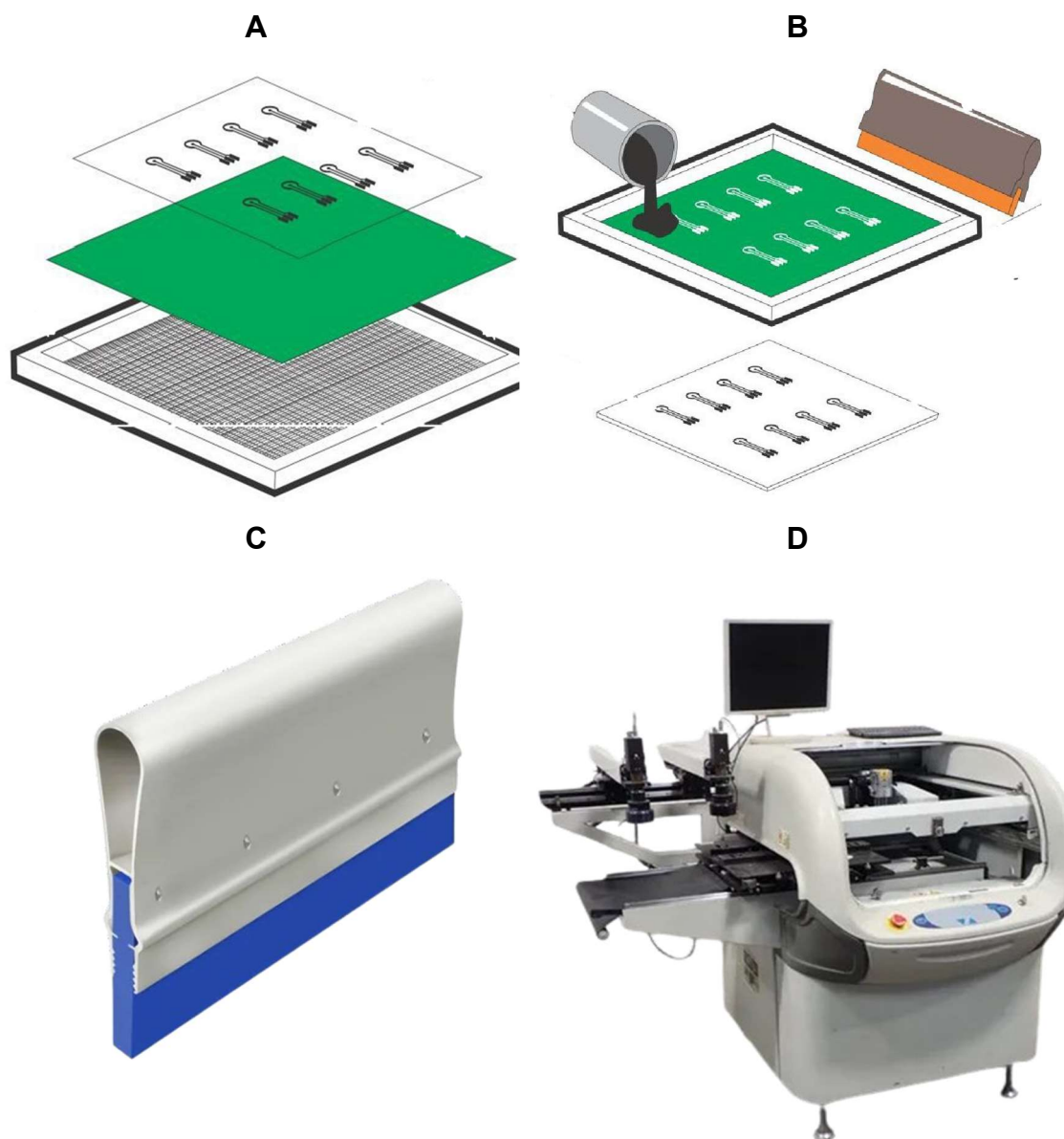


Figura 16. Etapas e componentes do método de serigrafia. **A)** Preparo da tela de poliéster com o design de interesse. **B)** Deposição da tinta condutiva de interesse na superfície do substrato. **C)** Rodo de impressão manual. **D)** Impressora semiautomática DEK 248. **Fonte:** **A), B):** Adaptado de [68]. **C)** Disponível em [69]. **D)** Disponível em [70].

O emprego desta técnica na produção de ECI possibilita a miniaturização e portabilidade destes dispositivos, sendo possível a obtenção de um sistema eletroquímico completo que engloba os eletrodos de referência, trabalho e

auxiliar no mesmo substrato e extremamente versátil em relação a geometria do eletrodo e uso das tintas condutivas de interesse [71, 72].

A definição do tipo de tinta condutiva e do substrato empregado na construção de um ECI é orientada por vários fatores, como facilidade de obtenção, relação custo x benefício, inércia química e resistência à temperatura acerca da escolha do substrato, e espalhabilidade, viscosidade e adesão adequadas no que concerne a escolha da tinta [73].

Nesse aspecto, as placas de circuito impresso (PCI) apresentam-se como excelentes opções de suporte para o desenvolvimento de um ECI utilizando a técnica de serigrafia, pois enquadram-se nos requisitos anteriormente citados que um substrato deve apresentar, são facilmente escaláveis sendo possível a produção de ECI com elevada reprodutibilidade.

Por definição, as PCI são dispositivos elétricos e mecânicos compostos pela associação de materiais condutores (na maior parte dos casos, o metal cobre) e isolantes (também denominados dielétrico, compostos geralmente por fibra de vidro e resina epóxi, formando um material nomeado *flame retardant, 4* (FR-4), que possuem trilhas elétricas customizadas sobrepostas ao longo de sua extensão [74, 75] conforme demonstrado na Figura 17.

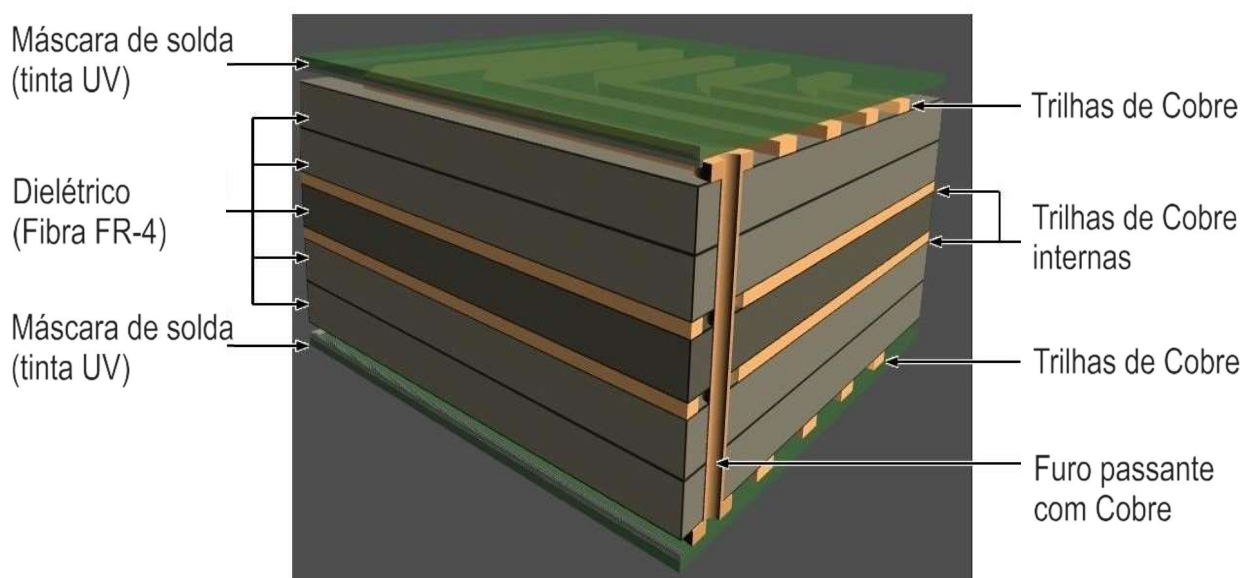


Figura 17. Projeto esquemático 3-D de uma placa de circuito impresso com multicamadas composta por quatro camadas de cobre (duas camadas internas), cinco camadas dielétricas e a camada de máscara superior e inferior. **Fonte:** Adaptado e traduzido de [74].

O uso de um suporte previamente manufaturado, como as PCI, diminui o caráter artesanal atrelado ao desenvolvimento dos ECI via técnica de serigrafia, pois este substrato contém trilhas previamente determinadas e padronizadas que serão recobertas com as tintas condutivas de interesse, além de eliminar a necessidade de aplicação de quaisquer camadas isolantes protetoras, como adesivos ou tintas, dado que a PCI possui uma fina camada de tinta ultravioleta (denominada máscara de solda) já depositada sobre a sua superfície.

Destaca-se também a maior resistência e durabilidade dos ECI produzidos utilizando PCI, pois na execução da serigrafia, as trilhas de conexão dos eletrodos são feitas com as próprias tintas condutivas [76-78], porém, ao serem encaixados e desencaixados das caixas conectoras apropriadas utilizadas na execução de suas análises, estas trilhas podem sofrer desgaste mecânico, diminuindo a operacionalidade do eletrodo. Dessa forma, o uso de PCI como suporte para o desenvolvimento de ECI, minimiza a ocorrência desse possível problema, visto que as trilhas metálicas de conexão são altamente resistentes. Assim, verifica-se que com o uso de PCI na construção de ECI via serigrafia, é possível a produção simultânea e eficaz de conjuntos de eletrodos, com reprodutibilidade e padronização satisfatórios.

A literatura disponível reporta diversos imunossensores eletroquímicos baseados na utilização de eletrodos de PCI convencionais confeccionados com um recobrimento metálico padrão, uma liga metálica composta por níquel e ouro [77-80]. Os eletrodos de PCI com finalização de ouro, geralmente apresentam baixos potenciais de oxidação [83] além de apresentarem inúmeros poros microscópicos em sua superfície, denominados *pinhole defects*, que interferem na reprodutibilidade e uniformidade da superfície dos mesmos [84].

5. Proposta do trabalho

O desenvolvimento do presente estudo visou a obtenção de plataformas de produção simplificada e custo acessível para a construção de imunossensores eletroquímicos label-free voltados para a detecção de troponinas cardíacas.

Foram fabricados eletrodos de carbono grafite e eletrodos de carbono impresso utilizando como substrato placas de circuito impresso que, posteriormente, foram utilizados como transdutores eletroquímicos. Nanomateriais derivados do grafeno, como o óxido de grafeno reduzido e pontos quânticos de grafeno foram utilizados para modificação da superfície dos transdutores, devido as suas características de biocompatibilidade, facilidade de obtenção, elevada área superficial e disponibilidade de grupos funcionais para ancoramento de biomarcadores, investigando-se ainda a utilização de ninidrina como indicador de imunocomplexação.

Referências

- [1] FERNANDES, C. C. B. S.; RODRIGUES, C. C. N.; MACHADO, J. M. L. V.; RICARDO, A. K. Q. de S. Incidence of acute myocardial infarction in young adult patients in a hospital in Maceió/AL. **Braz. J. of Health Review**, v. 5, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n1-041>.
- [2] NICOLAU, J. C.; FEITOSA, F.G. S.; PETRIZ, J. L.; FURTADO, R. H. M.; *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 117, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.36660/abc.20210180>.
- [3] DATASUS. Tab Net Win32 3.0: Óbitos por ocorrência segundo Capítulo CID-10 Capítulo CID-10: IX. Doenças do aparelho circulatório Causa - CID-BR-10: ... 068.1 Infarto agudo do miocárdio Período: 2011-2021, Brasil. Acesso em setembro, 2023. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>.
- [4] BYRNE, R. A.; ROSSELLO, X.; COUGHLAN, J.J.; BARBATO E.; *et al.* ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes; Developed by the task force on the management of acute coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC), **Eur. Heart J.**, 2023, ehad191. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad191>.
- [5] POURALI, A.; OMIDI, Y. Diagnosis of acute myocardial infarction: highlighting cardiac troponins as vital biomarkers. **Bioimpacts.**, v.13, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.34172/bi.2023.22023>.
- [6] THYGESEN, K.; ALPERT, J.S.; JAFFE, A. S.; CHAITMAN, B. R.; *et al.* Fourth universal definition of myocardial infarction; Developed by the Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/ American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF), **Circulation**, v. 138, n. 20, 2018. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>.
- [7] POURALI, A.; RASHIDI, M. R.; REZA M.; BARAR, J.; *et al.* Voltammetric biosensors for analytical detection of cardiac troponin biomarkers in acute myocardial infarction, **Trends Analyt. Chem.**, v.134, n. 9, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116123>.
- [8] SHAVE, R.; BAGGISH, A.; GEORGE, K.; WOOD, M.; *et al.* Exercise induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms, and implications. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 56, n. 3, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.037>.
- [9] NAVARRO, E.; BAÑÓN, R.; GINER, S.; DEVESA, MA.; CARBONA, B. Utilidad de la determinación de la fracción I de la Troponina cardíaca (cTnI), en el diagnóstico de la muerte súbita de origen cardíaco en autopsias forenses. **Cuad. med. Forense**, v. 13, n.48-49, 2007. Disponível em: <https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113576062007000200002&lng=es&tlng=es>
- [10] FRENCH, J.K.; WHUTE, H.D. Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. **Heart**. v. 90, n. 1, 2004. <https://doi.org/10.1136/heart.90.1.99>.

- [11] NUNES, E. O.; FIGUEIREDO, A. M. A bioquímica clínica no diagnóstico e prognóstico de pacientes acometidos pelo Infarto Agudo do Miocárdio evidenciando a importância da Troponina T. **Salusvita**, v. 37, n. 2, 2018.
- [12] Lopez, J. C. A. B.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis (fifth edition). **Ind. J. Clin. Biochem.**, n. 28, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0287-7>.
- [13] HALEEM, A.; JAVAID, M.; SINGH, R. P.; SUMAN, R.; RAB, S. Biosensors applications in medical field: A brief review, **Sens.**, v. 2, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2021.100100>.
- [14] NARESH, V.; LEE, N. A. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. **Sens.**, v. 21, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.3390/s21041109>.
- [15] MOLLARASOULI, F.; KURBANOGU, S.; OZKAN, S. The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. **Biosensors**, v. 9, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.3390/bios9030086>.
- [16] LOPES, P. D. Interação Ag-Ac - Testes sorológicos primário e secundário. Jaboticabal, 2016. 54 slides, coloridos. Acompanha texto. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/aula8-interacao-ag-ac-testes-sorologicos-primarios-e-secundarios.pdf>>. Acesso em setembro, 2023.
- [17] KENNEDY, P. J.; OLIVEIRA C.; GRANJA, P. L.; SARMENTO, B. Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 38, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1357002>.
- [18] CHEN, H.; ZHANG, J.; HUANG, R.; WANG, D.; *et al.* The Applications of Electrochemical Immunosensors in the Detection of Disease Biomarkers: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 8, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28083605>.
- [19] POLICE-PATIL, A.V.; CHUANG, Y.-S.; LI, C.; WU, C.-C. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors with Nanomaterial Assistance for Signal Amplification. **Biosensors**, v. 13, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13010125>.
- [20] BENJAMIN S.R.; SANTOS, L. K. B.; SILVA, J.E.G.; MENDONÇA, P. D.; *et al.* Electrochemical Immunosensors and Biomimetic Sensors for the Detection of the Myocardial Infarction Biomarkers. **Significances Bioeng. Biosci.**, v. 5, n. 5, 2023. <https://doi.org/10.31031/SBB.2023.05.000623>.
- [21] KIM, J.; PARK, M.; Recent Progress in Electrochemical Immunosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11100360>.
- [22] KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Chapter 1 - Introduction to Biosensors. In: KARUNAKARAN, C.; BHARGAVA, K., *et al.* (Ed.) **Biosens. Bioelectron.**, Elsevier, 2015. p.1-68. ISBN 978-0-12-803100-1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>.

- [23] HOUSSIN, T.; SENEZ, V. Chapter Six - Electrochemical Detection. In: BRIDLE, H. (Ed.). *Waterborne Pathogens*. Amsterdam: Academic Press, 2014. p.147-188. ISBN 978-0-444-59543-0. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59543-0.00006-2>
- [24] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e CROUCH, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6^a Ed., Cidade: Belmont, Califórnia, EUA. Editora: Thomson Brooks/Cole, p. 1039-1041. ISBN: 495012017, 2007.
- [25] LEVA-BUENO, J.; PEYMAN, S. A.; MILNER, P. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. **Med. Microbiol. and Immunol.**, v. 209, n. 8, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00668-0>.
- [26] VENTON, B. J.; DISCENZA, D. J. Chapter 3 - Voltammetry, Editor(s): Bhavik Patel, *Electrochemistry for Bioanalysis*, Elsevier, 2020, Pages 27-50, ISBN 9780128212035, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821203-5.00004-X>
- [27] PACHECO, W. F.; SEMAAN, F.S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITA, A.G.S.L.; AUCÉLIO, R.Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 4, 2013. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>
- [28] LU, D.; ZHU, D.Z.; GAN, H.; YAO, Z.; *et al.* Prospects and challenges of using electrochemical immunosensors as an alternative detection method for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology, **Sci. Total Environ.**, v. 777, n. 15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146239>
- [29] KOÇ, Y.; MORALI, U.; EROL, S.; AVCI, H. Investigation of electrochemical behavior of potassium ferricyanide/ferrocyanide redox probes on screen printed carbon electrode through cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **Turk. J. Chem.**, v. 45, n. 6, 2021. <https://doi.org/10.3906/kim-2105-55>
- [30] AKHOUNDIAN, M.; ALIZADEH, T. Enzyme-free colorimetric sensor based on molecularly imprinted polymer and ninhydrin for methamphetamine detection, **Spectrochim. Acta - A: Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 285, n. 15, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121866>.
- [31] CHU, L.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; KANG, X. A novel biosensor based on Blue-ray disc coating film for determination of total amino acid content in tea leaves, **RSC Adv.**, v. 4, n. 11, 2021. <https://doi.org/10.1039/d1ra07061d>
- [32] MCGOLDRICK, L.K.; HALÁMEK, J. Recent Advances in Noninvasive Biosensors for Forensics, Biometrics, and Cybersecurity. **Sensors (Basel)**, v. 20, n. 21, 2020. <https://doi.org/10.3390/s20215974>.
- [33] STEFFEN, V.; OTTEN, J.; ENGELMANN, S.; RADEK, A.; *et al.*, A Toolbox of Genetically Encoded FRET-Based Biosensors for Rapid L-Lysine Analysis. **Sensors**, v. 16, n. 19, 2016. <https://doi.org/10.3390/s16101604>
- [34] GUEDES, P.H.G.; BRUSSASCO J.G.; MOÇO, A.C.R.; MORAES, D.D.; *et al.*, Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*, **Talanta** v. 34, n. 5, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>

