

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE CREATININA
BASEADA EM ELETRODO DE GRAFITE DE PILHA
MODIFICADO COM COBRE**

PALLOMA ASSUNÇÃO PEREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO ALVES DE SOUSA LUZ

Teresina – PI
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE CREATININA
BASEADA EM ELETRODO DE GRAFITE DE PILHA
MODIFICADO COM COBRE**

PALLOMA ASSUNÇÃO PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química
Orientador: Prof. Dr. Roberto Alves de Sousa Luz

Teresina – PI

2020

DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE CREATININA BASEADA EM ELETRODO DE GRAFITE DE PILHAS MODIFICADO COM COBRE

PALLOMA ASSUNÇÃO PEREIRA

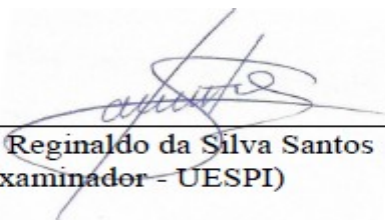
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Química

Aprovado em 11 de Setembro de 2020.

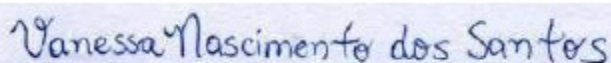
Membros da Banca:



Prof. Dr. Roberto Alves de Sousa Luz
(Presidente/Orientador – UFPI)



Prof. Dr. Reginaldo da Silva Santos
(Examinador – UESPI)



Prof. Dra. Vanessa Nascimento dos Santos
(Examinadora – UNIVASF)

Prof. Dr. José Luiz Silva Sá
(Suplente - UESPI)

Teresina – PI

2020

Aos meus pais, em especial minha MÃE, por toda dedicação e esforço na minha trajetória acadêmica. Ao meu esposo Jean, que sempre esteve ao meu lado, cuja força foi fundamental a finalização do trabalho.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, Fonte Inesgotável de Força e Amparo.
- ❖ Ao meu Professor, Orientador, Dr. Roberto Alves de Sousa Luz, pelo apoio, conhecimento compartilhado, bem como, idéias, sugestões e críticas.
- ❖ Ao Laboratório de Automontagem Supramolecular (LAS), pelo fornecimento de materiais e equipamentos que foram importantes para realização do meu trabalho
- ❖ Aos meus amigos Steffane, Samuel, Angélica, Jéssica, Elízio, Felipe, Jefferson, Julian, Lucas, Caio, Germano, Wallonilson, Iara, Geovana, Lizia, Anderson, Eliemy, Aurileide, Jamilson, Andressa, Renata, Maria, Patrícia, Tatiane, Regiane, Francisco, Julieson pela amizade, por todos os conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração e apoio.
- ❖ A amiga Steffane, agradeço pelo carinho e por toda a disposição e ajuda oferecida durante a execução da parte experimental deste trabalho.
- ❖ Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí
- ❖ Ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, Campus Petrônio Portela, que possibilitaram a realização deste trabalho
- ❖ A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação de mestrado.
- ❖ A FAPEPI e CAPES pela bolsa concedida

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

Pereira, P. A. Detecção Eletroquímica da Creatinina baseada em eletrodo de grafite de pilha modificado com cobre. 2020. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Piauí, Piauí, 2020.

RESUMO

O presente trabalho descreve pela primeira vez a fabricação de um sensor eletroquímico de creatinina baseado em eletrodo de grafite modificado com cobre a partir de baterias comuns recicláveis (GBE-Cu). O GBE-Cu foi preparado por eletrodeposição de cobre na superfície do eletrodo e apresentou elevada sensibilidade frente a oxidação da creatinina, além de alta estabilidade, seletividade e repetibilidade. O cobre foi eletrodepositado por técnicas de cronoamperometria no potencial de -0,7 V em um tempo de 100s . O eletrodo de grafite modificado com cobre, foi caracterizado por voltametria cíclica e depois utilizado para detecção eletroanalítica da creatinina, observando um aumento linear nas correntes de oxidação em função da concentração de creatinina na faixa de 26,5 mol L⁻¹ a 150,3 mol L⁻¹, com limites de detecção e quantificação de 7,73 mol L⁻¹ e 25,79 mol L⁻¹, respectivamente. Finalmente, o sensor foi aplicado para detectar creatinina em amostras de urina artificial. Este trabalho oferece uma estratégia promissora para fabricar um sensor reproduzível e de baixo custo para a detecção e quantificação da creatinina.

Palavras-chave: Eletrodeposição; grafite de pilha; creatinina; urina artificial; voltametria cíclica

Pereira, P. A. Electrochemical Detection of Creatinine based on Copper Graphite Battery Electrode. 2020. Dissertation - Graduate Program in Chemistry, State University of Piauí, Piauí, 2020.

ABSTRACT

The present work describes for the first time the manufacture of a creatinine electrochemical sensor based on copper modified graphite electrode from recyclable common batteries (GBE-Cu). GBE-Cu was prepared by electrodeposition of copper onto the graphite electrode and showed a high sensitivity toward creatinine oxidation, in addition to high stability, selectivity and repeatability. Copper was electrodeposited using chronoamperometric techniques at the potential of -0.7 V in a time of 100s. The graphite electrode modified with copper, was characterized by cyclic voltammetry and then used for electroanalytical detection of creatinine, observing a linear increase in oxidation currents as a function of the concentration of creatinine in the range of 26.5 mol L^{-1} to 150.3 mol L^{-1} , with detection and quantification limits of 7.73 mol L^{-1} and 25.79 mol L^{-1} , respectively. This work offers a promising strategy to manufacture a low-cost and reproducible sensor for the detection and quantification of creatinine.

Keywords: Electrodeposition; graphite battery; creatinine; artificial urine; cyclic voltammetry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Esquema ilustrativo da conversão de creatina em creatinina.....	18
Figura 2: Esquema ilustrativo dos componentes de um Sensor Eletroquímico.....	21
Figura 3: Esquema ilustrativo de obtenção, preparação e modificação do GBE-Cu.	29
Figura 4: . Voltamogramas cíclicos para o GBE completamente isolado (linha preta) e com a área de trabalho exposta (linha azul) em solução $K_4[Fe(CN)_6]$ 1mmol L^{-1} com KCl $0,1\text{mol L}^{-1}$ a 25 mVs^{-1}	33
Figura 5: Voltamogramas cíclicos para o GBE antes e depois da eletrodeposição de Cu, em $0,1\text{mol L}^{-1}$ PBS pH 6,0. Velocidade de varredura: 25 mV s^{-1}	34
Figura 6: A) Voltamogramas cíclicos para GBE e GBE-Cu em $0,1\text{ M}$ PBS pH 6,0 na ausência e presença de creatinina ($88,4\text{ }\mu\text{M}$) a 25mVs^{-1} . Inset: visualização ampliada dos voltamogramas para o GBE. B) Voltamogramas cíclicos para o GBE-Cu em PBS pH 6,0 com $88,4\text{ }\mu\text{M}$ de creatinina.....	36
Figura 7: Voltamogramas cíclicos para os diferentes parâmetros de eletrodeposição: A) Concentração de cobre; B) Potencial aplicado; C) Tempo de eletrodeposição e D) Efeito do pH na resposta de corrente do GBE-Cu na presença de $88,4\text{ }\mu\text{M}$ de creatinina.....	38
Figura 8: (A) Voltamogramas cíclicos para o GBE-Cu em $0,1\text{mol L}^{-1}$ PB com diferentes concentrações de creatinina a 25 mV s^{-1} (Inset: visão ampliada das correntes de pico de oxidação). (B) Curva analítica para o sensor de creatinina GBE-Cu.....	40
Figura 9: (A) 80 ciclos voltamétricos obtidos para GBE-Cu em solução de PBS $0,1\text{M}$ na presença de $88,4\text{ }\mu\text{M}$ de creatinina. (B) Voltamogramas cíclicos para cinco testes diferentes em PBS com $88,4\text{ }\mu\text{M}$ de creatinina, usando um mesmo eletrodo.....	42
Figura 10: Estudo de interferência na resposta da creatinina: (A) na presença de cada interferente (glicose, ácido ascórbico, cloreto de sódio e uréia, respectivamente); e (B) na presença de todos os interferentes ao mesmo tempo; (C) Voltamogramas cíclicos.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros avaliados para eletrodeposição do cobre.....	37
Tabela 2: Comparação entre limite de detecção, faixa linear e tipo de eletrodo utilizado na literatura, para a detecção eletroquímica da creatinina.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Ascórbico