- [35] SEGATTO, M.S.; SOLER, F.S.; OLIVEIRA, C.A.P.; MADURRO, A.G.B.; *et al.* Novel electrochemical platform based on copolymer poly(aniline-4-aminophenol) for application in immunosensor for thyroid hormones. **J. Solid. State Electrochem.** v. 4, n. 2, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04672-5>
- [36] AMARAL, E. M. F.; ANDRADE, J. C.B.; FREITAS, L. B.; TEIXEIRA, G.T.L.; *et al.* Electrochemical Sensors and Biosensors: Their Basic Working Principles and Some Applications. **Rev. Virtual de Química.** v. 15, n. 16, 2022. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20220112>.
- [37] MANSURIYA, B. D.; ALTINTAS, Z. Enzyme-Free Electrochemical Nano-Immunosensor Based on Graphene Quantum Dots and Gold Nanoparticles for Cardiac Biomarker Determination. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11030578>
- [38] JING, L.; SHENWEI, Z.; LI, Z.; YU, Z.; *et al.* A Novel Graphene-Based Nanomaterial Modified Electrochemical Sensor for the Detection of Cardiac Troponin I, **Front. Chem.**, v. 9, n. 23, 2021. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.680593>
- [39] KARAMAN, O.; OZCAN, C.; KARAMAN, B.B.; YOLA, N.; *et al.* Electrochemical cardiac troponin I immunosensor based on nitrogen and boron-doped graphene quantum dots electrode platform and Ce-doped SnO₂/SnS₂ signal amplification, **Mater. Today Chem.**, v. 23, n.7, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100666>.
- [40] KUMAR, S.; GUPTA, B.; MALHOTRA, D. Ultrasensitive biosensing platform based on yttria doped zirconia-reduced graphene oxide nanocomposite for detection of salivary oral cancer biomarker, **Bioelectrochemistry**, v. 140, n. 23, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107799>.
- [41] NETO, A. H. C.; GUINEA, F.; PERES, N. M. R.; NOVOSELOV, K. S.; *et al.* The Electronic Properties of Graphene, **Rev. Mod. Phys.**, v. 81, n. 1, 2009. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.81.109>
- [42] GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nat. Mater.**, v. 6, n. 3, 2007. <https://doi.org/10.1038/nmat1849>
- [43] WORKU, A. K.; AYELE, D. W. Recent advances of graphene-based materials for emerging technologies, **Results Chem.**, v. 5, n. 19, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100971>
- [44] BROWNSON, D. A. C.; SMITH, G. C.; BANKS, C. E. Graphene oxide electrochemistry: the electrochemistry of graphene oxide modified electrodes reveals coverage dependent beneficial electrocatalysis. **R. Soc. Open Sci.**, v. 4, n. 11, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsos.171128>
- [45] SHAN, R.; KAUSAR, A.; MUHAMMAD, B.; SHAH, S.; Progression from graphene and graphene oxide to high performance polymer- based nanocomposite: A review. **Polym. Plast. Technol.Eng.** v. 54, n. 2, 2015. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.955202>

- [46] PATIL, S.; RAJKUBERAN, C.; SAGADEVAN, S. Recent biomedical advancements in graphene oxide and future perspectives, **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** v. 86, n. 6, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104737>
- [47] HOU, Y.; LV, S.; LIU, L.; LIU, X. High-quality preparation of graphene oxide via the Hummers' method: Understanding the roles of the intercalator, oxidant, and graphite particle size. **Ceram. Int.**, v. 46, n. 2, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.231>
- [48] LUNDIE, M.; SLJIVANCANIN, Z.; TOMIC, S. Electronic and optical properties of reduced graphene oxide. **J. Mater. Chem. C**, v. 3, n. 29, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5TC00437C>
- [49] ALIYEV, E.; FILIZ, V.; KHAN, M. M.; LEE, Y. J.; *et al.* Structural characterization of graphene oxide: Surface functional groups and fractionated oxidative debris. **Nanomaterials**, v. 9, n. 8, 2019. <https://doi.org/10.3390/nano9081180>
- [50] DIMIEV, A. M.; TOUR, J. M. Mechanism of graphene oxide formation. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, 2014. <https://doi.org/10.1021/nn500606a>
- [51] LIU, C.; WANG, K.; LOU, S.; TANG, Y.; *et al.* Direct Electrodeposition of Graphene Enabling the One-Step Synthesis of Graphene–Metal Nanocomposite Films. **Small**, v. 9, n. 12, 2011. <https://doi.org/10.1002/sml.201002340>
- [52] GAO, F.; QI, X.; CAI, X.; WANG, Q.; *et al.* Electrochemically reduced graphene modified carbon ionic liquid electrode for the sensitive sensing of rutin. **Thin Solid Films**, v. 520, n. 15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2012.03.002>
- [53] TOH, S. Y.; LOH, K. S.; KAMARUDIN, S. K.; DAUD, W. R. W. Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: Synthesis and characterization. **Chem. Eng. J.**, v. 251, n. 1, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.004>
- [54] SHEN, J.; CHEN, W.; YANG, Z.; LU, G.; *et al.* A Critical Review of Graphene Quantum Dots: Synthesis and Application in Biosensors. **Nano**, v. 16, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1142/S1793292021300012>
- [55] TIAN, P.; TANG, L.; TENG, K. S.; LAU, S. P. Graphene quantum dots from chemistry to applications. **Mater. Today Chem.**, v. 10, n. 22, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.09.007>
- [56] MORE, M. P.; LOHAR, P. H.; PATIL, A. G.; PATIL, P. O.; *et al.* Controlled synthesis of blue luminescent graphene quantum dots from carbonized citric acid: Assessment of methodology, stability, and fluorescence in an aqueous environment, **Mater. Chem. Phys.**, v. 220, n. 33, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.08.046>
- [57] DONG, Y.; SHAO, J.; CHEN, C.; LI, H.; *et al.* Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree

of citric acid. **Carbon**, v. 50, n. 12, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.06.002>.

[58] NAIK, J. P.; SUTRADHAR, P.; SAHA, M. Molecular scale rapid synthesis of graphene quantum dots (GQDs). **J. Nanostruct. Chem.** v. 7, n. 6, 2017. <https://doi.org/10.1007/s40097-017-0222-9>

[59] MCCREERY, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. **Chem. Rev.**, v. 108, n. 7, 2008. <https://doi.org/10.1021/cr068076m>

[60] SILVA, R. M.; da SILVA, A. D.; CAMARGO, J. R.; de CASTRO, B.S.; *et al.* Carbon Nanomaterials-Based Screen-Printed Electrodes for Sensing Applications. **Biosensors**, v. 13, n. 453, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13040453t>

[61] ABDEL-AZIZ, A. M.; HASSAN, H. H.; BADR, I. H. A. Activated Glassy Carbon Electrode as an Electrochemical Sensing Platform for the Determination of 4-Nitrophenol and Dopamine in Real Samples. **ACS Omega**, v.7, n. 38, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03427>

[62] CARVALHO, J. H. S.; GOGOLA, J. L.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; *et al.* Disposable and low-cost lab-made screen-printed electrodes for voltammetric determination of L-dopa, **Sens. Actuators Rep.** v. 3., n. 18, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100056>

[63] ARAÚJO, D. A.G.; CAMARGO, J. R.; PRADELA-FILHO, L. A.; LIMA, A.P.; MUNHOZ, R.A.A.; *et al.* A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid. **Microchem. J.**, v. 158, n. 34, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105297>

[64] SEGATTO, M. S. Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli (ácido 4- hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido: nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina. 2017. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017. <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.446>

[65] RODOVALHO, V. R.; Biossensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G: uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2016.443>

[66] LENGWILER, G. A history of screen printing: how an art evolved into an industry. **Ohio ST Media Group International**, 2013. ISBN 9780944094747. <https://doi.org/10.1017/alj.2015.11>

[67] BANKS, C. E.; FOSTER, C. W.; KADARA, R. O. Fundamentals of Screen-Printing Electrochemical Architectures. In: (Ed.). **Screen-Printing Electrochemical Architectures**: Springer International Publishing, 2016. cap. 2,

p.13-23. (Springer Briefs in Applied Sciences and Technology).
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-25193-6>

[68] PAULA, L. F. Desenvolvimento de tintas condutivas e sua aplicação em eletrodos impressos. 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17517>

[69] Disponível em <<https://www.augesilk.com.br/tiras-e-rodos/rodo-aluminio-poliuretano-polypress-dureza-70-c-100-cm>>. Acesso em setembro de 2023.

[70] Disponível em <<https://hgrinc.com/productDetail/Inspection/Used-Dek-Dek-248-cerd-Screen-Printer/06211340003/>>. Acesso em setembro de 2023.

[71] BANKS, C. E.; FOSTER, C. W.; KADARA, R. O. **Screen-Printing Electrochemical Architectures**. Springer International Publishing, 2016. ISBN 978-3-319-25193-6. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25193-6>

[72] KHAN, S.; DAHIYA, R.; LORENZELLI, L. Technologies for Printing Sensors and Electronics Large Flexible Substrates: A Review. **IEEE Sens. J.**, v. 15, n. 6, 2014. <https://doi.org/10.1109/jsen.2014.2375203>

[73] ANDREOTTI, I. A. A.; ORZARI, L. O.; CAMARGO, J. R.; FARIA, R. C.; *et al.* Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. **J. Electroanal. Chem.**, v. 840, n. 85, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.059>

[74] SHAMKHALICHENAR, H.; BUECHE, C. J.; CHOI, J. W. Printed Circuit Board (PCB) Technology for Electrochemical Sensors and Sensing Platforms. **Biosensors**, v. 10, n. 11, 2020. <https://doi.org/10.3390/bios10110159>

[75] ZUPACIC, U.; RAINBOW, J.; ESTRELA, P.; MOSCHOU, D. Utilising Commercially Fabricated Printed Circuit Boards as an Electrochemical Biosensing Platform. **Micromachines**, v. 12, n. 793, 2021. <https://doi.org/10.3390/mi1207079>

[76] FLAUZINO, J.M.R.; NGUYEN, E.P.; YANG, Q.; ROSATI, G.; *et al.* Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection, **Biosens. Bioelectron.**, v. 195, n.56, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113628>.

[77] FREITAS, R.C.; FONSECA, W.T.; AZZI, D.C.; RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; *et al.* Flexible electrochemical sensor printed with conductive ink made with craft glue and graphite to detect drug and neurotransmitter, **Microchem. J.**, v. 191, n. 78, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108823>.

[78] SILVA, L.R.G.; STEFANO, J.S.; CRAPNELL, R.D.; BANKS, C.E.; *et al.* Additive manufacturing of carbon black immunosensors based on covalent immobilization for portable electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike S1 protein, **Talanta Open**, v.8, n. 7, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2023.100250>.

- [79] EVANS, D.; PAPADIMITRIOU, K.I.; VASILAKIS, N.; PANTEDELIDIS, P.; *et al.* A Novel Microfluidic Point-of-Care Biosensor System on Printed Circuit Board for Cytokine Detection. **Sensors**, v. 18, n. 40, 2018. <https://doi.org/doi:10.3390/s18114011>
- [80] TALEBI, S.; DARAGHMA, S.M.A.; SUBRAMANIAM, R. T.; BAHSSU, S.; *et al.* Printed-Circuit-Board-Based Two-Electrode System for Electronic Characterization of Proteins. **ACS Omega**, v. 5, n. 8, 2020. <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03831>
- [81] MIRZAJANI, H.; CHENG, C.; VAFAIE, R.H.; WU, J.; *et al.* A customizable cost-effective design for printed circuit board-based nanolayered gold screen-printed electrode: From fabrication to bioapplications. **Front. Bioeng. Biotechnol.** v. 10, n. 32, 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1036224>.
- [82] MIRZAJANI, H.; CHENG, C.; VAFAIE, R.H.; WU, J.; *et al.* Optimization of ACEK-enhanced, PCB-based biosensor for highly sensitive and rapid detection of bisphenol a in low resource settings. **Biosens. Bioelectron.** v. 196, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113745>.
- [83] FAKHR, M.H.; BESHCHASNA, N.; BALAKIN, S.; CARRASCO, I. L.; *et al.* Cleaning of LTCC, PEN, and PCB Au electrodes towards reliable electrochemical measurements. **Sci Rep.**, v. 12, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23395-3>.
- [84] NANDESHWAR, R.; TALLUR, S. Electrochemical detection of myeloperoxidase (MPO) in blood plasma with surface-modified electroless nickel immersion gold (ENIG) printed circuit board (PCB) electrodes. **Biosens. Bioelectron.** v. 246, n. 45, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115891>.

Capítulo 2 - Reduced Graphene Oxide and Graphene Quantum Dots nanomaterial: Application in an electrochemical immunosensor for cardiac troponin I detection

O capítulo 2 está de acordo com as normas da revista Analytical Biochemistry.

(<https://www.sciencedirect.com/journal/analytical-biochemistry>)

**Reduced Graphene Oxide and Graphene Quantum Dots nanomaterial:
Application in an electrochemical immunosensor for cardiac troponin I
detection.**

Jéssica G. Brussasco^a, Pedro H. G. Guedes^a, Dayane D. Moraes^a, José M. R. Flauzino^b, Luiz F. G. Luz^a, Anna C. R. Moço^a, Guilherme L. Fernandes^c, Ana G. Brito-Madurro^a, João M. Madurro^{a,d*}

^a Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

^b Department of Bioengineering, Royal School of Mines, Imperial College London, London, UK.

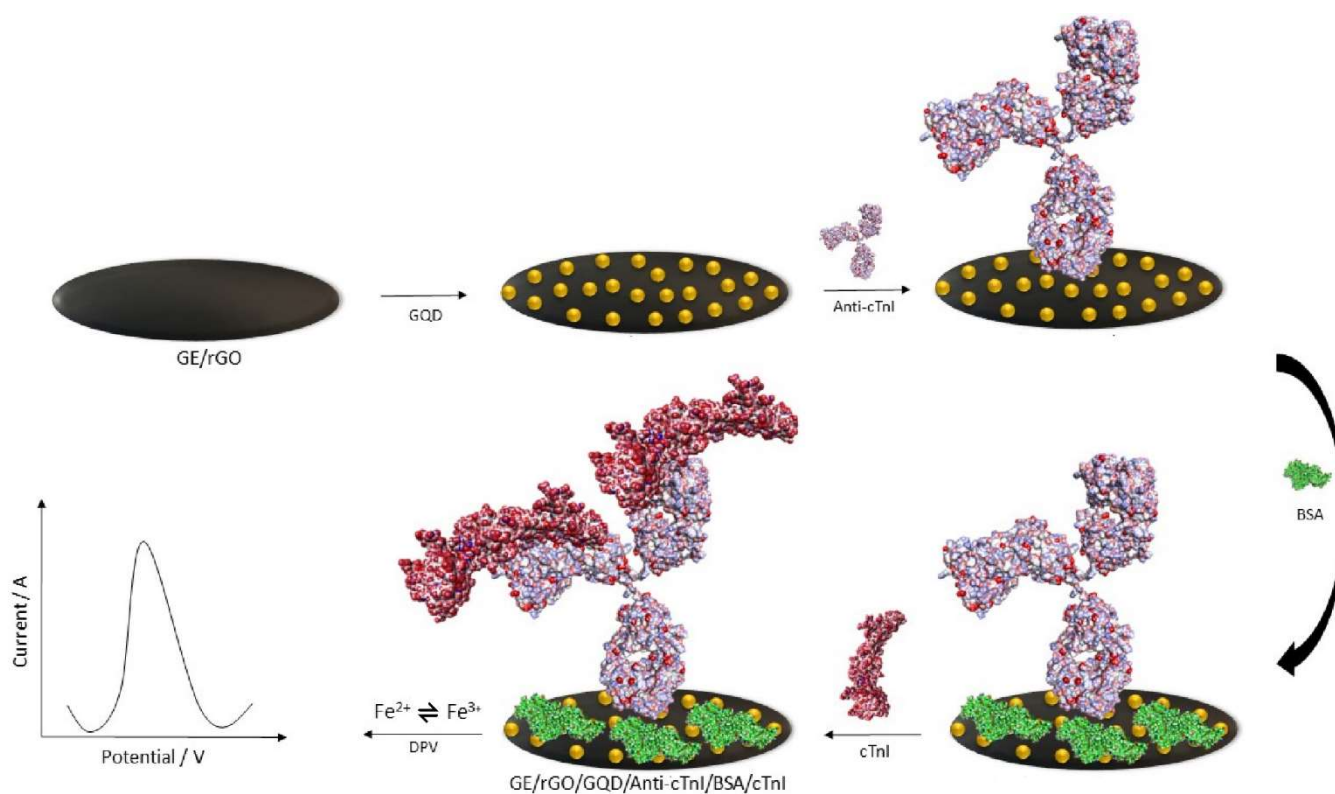
^c Institute of Physics, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

^d Institute of Chemistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

Correspondence author: João M. Madurro

E-mail: jmadurro@ufu.br

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- An electrochemical immunosensor was developed for the detection of cardiac troponin I.
- The platform was constructed using a graphene-based nanomaterial association.
- Reduced graphene oxide and graphene quantum dots were combined to anchor anti-cTnI.
- The device demonstrated wide detection range, long-term storage, and selectivity.
- The immunosensor was able to differentiate health from sick patients and regeneration.

ABSTRACT

Cardiac troponin I (cTnI) is the gold standard biomarker for the early diagnosis of acute myocardial infarction, one of the leading causes of death worldwide. Thus, the development of fast, accurate, and simple methodologies for the quantification of cTnI is a global need. This work describes the construction of a new electrochemical immunosensor for cTnI detection using graphite electrodes modified with a graphene-based material combination, consisting of reduced graphene oxide and graphene quantum dots. This association is intended to increase the surface area of the electrode and provide more active sites for antibody immobilization. Analytical assays by differential pulse voltammetry showed a wide range of detection (from 1 pg/mL to 4 ng/mL), selectivity against different analytes, stability for 80 days of storage and regeneration capacity, being a promising and easy to produce platform for cTnI detection.

Keywords: *nanomaterial, electrochemical immunosensor, graphene quantum dots, reduced graphene oxide, cardiac troponin I.*

RESUMO

A troponina I cardíaca (TnIc) é considerada o biomarcador padrão ouro para o diagnóstico precoce do infarto agudo do miocárdio, uma das principais causas de morte no mundo. Assim, o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas e simples para a quantificação de TnIc é uma necessidade global. Este trabalho descreve a construção de um novo imunossensor eletroquímico para detecção de TnIc utilizando eletrodos de grafite modificados com uma combinação de materiais à base de grafeno, consistindo em óxido de grafeno reduzido e pontos quânticos de grafeno. Esta associação tem como objetivo aumentar a área superficial do eletrodo e fornecer mais sítios ativos para imobilização de anticorpos. Ensaios analíticos por voltametria de pulso diferencial mostraram ampla faixa de detecção (de 1 pg/mL a 4 ng/mL), seletividade contra diferentes analitos, estabilidade por 80 dias de armazenamento e capacidade de regeneração, sendo uma plataforma promissora e de fácil produção para detecção de TnIc.

Palavras-chave: *nanomaterial imunossensor eletroquímico, pontos quânticos de grafeno, óxido de grafeno reduzido, troponina I cardíaca.*

1 INTRODUCTION

In the last 20 years, heart failure has claimed the lives of 16% of the world's population, especially acute myocardial infarction (AMI), which rapid and accurate diagnosis is a determining factor for patient survival [1,2]. Cardiac troponin I (cTnI) is considered the gold standard cardiac biomarker for AMI diagnosis, owing to its specificity and longtime of alteration in the bloodstream [3,4].

Normally, cTnI detection is performed by immunoenzymatic assays; however, these tests take a long time to execute the analysis, require skilled labor and a specialized laboratory apparatus. In that regard, electrochemical immunosensors are great options for cTnI detection because they are easy to operate, present fast response time, selectivity, sensibility and are point-of-care suitable [5,6].

For the propose of producing even more sensitive platforms, improve their electronic behavior and provide functional groups for anchoring biomolecules, the application of graphene-based nanomaterials in electrochemical immunosensors for cTnI detection is widely used [7-11].

Reduced graphene oxide (rGO) is a great electronic conductor, due to the presence of delocalized π electrons; being an easy and material to produce, making it ideal for electrode modification [12-14]. However, during the reduction process, some structural defects can occur, affecting their electronic properties in some way, in addition to the decrease in oxygenated functional groups used for immobilization of biomolecules [15-18]. In that regard, its association with graphene quantum dots (GQD) can solve this problem.

GQD are zero-dimensional carbon nanomaterials which exhibit interesting properties such as: quantum confinement, high surface area, several surface groups and low toxicity, allowing their use in biological applications [19]. There are two major routes used in the synthesis of GQD: top-down and bottom-up methodologies [20,21]. The bottom-up methodology is summarily based on the fusion of organic precursors, such as weak acids to produce GQD, showing excellent control of the conditions of the synthesized material [22,23]. In this sense, the synthesis of GQD from the pyrolysis of citric acid comes out ahead, since it is a simplified methodology which does not require a sophisticated experimental apparatus, being based on a cheap reagent, easily found in laboratories, resulting in a material full of oxygenated functional groups, especially carboxylic groups [24,25].

In the production of immunosensors, the immobilization of the antibody on the electrode surface is a preponderant factor [26]. Physical adsorption (or physisorption) is an inexpensive and fast technique for immobilizing biomolecules, such antibodies, onto electrodes surfaces and it occurs primarily through ionic interactions, hydrogen bonds and Van der Waals forces [27, 28].

Rocha and collaborators demonstrated the effective immobilization by physical adsorption of Anti-*Staphylococcal Enterotoxin A* antibodies on the surface of glassy carbon electrodes modified with rGO, making it possible detect staphylococcal enterotoxin A in milk samples, resulting in a detection limit of which detection limit is 0.102 $\mu\text{g/mL}$ [29] and Discha and collaborators used graphene quantum dots to immobilize progesterone antibodies on glassy carbon electrodes, resulting in the production of a device sensitive to small concentrations of progesterone [30].

The association of rGO and GQD to form a graphene-based nanomaterial is an interesting feature. Together, such nanomaterials can provide a large increase in surface area, in addition to supply more active sites for the immobilization of biomolecules, and the similar conjugated structures of these species can easily interact through strong π – π interactions [31,32].

In this sense, this paper reports a sensitive electrochemical immunosensor for cTnI detection, based on the association of graphene-based nanomaterials, rGO and GQD. This device presented accuracy, selectivity, sensitivity, possibility of regeneration and storage capacity. To the best of our knowledge, no previous paper is available reporting the synthesis, characterization, and application of the rGO/GQD nanomaterial for cTnI detection.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Cardiac troponin I monoclonal antibody (anti-cTnI), cardiac troponin I (cTnI), cardiac troponin T (cTnT) and Bovine Serum Albumin (BSA) were purchased from Sigma Aldrich. Potassium ferricyanide and potassium ferrocyanide were purchased from Vetec, potassium chloride and sodium dodecyl sulphate were purchased from Reagen and Neon (Brazil), respectively. Citric acid, sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate and monosodium hydrogen phosphate were purchased from Merck. All reagents presented analytical grade and were used as received, without further purification. For all aqueous solutions, ultrapure water (18.2 M Ω cm) was used and deoxygenated by bubbling ultrapure nitrogen for 20 minutes before each electrochemical measure. Human serum samples from sick (infarcted patients) and healthy (non-infarcted patients) were obtained from Sabin Medicina Diagnóstica Laboratory (Uberlandia, Brazil) and kept frozen until the moment of analysis.

2.2 Apparatus

Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were performed using an electrochemical system CHI 760C (CH Instruments, USA) in a three-electrode cell: graphite disk electrode (Alfa Aesar, 99% purity, 6 mm diameter) as working electrode, platinum wire as counter electrode, and Ag/AgCl/Cl⁻ (3 mol L⁻¹ KCl) as reference electrode. The graphite electrodes were assembled according to Castro [33].

Surface morphology of nanomaterials was characterized by scanning electron microscope (SEM) using model Vega3 LMU (TESCAN, Czech Republic), operated at 5.00 kV, and scanning probe microscopy (SPM) model 5100 (Hitachi, Japan) and model SPM9600 (Shimadzu, Japan), performed in dynamic force microscopy (DFM) mode. The DFM images were processed, and the root mean square coefficient (Rq) was calculated with the Gwyddion software. Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum was recorded using a spectrophotometer FT-IR Frontier Single Range – MIR (Perkin Elmer, USA), in solid state with attenuated total reflectance accessory. The absorption spectra were obtained using a UV–Vis spectrophotometer (Shimadzu 1800). The height profile and size of the GQD were obtained by SPM9600, analyzing a mica surface, where 20 μ L of the GQD dispersion in a dilution (1:500) in ethanol was deposited at room temperature and pressure and dried for 4 hours.

2.3 Graphene nanomaterial production (rGO/GQD)

Graphite electrodes (GE) were mechanically polished with sandpaper and aqueous suspension of alumina (0.3 μm), washed with deionized water, dried, and preconditioned in HClO_4 solution (0.50 mol L^{-1}) by CV from 0.3 to + 1.1 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$), for 4 cycles at 50 mV.s^{-1} . Graphene oxide (GO) was produced and electrochemically reduced on the GE surface, according to Flauzino [34], producing reduced graphene oxide (rGO). Graphene quantum dots dispersion was prepared as described for Dong [35], then sonicated for 2 hours, this dispersion was characterized by FTIR and UV-Vis. The dispersion of graphene quantum dots (20 μL) was added onto the surface of modified graphite electrode with reduced graphene oxide (GE/rGO) and dried for 30 minutes at 55°C, producing the electrode modified with the graphene nanomaterial (rGO/GQD).

2.4 Immunosensor construction

After modification with the graphene nanomaterial (rGO/GQD), the surface of the electrodes was rinsed with distilled water, dried with nitrogen gas flow and the biomolecules were immobilized.

For all the following steps, the same incubation time (30 minutes), storage form (airtight container), and three times pipetting washing (150 μL of phosphate buffer 0.10 mol L^{-1} , pH 7.4) were utilized. The anti-troponin I antibody (Anti- cTnI) was diluted in phosphate buffer (0.10 mol L^{-1} , pH 7.4) to concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 10 μL of this solution were added onto the graphite electrode modified with rGO/GQD, followed by incubation, and washing. Succeeding, 30 μL of a blocking solution with bovine serum albumin (BSA, 0.1 mmol L^{-1} , also solubilized in phosphate buffer, 0.10 mol L^{-1} , pH 7.4) were incorporated, incubated, and washed.

2.5 cTnI detection in human serum samples

Six different cTnI concentrations were added to serum samples of a healthy human samples (1.10⁻³ ng mL^{-1} , 1.10⁻² ng mL^{-1} , 1.10⁻¹ ng mL^{-1} , 0.41 ng mL^{-1} , 2 ng mL^{-1} and 4 ng mL^{-1}) and 10 μL of each was used to build the calibration curve. Sick (infarcted) and healthy (non-infarcted) human serum samples were analyzed for cTnI concentration.

2.6 Electrochemical measurements and data presentation

Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry were conducted using $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol L^{-1}) in KCl solution (0.1 mol L^{-1}). The experiments were performed in triplicate and numeric results are presented as arithmetic mean $\pm$ standard deviation.

2.7 Selectivity, regeneration, and shelf-life test

The selectivity of the immunosensor was studied using serum of healthy patients enriched with cardiac Troponin T (cTnT, 4 ng mL^{-1}). The regeneration protocol was conducted according to Dutra [36]: 30 μL of sodium dodecyl sulfate solution (SDS, 1%) were applied onto the electrode surface for 2 minutes then washed with phosphate buffer. Shelf-life test was conducted maintaining the immunosensor sealed and packed in a humid chamber, at 4° C under nitrogen atmosphere for 80 days, with measurements taken every 20 days, likewise Guedes [37].

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Characterization of GQD dispersion

Characterization of the GQD dispersion by UV–Vis absorption, FTIR spectrum, DFM and SEM images are presented in Figure 1.

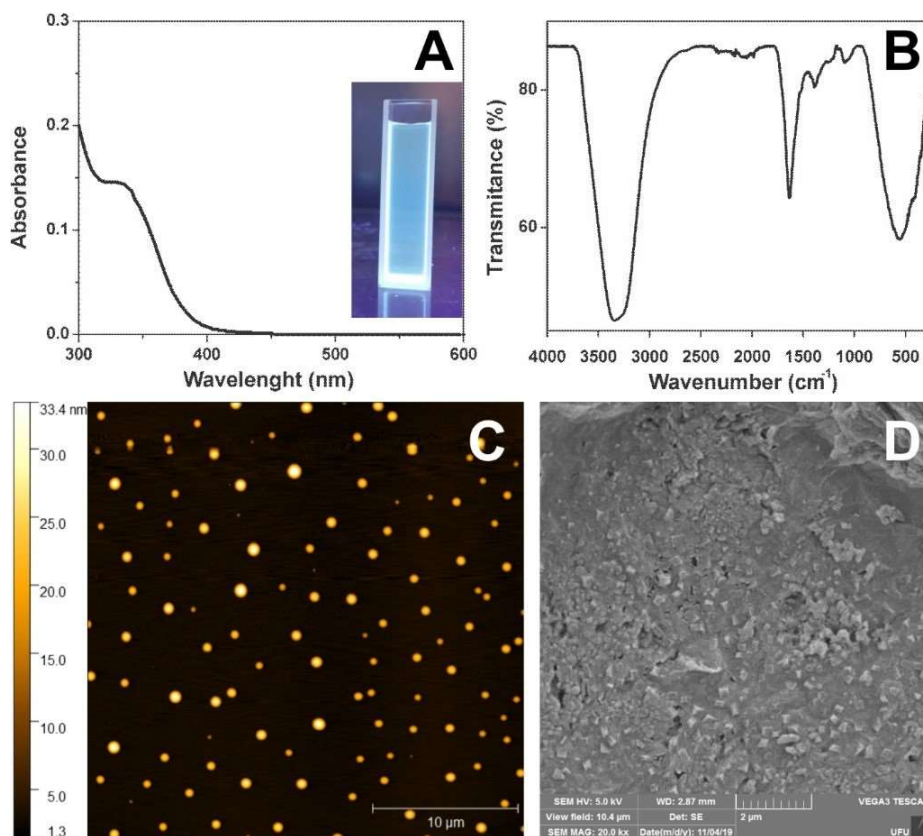


Figure 1. (A) UV–vis absorption spectrum of GQD, insert the GQD suspension under UV light. (B) FTIR spectrum of GQD. (C) AFM topography image of GQD drop-casted onto the mica substrate. (D) SEM image of GQD.

In Figure 1A, a wide absorption around 340 nm is observed, assigned to the absorption of energy of the electronic π - π^* transition due to aromatic sp^2 domains [38], upon UV irradiation at 365 nm, the GQD dispersion presented a blue luminescent (Figure 1A, insert). The FTIR spectrum of GQD dispersion (Fig. 1B) presents exhibit absorption of hydroxyl (3334 and 942 cm^{-1}), carboxyl (1633 and 1390 cm^{-1}), alkoxy (1170 cm^{-1}), aromatic $C=C$ (1460 cm^{-1}), harmonic bands (2000 - 1600 cm^{-1}) and CH_2 rocking vibration (560 cm^{-1}) [39].

Presence of spherical nano quantum dots with slightly different diameters was revealed by the GQD dispersion on mica substrate (Fig. 1C). The height distribution in the DFM image is unaffected by convolution effects [40, 41] therefore, this dispersion could be recognized by the height maximum variation statistics, whose GQD's average diameter is equivalent to $22.6 \pm 7.2\text{ nm}$, although smaller GQD could also be distinguished. SEM image (Fig. 1D) shows an almost globular material, with a certain degree of aggregation and different sizes, corroborating with the profile observed in Fig. 1C.

3.2 Morphological analysis and electrochemical characterization of rGO/GQD nanomaterial

A high surface area is a desired feature in the development of immunosensors, as it results in more sites for immobilization of antibodies and thus the development of a sensitive device [27]. The DFM technique can enlighten how the modification of the electrode surface can alter its morphology. Figure 2 presents DFM images of the bare graphite electrode (A), graphite electrode modified with rGO (B), graphite electrode modified only with GQD (C) and graphite electrode modified with both rGO/GQD (D).

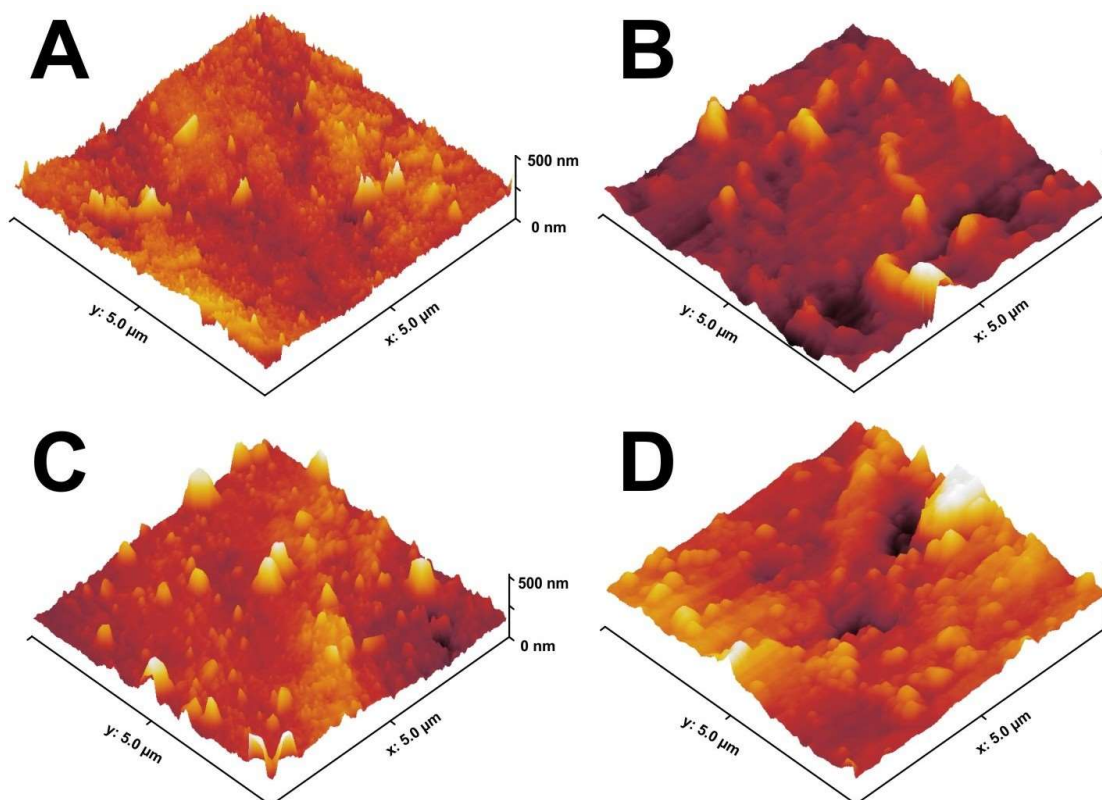


Figure 2. Bare graphite electrode (A), graphite electrode modified with rGO (B), graphite electrode modified only with GQD (C) and graphite electrode modified with both rGO/GQD (D).

It is possible to monitor the changes of the electrode surface at each step of the rGO/GQD nanomaterial obtention. After the rGO (Figure 2B, $R_q = 79.06 \pm 8.19$ nm) and GQD (Figure 2C, 96.60 ± 7.45 nm) modification onto the graphite electrode, both R_q values increase when compared to bare graphite electrode (Figure 2A, 67.78 ± 5.65 nm), as expected after an addition of a graphene-based nanomaterial [42], while the rGO/GQD proposed nanomaterial presents the higher R_q value observed (Figure 2D, 174.6 ± 12.96 nm). This increase of 2.2x in R_q values compared to the electrode modified with rGO alone and 1.8x compared to the GQD modification indicates the satisfactory association of these nanomaterials, resulting in the production of platform with elevated roughness, an interesting feature for successful immobilization of biomolecules [43].

Each assembly step of modification process to obtain the rGO/GQD nanomaterial was investigated by cyclic voltammetry assays, conducted in KCl solution containing an anionic probe ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$). Figure 3 shows the cyclic voltammograms recorded with the bare graphite electrodes (), —

graphite electrode modified with rGO (—), graphite electrodes modified with GQD (—), graphite electrode modified with the nanomaterial rGO/GQD (—) and with the Anti-cTnI immobilized onto the modified electrode with rGO/GQD (—).

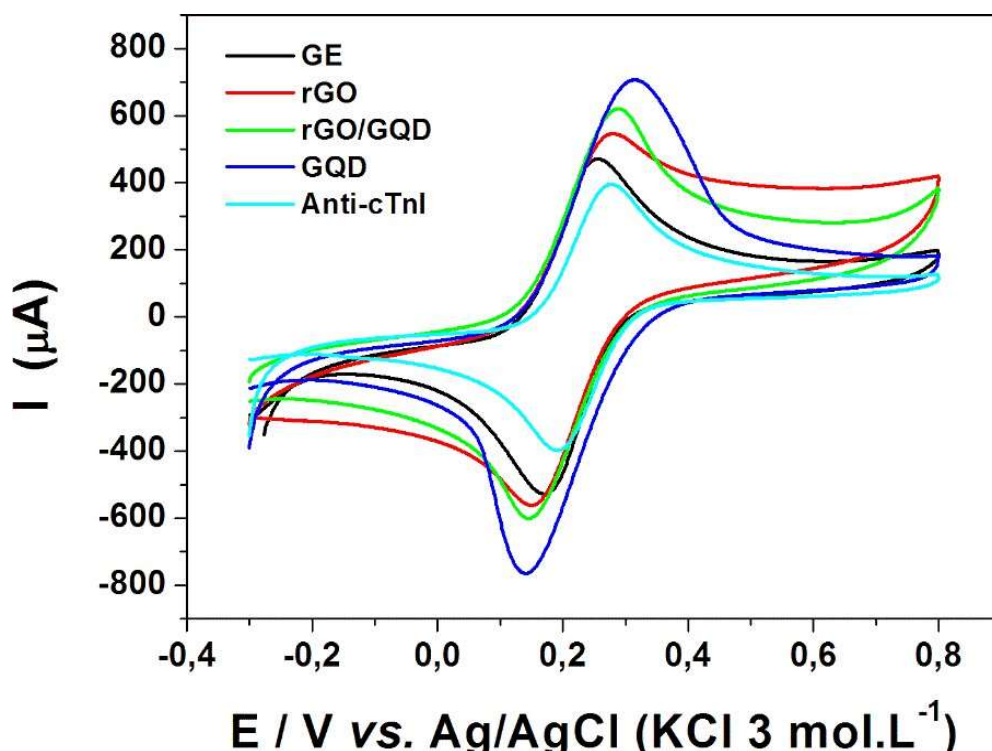


Figure 3. Cyclic voltammograms of graphite electrodes without modification (—), graphite electrodes modified with rGO alone (—), graphite electrodes modified with GQD (—), graphite electrodes modified with the nanomaterial rGO/GQD (—) and Anti-cTnI immobilized onto graphite electrodes modified with the nanomaterial (—) in KCl solution (0.10 mol.L^{-1}) containing $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5.0 mmol.L^{-1}), 50 mV.s^{-1}

The rGO incorporation onto the electrode surface (Fig. 3, —) increase both anodic ($I_{pa} = 519,5 \pm 11,5 \mu\text{A}$) and cathodic ($I_{pc} = 521,1 \pm 16 \mu\text{A}$) peak current values when compared to the bare electrode (Fig. 3, —, $I_{pa} = 479,5 \pm 10,5 \mu\text{A}$; $I_{pc} = 488,5 \pm 5 \mu\text{A}$). The electrode modified with GQD (Fig. 3, —) presented the highest average values of anodic and cathodic peak currents observed, $I_{pa} = 665,25 \pm 16 \mu\text{A}$; $I_{pc} = 698,5 \pm 27 \mu\text{A}$, in addition to also promote a great electron transfer rate, owing to their high electrical conductance and elevated surface to volume ratio [19].

The rGO/GQD (Fig. 3, —) nanomaterial exhibits a small drop in both peak current values ($I_{pa} = 583,5 \pm 22,5 \mu\text{A}$; $I_{pc} = 549,3 \pm 9,7 \mu\text{A}$) when compared with the electrode modified with only GQD, attributed to the large amount of oxygen-rich functional groups, mostly composed of carboxylates groups from GQD and several other oxygen species which can be not fully reduced and are present on the edges of rGO sheets and can hinder the oxidation of the anionic probe.

A smaller potential peak difference is observed in the electrode with rGO/GQD ($\Delta E_p = 0,13 \pm 0,02 \text{ V}$) in comparison to the electrode modified with GQD alone ($\Delta E_p = 0,17 \pm 0,02 \text{ V}$), due to an improvement in the electron transfer rate attributed to the presence of this nanomaterial and better conductivity of the electrode surface, due to the presence of delocalized π electrons. [12-14].

The incorporation of the antibody Anti-cTnI (Fig. 3, —) decreased both anodic and cathodic peak currents ($I_{pa} = 380,7 \pm 4,1 \mu A$; $I_{pc} = 388,3 \pm 4,6 \mu A$) due the poor conductivity of proteins and the increased steric hindrance preventing the ferro/ferricyanide ions from reaching the electrode surface.

The solution pH plays an important role in the antibody adsorption to the surface of the nanomaterial, as it can modify the net surface charge of the protein based on its isoelectric point (pI). The pI corresponds to the pH value where the molecule is electrically neutral, becoming positively charged when the solution pH is below the molecule's pI and negatively charged when the solution pH is above it [44].