CA - Creatinina Amidohidrolase

CI- Creatinina Amidinohidrolase

Cn – Creatinina

Cu – Cobre

E – Potencial

ECS – Eletrodo de Calomelano Saturado

GBE – Eletrodo de Grafite de Pilha

GBE-Cu – Eletrodo de Grafite de Pilha modificado com Cobre

Glu – Glicose

I – Corrente

I_{pa} – Corrente de pico anódico

I_{pc} – Corrente de pico catódico

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

PBS – *Phosphate buffer solution* (Solução tampão fosfato).

SC – Cloreto de sódio

SO - Sarcosina Oxidase

U - Uréia

vs – versus

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos geral e específicos.....	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
CAPÍTULO 2 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Creatinina.....	18
2.2 Sensores eletroquímicos para creatinina.....	21
2.3 Eletrodos de Grafite de Pilhas Comuns.....	23
2.4 Eletrodos Modificados com Cobre.....	25
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	27
3.1 Materiais e Reagentes.....	27
3.2 Preparação do Eletrodo GBE-Cu.....	27
3.3 Estudos Eletroquímicos.....	29
3.3.1 Otimização dos parâmetros de construção do GBE-Cu.....	29
3.3.2 Caracterização do GBE-Cu.....	30
3.3.3 Aplicação do GBE-Cu como sensor de creatinina.....	30
3.3.4 Sensibilidade.....	30
3.3.5 Seletividade.....	31
3.3.6 Estabilidade.....	31
3.3.7 Repetibilidade.....	32
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Área de trabalho do eletrodo.....	33
4.2 Comportamento Eletroquímico da creatinina no GBE-Cu.....	34
4.3 Parâmetros de otimização da fabricação do GBE-Cu para detecção de creatinina	37
4.4 Determinação eletroquímica da Creatinina.....	39
4.5 Estabilidade e Repetibilidade.....	41
4.6 Estudo dos interferentes e análise em amostra de urina artificial.....	43

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....45

Referências 46

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A Creatinina é o produto final do metabolismo da creatina em mamíferos (Chen, et al., 2006; Neih, et al., 2013), essa substância é produzida naturalmente no organismo e filtrada pelos rins em quantidades constantes (Han, et al., 2016). Considerada um analito químico essencial (Grabowska, et al., 2005), a creatinina é uma importante substância diagnóstica (Pandey, et al., 2018), pois sua detecção e quantificação pode ser correlacionada com vários problemas de saúde, tais como disfunção renal e muscular (Monosik et al., 2012), infarto agudo do miocárdio e no controle de pacientes que recebem hemodiálise (Serafín, et al., 2013; Wen, et al., 2014).

A concentração fisiológica de creatinina no organismo humano, varia de 40 - 150 μM (Lad et al., 2008; Isildak et al., 2012), independente dos hábitos alimentares (Chen, et al., 2012). Valores acima dessa faixa, indicam insuficiência renal, podendo levar a necessidade de diálise ou transplante quando maiores que 500 μM (Pandey, et al., 2018). Esses níveis são avaliados com base na detecção de creatinina nos fluidos biológicos, mais comumente no soro sanguíneo e na urina.

Atualmente, a maioria dos métodos de detecção existentes são baseados na eletrocatalise enzimática da creatinina e na colorimetria, através da Reação de Jaffé (Chen, et al., 2013; Walsh, et al., 2002). No entanto, esses métodos apresentam algumas desvantagens, por exemplo, as análises baseadas na ação das enzimas envolvem um elevado custo, baixa estabilidade e ensaios demorados (Yadav et al.,

2011; Pundir, et al., 2013; Tsuchida, et al., 1983), já os métodos colorimétricos são adversamente afetados por numerosos metabólitos presentes nos fluidos biológicos levando a interferência nos resultados.

A determinação da creatinina em fluidos biológicos também é possível com alguns métodos cromatográficos, porém os instrumentos necessários para a realização das análises, são dispendiosos, apresentam certa morosidade na preparação das amostras e exigem pessoas qualificadas para operá-los, não sendo adequados para análises de rotina (Pundir, et al., 2013). Com isso, os sensores eletroquímicos têm atraído muita atenção, por apresentarem vantagens práticas como simplicidade operacional, sensibilidade e seletividade (Lv, et al., 2018). Nesse sentido, diferentes tipos de eletrodos têm sido utilizados no desenvolvimento de sensores para a detecção e quantificação da creatinina, tais como, eletrodo a base de amônia (Killard, et al., 2000), ouro, carbono vítreo e eletrodos seletivos de íons (Pundir et al., 2013). Dentre eles, os eletrodos de carbono têm se destacado por serem mais econômicos e apresentarem uma ampla janela de potencial e atividade catalítica para várias reações redox (McCreery, et al., 2008). Uma fonte alternativa de grafite utilizada na produção de eletrodos são os bastões de carbono grafite encontrados em pilhas comuns de 1,5 V. Esse material apresenta uma alta pureza podendo ser utilizado com vantagens na construção de eletrodos de trabalho para sistemas eletroquímicos (Baio, et al., 2014).

Uma vez que a creatinina é conhecidamente uma espécie eletroquimicamente inativa, normalmente para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, os eletrodos utilizados são modificados com diferentes materiais sensíveis à sua presença. A creatinina apresenta várias coordenações possíveis com íons metálicos, tais como Ag(I), Hg(II), Cd(II), Zn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Pt(II) and Pd(II) (Birdsall ;

Weber, 1990; Raveendran et al.,2017). Essa propriedade tem sido utilizada para a determinação quantitativa da creatinina. Dentre os metais utilizados, o cobre se apresenta como um bom candidato para melhorar a sensibilidade na detecção de creatinina, principalmente devido sua atividade eletrocatalítica (Jagadeesan, et al., 2019; Yang, et al., 2019; Boobphahom, et al., 2019).

Desta forma, neste trabalho, nós propomos um novo sensor eletroquímico baseado em eletrodos reciclados de carbono extraído de pilhas modificados com cobre para a detecção de creatinina em amostras de urina artificial. O sensor apresentou uma faixa linear de operação de 26,5 a 150,3 μM com alta sensibilidade, seletividade e estabilidade eletroquímica. Até onde sabemos, esse é o primeiro trabalho reportando o desenvolvimento de um sensor baseado em eletrodos provenientes de pilhas comerciais que detecta creatinina em amostra de urina artificial, sendo um sistema promissor e econômico para o monitoramento não invasivo desses metabólitos.