Herein, the Anti-cTnI was diluted in phosphate buffer at pH 7.4, which confer a positive net charge as the antibody have theoretical isoelectric point of 9.87, so positively charged residues of the antibody can interact electrostatically with the functional groups of the graphene quantum dots [45]. Besides that, other non-covalent interactions such as π - π stacking, hydrogen bonding, Van der Waals forces and hydrophobic interactions play a role in the antibody adsorption onto the modified electrode surface [28, 46].

3.3 Morphological analysis of the biofunctionalization of the modified electrode

The rGO/GQD electrode surface was analyzed by SEM and DFM at each stage of their biofunctionalization: immobilization of the Anti-cTnI probe (Fig. 4A, Fig. 4E), blocking step with BSA (Fig. 4B, Fig. 4F), and after addition of serum samples from sick patient (Fig 4C, Fig. 4G) and healthy patients (Fig 4D, Fig. 4H).

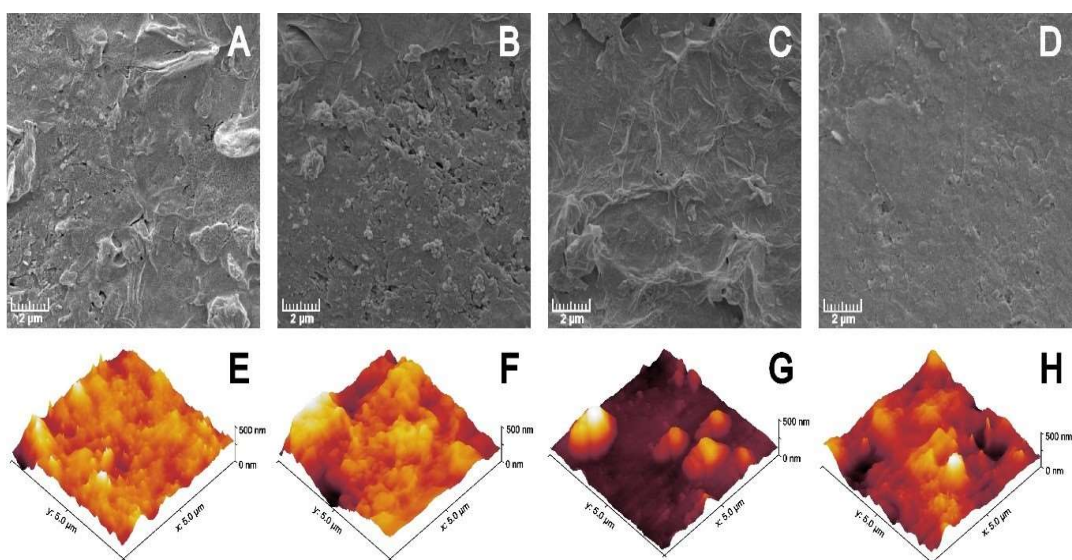


Figure 4. SEM and DFM images of rGO/GQD electrode with: Anti-cTnI (A, E); Anti-cTnI/BSA (B, F); Anti-cTnI/BSA/sick patient serum (C, G), Anti-cTnI/BSA/health patient serum (D, H). Magnification factor of SEM images: 15×10^3 times.

The SEM image of Anti-cTnI probe (Figure 4A) presents several clusters formations along the surface, whose DFM image shows numerous small peaks (Figure 4E, $R_q = 49.83 \pm 5.96$ nm). A comparison of the Figure 4E and Figure 2D allows us to observe the decrease of R_q values after the immobilization of the anti-cTnI probe on the surface of the electrode modified with the rGO/GQD nanomaterial ($R_q = 49.83 \pm 5.96$ nm and $R_q = 174.6 \pm 12.96$ nm, respectively).

This considerable decrease in R_q value is attributed to the immobilization of antibodies onto the surface, which cover the electrode surface valleys.

A slight increase in R_q values was observed after addition of BSA (Fig 4F, 82.47 ± 8.65 nm), attributed to the presence of the protein cover layer. The addition of a sick patient sample showed increase in surface roughness (Fig 4G, $R_q = 275.65 \pm 23.38$ nm) and the appearance of big protein aggregates onto the surface of the electrode when compared to the addition of healthy patient sample (Fig 4H $R_q = 87.15 \pm 7.38$ nm), attributed to the formation of the immunocomplex, in agreement with the images observed by SEM.

3.4 Figures of merit of the immunosensor

It is important to determine the figures of merit in the development of a biosensor, aiming evaluation of the analytical method and reliability of its results [47]. Some of them are shown in Figure 5.

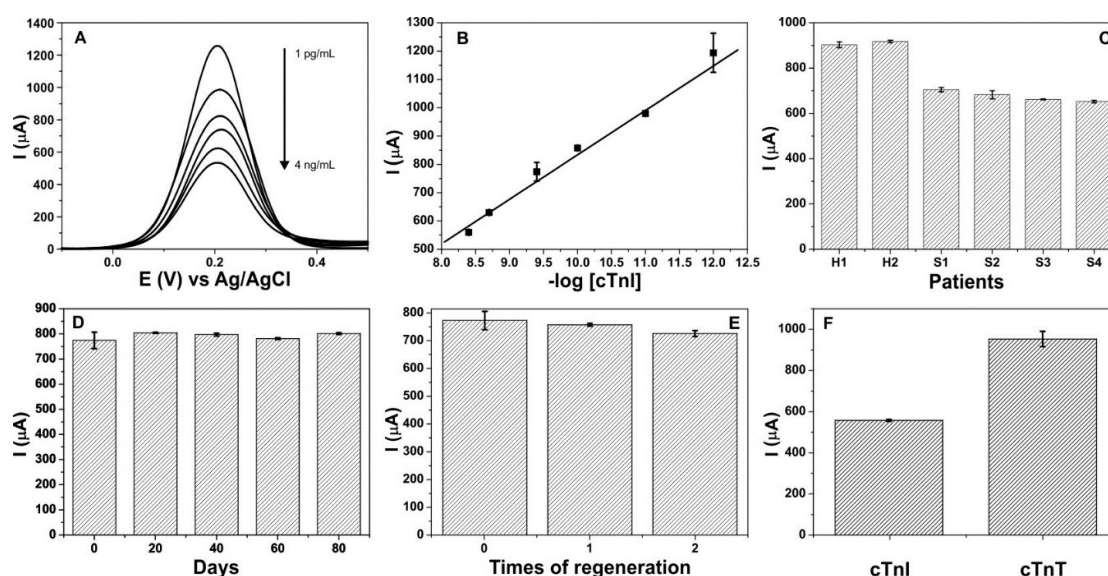


Figure 5. (A) Differential pulse voltammograms of the immunosensor for different cTnI concentrations. (B) Calibration curve of the immunosensor. (C) Histogram showing the current (I) for healthy (H1 - H2) and sick (S1 - S4) patients serum samples. (D) Days of stability. (E) Regeneration. (F) cTnI and cTnT response. Electrolyte: KCl solution (0.1 mol.L^{-1}) containing $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5 mmol.L^{-1}). Modulation amplitude: 50 mV.s^{-1} . Scan rate: 25 mV.s^{-1} .

In physiological situations, a small fraction of cardiac troponin I circulates in the bloodstream, called circulating cardiac troponin I [48]. In patients with typical symptoms of AMI, the concentration of this biomarker rises rapidly and takes time to stabilize. Thus, for calibration curve construction, samples of healthy patient serum were enriched with cTnI, in the working range of 1 pg.mL^{-1} to 4 ng mL^{-1} , encompassing from healthy patients ($<0.04 \text{ ng mL}^{-1}$) to sick patients ($>0.40 \text{ ng mL}^{-1}$) [49].

Figure 5A shows a decrease of the current values with the successive increases of cTnI concentration, probably due to steric hindrance caused by the size and high molecular weight of the antigen molecules, hindering the electronic transfer of the redox pair to the electrode. Figure 5B presents the calibration curve of the biosensor, where the current in the differential pulse voltammetry analysis correlates with the logarithm of the cTnI concentrations. The curve can be fitted

by a linear regression with equation $I (\mu A) = 157.1 \cdot \log [cTnI] - 736.5$ ($r = 0.997$), being 1 pg. mL^{-1} the lowest concentration detected, with sensitivity equal to $157 \mu A. \text{mL. ng}^{-1}$.

Figure 5C shows a differentiation of current values, with samples from healthy patients (H1-H2) showing lower current values when compared to samples from sick patients (S1-S4), indicating the formation of the immune complex. Figure 5D shows the shelf-life evaluation from the developed immunosensor. The electrodes maintained their current response in 80 days, with a variation of less than 10%, being a promising result since a device with a longer shelf life is indicated for possible future commercialization [50].

Regeneration of biosensors surface allowing their use for more than one analysis [51]. Figure 5E indicates that the regenerated electrodes maintained their current response for two analyzes.

It is known that cTnI is complexed with troponin cTnT [52], making its definition as an isolated analyte complex. However, the Figure 5F shows the selective capacity of the developed immunosensor, since in front of a sample enriched with cTnT, it was observed higher current value when compared to current generated by immunocomplex formation with cTnI, indicating differentiation in detection. Although both cTnI and cTnT are used in the diagnosis of AMI, there is greater specificity as of cTnI compared to cTnT, since the cardiac form of cTnI differs by 31 amino acids more from its skeletal form, while the cardiac form of cTnT has only 11 extra amino acids compared to skeletal shape [53].

There are several immunosensors based in graphene nanomaterials for detection of cardiac troponin I reported in the literature, some of them are listed in Table 1, but none of these works report reusable platforms or with 80-days stability, both extremely important parameters in relation to the use of immunosensors, since a reusable device allows cost savings, and a long shelf life predicts a possible commercialization.

Table 1. Analytical parameters of different electrochemical immunosensors described for Troponin I.

Platform	Detection technique	Stability	Regeneration	Ref.
Lignin-scribed graphene conjugated with nitrogen-doped GQD and lignin-derived silver nanoparticles	Electron Impedance Spectroscopy	42 days	N.A.	[54]
GQD-modified flexible ITO electrodes	CV	N.A.	N.A.	[55]
Gold nanoparticles/ chitosan functionalized graphene oxide composites	DPV	20 days	N.A.	[56]
N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol functionalized GQD	CV	N.A.	N.A.	[57]
rGO/GQD nanomaterial	DPV	80 days	2 times	This work

(N.A. not available)

4 Conclusions

The development of new cTnI detection methodologies is of great clinical importance for identification of infarcted patients. In this paper, it was demonstrated that the use of a graphene-based nanomaterial, composed of rGO and GQD was satisfactory, resulting in the production of a selective device for detecting cardiac troponin I in human serum, with wide work range, stability during the shelf life of 80 days and with the possibility of reuse for 2 times, characteristics that configure this immunosensor as a viable and robust option for cTnI detection.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), IPAC-SABIN for kindly providing the serum samples and Institute of Physics of Federal University of Uberlandia (INFIS/UFU) multiuser lab, supported by the grant “Pró-Equipamentos” from Brazilian Agency CAPES.

References

- [1] World Health Organization, The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death/>, 2020 (accessed 04 December 2023).
- [2] G. Sulo, J. Igland, S.E. Vollset, O. Nygard, M. Ebbing, E. Sulo, G.M. Egeland, G.S. Tell, Heart Failure Complicating Acute Myocardial Infarction; Burden and Timing of Occurrence: A Nation-wide Analysis Including 86 771 Patients From the Cardiovascular Disease in Norway (CVDNOR) Project. **J. Am. Heart Assoc.** 5 (2016) <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002667>.
- [3] E. Spain, S. Carrara, K. Adamson, H. Ma, R. O’Kennedy, L. De Cola, R. J. Forste, Cardiac Troponin I: Ultrasensitive Detection Using Faradaic Electrochemical Impedance, **ACS Omega.** 3 (2018) <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01758>.
- [4] S. I. Kaya, A. Cetinkaya, G. Ozcelikay, S. N. Samanci, S.A. Ozkan, Approaches and Challenges for Biosensors for Acute and Chronic Heart Failure. **Biosensors.** 13 (2023) <https://doi.org/10.3390/bios13020282>
- [5] D. Chauhan, Pooja, V. Nirbhaya, C.M. Srivastava, R. Chandra, S. Kumar, Nanostructured transition metal chalcogenide embedded on reduced graphene oxide based highly efficient biosensor for cardiovascular disease detection. **Microchem J.** 155 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104697>.
- [6] F. Mollarasouli, S. Kurbanoglu, S.A. Ozkan, The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis, **Biosensors.** 9 (2019) <https://doi.org/10.3390/bios9030086>.
- [7] B.D. Mansuriya, Z. Altintas, Enzyme-Free Electrochemical Nano-

Immunosensor Based on Graphene Quantum Dots and Gold Nanoparticles for Cardiac Biomarker Determination. **Nanomaterials.** 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/nano11030578>.

[8] L. Jing, Z. Shenwei, Z. Li, Z. Yu, Z. Hua, Z. Chuanxi, X. Xuexi, W. Mingjie, Z. Jinying, Y. Yiqiang, A Novel Graphene-Based Nanomaterial Modified Electrochemical Sensor for the Detection of Cardiac Troponin I, **Front. Chem.** 9 (2021) <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.680593>.

[9] O. Karaman, N. Özcan, C. Karaman, B.B. Yola, N. Atar, M.L. Yola, Electrochemical cardiac troponin I immunosensor based on nitrogen and boron-doped graphene quantum dots electrode platform and Ce-doped SnO₂/SnS₂ signal amplification, **Mater. Today Chem.** 23 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100666>.

[10] S. Kumar, N. Gupta, B. D. Malhotra, Ultrasensitive biosensing platform based on yttria doped zirconia-reduced graphene oxide nanocomposite for detection of salivary oral cancer biomarker, **Bioelectrochemistry.** 140 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.107799>.

[11] M.Liu, R. Jiang, M. Zheng, M.Li, Q. Yu, H. Zhu, H. Guo, H. Sun, A sensitive ratiometric biosensor for determination cardiac troponin I of myocardial infarction markers based on N, Zn-GQDs, **Talanta.** 249 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123577>.

[12] C. Chaudhary, S.Kumar, R. Chandra, Monophasic molybdenum selenide-reduced graphene oxide nanocomposite sheets based immunosensing platform for ultrasensitive serotonin detection, **Microchem. J.** 159 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105344>.

[13] S. Taniselass, M. K. M. Arshad, S.C.B. Gopinath, M.F.M. Fathil, C. Ibau, P. Anbu, Impedimetric cardiac biomarker determination in serum mediated by epoxy and hydroxyl of reduced graphene oxide on gold array microelectrodes. **Microchim. Acta.** 188 (2021) <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04922-x>.

[14] S. Chen, L. Xu, K. Sheng, Q. Zhou, B.Dong, X. Bai, G.Lu, H.Song, A label-free electrochemical immunosensor based on facet-controlled Au nanorods/reduced graphene oxide composites for prostate specific antigen detection, **Sens. Actuators B: Chem.** 336 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129748>.

[15] J. An, C. Wen, C. Chen, X. Qiu, Structural Defects of Graphene Oxidation Reduction and Its High-Efficiency Structural Reforming Technology, **Int. J. Photoenergy.** 7 (2021) <https://doi.org/10.1155/2021/8894830>.

[16] K. Erickson, R. Erin, Z. Lee, N. Alem, W. Gannett, A. Zettl, Determination of the local chemical structure of graphene oxide and reduced graphene oxide, **Adv. Mater.** 22 (2010) <https://doi.org/10.1002/adma.201000732>.

[17] C. Gomez Navarro, J.C. Meyer, R.S. Sundaram, A. Chuvilin, S. Kurasch, M.

Burghard, K. Kern, U. Kaiser, Atomic structure of reduced graphene oxide, **Nano Lett.** 10 (2010) <https://doi.org/10.1021/nl9031617>.

[18] N. M. S. Hidayah, W. Liu, C. Lai, N. Z. Noriman, C. S. Khe, U. Hashim, H. C. Lee, Comparison on graphite, graphene oxide and reduced graphene oxide: Synthesis and characterization, **AIP Conf. Proc.**, 1892 (2017) <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5005764>.

[19] S. Campuzano, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Carbon dots and graphene quantum dots in electrochemical biosensing, **Nanomaterials**. 9 (2019) <https://doi.org/10.3390/nano9040634>.

[20] S. Zhou, H. Xu, W. Gan, Q. Yuan, Graphene quantum dots: recent progress in preparation and fluorescence sensing applications, **RSC Adv.** 6 (2016) <https://doi.org/10.1039/c6ra24349e>.

[21] G.L. Hong, H.L. Zhao, H.H. Deng, H.J. Yang, H.P. Peng, Y.H. Liu, W. Chen, Fabrication of ultra-small monolayer graphene quantum dots by pyrolysis of trisodium citrate for fluorescent cell imaging, **Int J Nanomedicine**. 13 (2018) <https://doi.org/10.2147/IJN.S168570>.

[22] S. Iravani, R.S. Varma, Green synthesis, biomedical and biotechnological applications of carbon and graphene quantum dots. A review, **Environ Chem Lett.** 18 (2020) <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00984-0>.

[23] S. Kadian, S.K. Sethi, G. Manik, Recent advancements in synthesis and property control of graphene quantum dots for biomedical and optoelectronic applications, **Mater. Chem. Front.** 5 (2021) <https://doi.org/10.1039/d0qm00550a>.

[24] J.P. Naik, P. Sutradhar, M. Saha, Molecular scale rapid synthesis of graphene quantum dots (GQDs), **J Nanostructure Chem.** 7 (2017) <https://doi.org/10.1007/s40097-017-0222-9>.

[25] A.D. Chowdhury, A.B. Ganganboina, F. Nasrin, K. Takemura, R.A. Doong, D.I. S. Utomo, J. Lee, I.M. Khoris, E.Y. Park, Femtomolar Detection of Dengue Virus DNA with Serotype Identification Ability, **Anal. Chem.** 90 (2018) <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01802>.

[26] M.S. Segatto, F.S. Soler. C.A.P. Oliveira, A. G. Brito-Madurro, J. M. Madurro, Novel electrochemical platform based on copolymer poly(aniline-4-aminophenol) for application in immunosensor for thyroid hormones. **J Solid State Electrochem** 24 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04672-5>

[27] L.T. Tufa, S. Oh, V. T. Tran, J. Kim, K. J. Jeong, T. J. Park, H. J. Kim, J. Lee, Electrochemical immunosensor using nanotriplex of graphene quantum dots, Fe₃O₄, and Ag nanoparticles for tuberculosis, **Electrochim. Acta.** 290 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.09.108>.

- [28] A. Bhakta, E. Evans, T.E. Benavidez, C.D. Garcia, Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review, **Anal Chim Acta**. 872 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.031>.
- [29] G. S. Rocha, M. K. L. Silva, I. Cesarino, Reduced Graphene Oxide-Based Impedimetric Immunosensor for Detection of Enterotoxin A in Milk Samples, **Materials**. 13 (2020) <https://doi.org/10.3390/ma13071751>.
- [30], P. K. Disha, M. K. Nayak, P. Kumar, A bio-sensing platform based on graphene quantum dots for label free electrochemical detection of progesterone, **Mater. Today: Proc.**, 48 (2022) <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.230>.
- [31] Z.S. Qian, X. Y. Shan, L. J. Chai, J. R. Chen, H. Feng, A fluorescent nanosensor based on graphene quantum dots–aptamer probe and graphene oxide platform for detection of lead (II) ion, **Biosens. Bioelectron**. 68 (2015) <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.057>.
- [32] V. Serafín, A. Valverde, G. Martínez-García, E. Martínez-Periñán, F. Comba, M. Garranzo-Asensio, R. Barderas, P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Graphene quantum dots-functionalized multi-walled carbon nanotubes as nanocarriers in electrochemical immunosensing. Determination of IL-13 receptor $\alpha 2$ in colorectal cells and tumor tissues with different metastatic potential, **Sens. Actuators B: Chem.** 284 (2019) <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.01.012>.
- [33] A. C. H. Castro, E. G. França, L. F. de Paula, M. M.C.N. Soares, L. R. Goulart, J. M. Madurro, A. G. Brito-Madurro, Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus, **Appl. Surf Sci.** 314 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.084>.
- [34] J.M.R. Flauzino, E.L. Pimentel, L.M. Alves, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, A Novel and Reusable Electrochemical Genosensor for Detection of Beef Adulteration, **Electroanalysis**. 33 (2021) <https://doi.org/10.1002/elan.202060029>.
- [35] Y. Dong, J. Shao, C. Chen, H. Li, R. Wang, Y. Chi, X. Lin, G. Chen. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid, **Carbon**. 50 (2012) <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.06.002>.
- [36] R.F. Dutra, L.T. Kubota, An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip, **Clin. Chim. Acta**. 376 (2007) <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.07.029>.
- [37] P.H.G. Guedes, J.G. Brussasco, A.C.R. Moço, D.D. Moraes, J.M.R. Flauzino, L.F.G. Luz, M.T.G. Almeida, M.N. Soares, R.J. Oliveira, J.M. Madurro, A.G. Brito-Madurro, Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for Candida auris, **Talanta**. 235 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>.

- [38] S.K. Tuteja, R. Chen, M. Kukkar, C.K. Song, R. Mutreja, S. Singh, A.K. Paul, H. Lee, Kim KH, Deep A, Suri CR. A label-free electrochemical immunosensor for the detection of cardiac marker using graphene quantum dots (GQDs), **Biosens. Bioelectron.** 86 (2016) 86 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.052>.
- [39] M.P. More, H. P. Lohar, A. G. Patil, P.O. Patil, P.K. Deshmukh, Controlled synthesis of blue luminescent graphene quantum dots from carbonized citric acid: Assessment of methodology, stability, and fluorescence in an aqueous environment, **Mater. Chem. Phys.** 220 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.08.046>.
- [40] A.C.A. Silva, S. L. V. Deus, M. J. B. Silva, N. O. Dantas, Highly stable luminescence of CdSe magic-sized quantum dots in HeLa cells, **Sens. Actuators B: Chem.** 191 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.063>.
- [41] Q. K. Ong, I. Sokolov, Attachment of nanoparticles to the AFM tips for direct measurements of interaction between a single nanoparticle and surfaces, **J. Colloid Interface Sci.** 310 (2007) <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.02.010>.
- [42] Y. Li, Y. Jiang, T. Mo, H. Zhou, Y. Li, S. Li, Highly selective dopamine sensor based on graphene quantum dots self- assembled monolayers modified electrode, **J. Electroanal. Chem.**, 767 (2016) <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.02.016>.
- [43] P. Sankar, J. Mitra, Protein Adsorption on Biomaterial Surfaces: Conformational and Biological Consequences – A Review, **Surface Sci. Technol.**, 36 (2020) <https://doi.org/10.18311/jsst/2020/23282>.
- [44] S. C. Moldoveanu, V. David, Chapter 5 - Properties of Analytes and Matrices Determining HPLC Selection, in S.C. Moldoveanu, V. David (Eds.), Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis, **Elsevier**, 2017, pp. 189-230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00005-6>.
- [45] J. Luo, S. Li, M. Xu, M. Guan, M. Yang, J. Ren, Y. Zhang, Y. Zeng; Real-time detection of cardiac troponin I and mechanism analysis of AlGaAs/GaAs high electron mobility transistor biosensor. **AIP Adv.** 10 (2020) <https://doi.org/10.1063/5.0027553>.
- [46] S. Shahriari, M. Sastry, S. Panjikar, R. K. S. Raman, Graphene and Graphene Oxide as a Support for Biomolecules in the Development of Biosensors, **Nanotechnol. Sci. Appl.** 14 (2021) <https://doi.org/10.2147/NSA.S334487>.
- [47] C.I.L. Justino, T.A. Rocha-Santos, A.C. Duarte, Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications, **TrAC - Trends Anal. Chem.** 29 (2010) <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.07.008>.
- [48] M. R Moksnes, H.Rosjo, A. Richmond, M. N. Lyngbakken, S. E. Graham, A.F. Hansen, B. N. Wolford, S.A. G. Taliun, Genome-wide association study of cardiac troponin I in the general population, **Hum. Mol. Genet.** 30 (2021)

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddab124>.

[49] M. Vasudevan, M.J.Y. Tai, V. Perumal, S.C.B. Gopinath, S.S. Murthe, M. Ovinis, N.M. Mohamed, N. Joshi, Cellulose acetate-MoS₂ nanopetal hybrid: A highly sensitive and selective electrochemical aptasensor of Troponin I for the early diagnosis of Acute Myocardial Infarction, **J Taiwan Inst. Chem. Eng.** 118 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2021.01.016>.

[50] J.A. Goode, J.V.H. Rushworth, P.A. Millner, Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes, **Langmuir** 31 (2015) <https://doi.org/10.1021/la503533g>.

[51] I.A. Katrukha, Human cardiac troponin complex. structure and functions, **Biochem.** 78 (2013) <https://doi.org/10.1134/S0006297913130063>.

[52] H. Zhao, X. Du, H. Dong, D. Jin, F. Tang, Q. Liu, P. Wang, L. Chen, P. Zhao, Y. Li, Electrochemical immunosensor based on Au/Co-BDC/MoS₂ and DPCN/MoS₂ for the detection of cardiac troponin I, **Biosens. Bioelectron.** 175 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112883>.

[53] M.B. Nienhuis, J.P. Ottervanger, H.J.G. Bilo, B.D. Dikkeschei, F. Zijlstra, Prognostic value of troponin after elective percutaneous coronary intervention: A meta-analysis, **Catheter. Cardiovasc. Interv.** 71 (2008) <https://doi.org/10.1002/ccd.21345>.

[54] M. Vasudevan, S. Remesh, V. Perumal, P. B. Raja, M. Nasir, M. Ibrahim, S.C.B. Gopinath, H.-L.Lee, S. Karuppanan, M. Ovinis, N. Arumugam, R. S. Kumar, Lignin derived nanoparticle intercalation on nitrogen-doped graphene quantum dots for electrochemical sensing of cardiac biomarker, **Microchem. J.**, 195 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109405>

[55] S. K. Arumugasamy, G. Chellasamy, K. Yun, J. Hyun, Bio-quantum dots for electrochemical sensing of cardiac biomarkers of acute myocardial infarction, **J. Ind. Eng. Chem.**, 129 (2023) <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2023.09.008>.

[56] B. Sun, L. Kan, Y. Liu, Y. Sun, J. Liu, Y. Wu, H. Li, S. Yu, L. Bao, C. Gao, An Electrochemical Immunosensor Based on GO@CS for Highly Sensitive and Accurate Detection of Cardiovascular Markers-cTn- I, **J. Electrochem. Soc.** 170 (2023) <https://doi.org/10.1149/1945-7111/ad066a>.

[57] M. Guo, J. Shu, D. Du, M. A. Haghighatbin, D.Y. Z. Bian, H. Cui. A label-free three potential ratiometric electrochemiluminescence immunosensor for cardiac troponin I based on N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol functionalized graphene quantum dots, **Sens. Actuators: B. Chem.** 334 (2021) <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129628>.

Capítulo 3 - Carbon Printed Circuit Board electrode for cardiac troponin T detection utilizing ninhydrin as immunocomplexation indicator.

O capítulo 3 está de acordo com as normas da revista Microchemical Journal.

(<https://www.sciencedirect.com/journal/microchemical-journal>)

Carbon Printed Circuit Board electrode for cardiac troponin T detection utilizing ninhydrin as immunocomplexation indicator.

Jéssica G. Brussasco^a, Pedro H. G. Guedes^a, Luiz F. G. Luz^a, Dayane D. Moraes^a, Vítor Fonseca Barbosa^b, José M. R. Flauzino^c, Atair C. Silva^d, Ana G. Brito-Madurro^a, João M. Madurro^{a,e*}

^a Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

^b Faculty of Electrical Engineering, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

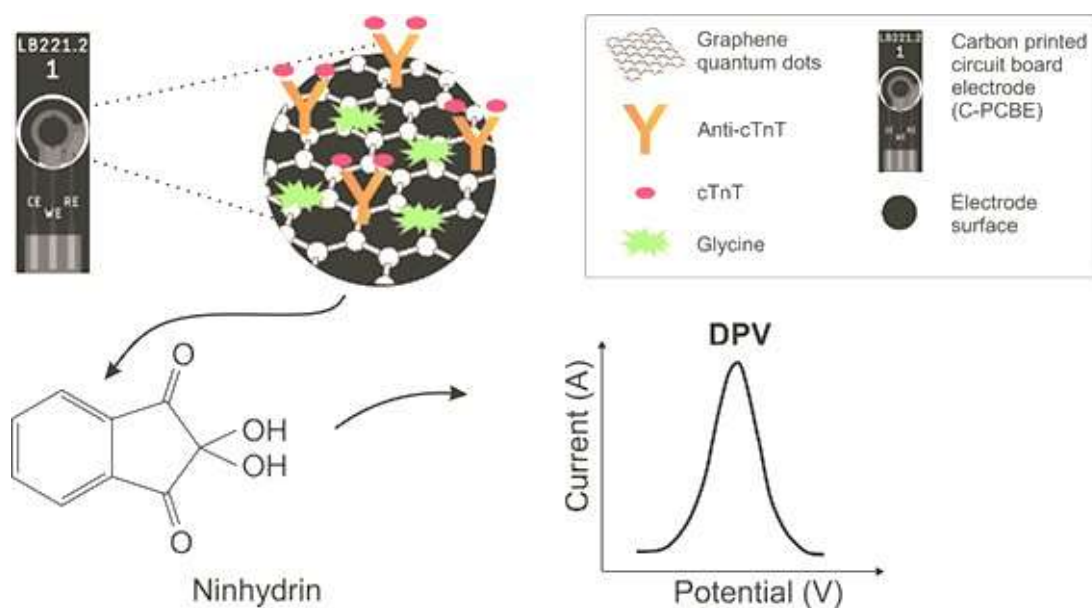
^c Department of Bioengineering, Royal School of Mines, Imperial College London, London, UK.

^d Institute of Physics, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

^e Institute of Chemistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed: João M. Madurro
E-mail: jmadurro@ufu.br

GRAPHICAL ABSTRACT



HIGHLIGHTS

- An electrochemical immunosensor was developed for cardiac troponin T detection.
- Printed circuit boards were utilized to develop a screen-printed carbon electrode.
- The surface of the electrode was modified with graphene quantum dots.
- Ninhydrin was utilized for the first time as immunocomplexation indicator.
- The device presented stability, selectivity, regeneration, and wide detection range.

ABSTRACT

Cardiac troponin T (cTnT) is a well-known sensitive biomarker for detection of acute myocardial infarction, one of the principals causes of death worldwide. The development of accurate, simple, sensitive, and selective methods that provide rapid detection of this biomarker is crucial for the survival of the patient. In the present work, we developed an innovative electrochemical immunosensor utilizing printed circuit board as matrix for carbon screen-printed electrodes development and the electrode was characterized by X-ray crystallography, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, cyclic voltammetry and pulse differential voltammetry. The proposed device was modified with graphene quantum dots for immobilization of anti-cTnT antibody and differential pulse voltammetry was applied to monitoring the oxidation peak of ninhydrin, employed here as a novel immunocomplexation indicator. The designed immunosensor exhibited very good sensitivity, reproducibility, reusability, storage life being able to successfully detect cTnT in human serum samples. Furthermore, considering the small sample volumes needed, the short time required for analysis, and the possibility of miniaturization, this immunosensor represents a promising analytical device for point-of-care cTnT analyses.

Keywords: *acute myocardial infarction, printed circuit board electrode, electrochemical immunosensor, graphene quantum dots, ninhydrin.*

RESUMO

A troponina T cardíaca (TnTc) é um biomarcador sensível largamente aplicado na detecção do infarto agudo do miocárdio, uma das principais causas de morte no mundo. O desenvolvimento de métodos precisos, simples, sensíveis e seletivos que proporcionem a detecção rápida deste biomarcador é crucial para a sobrevivência do paciente. No presente trabalho, desenvolvemos um imunossensor eletroquímico inovador utilizando placa de circuito impresso como matriz para desenvolvimento de eletrodos de carbono impresso. O eletrodo foi caracterizado por cristalografia de raios X, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. O dispositivo proposto foi modificado com pontos quânticos de grafeno para imobilização do anticorpo anti- TnTc, aplicando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial foi aplicada para monitoramento do pico de oxidação da ninidrina, aqui empregada como um novo indicador de imunocomplexação. O imunossensor projetado apresentou sensibilidade, reprodutibilidade, possibilidade de reutilização e tempo de prateleira interessantes sendo capaz de detectar TnTc com sucesso em amostras de soro humano. Além disso, considerando os pequenos volumes de amostra necessários, o curto tempo necessário para análise e a possibilidade de miniaturização, este imunossensor representa um dispositivo analítico promissor para análises *point-of-care* de TnTc.

Palavras-chave: infarto agudo do miocárdio, eletrodo de placa de circuito impresso, imunossensor eletroquímico, pontos quânticos de grafeno, ninidrina.

1 INTRODUCTION

Cardiac troponin T (cTnT) is one of the most used biomarkers for the diagnosis and early detection of acute myocardial infarction (AMI) owing to its high specificity, sensitivity, and blood circulation within 10–14 days after an AMI episode [1,2]. The determination of blood cTnT concentration is usually performed using immunochemical methods [3]; however, these assays are expensive, challenging to perform, and have a long turnaround time [4]. The development of new diagnostic options, such as electrochemical immunosensors, is important and extremely necessary because they provide rapid, dependable, and accurate results [5].

Electrochemical immunosensors are electrochemical biosensors that use antibodies as biological recognition elements to detect antigens at small concentrations. Besides their inherent sensitivity, specificity, and ease of operation, they can be miniaturized, making them suitable for point-of-care testing [6,7].

Among graphene derivatives, graphene quantum dots (GQD) have been widely used as electrochemical immunosensors to improve analytical performance [8-11]. The thermal decomposition of weak organic acids to obtain GQD combines a simplified methodology with affordable reagents [12]. Citric acid ($C_6H_8O_7$) is one of the most widely used precursors owing to its low cost, ease of production, and safe handling [13,14]. GQD are formed by condensation reactions through intermolecular dihydroxylation under basic reaction conditions, presenting valuable characteristics such as a planar conjugate structure, improved biocompatibility, minimal toxicity, large surface area, and an abundance of oxygen-containing functional groups, such as carboxyls and hydroxyls, which can enable better and more effective biomolecule immobilization via non-covalent interactions, such as π - π stacking, electrostatic binding, and hydrogen bonding [15,16].

As an alternative approach for the construction of electrochemical immunosensors, or even biosensing platforms, printed circuit board electrode (PCBE) technology has attracted considerable attention because of its advantages such as mass production, standardization, low cost, robustness, and high design customization [17,18].

Most of the available data report the use of gold PCBE in electrochemical immunosensors [19-23], but this type of electrode presents a low potential for oxidation and the possibility of liquid infiltration in the electrode working area owing to the occurrence of microscopic pores on the surface during the deposition process of the chosen metallic layer, known as pinhole defects, which interfere with the reproducibility and uniformity of the electrode surface, limiting their application [24, 25].

In this regard, the printed circuit board can be used as a substrate for carbon electrode fabrication utilizing the screen-printing technique, whose basic characteristic refers to the deposition of conductive inks on suitable substrates [26]. This work proposes a union of these two methodologies to produce a novel electrode in the literature, low production cost and highly reproducible, named as carbon printed circuit board electrode (C-PCBE).

Label-based and label-free approaches can be used to classify electrochemical immunosensors. The first type, label-based electrochemical immunosensors, has a more complex preparation and expensive production,

showing considerable denaturation of biomarkers, while the label-free electrochemical immunosensors are the opposite [27], offering a simpler and lower cost option.

Generally, label-free methods utilize electron mediators or redox-active probes, such as Prussian blue [28,29], hydroquinone [30,31], thionine [32,33], hexaammineruthenium (III) chloride [34,35], ferrocene [36,37], and potassium ferrocyanide/ferricyanide [38,39] in the reaction medium as a strategy to amplify and increase the electrochemical signal because antibodies and antigens are usually electrochemically inert [40]. ninhydrin (1,2,3- indanetrione hydrate) is a strong candidate as an electroactive indicator of immunocomplexation because it is widely used for amino acid identification and/or quantification analysis [41,42] and is related to the DNA hybridization indicator proposed by Brito-Madurro et al. [43]. Additionally, the application of ninhydrin as an immunocomplexation indicator has not been explored.

In this study, a new carbon screen-printed electrode was developed using printed circuit boards as substrates (C-PCBE). For the first time, the use of ninhydrin as an electroactive immunosensor indicator has been explored for cardiac troponin T detection in real serum samples. The C-PCBE was modified with GQD to improve the electrode surface area and provide functional groups that act as bio-anchors for antibody immobilization, producing a novel and reusable electrochemical immunosensor, able to distinguish between healthy and sick patients, highly selective, with long-term stability, and a wide range of detection. To date, no study has reported this approach to fabricate carbon screen-printed electrodes or ninhydrin utilization as antigen–antibody binding indicator, highlighting the innovative character of this study.

2 METHODOLOGIES

2.1 Chemical, biomolecules, and experimental apparatus

All reagents used were of analytical grade and were used as received. All solutions used were prepared with ultra-high purity water (18.2 MΩ.cm, Gehaka) and purged with ultrapure nitrogen for 20 minutes before each electrochemical measurement. Isopropanol (C₃H₈O), glacial acetic acid (CH₃CO₂), sodium acetate trihydrate (CH₃CO₂Na.3H₂O), citric acid (C₆H₈O₇), sodium hydroxide (NaOH), potassium chloride (KCl), sodium dodecyl sulphate (NaC₁₂H₂₅SO₄), disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄), monosodium hydrogen phosphate (NaH₂PO₄) and sulfuric acid (H₂SO₄) were purchased from Merck.

Potassium ferricyanide K₃[Fe(CN)₆], potassium ferrocyanide K₄[Fe(CN)₆], ninhydrin (C₉H₆O₄) and glycine (C₂H₅NO₂) were purchased from Vetec. The biomolecules used in this paper were: cardiac troponin T monoclonal antibody (anti-cTnT) and cardiac troponin T (cTnT), purchased from Abcam, cardiac troponin I (cTnI), cancer antigen 125 (CA-125) and C-reactive protein (CRP) were purchased from Sigma Aldrich Life Science. The human serum samples from healthy (non-infarcted) and sick (infarcted) persons, were obtained from Sabin Medicina Diagnóstica Laboratory (Uberlândia, Brazil) kept frozen until the analysis and, when used, diluted in phosphate buffer (1:10, V/V).

Voltammetric tests such as cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were performed using a potentiostat CHI 760C (CH Instruments, USA). Solution of an anionic probe K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] (5

mmol/L) in KCl (0.1 mol/L) was utilized in CV analysis and phosphate buffer (0.1 mol/L; pH 7.4) was used as supporting electrolyte in DPV measurements. The experiments were performed in triplicate and numeric results are presented as arithmetic mean $\pm$ standard deviation.

2.2 Carbon printed circuit board electrodes construction (C-PCBE)

The printed circuit board was designed using Eagle Autodesk software and fabricated by PCB Way (Hangzhou, China), with a 91.4x 95.8 mm panel containing 27 detachable electrodes. The board is composed of a chemically inert material, named flame retardant class 4 (FR-4), with a thickness of 1.6 mm and tolerability of up to 140 °C for the C-PCBE curing processes. Superimposed on the mechanical structure of the FR-4, there is a layer of 1 ounce of copper, having the function of establishing electrical contact between the potentiostat and conductive inks of the C-PCBE. A thin layer of tin was electrodeposited on the copper to prevent oxidation processes. In addition, a black solder mask was applied for electrical isolation. The panel was cleaned with isopropanol, dried in the oven at 80° C for 5 min, then printed in a semi-automatic printer (DEK 248, UK), using heat-stabilized polyester films modified with the design of interest, by screen-printed technique, recovering specific areas from the electrode with conductive carbon and silver inks. Figure 1 shows the steps of the C-PCBE construction.