1.1 Objetivos geral e específicos

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico baseado em eletrodos de carbono grafite provenientes de pilhas comerciais (AA) descarregadas, para detecção e quantificação de creatinina em urina sintética.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Construir e modificar a superfície dos eletrodos de carbono grafite por eletrodeposição de cobre (GBE-Cu);
- Caracterizar e otimizar eletroquimicamente os eletrodos modificados;
- Investigar o comportamento eletroquímico da creatinina por voltametria cíclica;
- Avaliar o estudo da estabilidade, sensibilidade e seletividade dos eletrodos modificados na presença da creatinina;
- Determinar os limites de detecção e quantificação;
- Aplicar do sensor na detecção de creatinina em amostras de urina sintética por voltametria cíclica

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Creatinina

A creatinina (2-amino-1-metil-2-imidazolin-4-ona) é um dos principais compostos do metabolismo muscular, e é produzida em uma taxa praticamente constante em nosso organismo (Yadav, 2012). Durante o processo de contração dos músculos, a creatina é espontaneamente convertida em creatinina (Stefan; Bokretzion, 2006). Depois de produzida, a creatinina é transportada para os rins, pelo sangue, através da filtração glomerular, e após filtrada, é eliminada na urina (Yadav, 2012) (Figura 1). Com isso, a creatinina se torna uma importante substância diagnóstica em fluidos biológicos (Soldatkin, et al., 2002). Por exemplo, monitorando os níveis de creatinina na urina e no soro sanguíneo, é possível calcular a taxa de filtração glomerular, que é um dos parâmetros utilizados em exames médicos para avaliar a função dos rins.

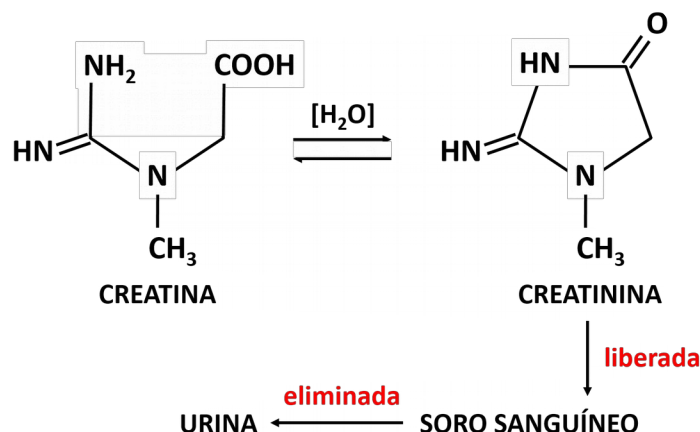


Figura 1: Esquema ilustrativo da conversão de creatina em creatinina

Os rins são órgãos fundamentais no funcionamento do corpo. Eles filtram o sangue e auxiliam na eliminação de toxinas do organismo. A doença renal crônica (DRC) leva a uma perda gradual e irreversível dessas funções comprometendo o funcionamento de outros órgãos (Junior, 2004; Bastos et al., 2010). A DRC está associada a alta taxa de morbidade e mortalidade, com grande impacto socioeconômico, se tornando um desafio de saúde pública em âmbito mundial (Aguilar et al., 2020).

Uma pesquisa que monitora a doença renal crônica no Brasil, analisou o ano de 2016 e identificou 122.825 pessoas em terapia renal substitutiva e estimou que o país gasta 1 bilhão de reais em diálise e transplante. A DRC mostra como fator associado a lesão renal e a consequente perda de função, as doenças como diabetes e hipertensão bem como, o tabagismo e o consumo de álcool. No entanto, acredita-se que a DRC, no Brasil, esteja associada a fatores de risco, como, estilo de vida não saudáveis e doenças crônicas, doenças as quais foram citadas anteriormente. (Aguilar et al., 2020).

Os níveis de concentração de creatinina no soro e na urina, indicam a eficácia do desempenho dos rins e também refletem as funções musculares, da tireóide (Tajarro, et al., 2016), renais e infarto do miocárdio (Stefan; Bokretson, 2006). A quantidade de creatinina na urina normalmente é proporcional a quantidade de creatina e fosfocreatina presente no corpo (Stefan, 2003), com isso é útil deduzir a eficiência dos rins e diagnosticar a insuficiência renal como resultado da produção de creatinina (Randviir, et al., 2013). Nesse sentido, se torna de grande importância o desenvolvimento de métodos práticos, sensíveis e baratos para monitorar os níveis de creatinina (Tiwari; Shukla, 2009).

Atualmente, a determinação analítica da creatinina nos fluidos biológicos (urina, soro ou plasma) pode ser realizada empregando-se diferentes metodologias, sendo, as mais comuns, aquelas baseadas na reação de Jaffé. Essa reação, descrita pela primeira vez em 1886 (Slot, 1965; Dunea, 1968; Lewinska et al., 2010), relata a formação de um complexo de coloração vermelha quando a creatinina reage com picrato em meio alcalino. No entanto, sabe-se que várias substâncias presentes nos fluidos biológicos também formam complexos de cor vermelha com o picrato em meio básico, interferindo diretamente na determinação da creatinina. Dentre esses interferentes, podemos citar as proteínas plasmáticas, glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, etc (Niazpour et al., 2019; Sittiwong e Unob, 2016; Ciou et al., 2020).

Outros métodos analíticos, como cromatografia líquida e espectroscopia de massa, também são empregados para a determinação de creatinina em amostras clínicas, porém são métodos morosos, que requerem equipamentos de alto custo e técnicos especializados para operá-los, não sendo adequados para análises de rotina (Sununta et al., 2018; Tseng et al., 2018). Nesse contexto, os sensores eletroquímicos apresentam-se como uma alternativa viável e interessante, devido as suas vantagens práticas, tais como simplicidade operacional, sensibilidade, seletividade e rapidez nas análises (Reddy e Gobi, 2013). No tópico a seguir, fazemos uma breve revisão sobre os sensores eletroquímicos para detecção de creatinina.

2.2 Sensores eletroquímicos para creatinina

Os sensores eletroquímicos são dispositivos que permitem coletar dados e obter informações, manuseando minimamente o sistema em estudo (Lowinsohn & Bertotti, 2006). Eles são baseados na conversão da concentração dos analitos em sinais elétricos que exibem mudanças na corrente, potencial e/ou condutividade (Naveen et al., 2017). O uso desses dispositivos na fabricação de ferramentas analíticas portáteis aumentaram nas últimas décadas, principalmente devido as suas vantagens práticas, tais como facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo, além de permitirem a obtenção de informações in situ e em tempo real (Karimi et al., 2019; Lowinsohn; bertotti, 2006). De uma forma geral, os sensores são compostos por um elemento de reconhecimento que interage especificamente com o analito de interesse; um transdutor eletroquímico que converte essa interação em um sinal mensurável; e um sistema de processamento e exibição de sinal (Figura 2).

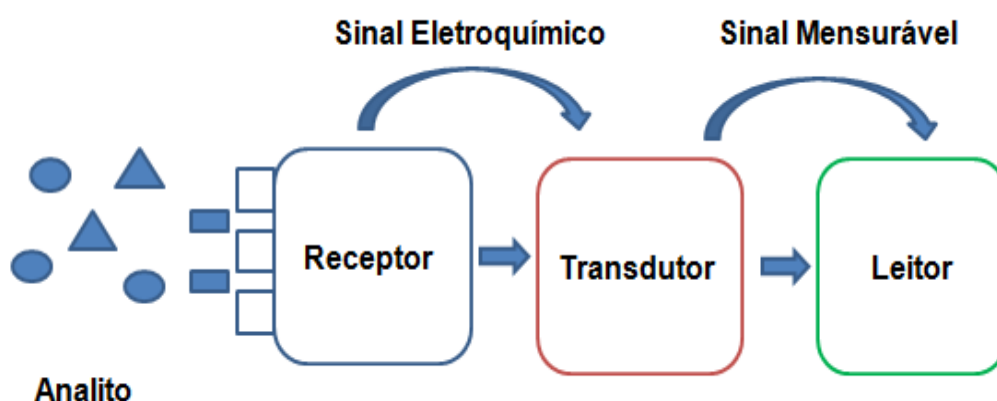


Figura 2: Esquema ilustrativo dos componentes de um Sensor Eletroquímico

O primeiro sensor para creatinina, não baseado no método de Jaffé, foi relatado em 1976 pelo grupo de Meyerhoff e consistia em um eletrodo de detecção de gás amônia (Meyerhoff and Rechnitz, 1976). O eletrodo usava uma via enzimática, em que a creatinina era hidrolisada com geração de amônia. As enzimas utilizadas no trabalho foram a Creatinina Desaminase (CD) e Glutamato Desidrogenase (GDH). Este primeiro sensor serviu de inspiração para vários outros estudos baseados na detecção indireta de creatinina, tanto por sensoriamento de amônia (Magalhães e Machado, 2002; Mascini e Palleschi, 1982), quanto por outros métodos como a detecção de pH (Zhybak et al., 2016) e o monitoramento eletroquímico da oxidação do NADH (Fossati et al., 1994).

Nos últimos anos, tem sido reportada a detecção voltamétrica de creatinina utilizando eletrodos impressos com polímeros (Diouf et al., 2017; Rao et al., 2017; Wen et al., 2014). Em princípio, os polímeros são impressos no eletrodo com tamanho e forma específicos para hospedar seletivamente a espécie de interesse. Diouf e colaboradores (2017) relataram um sensor deste tipo, onde os sítios de ligação para creatinina são gerados em uma camada de cloreto de polivinila depositada em eletrodos de ouro. Este sensor foi capaz de identificar baixa concentração de creatinina (limite de detecção de 0,016 ng/mL) sendo aplicado com sucesso em urina diluída. Porém, para amostras mais concentradas de urina, o sensor foi afetado por interferentes, o que pode limitar sua aplicação em amostras reais de fluidos biológicos. Além disso, o longo tempo necessário para todo o ensaio (de 2 a 5 h) é uma desvantagem considerável.

Exemplos similares foram demonstrados por Rao e Wen, que reportaram a detecção eletroquímica de creatinina usando eletrodos modificados com nanopartículas de níquel ou óxido de ferro, junto com polianilina (PANI) (Rao et al.,

2017; Wen et al., 2014). Em ambos os trabalhos, os sensores foram construídos utilizando eletrodos de carbono vítreo modificados com compósitos nanopartícula-PANI obtidos por eletrodeposição e aplicados na detecção de creatinina em amostras de fluidos artificiais. Novamente a grande desvantagem é o tempo necessário para preparação e aplicação do sensor (aproximadamente 3h, considerando todas as etapas de incubação, polimerização, lavagem, etc).

Outros sensores voltamétricos que também têm sido relatados, são baseados no monitoramento da creatinina por meio de sua interação seletiva com íons Cu(II), Fe(III) ou quantum dots (Raveendran et al., 2017; Kumar et al., 2017; Hooshmand and Es'haghi, 2017). Raveendran e colaboradores (2017), por exemplo, propuseram um sensor capaz de detectar indiretamente a creatinina, monitorando a atividade do complexo formado entre os íons cobre(II) e a creatinina. O sensor, construído com eletrodos impressos de carbono, apresentou uma ampla faixa linear de detecção (de 6 a 378 μM de creatinina). No entanto, a seletividade só foi alcançada após uma etapa adicional de pré-incubação da amostra com PbO_2 , o que aumenta o tempo e o custo de análise. Assim, a busca por eletrodos mais simples, que sejam sensíveis e seletivos à creatinina, se torna de grande importância para aplicações práticas. Nesse contexto, os eletrodos a base de carbono grafite são fortes candidatos. Eles apresentam uma alta reatividade eletroquímica, boa disponibilidade comercial e uma superfície de fácil modificação e renovação (Castañeda *et al.*, 2017; Rana et al., 2019; Torrinha *et al.*, 2018; Rothermel *et al.*, 2016).

2.3 Eletrodos de Grafite de Pilhas Comuns

A utilização de eletrodos a base de carbono tem se destacado em aplicações eletroanalíticas (Rana et al., 2018). Para tal finalidade, vários tipos de carbono são

empregados como eletrodos de trabalho, tais como carbono vítreo, grafite pirolítico, fibras e pasta de carbono e várias outras formas, como os nanotubos e grafenos (Baio et al., 2014). Entretanto, a maioria desses eletrodos apresentam um custo relativamente alto limitando, suas aplicações práticas. Nesse sentido, a confecção de eletrodos utilizando materiais alternativos mais econômicos e com respostas equivalentes às obtidas pelos eletrodos comerciais tem se tornado um campo cada vez mais explorado em eletroanalítica.

Uma fonte alternativa de carbono, são os cátodos de pilhas comuns de 1,5V, que são constituídos por bastões de grafite natural de alta pureza, produzindo assim um material mais econômico que pode ser utilizado com vantagens na construção de eletrodos de trabalho para sistemas eletroquímicos (Baio et al., 2014). A utilização deste tipo de material permite a preparação de sensores com tamanhos e diâmetros diferentes. O grafite obtido da pilha possibilita a modificação da sua superfície com uma enorme variedade de modificadores, que podem melhorar a seletividade e a sensibilidade (Souza, 1997) podendo ser usado em aplicações analíticas, como na detecção e quantificação de creatinina.

A modificação de eletrodos tem sido realizada usando diferentes técnicas, como, decomposição térmica, microemulsão e eletrodeposição (Matsushima et al., 2012). Dentre elas, a eletrodeposição é uma das mais utilizadas devido a sua simplicidade (Matsushima et al., 2012). O processo de eletrodeposição está associado com a formação de depósitos ou camadas do material de interesse na superfície de um eletrodo por meio de reações eletroquímicas. Os métodos de deposição de metais podem ser realizados por eletrodeposições galvanostática (mediada por corrente constante) ou potenciostática (produzida sob aplicação de um potencial constante). As características morfológicas e estruturais das camadas

depositadas podem variar de acordo com a densidade de corrente utilizada ou potencial aplicado.

Neste trabalho, utilizamos a eletrodeposição potencioestática (aplicando a técnica de cronoamperometria) para modificar a superfície dos eletrodos reciclados de grafite de pilhas comuns com depósitos de cobre. Nos últimos anos, muito autores tem apontado o cobre como um material promissor na modificação de eletrodos para detecção de creatinina, conforme descrito no tópico a seguir.

2.4 Eletrodos Modificados com Cobre

O termo EQM foi introduzido na eletroquímica por Murray em 1975, para designar os eletrodos com espécies quimicamente ativas, que são imobilizadas em sua superfície com o intuito de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução (Souza, 1996), desenvolvendo eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas (Katz et al., 1994), até a detecção e monitoramento de moléculas de interesse (Persson et al., 1990; Victor et al., 2002).

Algumas das vantagens dos EQM são a alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (Pereira, et al., 2002). Dependendo do tipo de modificação, é possível diminuir o sobrepotencial que alguns analitos requerem pra se oxidar ou reduzir, diminuindo problemas com interferentes e melhorando a estabilidade dos sensores durante as análises (Moftale; Nyokkong, 1996).

Diferentes materiais têm sido reportados para modificação de eletrodos voltados para a detecção de creatinina (Boobphahom et al., 2019). Dentre eles, os materiais de cobre têm ganhado destaque devido suas propriedades, como alta condutividade térmica e elétrica, alta área superficial específica e pela diversidade

de morfologias que pode apresentar (Wang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016). O cobre é um metal de transição que apresenta múltiplos estados de oxidação (Cu^0 , Cu^+ , Cu^{2+} e Cu^{3+}), sendo o mais estável o Cu^{2+} (Coutinho *et al.*, 2009). É reportado que os íons Cu^{2+} podem se coordenar com a creatinina formando complexos solúveis (Pugia *et al.*, 2000 ; Birdall; Weber, 1990; Garcia *et al.*, 2019). Com base nisso, diferentes autores já reportaram o uso de eletrodos modificados com cobre para detecção de creatinina, tais como eletrodo de platina (Chen; Lin ,2012), de ouro (Pedrozo *et al.*, 2020) e eletrodo impresso de carbono (Raveendran *et al.*, 2017).