Figure 1A shows the electrode without any coating, as received from the factory. The carbon ink (Electrodag 423SS) was used to cover the designed surfaces of the work ($\phi = 4\text{mm}$) and the counter-electrode area (Fig. 1B), along with a lab-made silver-ink [44] for the reference electrode area (Fig. 1C), as observed in Fig 1 B. At each stage of paint deposition, the substrate was cured in the oven at 60° C for 30 min, divided into units and applied vinyl adhesive to limit the work area, as indicated in Figure 1D.

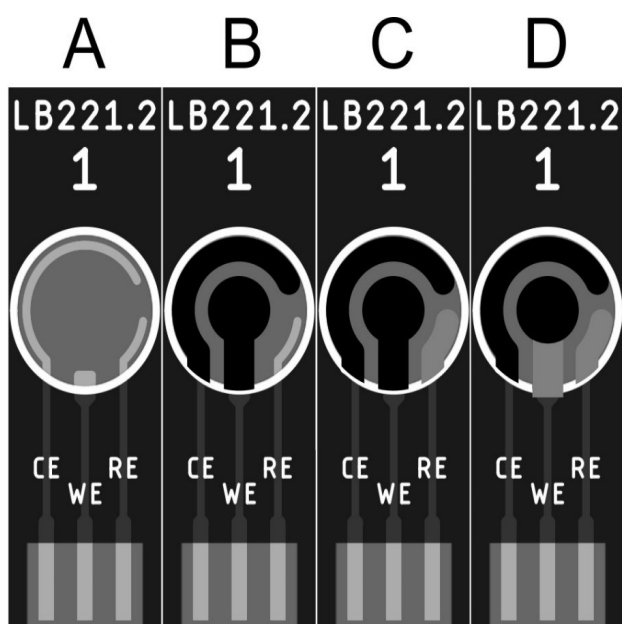


Figure 1. (A) C-PCBE electrode before ink recover, (B) Carbon conductive ink recovers, (C) Silver conductive ink recovers, (D) C-PCBE electrode produced with the working area delimited with vinyl adhesive.

2.3 Characterization methods

The surface of the C-PCBE was characterized by scanning probe microscopy (SPM) model 5100 (Hitachi, Japan) and model SPM9600 (Shimadzu, Japan), performed in dynamic force microscopy (DFM) mode, and scanning electron microscope (SEM) utilizing a model Vega3 LMU (TESCAN, Czech Republic), operated at 5.00 kV. X-ray crystallography data (XRD) was obtained Shimadzu with a XRD 6000 diffractometer, using Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) with voltage 40 kV and 40 mA in a range of 20 to 70° in 2 θ mode, with step of 0.02° and with accumulation of 1s/point.

2.4 C-PCBE cleaning and modification with graphene quantum dots (GQD)

Prior to use, the C-PCBE produced undergo electrochemical cleaning by CV in 0.1 M H₂SO₄ solution, between -0.60 V and + 1.00 V, 20 cycles at 100 mV/s to obtain a common voltammetric profile and a surface free of any impurities. After the cleaning step, 4 μL of a graphene quantum dots suspension was produced according to Dong [13] and sonicated for 2 hours. It was drop-casted onto the working area of the C-PCBE and dried in the oven at 80 °C for 5 min, resulting on the C-PCBE/GQD electrode.

2.5 Immunosensor preparation and cTnT detection

The anti-cTnT solution (diluted in sodium acetate buffer, pH = 4) was immobilized by dripping 2 μL (0.1 $\mu\text{mol/L}$) in the functionalized working area of the C-PCBE/GQD electrode, incubated for 30 min in a humid chamber and room temperature and washed with phosphate buffer under slight agitation. To avoid the binding of non-desired molecules, a blocking solution with glycine (2 μL , 1 mmol/L) was applied during 60 min and the washing step was repeated, producing the immunosensor. The immunocomplex formation were carried by dripping 2 μL of the human serum sample (1:10 V/V in phosphate buffer) enriched with cTnT onto the surface of the immunosensor. Then, the steps used in the antibody immobilization and washing were repeated. After the immunocomplex formation, according to the protocol established for Brito-Madurro and collaborators [43], 2 μL of a ninhydrin solution (100 $\mu\text{mol/L}$) was added in the electrode surface, incubated for 10 min and gently washed in phosphate buffer solution to remove unboding species.

2.6 Analytical parameters

In all the analytical parameters evaluated here, the analyzes were conducted with the DPV technique, monitoring the ninhydrin oxidation peak and the serum samples volume used was always the same (2 μL).

For the calibration curve obtention, six different concentrations of cTnT were incorporated in a healthy human serum (0.5 pg/mL, 10 pg/mL, 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, and 18 ng/mL) and the limit of detection was reported as the lowest concentration detected. The selectivity of the immunosensor was analyzed utilizing serum samples of healthy patients enriched with cardiac cTnT, cTnI, CA-125 and CPR antigens in the same concentration (5 ng/mL). A shelf-life study was conducted maintaining the immunosensor at 4° C under inert atmosphere for 28 days and regenerations studies were performed according to Dutra [45].

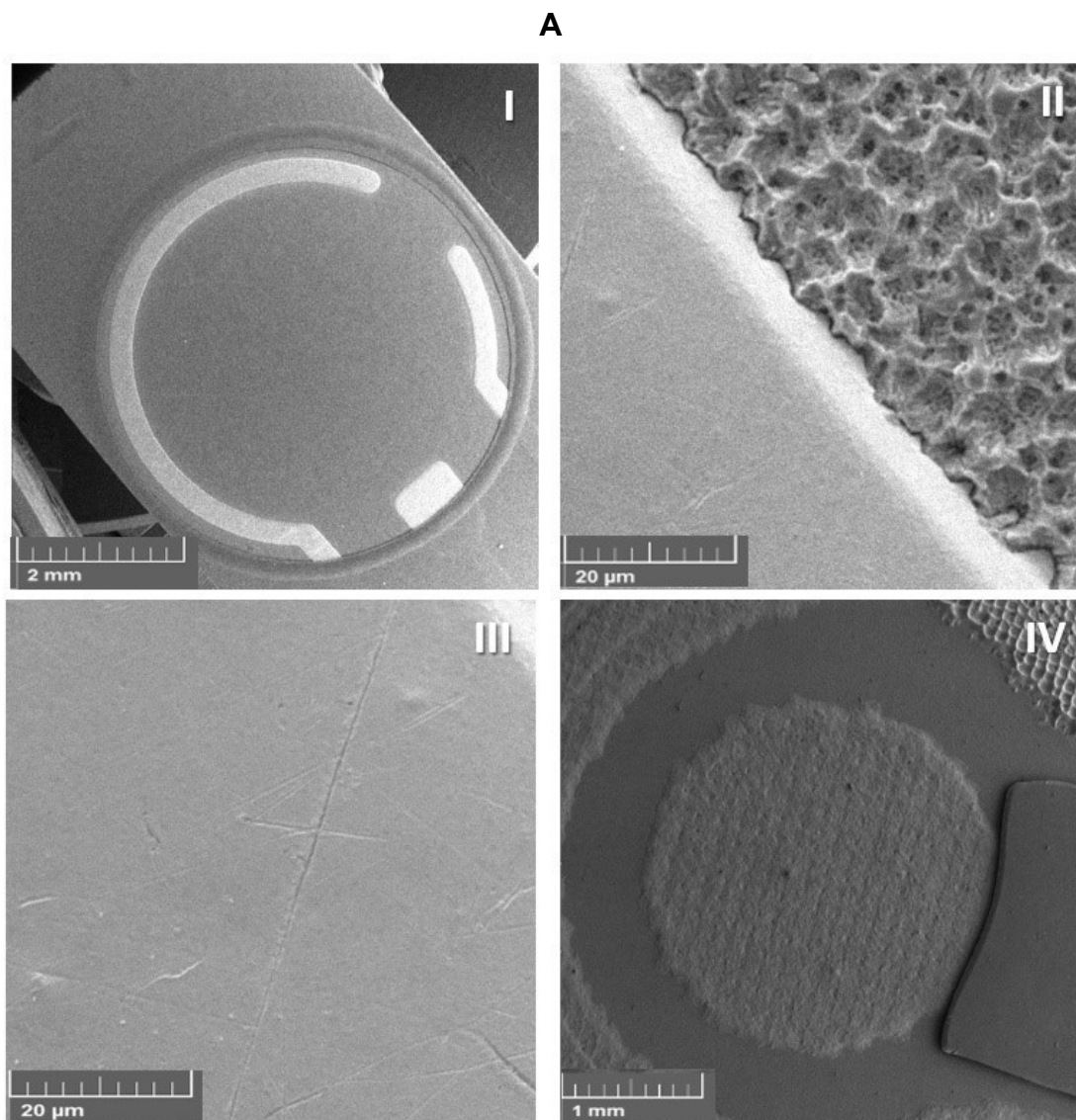
3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3 C-PCBE development and characterization

In each panel there are 27 detachable electrodes of standard unit size 10.16 mm x 32.00 mm, designed for a price optimization of the projected board, as demonstrated in Figure S1. In addition to delimiting the electrode area, a small white circle was included to prevent eventual liquid leakage. Figure S2 illustrates the electrode before (A) and after (B) the coating with conductive carbon and silver inks and application of the adhesive to delimit the circular work area.

The construction of an electrode, starting from a manufactured material, simplifies several stages of the process, making it possible to save a considerable volume of conductive inks, especially the silver ink (the most expensive), generally used to make the connection of the conductive tracks and act as a pseudo-reference [46,47].

Figure 2A shows SEM images at different magnifications factors of the electrode developed, before (I) and after (IV) the screen-printed technique applied, as well as the component material of the board (II), FR-4 and the patterned conductive traces (III).



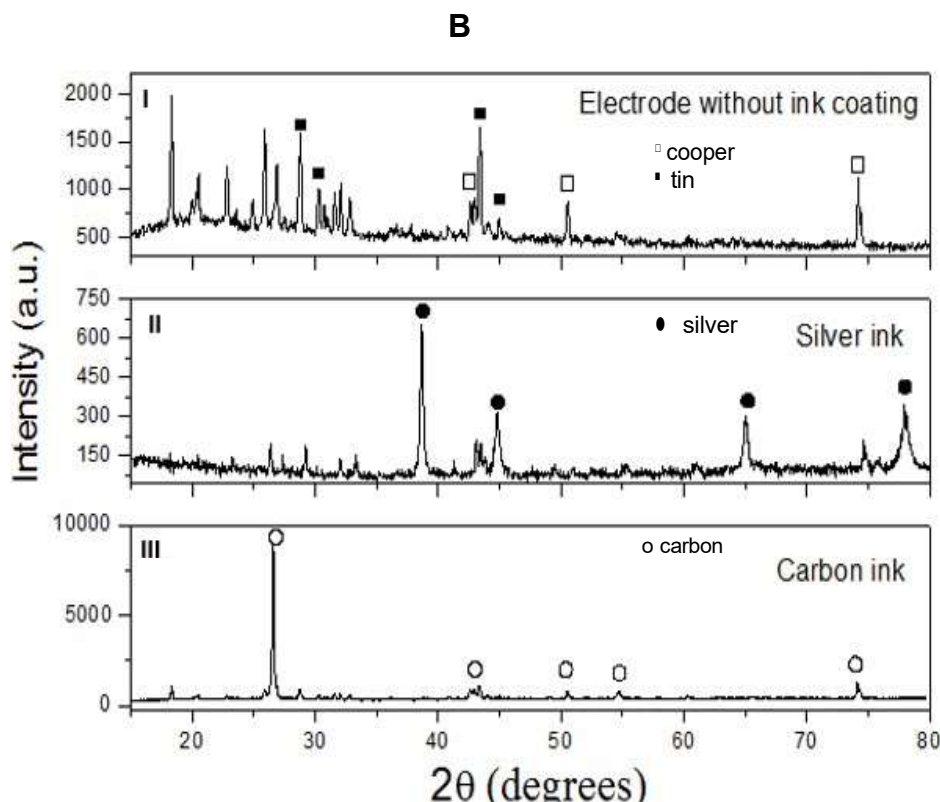


Figure 2. (A) SEM images at different magnifications of the C-PCBE electrode: before (I) and after (IV) the ink recover, (II) FR-4 board material, (III) patterned conductive traces. (B) XRD crystallography data: C-PCBE electrode without ink recover (I), C-PCBE electrode after conductive silver ink recover (II), C-PCBE electrode after conductive carbon ink recover (III). Magnification factor of SEM images: A I, A IV= 25 times; A II, A III = 2×10^3 times.

The PCB material, FR-4, in addition to being a material resistant to temperature and mechanical stress [18-24] has several pores onto the surface, as demonstrated in Fig. 2A II, helping in the deposition and adhesion of the paints used, likewise, the conductive wires, which have small grooves, as demonstrated in Figure 2A III. Before manufacturing the electrode, is possible to observe the exposed metallic contours of the electrode (Fig. 2A I) and after the screen-printed technique execution, all contours are uniformly covered with conductive carbon and silver inks, as seen in Figure 2A IV. Figure 2B shows the XRD of three stages of electrode construction: without coating (Fig. 2B I), after coating with conductive silver paint to produce the reference electrode (Fig. 2 B II) and with coating of conductive carbon ink to obtain the working and auxiliary electrodes (Fig. 2B III). The data was compared with the references, as showed in Figure S3.

The developed electrode is mostly made of FR-4 material, which is composed of epoxy resin and glass fiber, some peaks are not easily identified in Fig 2 B I, due to the miscellaneous of this material, however it is possible to discern the presence of metallic copper, identified in the image by $\square$ (Figure S3 A, JCPDS card, n° 37502), used for the patterned conductive wires, and tin (Figure S3 B, JCPDS card n° 106072), used to prevent oxidative processes of the plate, identified as $\blacksquare$. After the coating, the peaks of greatest intensity observed are those referring to silver (Fig 2B II, identified in the data as $\bullet$ and in Figure S3 C, JCPDS card, n° 22434) and carbon (Fig 2B III identified in the data as $\circ$, and in Figure S3 D, JCPDS card, n° 76767), thus confirming a satisfactory coating and the effectiveness of applying the screen-printed technique.

3.4 Morphological analysis and electrochemical assays of the C-PCBE and -C-PCBE/GQD electrodes

Figure 3A shows DFM images of the bare C-PCBE (Fig. 3A I) and C-PCBE/GQD electrode (Fig. 3A II).

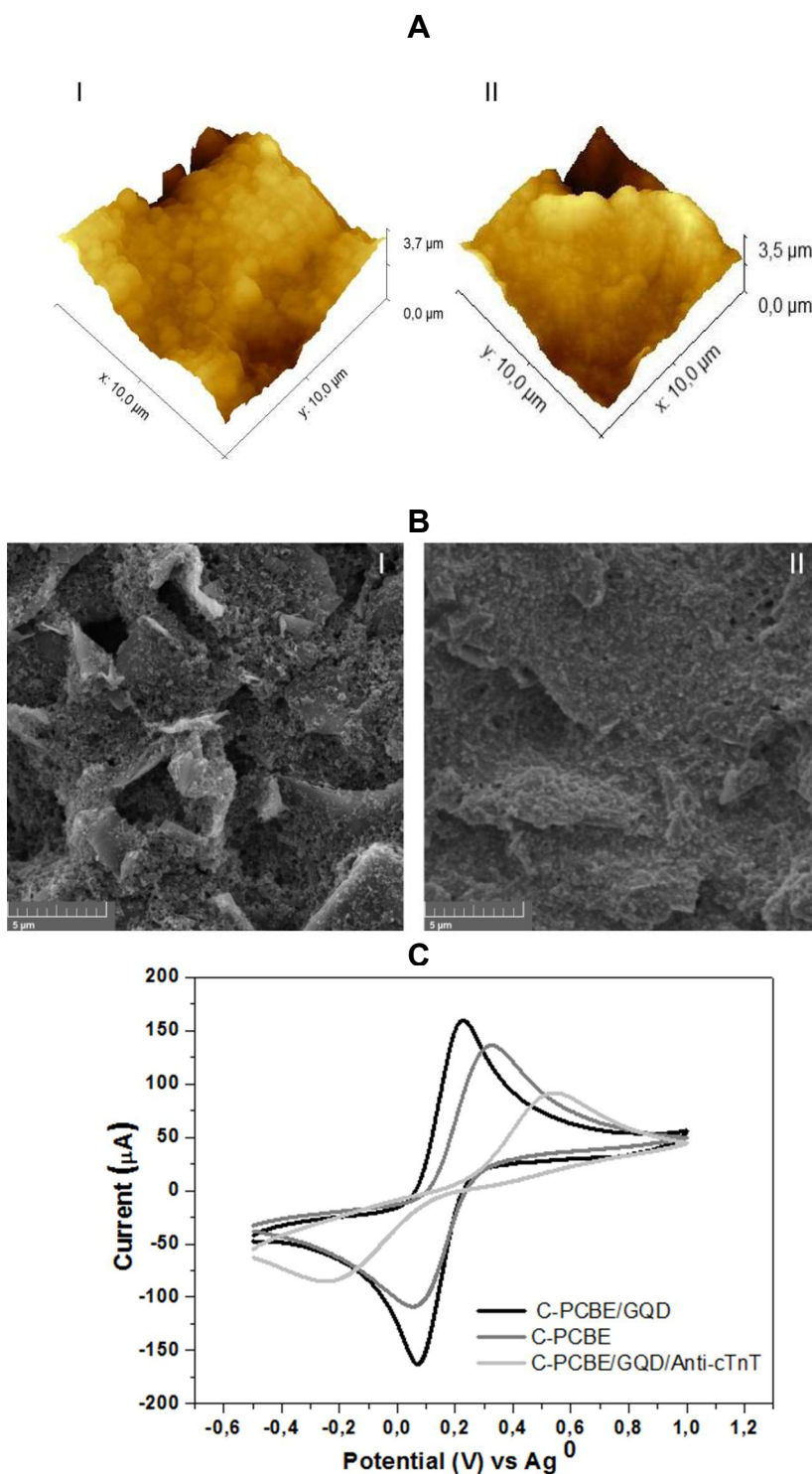


Figure 3. (A) DFM images of C-PCBE electrode (I) and C-PCBE/GQD electrode (II). (B) SEM images of C-PCBE electrode (I) and C-PCBE/GQD electrode, magnification factor = 10×10^3 times. (C) Cyclic voltammograms of C-PCBE/GQD (—), C-PCBE (—) C-PCBE/GQD/Anti-cTnT (—) in KCl solution (0.10 mol/L) containing $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (5.0 mmol/L), scan rate 50 mV/s.

The quadratic roughness coefficient (R_q) C-PCBE electrode (Fig. 3A I, 516.4 ± 7.2 nm) was smaller than the C-PCBE/GQD electrode (Fig. 3A II, 645.2 ± 13.7 nm). This increase of the R_q values can be attributed to inherent characteristic of the increase in surface area after the incorporation of a nanomaterial [48,49]. The presence of a rougher surface is particularly interesting for the biomolecule adsorption, providing the possibility of more effective adhesion [50,51].

SEM image of the bare C-PCBE (Fig. 3B I) exhibited a surface with sheets and blade structures spread throughout the electrode surface and ultrafine carbon particles, standard features of conductive carbon inks, often used in screen printing procedures [52,53] despite of the C-PCBE/GQD electrode (Fig. 3B II), which exhibits several and more homogeneous granules along the surface, indicating the adhesion of the GQD suspension to the electrode as exhibited in the DFM analyses, with an increase in R_q values after the GQD incorporation.

Figure 3C shows the electrochemical response of the bare C-PCBE (—), C-PCBE/GQD (—) and C-PCBE/GQD/Anti-cTnT (—) in a CV tests conducted with in KCl solution (0.10 mol/L) with $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5.0 mmol/L).

Significant improvement was observed in anodic (I_{pa}) and cathodic (I_{pc}) peak current values, after the GQD incorporation ($I_{pa} = 150 \pm 2.75$ μ A; $I_{pc} = 145 \pm 4.5$ μ A) when compared with C-PCBE ($I_{pa} = 109 \pm 1.5$ μ A; $I_{pc} = 94 \pm 3.6$ μ A), indicating increased electron transfer, largely due to increased electrode surface area, as previously seen in SEM and DFM data.