Neste trabalho é descrito o uso de um sensor eletroquímico, obtido de pilha comercial, modificado com cobre, como uma alternativa simples e de baixo custo para detectar e quantificar a creatinina. Com o intuito de obter melhor resposta eletroanalítica, o eletrodo de trabalho foi otimizado. A aplicação do método foi demonstrada através da quantificação e detecção da creatinina em solução tampão fosfato(PBS) e na detecção em urina artificial, por voltametria cíclica.

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados foram de qualidade analítica. O eletrodo de carbono grafite (GBE) foi obtido de pilhas comum (AA) descarregadas. Creatinina foi adquirida da Sigma-Aldrich. Hidróxido de potássio (KOH), ácido fosfórico (H_3PO_4), cloreto de sódio (NaCl), fosfato bibásico de potássio (K_2HPO_4), fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), foram adquiridos pela Dinâmica (Brasil). A amostra de urina artificial (0,73 g NaCl, 0,40 g KCl, 0,27 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,56 g Na_2SO_4 , 0,35 g KH_2PO_4 , 0,25 g NH_4Cl e 6,25 g ureia em um balão volumétrico de 250 mL, completando-o com água deionizada) foi preparada conforme procedimento descrito por Silva e colaboradores (2015). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade 18,2 MΩ cm, purificada pelo sistema Purelab Option-Q (Elga Labwater).

3.2 Preparação do Eletrodo GBE-Cu

O eletrodo de grafite foi obtido a partir de pilhas comuns comerciais (AA) de 1,5 V descarregadas. Inicialmente foi retirado o invólucro metálico da pilha e em seguida realizada a remoção da tampa de aço do polo positivo, dando acesso ao

bastão de grafite que foi cuidadosamente removido com o auxílio de um alicate. Os demais componentes contidos na pilha foram devidamente acondicionados.

Posteriormente, o bastão de grafite obtido foi submetido a limpeza com água, seguido de um tratamento mecânico de abrasão, com lixa d'água de granulação 1200, por toda a superfície. Para delimitar a área de trabalho do eletrodo, realizou-se um processo de isolamento da parte lateral do mesmo com parafina (camada isolante hidrofóbica), de forma que apenas a extremidade do eletrodo ficasse exposta (área da base $0,126 \text{ cm}^2$). Numa etapa seguinte, a superfície exposta do eletrodo GBE foi então modificada por eletrodeposição de cobre. Para isso, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de CuSO_4 foi dissolvido em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e eletrodepositados na superfície do GBE utilizando a técnica de cronoamperometria, com um potencial de $-0,7 \text{ V}$ aplicado por 100 s à temperatura ambiente $\sim 25^\circ\text{C}$ (esses parâmetros de deposição, como concentração, potencial e tempo foram otimizados experimentalmente). Por fim, o eletrodo modificado GBE-Cu foi lavado com água ultrapura e utilizado nos estudos eletroquímicos. Na Figura 3 é apresentado um esquema ilustrativo da fabricação e modificação do GBE-Cu.

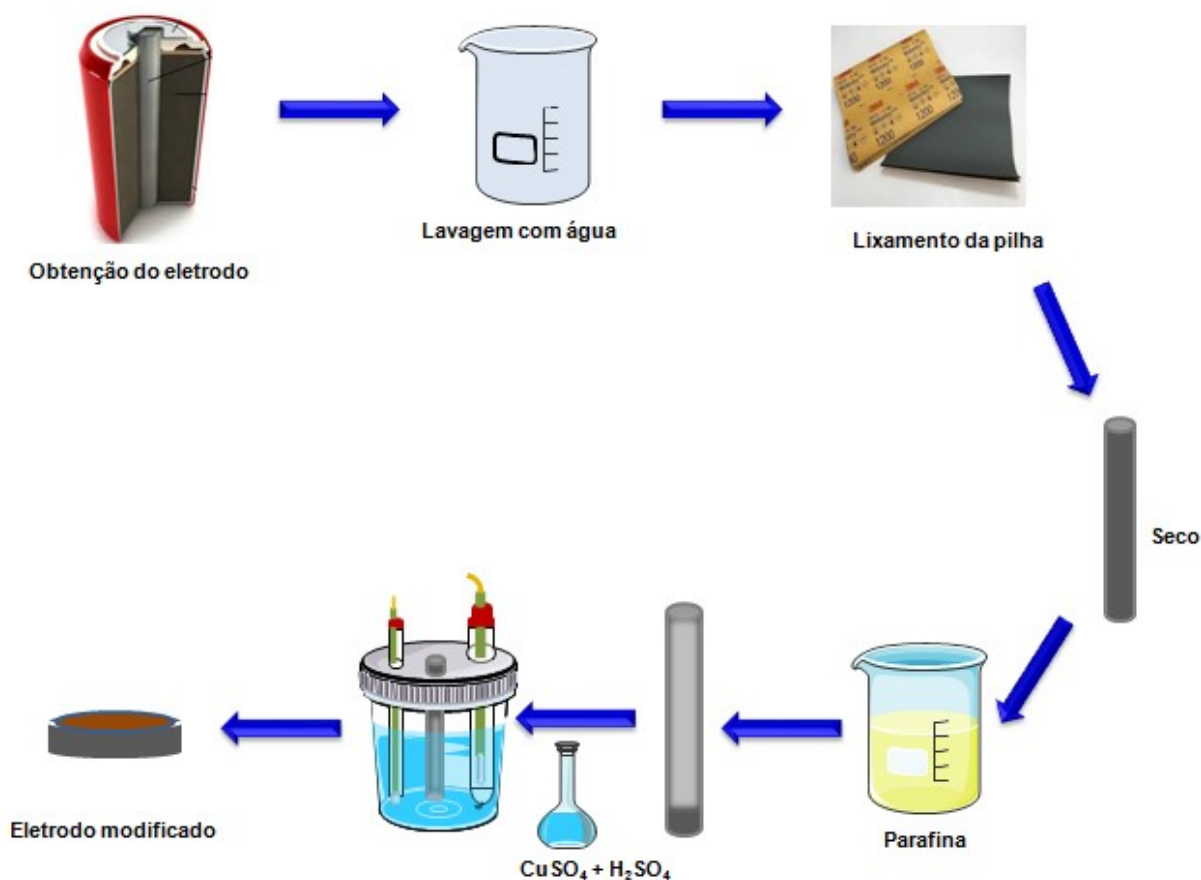


Figura 3: Esquema ilustrativo de obtenção, preparação e modificação do GBE-Cu

3.3 Estudos Eletroquímicos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/ Galvanostato Autolab PGSTAT 128N, utilizando uma célula convencional de três eletrodos: GBE ou GBE-Cu (eletrodo de trabalho); calomelano (eletrodo de referência); placa de platina (eletrodo auxiliar).

3.3.1 Otimização dos parâmetros de construção do GBE-Cu

A construção do GBE-Cu foi otimizada com base nos parâmetros de eletrodeposição de cobre. Para isso, foi utilizada a técnica de cronoamperometria,

variando o potencial aplicado ($-0,5$ a $-0,9\text{V}$), o tempo de deposição (40 a 120 s) e a concentração de CuSO_4 ($0,01$ a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Após cada etapa de eletrodeposição, os eletrodos foram submetidos a análises de voltametria cíclica na faixa de potencial de $0,35\text{V}$ a $-0,6\text{V}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $88,4 \mu\text{M}$ de creatinina.