About the potential values, a pair of well-defined redox peaks, anodic (E_{pa}) and cathodic (E_{pc}) are seen in both analysis, however the GQD modification shifted the potential to cathodic values ($E_{pa} = 0.23 \pm 0.015$ V, $E_{pc} = 0.06 \pm 0.017$ V) comparing to C-PCBE ($E_{pa} = 0.33 \pm 0.015$ V, $E_{pc} = 0.04 \pm 0.02$ V) improving electrode electrocatalysis, therefore the ΔE_p values, decreases to 0.29 V at C-PCBE to 0.17 V at C-PCBE/GQD electrode, demonstrating the GQD provides more electroactive interaction sites that can facilitate the electron transfer between the redox couple and the modified electrode surface. The use of GQD also provide functional groups, like hydroxyl and carboxyl, for anchoring antibodies via physical adsorption, by non-covalent interactions, like π - π stacking, Van der Waals forces, hydrophobic interactions, and hydrogen bonding [54]. It is worth mentioning that the dilution of the anti-cTnT probe in sodium acetate buffer at pH = 4, as in this work, give the antibody a positive net charge, due to its isoelectric point is being approximately 5 [55], therefore, an electrostatic interaction can occur between the positively charged residues of the probe and with the functional groups of the GQD.

The immobilization of the probe Anti-cTnT (Fig. 3,) results in a decreased in both peak currents, ($I_{pa} = 65.5 \pm 3.5$ μ A; 48.2 ± 1.7 μ A), and an increase in ΔE_p values (0.27 V), demonstrating their insulating nature, interfering in electron transfer processes of the redox couple $Fe^{2+/3+}$.

3.5 Biofunctionalization of the C-PCBE/GQD electrodes

Figure 4 shows the SEM and DFM images after each stage of the biofunctionalization of the C-PCBE/GQD electrode: immobilization of the anti-cTnT (Fig 4A I, Fig 4B I), blocking step with glycine (Fig 4A II, Fig 4B II), and addition of serum samples from sick (Fig 4A III, Fig 4B III) or healthy (Fig 4A IV, Fig 4B IV) patients.

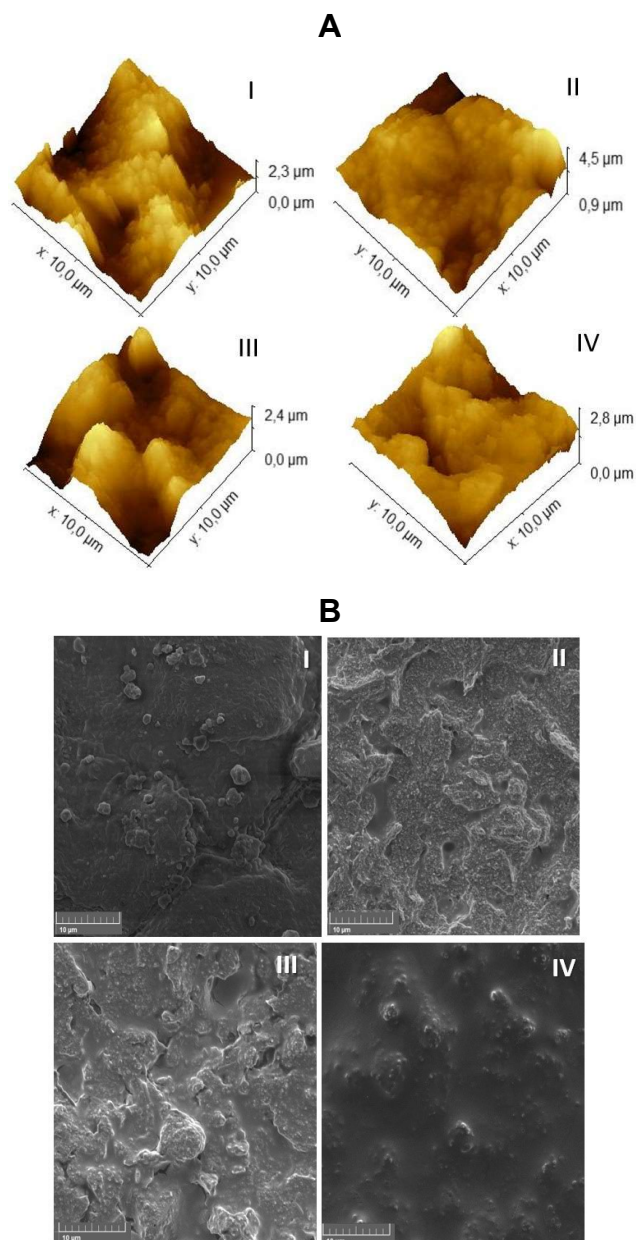


Figure 4. (A) DFM and (B) SEM images after stages of the biofunctionalization of the C-PCBE/GQD electrode: immobilization of the anti-cTnT (Fig. 4A I, Fig. 4B I), blocking step with glycine (Fig. 4A II, Fig. 4B II), and with an addition of serum samples from sick (Fig. 4A III, Fig. 4B III) and healthy (Fig. 4A IV, Fig. 4B IV) patients. Magnification factor of SEM images = $5 \cdot 10^3$ times.

Comparing the R_q values of the probe immobilization (451 ± 12.8 nm, Fig. 4A I) and after glycine incorporation (645 ± 9.2 nm, Fig. 4A II), an increment was observed, presumable to cover layer of the glycine, being confirmed by the SEM image (Fig. 4B II) with several small granules along the surface, while clusters of globular formations are attributed to the cTnT probe (Fig. 4B I). The formation of the immunocomplex tends to make the surface rougher [56], with a diffuse and heterogeneous surface (Fig. 4B III) and higher values of R_q (Fig. 4A III, $R_q = 438 \pm 13.9$ nm), while the SEM image referring to the healthy patient indicates a smoother surface (Fig. 4B IV) and a lower R_q value ($332.1 \text{ nm} \pm 15.8 \text{ nm}$, Fig. 4A IV).

3.6 Analytical performance of the immunosensor with ninhydrin application as immunocomplexation indicator

Ninhydrin solution was previously used as DNA hybridization indicator, as cited earlier, with an oxidation peak at - 0.25 V in gold electrodes. Theoretical calculation indicates a greater affinity of the species for double-stranded DNA than for single-stranded DNA, with hydrogen bonds responsible for maintaining the interaction [43].

Using a C-PCBE, an oxidation peak was observed at - 0.30 V in DPV essay, as indicated in Figure 5 A.

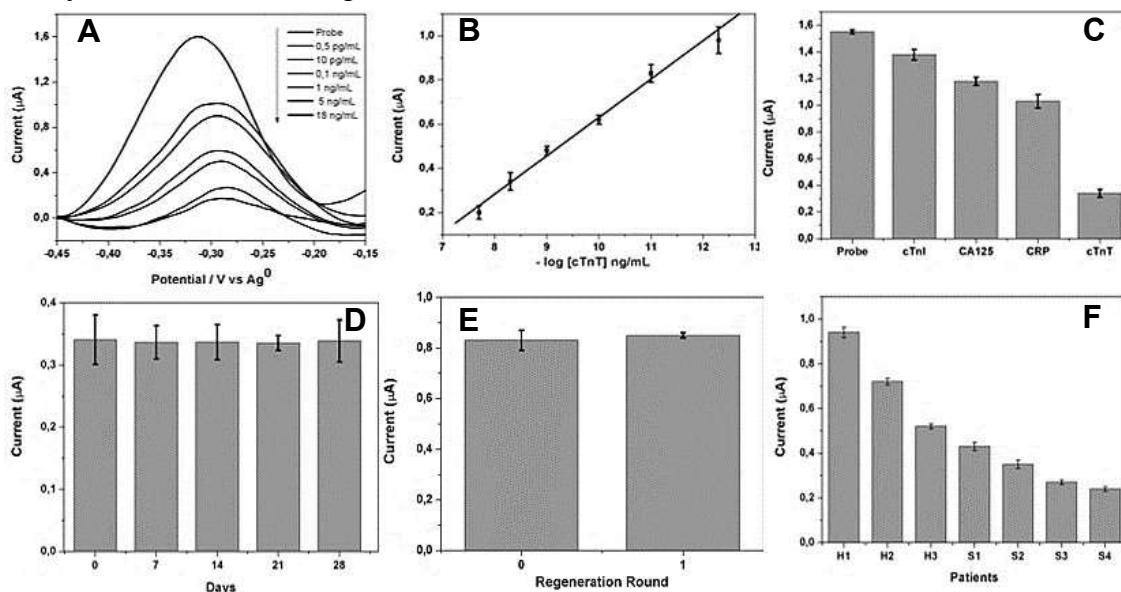


Figure 5. (A) Differential pulse voltammograms of the immunosensor for six different cTnT concentrations in enriched human serum sample. (B) Calibration curve of the immunosensor. (C) Bar charts showing the current response for different types of antigens (cTnI, CA 125, CRP, free T3, cTnT, and solution without cTnT). (D) Bar charts showing the current response obtained after 28 days storage. (E) Reuse capacity. (F) Bar charts showing the current response obtained from healthy (H1 – H2) and sick (S1 – S4) patients samples analyses. Electrolyte: Phosphate Buffer (0.1 mol/L), scan rate 30 mV/s; modulation amplitude 60 mV; interval time 0.2 s.

Biomolecules such as antibodies and proteins are not conductive and their accumulation on the surface of the electrode results in the formation of an insulating layer [40]. Given this, the value of the ninhydrin oxidation peak was inversely proportional to the cTnT concentration on the electrode surface, whereas the greater the presence of the target protein, the less accessible the electrode surface is to the direct ninhydrin oxidation. Therefore, ninhydrin appears to function here as a steric indicator of the immunocomplexation event, with electron transfer decreasing with increasing layer thickness.

The immunosensor developed was capable to detect the analyte in very small concentrations, even below or above of the reference value, determined between 0.1 and 1 ng/mL [55], in the linear range from 0.5 pg/mL to 18 ng/mL. Carrying out the linear regression between the cTnT logarithmic concentration and the ninhydrin oxidation peak current values (Fig. 5B), the equation obtained was $I (\mu A) = -1.1081 + 0.17391 \cdot \log[cTnT]$, $r = 0.993$, with sensitivity equal to $1.1081 \mu A \cdot mL / ng$, with 0.5 pg/mL being the lowest concentration detected.

Figure 5C shows the selectivity of the device against other types of antigens: cardiac troponin I, (cTnI), cancer antigen 125, (CA-125) and C-reactive protein (CRP) used as negative controls, observing higher current values, indicating the non-formation of the immunocomplex, and favoring the oxidation of ninhydrin on the electrode surface.

In the stability study (Fig. 5D), the immunosensor kept 100% of their current response for 28 days. After this period, the biomolecules probably suffer leaching.

The regeneration of an immunosensor is an interesting option, with the purpose of reducing costs and maintaining operability, allowing its reuse. Here, it was possible to regenerate the device just once (Fig. 5E), probably due to leaching of anti-cTnT or loss of function due to the use of solution of sodium dodecyl sulphate [57].

Differentiation in the current response of the ninhydrin oxidation (Fig. 5F) was determined analyzing human serum samples from sick (S1 - S4) or healthy (H1 - H3) persons, with superior current values determined in healthful patients, indicating the facility of ninhydrin oxidation, attributed to the absence of the immunocomplex, contrary to the response of ill patients, with lower current values observed.

4 Conclusions

In this work, an innovative type of printed carbon electrode was developed, utilizing printed circuit board as substrate, demonstrating an exciting approach regards to the efficient production of carbon screen-printed electrodes. The electrode developed was modified with GQD to produce an electrochemical immunosensor for the cTnT detection in real samples of human serum, using for the first time a ninhydrin solution as indicator of immunocomplexation. The device was able to differentiate samples from sick and healthy patients, maintaining 100% of its response during 28 days of storage, presenting reusability, whose being able to detect low concentrations of cTnT in human serum samples and demonstrating potential for use as an alternative for AMI diagnosis.

Credit Author Statement

Jéssica G. Brussasco: Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Investigation, Writing. Pedro H. G. Guedes: Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Writing. Luis F. G. Luz: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal Analysis, Writing. Dayane D. de Moraes: Methodology, Investigation. Vítor F. Barbosa: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing. José M. R. Flauzino: Methodology, Conceptualization, Writing. Atair C. Silva: Formal Analysis. Ana G. Brito-Madurro: Supervision, Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Writing-Reviewing and Editing, Funding acquisition. João M. Madurro: Supervision, Conceptualization, Methodology, Formal Analysis, Writing-Reviewing and Editing, Funding acquisition.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] MA, H.; CASSEDY, A.; O'KENNEDY, R. The role of antibody-based troponin detection in cardiovascular disease: A critical assessment, **J. of Immunol. Methods**, v. 497, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113108>.
- [2] LANDIM, V. P. A.; FOGUEL, M. V.; PRADO, C. M.; SOTOMAYOR, M. P. T.; VIEIRA, I. C.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. A Polypyrrole/Nanoclay Hybrid Film for Ultra-Sensitive Cardiac Troponin T Electrochemical Immunosensor, **Biosensors**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12070545>.
- [3] NERES, L. C. S.; FELICIANO, G. T.; DUTRA, R. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development of a selective molecularly imprinted polymer for troponin T detection: a theoretical-experimental approach, **Mater. Today Commun.**, v. 30, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102996>.
- [4] SHEN, Q.; LIU, M.; LÜ, Y.; ZHANG, D.; CHENG, Z.; LIU, Y.; GAO, H.; JIN, Z. Label-Free Electrochemical Immunosensor Based on a Functionalized Ionic Liquid and Helical Carbon Nanotubes for the Determination of Cardiac Troponin I, **ACS Omega**, v. 4, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01152>.
- [5] CHEN, H.; ZHANG, J.; HUANG, R.; WANG, D.; DENG, D.; ZHANG, Q.; LUO, L. The Applications of Electrochemical Immunosensors in the Detection of Disease Biomarkers: A Review. **Molecules**, v. 28, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28083605>.
- [6] BENJAMIN, S. R.; SANTOS, L. K. B.; SILVA, J. E. G.; MENDONÇA, P. D.; SILVA, B. V. M.; DUTRA, R. F. Electrochemical Immunosensors and Biomimetic Sensors for the Detection of the Myocardial Infarction Biomarkers. **Significances Bioeng. Biosci.**, v. 5, 2023. <https://doi.org/10.31031/SBB.2023.05.000623>.
- [7] SANGILI, A.; KALYANI, T.; CHE, S.; RAJENDRAN, K.; JANA, S. K. Label-free electrochemical immunosensor based on L-cysteine-functionalized AuNP on reduced graphene oxide for the detection of dengue virus E-protein in dengue blood serum, **Compos. B. Eng.**, v. 238, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109876>.
- [8] KOLHE, P.; ROBERTS, A.; GANDHI, S. Fabrication of an ultrasensitive electrochemical immunosensor coupled with biofunctionalized zero-dimensional graphene quantum dots for rapid detection of cephalexin, **Food Chem.**, v. 398, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133846>.

- [9] MOLLARASOULI, F.; SERAFÍN, V.; CAMPUZANO, S.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M.; ASADPOUR-ZEYNALI, K. Ultrasensitive determination of receptor tyrosine kinase with a label-free electrochemical immunosensor using graphene quantum dots-modified screen-printed electrodes, **Anal. Chim. Acta.**, v. 1011, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.039>.
- [10] SUN, B.; WANG, Y.; LI, D.; LI, W.; GOU, X.; GOU, Y.; HU, F. Development of a sensitive electrochemical immunosensor using polyaniline functionalized graphene quantum dots for detecting a depression marker, **Mater. Sci. Eng. C.**, v. 111, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110797>.
- [11] LAKSHMANAKUMAR, M.; NESAKUMAR, N.; SETHURAMAN, S.; Rajan K. S, KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. Fabrication of GQD-Electrodeposited Screen-Printed Carbon Electrodes for the Detection of the CRP Biomarker **ACS Omega.**, v. 6, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04043>.
- [12] KADIAN, S.; SETHI, S.K.; MANIK, G. Recent advancements in synthesis and property control of graphene quantum dots for biomedical and optoelectronic applications, **Mater. Chem. Front.**, v. 5, 2021 <https://doi.org/10.1039/d0qm00550a>.
- [13] DONG, Y.; SHAO, J.; CHEN, C.; LI, H.; WANG, R.; CHI, Y.; LIN, X.; CHEN, G. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid, **Carbon**, v. 50, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.06.002>
- [14] NAIK, J. P.; SUTRADHAR, P.; SAHA, M. Molecular scale rapid synthesis of graphene quantum dots (GQDs). **J Nanostruct Chem**, v. 7, 2017. <https://doi.org/10.1007/s40097-017-0222-9>.
- [15] QU, D.; ZHENG, M.; ZHANG, L.; ZHAO, H.; XIE, Z.; JING, X.; HADDAD, R. E.; FAN, H.; SU, Z. Formation mechanism and optimization of highly luminescent N-doped graphene quantum dots. **Sci. Rep.**, v. 4, 2014. <https://doi.org/10.1038/srep05294>.
- [16] YANG, A.; SU, Y.; ZHANG, Z.; WANG, H.; QI, C.; RU, S.; WANG, J. Preparation of Graphene Quantum Dots by Visible-Fenton Reaction and Ultrasensitive Label-Free Immunosensor for Detecting Lipovitellin of *Paralichthys Olivaceus*. **Biosensors.**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12040246>.
- [17] LI, T. Electrochemical applications of printed circuit boards: Electrocatalysis and internal reference electrodes, **Electrochem. Commun.**, v. 132, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107141>.
- [18] SHAMKHALICHENAR, H.; BUECHE, C. J.; CHOI, J. W. Printed Circuit Board (PCB) Technology for Electrochemical Sensors and Sensing Platforms. **Biosensors.**, v. 10, 2020. <https://doi.org/10.3390/bios10110159>.
- [19] EVANS, D.; PAPADIMITRIOU, K. I.; VASILAKIS, N.; PANTELIDIS, P.; KELLEHER, P.; MORGAN, H.; PRODROMAKIS, T. A Novel Microfluidic Point-

of-Care Biosensor System on Printed Circuit Board for Cytokine Detection. **Sensors.**, v. 18, 2018 <https://doi.org/10.3390/s18114011>.

[20] ZUPANČIČ, U.; RAINBOW, J.; ESTRELA, P.; MOSCHOU, D. Utilising Commercially Fabricated Printed Circuit Boards as an Electrochemical Biosensing Platform. **Micromachines.**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3390/mi12070793>.

[21] TALEBI, S.; DARAGHMA, S. M. A.; SUBRAMANIAM, R. T.; BHASSU, S.; KUMAR, G. G.; PERIASAMY, V. Printed-Circuit-Board-Based Two-Electrode System for Electronic Characterization of Proteins, **ACS Omega.**, v. 5, 2020. <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b03831>.

[22] GHORBANZADEH, S.; NAGHIB, S. M.; SADR, A.; MOLAABASI, F.; ZHANG, W.A customizable cost-effective design for printed circuit board-based nanolayered gold screen-printed electrode: From fabrication to bioapplications. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 4, 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1036224>.

[23] MIRZAJANI, H.; CHENG, C.; VAFAIE, R. H.; WU, J.; CHEN, J.; EDA, S. AGHDAM, E. N.; GHAVIFEKR. H. B. Optimization of ACEK-enhanced, PCB-based biosensor for highly sensitive and rapid detection of bisphenol a in low resource settings, **Biosens. Bioelectron.**, v. 196, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113745>.

[24] FAKHR, M. H.; BESHCHASNA, N.; BALAKIN, S.; CARRASCO, I. L.; HEITBRINK, A.; GÖHLER, F.; RÖSCH, N.; OPITZ, J. Cleaning of LTCC, PEN, and PCB Au electrodes towards reliable electrochemical measurements. **Sci. Rep.**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23395-3>.

[25] NANDESHWAR, R.; TALLUR, S. Electrochemical detection of myeloperoxidase (MPO) in blood plasma with surface-modified electroless nickel immersion gold (ENIG) printed circuit board (PCB) electrodes. **Biosens. Bioelectron.** v. 246, n. 45, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115891>.

[26] ARAÚJO, D. A. G.; CAMARGO, J. R.; PRADELA-FILHO, L. A.; LIMA, A. P.; MUÑOZ, R. A. A.; TAKEUCHIA, R. M.; JANEGITZ, B. C.; SANTOS, A. L. A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltametric determination of caffeic acid, **Microchem. J.**, v. 158, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105297>.