3.3.2 Caracterização do GBE-Cu

A caracterização eletroquímica do GBE-Cu foi realizada por voltametria cíclica, na ausência e na presença ($88,4 \mu\text{M}$) de creatinina em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0. Os voltamogramas foram obtidos na faixa de potencial $0,35\text{V}$ a $-0,6\text{V}$ em diferentes velocidades de varredura (15 a 400 mVs^{-1}).

3.3.3 Aplicação do GBE-Cu como sensor de creatinina

O estudo de aplicação do GBE-Cu como sensor para creatinina foi realizado por técnica de voltametria cíclica. Os voltamogramas foram obtidos em uma faixa de potencial de $0,35\text{V}$ a $-0,6\text{V}$. A medida foi realizada em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ variando a concentração de creatinina ($26,5 \mu\text{M}$ – $150,8 \mu\text{M}$) e em seguida em urina artificial na ausência e na presença de $88,4 \mu\text{M}$ de creatinina. Todos os experimentos foram realizados em temperatura a 25°C .

3.3.4 Sensibilidade

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são parâmetros fundamentais para determinação da sensibilidade de um sensor. A sensibilidade do GBE-Cu foi determinada a partir de uma curva de calibração (corrente *versus* concentração) obtida por medidas de voltametria cíclica realizadas em triplicata com

diferentes concentrações de creatinina ($26,5 \mu\text{M}$ – $150,28\mu\text{M}$) em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de potencial de $0,35\text{V}$ a $-0,6\text{V}$. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de 25°C . Os limites de detecção e quantificação foram calculados usando as relações $\text{LD} = 3\text{SD} / \text{S}$ e $\text{LQ} = 10\text{SD} / \text{S}$, onde SD é o desvio padrão do branco e S é o coeficiente angular da curva analítica.

3.3.5 Seletividade

A seletividade do sensor, mostra como o sensor se comporta na presença de outras moléculas, que possam interferir na detecção da molécula alvo. A seletividade do GBE-Cu foi avaliada através da técnica de voltametria cíclica, em que foram obtidos voltamogramas para o GBE-Cu na presença de creatinina e dos principais interferentes orgânicos e inorgânicos (ácido ascórbico, cloreto de sódio, glicose e uréia). Os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de $0,35\text{V}$ a $-0,6\text{V}$ em solução PBS $0,1\text{M}$. A sensibilidade foi estudada pelo o aumento e a diminuição da corrente na presença dos interferentes.

3.3.6 Estabilidade

A estabilidade consiste em demonstrar a variação da resposta em função dos números de medidas que são realizadas em sequência, com intuito de obter informações sobre a capacidade prática que o sensor tem de realizar medições. A estabilidade eletroquímica do GBE-Cu foi avaliada por meio da relação entre o número de ciclos voltamétricos e as correntes faradaicas, após a obtenção de 80 voltamogramas consecutivos na faixa de potencial de $0,35\text{V}$ a $-0,6\text{V}$ a 25mV s^{-1} em solução PBS $0,1\text{mol L}^{-1}$ na presença de $88,4\mu\text{M}$ de creatinina. Todos os experimentos foram realizados na temperatura de 25°C .

3.3.7 Repetibilidade

A repetibilidade mostra a variação da resposta do sensor em função do tempo, essas medidas foram feitas para se obter informações sobre o tempo que o sensor pode ser utilizado. A repetibilidade foi avaliada por voltametria cíclica. Os voltamogramas foram obtidos em uma faixa de potencial que varia de 0,35V a -0,6V em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ com creatinina 88,4μM. Os experimentos foram realizados em temperatura de 25°C. A repetibilidade foi estimada em porcentagem pela diferença entre as correntes dos 5 eletrodos testados.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Área de trabalho do eletrodo

Para avaliar a eficiência do processo de isolamento da área lateral do eletrodo, na Figura 4 são apresentados os perfis voltamétricos do GBE completamente isolado com parafina (linha preta), e com a área da base exposta (linha azul) em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} com KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ a 25 mVs^{-1} . Para o eletrodo completamente isolado, nenhuma corrente faradaica foi observada, enquanto para o eletrodo com a área de trabalho exposta, é evidente a presença dos processos redox referente ao par $Fe(CN)_6^{3-} / Fe(CN)_6^{4-}$, demonstrando que a estratégia utilizada aqui, além de simples, permite a obtenção de eletrodos de grafite de pilhas descarregadas com uma área de trabalho bem delimitada.

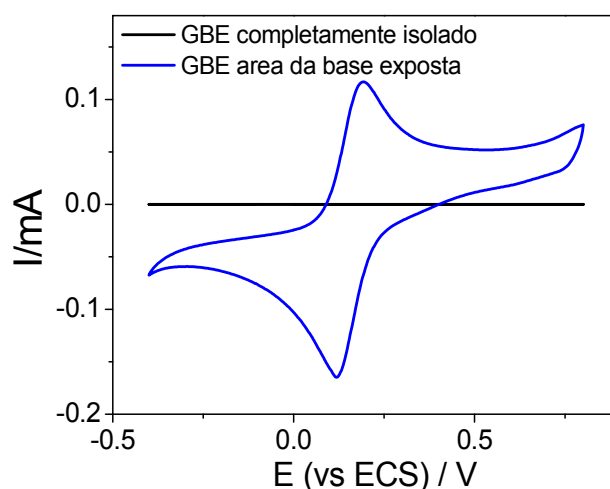


Figura 4: Voltamogramas cíclicos para o GBE completamente isolado (linha preta) e com a área de trabalho exposta (linha azul) em solução $K_4[Fe(CN)_6]$ 1 mmol L^{-1} com KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ a 25 mVs^{-1} .

4.2 Comportamento Eletroquímico da creatinina no GBE-Cu

As propriedades eletroquímicas dos eletrodos GBE e GBE-Cu foram investigadas por voltametria cíclica na faixa de 0,35 a -0,6V (vs ECS). Na Figura 5 são apresentados os voltamogramas cíclicos (CVs) obtidos para os eletrodos antes (GBE) e depois da eletrodeposição de cobre (GBE-Cu), em 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 6,0. Como pode-se observar, a eletrodeposição de cobre (linha azul) levou ao aparecimento de dois picos redox: um anódico em -0,04 V e um catódico em -0,2 V, atribuídos respectivamente à oxidação e redução do par Cu⁰/Cu(II) (Raveendran et al., 2017). Este resultado sugere que as partículas de cobre foram depositadas com sucesso na superfície do eletrodo.

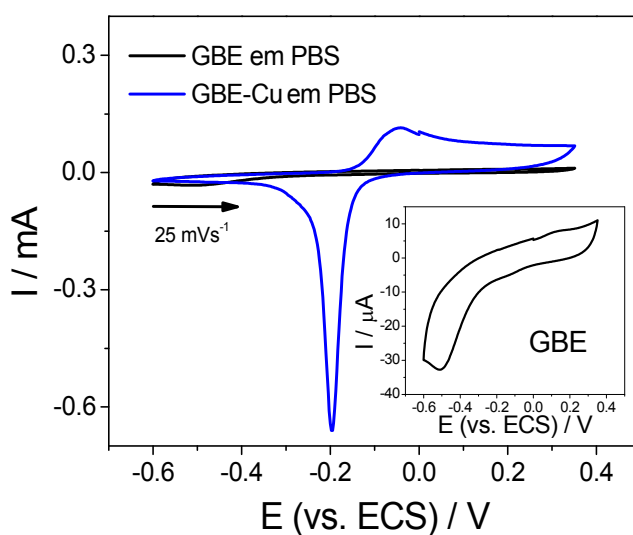


Figura 5: Voltamogramas cíclicos para o GBE antes e depois da eletrodeposição de Cu, em 0,1 mol L⁻¹ PBS Ph 6,0. Velocidade de varredura: 25 mVs⁻¹.