[27] PATIL, A. V. P.; CHUANG, Y.; LI, C.; WU, C. Recent Advances in Electrochemical Immunosensors with Nanomaterial Assistance for Signal Amplification. **Biosensors.**, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13010125>.

[28] SILVA, B. V. M.; CORDEIRO, M. T.; RODRIGUES, M. A. B.; MARQUES, E. T. A.; DUTRA, R. F. A Label and Probe-Free Zika Virus Immunosensor Prussian Blue@carbon Nanotube-Based for Amperometric Detection of the NS2B Protein. **Biosensors.**, v. 11, 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11050157>.

- [29] WANG, M.; JIANG, M.; LI, P.; YUAN, M.; ZHAO, C.; LAI, W.; LI, J.; HONG, C.; QI, Y. Construction of a competitive electrochemical immunosensor based on sacrifice of Prussian blue and its ultrasensitive detection of alpha-fetoprotein, **Anal. Chim. Acta.**, v. 1257, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341143>.
- [30] FENG, S.; YAN, M.; XUE, Y.; HUANG, J.; YANG, X. Electrochemical Immunosensor for Cardiac Troponin I Detection Based on Covalent Organic Framework and Enzyme-Catalyzed Signal Amplification. **Anal. Chem.**, v. 93, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02636>.
- [31] WANG, H.; ZHANG, Y.; YU, H.; WU, D.; MA, H.; LI, H.; DU, B.; WEI, Q. Label-free electrochemical immunosensor for prostate-specific antigen based on silver hybridized mesoporous silica nanoparticles. **Anal. Biochem.**, v. 434, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.012>.
- [32] GUO, G.; XU, S.; DU, Y.; JIANG, T.; SONG, J.; YANG, Z.; GAO, Y. Potassium cobalt hexacyanoferrate as a peroxidase mimic for electrochemical immunosensing of Lactobacillus rhamnosus GG, **Talanta**, v. 264, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124746>.
- [33] DOMÍNGUEZ-ARAGÓN, A.; ZARAGOZA-CONTRERAS, E. A.; FIGUEROA-MIRANDA, G.; OFFENHÄUSSER, A.; MAYER, D. Electrochemical Immunosensor Using Electroactive Carbon Nanohorns for Signal Amplification for the Rapid Detection of Carcinoembryonic Antigen. **Biosensors**, v. 13, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13010063>.
- [34] HUANG, J.; ZHANG, T.; ZHENG, Y.; LIU, J. Dual-Mode Sensing Platform for Cancer Antigen 15-3 Determination Based on a silica Nanochannel Array Using Electrochemiluminescence and Electrochemistry. **Biosensors**, v. 3, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13030317>.
- [35] KURUP, C. P.; MOHD-NAIM, N. F.; KEASBERRY, N. A.; ZAKARIA, S. N. A.; BANSAL, V.; AHMED, M. U.; Label-Free Electrochemiluminescence Nanosensor for the Ultrasensitive Detection of ApoA1 in Human Serum, **ACS Omega**, v. 7, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04300>.
- [36] LI, X.; LU, J.; LI, Z.; YANG, H.; LI, W.; LIU, Y.; MIAO, M. Electrochemical detection of alkaline phosphatase activity via atom transfers radical polymerization, **Bioelectrochemistry**, v. 144, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2021.1079986>.
- [37] RUDEWICZ-KOWALCZYK, D.; GRABOWSKA, I. Antibody–Ferrocene Conjugates as a Platform for Electro-Chemical Detection of Low-Density Lipoprotein. **Molecules**, v. 27, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27175492>.
- [38] GUPTA, A.; CHANSI; BASU, T. Gold Nanostructure Orchestrated Electrochemical Immunosensor Integrated with Antibody-Electroactive Probe Conjugate for Rapid Detection of SARS-CoV2 Antibody. **Eng. Proc.**, v. 35, 2023, <https://doi.org/10.3390/IECB2023-14717>.

- [39] SHIN, J. H.; YANG, H. J.; KIM, J. H.; YANG, J. C.; PARK, J.; PARK, J. P. Quantitative Label-free Determination of Thrombin Using a Chemically modified M13 Virus-electrode Interface. **Biotechnol. Bioproc. E.**, v. 28, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12257-022-0361-9>.
- [40] WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**. 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50011-8>
- [41] AKHOUNDIAN, M.; Taher ALIZADEH, T. Enzyme-free colorimetric sensor based on molecularly imprinted polymer and ninhydrin for methamphetamine detection, **Spectrochim. Acta Part A: Mol. and Biomol. Spectrosc.**, v. 285, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121866>.
- [42] HAEGER, G.; BONGAERTS, J.; SIEGERT, P. A convenient ninhydrin assay in 96-well format for amino acid-releasing enzymes using an air-stable reagent, **Analy. Biochem.**, v. 654, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114819>.
- [43] GUEDES, P. H. G.; BRUSSASCO, J. G.; MOÇO, A. C. R.; MORAES, D. D.; FLAUZINO, J. M. R.; LUZ, L. F. G.; ALMEIDA, M. T. G.; SOARES, M. N.; OLIVEIRA, R. J.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Ninhydrin as a novel DNA hybridization indicator applied to a highly reusable electrochemical genosensor for *Candida auris*, **Talanta.**, v. 34, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122694>.
- [44] MOÇO, A. C.R.; NETO, J. A. S.; MORAES, D. D. M.; GUEDES, P. H. G.; BRUSSASCO, J. G.; FLAUZINO, J. M. R.; LUZ, L. F. G.; SOARES, M. M. C. N.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Carbon ink-based electrodes modified with nanocomposite as a platform for electrochemical detection of HIV RNA, **Microchemical J.**, v. 170, 2021 <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106739>.
- [45] DUTRA, R. F.; KUBOTA, L. T. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified gold chip, **Clin. Chim. Acta.**, v. 376, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.07.029>.
- [46] FLAUZINO, J.M.R.; NGUYEN, E.P.; YANG, Q.; ROSATI, G.; PANACEK, D.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M.; BAKANDRITSOS, A.; OTYEPKA, M. A Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection, **Biosens. Bioelectron.**, v. 195, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113628>.
- [47] BAS, S. Z.; CETINER, R.; TEKEA, D.; OZMEN, M. A lab-made screen-printed sensing strip for sensitive and selective electrochemical detection of butylated hydroxyanisole, **Lab. Chip.**, v. 23, 2023. <https://doi.org/10.1039/D3LC00060E>.
- [48] LI, Y.; JIANG, Y.; MO, T.; ZHOU, H.; LI, Y.; LI, S. Highly selective dopamine

sensor based on graphene quantum dots self-assembled monolayers modified electrode, **J. Electroanal. Chem.**, v. 767, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.02.016>.

[49] TUFA, L. T.; OH, S.; TRAN, V. T.; KIM, J.; JEONG K.; PARK, T. J.; KIM H.; LEE, J. Electrochemical immunosensor using nanotriplex of graphene quantum dots, Fe₃O₄, and Ag nanoparticles for tuberculosis, **Electrochim. Acta.**, v. 290, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.09.108>.

[50] RECHENDORFF, K.; HOVGAARD, M. B.; FOSS, M.; ZHDANOV. V. P.; BESENBACHER, F. Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness, **Langmuir**, v 22, 2006. <https://doi.org/10.1021/la0621923>.

[51] MITRA, S.P. Protein Adsorption on Biomaterial Surfaces: Subsequent Conformational and Biological Consequences – A Review, **Surface Sci. Technol.**, v. 36 (1–2), 2020. <https://doi.org/10.18311/jst%2F2020%2F23282>.

[52] IBANEZ-REDIN, G.; WILSON, D.; GONÇALVES, D.; OLIVEIRA, O. N. Low-cost screen-printed electrodes based on electrochemically reduced graphene oxide-carbon black nanocomposites for dopamine, epinephrine, and paracetamol detection. **J.Colloid and Interface Sci.**, v. 515, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.12.085>

[53] CARVALHO, J. H. S.; GOGOLA, J.L.; BERGAMINI, M.F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; JANEGITZ, B.C. Disposable and low-cost lab-made screen-printed electrodes for voltammetric determination of L-dopa. **Sens. Actuators Rep.** v. 3, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100056>.

[54] TUTEJA, S.K.; CHEN, R.; KUKKAR, M.; SONG, C.K.; MUTREJA, R.; SINGH, S.; PAUL, AK.; LEE, H.; KIM, KH.; DEEP, A.; SURI, CR. A label-free electrochemical immunosensor for the detection of cardiac marker using graphene quantum dots (GQDs). **Biosens. Bioelectron.**, v. 86, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.052>.

[55] GIAROLA, J.F.; SOUTO, D.E.P.; KUBOTA, L.T. Evaluation of PAMAM Dendrimers (G3, G4, and G5) in the Construction of a SPR-based Immunosensor for Cardiac Troponin T. **Anal. Sci.**, v. 10, 2021. <https://doi.org/10.2116/analsci.20P394>.

[55] CASTRO, A.C.H.; ALVES, L.M.; SIQUEIROLI, A.C.S.; MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. Label-free electrochemical immunosensor for detection of oncomarker CA125 in serum. **Microchem. J.**, v. 155, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104746>.

[57] QUALTIERE, L.F.; ANDERSON, A.G.; MEYERS, P. Effects of ionic and nonionic detergents on antigen-antibody reactions. **J Immunol.**, v.119, 1977.

Supplemental Files

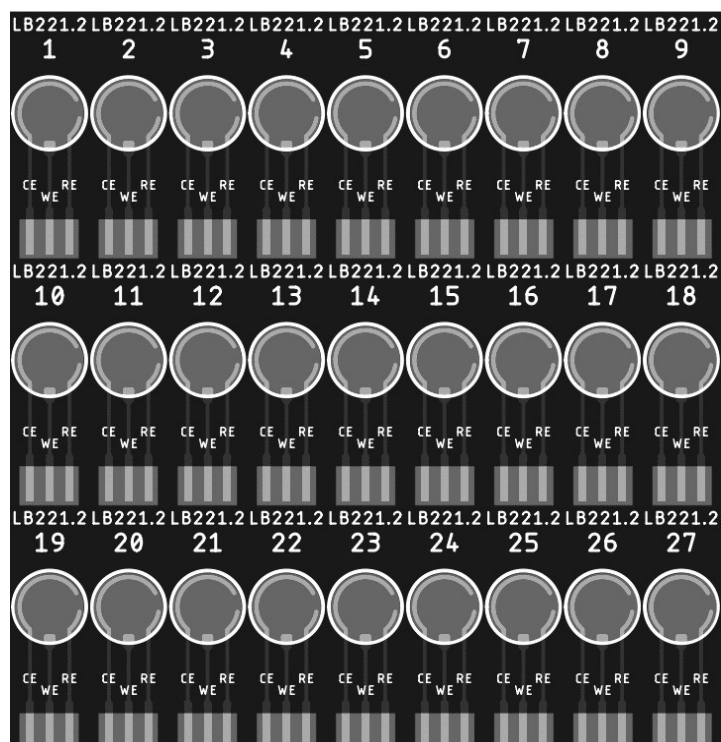
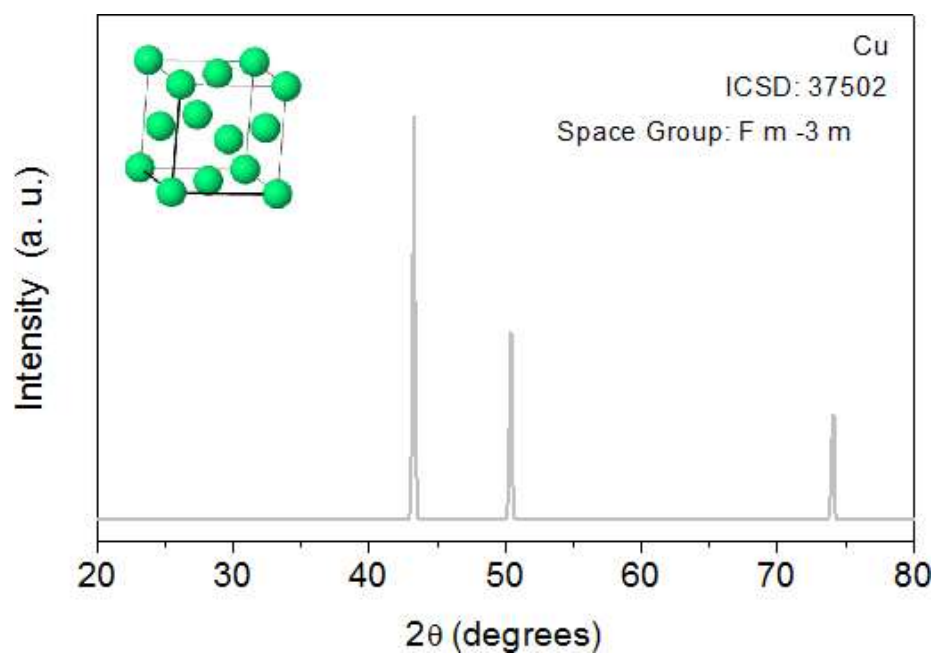


Figure S 1: Design of the pcb board

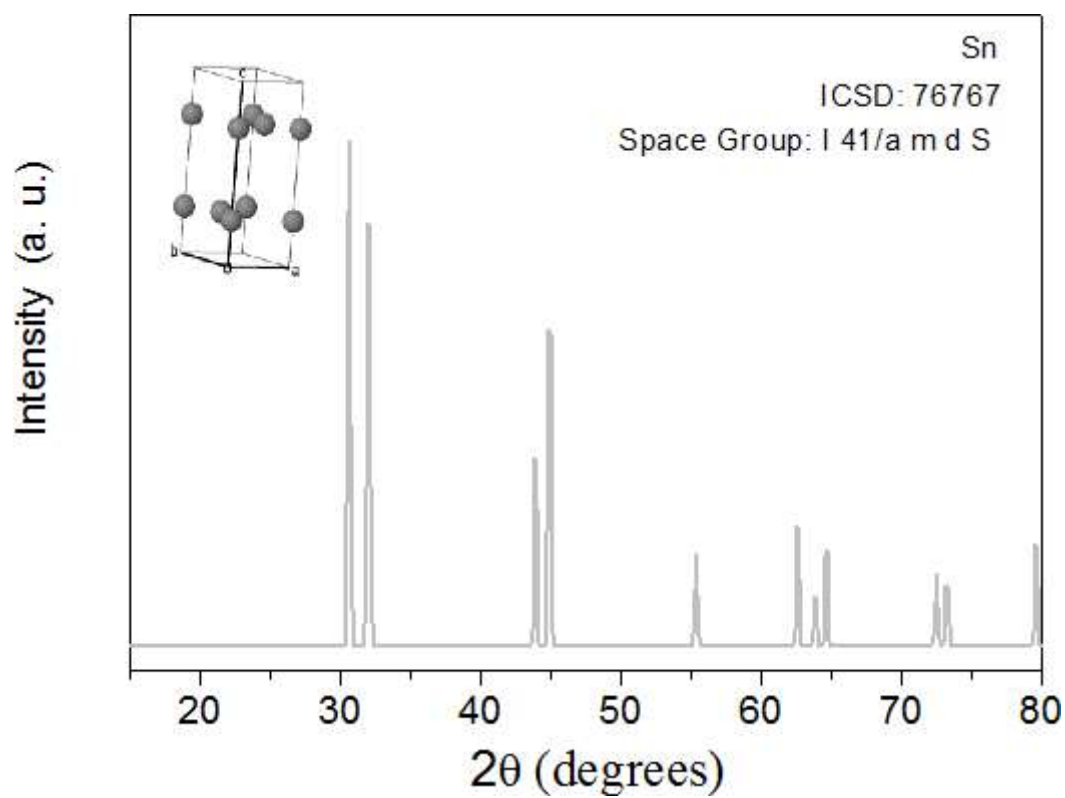


Figure S 2: CPCB-E electrode before (A) and after (B) the ink deposition.

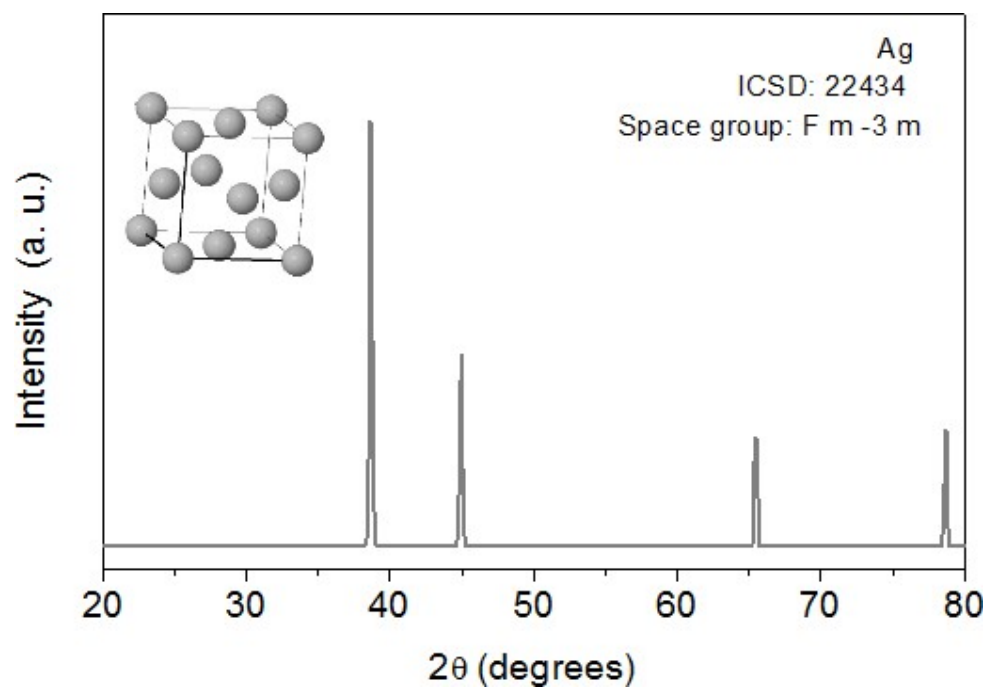
A



B



C



D

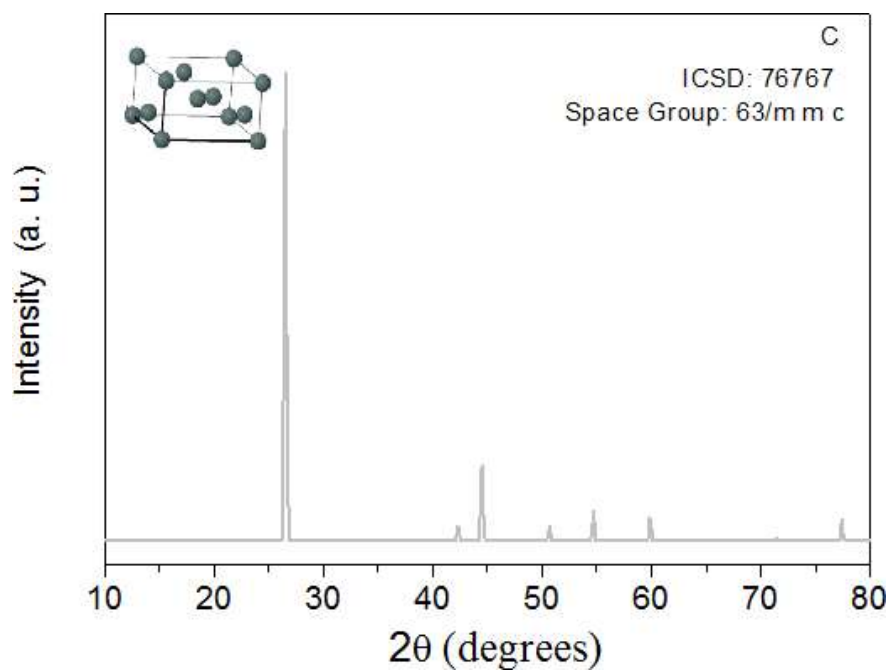


Figure S 3: XRD patterns of JCPDS cards. (A) Metallic Copper, (B) Tin, (C) Silver and (D) Carbon.