Na sequência, o comportamento eletroquímico do GBE-Cu foi avaliado na ausência e na presença de creatinina (Cn). Como esperado, os voltamogramas para o GBE sem modificação, não apresentaram corrente faradaica na presença ou ausência de creatinina (*inset* Figura 6A), confirmando que este eletrodo não possui propriedades catalíticas específicas nem mecanismos de detecção indireta para este analito. Por outro lado, para o GBE-Cu na presença de 88,4 μM de creatinina (Figura 6A, curva rosa), observou-se um aumento na corrente do pico de oxidação, e uma pequena diminuição na corrente catódica. É proposto que os íons Cu(II) formados durante a oxidação eletroquímica na superfície do eletrodo são quelados pela creatinina formando um complexo solúvel. Neste caso, o aumento da corrente de pico pode ser atribuído a dissolução do cobre na forma do complexo cobre-creatinina. Com isso, novas “camadas” de cobre serão expostas na superfície do eletrodo, aumentando a quantidade de Cu disponível para sofrer oxidação (Chen et al., 2012; Raveendran et al., 2017). Comportamento semelhante foi observado anteriormente para eletrodos de carbono impressos modificados por cobre (SPCE) (Raveendran et al., 2017). Portanto, a sensibilidade deste novo sistema de detecção é baseada na capacidade quelante entre a creatinina e o cobre, e não necessariamente no comportamento redox da própria creatinina.

O efeito da taxa de varredura nas correntes de pico pode ser usado para explorar informações valiosas sobre o comportamento eletroquímico da creatinina no GBE-Cu em PBS. Nesse sentido, voltamogramas foram registrados no GBE-Cu em 0,1mol L^{-1} PBS contendo 88,4 μM de creatinina em diferentes velocidades de varredura, de 15 a 400 mVs^{-1} (Figura 6B). Como pode ser observado, as correntes de pico aumentaram linearmente em função da raiz quadrada da velocidade de

varredura, indicando que o processo redox é controlado por difusão, provavelmente relacionado ao complexo solúvel cobre-creatinina.

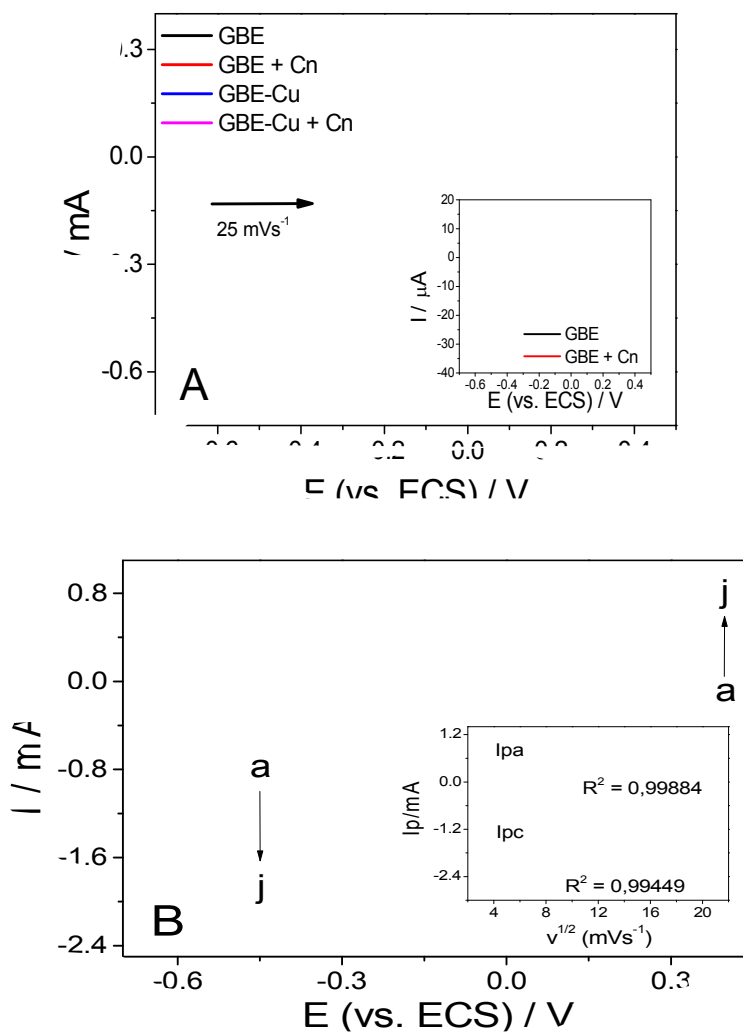


Figura 6: A) Voltamogramas cíclicos para GBE e GBE-Cu em 0,1 mol L⁻¹ PBS pH 6,0 na ausência e presença de creatinina (88,4 μM) a 25mVs⁻¹. Inset: visualização ampliada dos voltamogramas para o GBE. B) Voltamogramas cíclicos para o GBE-Cu em PBS pH 6,0 com 88,4 μM de creatinina em diferentes velocidades de varredura

4.3 Parâmetros de otimização da fabricação do GBE-Cu para detecção de creatinina

Afim de se obter as melhores condições para a detecção de creatinina, alguns parâmetros de construção do GBE-Cu foram otimizados. Para isso, um estudo cronoamperométrico foi realizado, variando a concentração de CuSO_4 , o potencial aplicado e tempo de deposição, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros avaliados para eletrodeposição do cobre.

Parâmetros	Variação
Concentração de cobre	$0,01 \text{ mol L}^{-1} - 0,2 \text{ mol L}^{-1}$
Potencial aplicado	$-0,5 \text{ V} - (-0,9 \text{ V})$
Tempo de deposição	$40 \text{ s} - 120 \text{ s}$

Inicialmente, a concentração de CuSO_4 disperso em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 foi variada entre $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Após as eletrodeposições em cada concentração, os eletrodos foram lavados com água deionizada e seus respectivos voltamogramas foram registrados em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS contendo $88,4 \text{ } \mu\text{M}$ de creatinina. Analisando os voltamogramas na Figura 7A, é possível observar que o GBE-Cu, preparado com $0,1 \text{ M}$ de Cu(II) , apresentou o maior pico de corrente de oxidação, quando comparado às demais concentrações avaliadas. Portanto, essa concentração de CuSO_4 ($0,1 \text{ M}$) foi utilizada nos demais experimentos.

Após otimizar a concentração de cobre, o potencial aplicado (de $-0,5$ a $-0,9 \text{ V}$) e o tempo de deposição (de 40 a 120 s) foram investigados. Com base nos voltamogramas das Figuras 7B e 7C, foram observados melhores resultados para

os eletrodos GBE-Cu preparados pela aplicação de $-0,7$ V por 100 s. Portanto, essas foram as condições otimizadas utilizadas neste trabalho para a fabricação de GBE-Cu para detecção eletroquímica de creatinina.

Em uma etapa seguinte, o efeito do pH na resposta do GBE-Cu à presença de creatinina foi investigado variando o pH de 5,0 a 8,0. Na Figura 7D são apresentados os voltamogramas obtidos para GBE-Cu em PBS 0,1 M com $88,4 \mu\text{M}$ de creatinina nos diferentes pHs e as maiores correntes de pico aparecem em pH 6,0 (*inset* Figura 7D). Os pKas da creatinina são 4,8 e 9,2, respectivamente, dessa forma a creatinina pode se tornar carregada positivamente em soluções ácidas, diminuindo seu comportamento quelante (Chen et al., 2012). Além disso, o pH da urina varia de 6 a 7, portanto, escolhemos o pH 6,0 como a condição ideal para a detecção da creatinina.

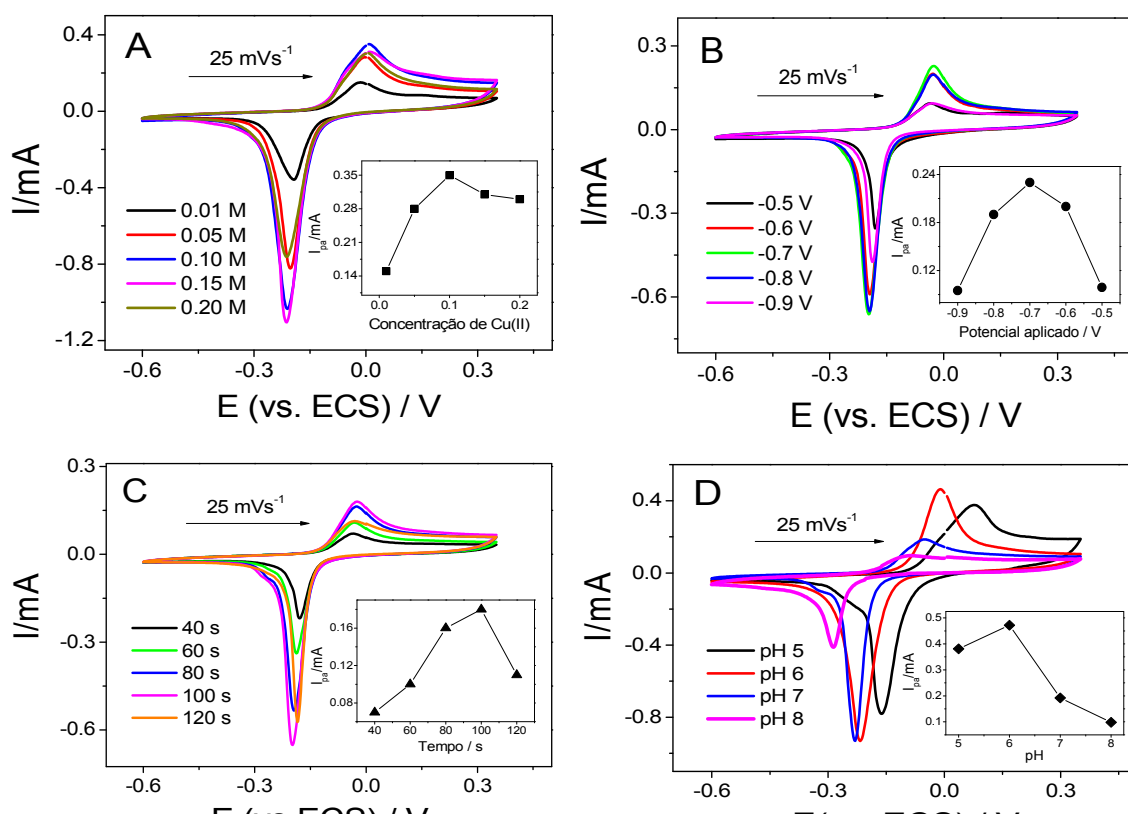


Figura 7: Voltamogramas cíclicos para os diferentes parâmetros de eletrodeposição: A) Concentração de cobre; B) Potencial aplicado; C) Tempo de eletrodeposição e D) Efeito do pH na resposta de corrente do GBE-Cu na presença de $88,4 \mu\text{M}$ de creatinina.

4.4 Determinação eletroquímica da Creatinina

Após a otimização das principais condições operacionais, a detecção eletroquímica de creatinina no eletrodo GBE-Cu foi realizada utilizando voltametria cíclica. Os experimentos foram realizados em triplicata, na faixa de -0,60V a 0,35V na velocidade de 25mV s^{-1} . Na Figura 8A, é possível observar que as correntes de oxidação aumentam linearmente com o aumento da concentração de creatinina na faixa de 26,5 a 150,3 μM , com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9979. Esse intervalo é adequado para a análise de amostras diluídas de urina, bem como de soro sanguíneo (40 -150 μM). O mecanismo de detecção da creatinina sugere que o cobre oxidado eletroquimicamente na superfície do eletrodo se combine com a creatinina para formar um complexo solúvel. Com a dissolução gradual do complexo cobre-creatinina na superfície do GBE-Cu, mais cobre é exposto, proporcionalmente à concentração de creatinina, e dessa forma, uma maior quantidade de cobre irá se oxidar, aumentando as correntes de oxidação (Raveendran et al.,2017). Com base na curva de calibração apresentada na Figura 8B, estimamos os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) em torno de 7,73 μM e 25,79 μM , respectivamente.

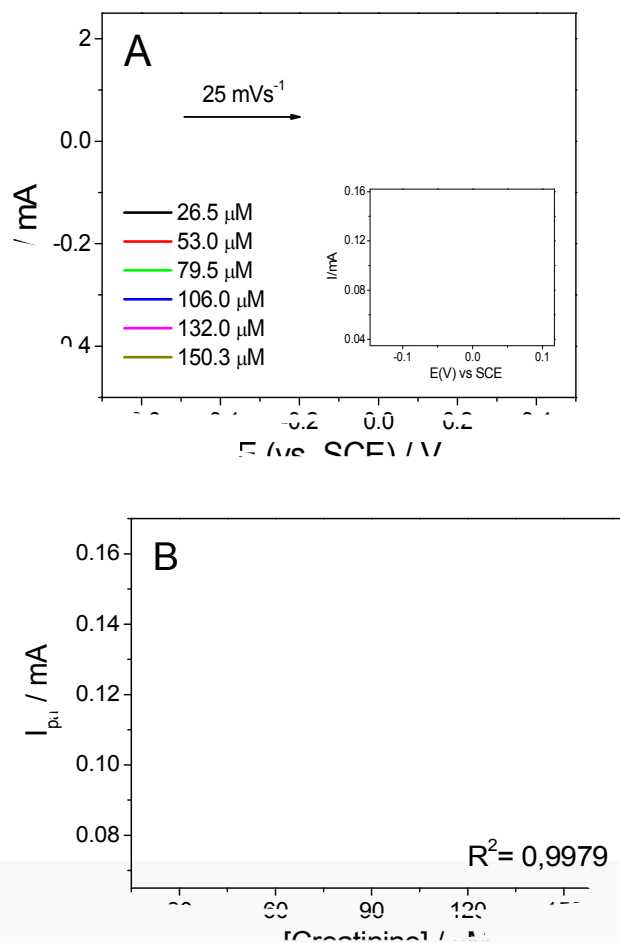


Figura 8: (A) Voltamogramas cíclicos para o GBE-Cu em 0,1 mol L⁻¹ PB com diferentes concentrações de creatinina a 25 mV s⁻¹ (Inset: visão ampliada das correntes de pico de oxidação). (B) Curva analítica para o sensor de creatinina GBE-Cu.

A Tabela 2 resume o desempenho analítico do GBE-Cu e fornece uma comparação com outras publicações sobre sensores de creatinina. O GBE-Cu apresentado neste trabalho, possui um limite de detecção próximo ou melhor, em comparação a outros sensores já reportados na literatura, com uma preparação experimental mais simples e com baixo custo efetivo, uma vez que o sensor é baseado em pilhas comuns recicláveis. Além disso, as análises podem ser

realizadas em uma acidez próxima do meio biológico, o que indica menos interferências e maior precisão na determinação da creatinina.

Tabela 2: Comparação entre limite de detecção, faixa linear e tipo de eletrodo utilizado na literatura, para a detecção eletroquímica da creatinina.

LOD	Faixa linear	Eletrodo	Referências
8.6 μ M	0,37mM - 3,6mM	Eletrodo impresso de carbono preanodizado.	[4]
12 μ M	12 μ M - 500 μ M	Eletrodo de carbono vítreo modificado com PVI[Fe(CN) ₅]	[5]
4.5 μ M	0 - 500 μ M	Eletrodo de platina modificado com as enzimas creatininase, creatinase e sarcosine oxidase (SO) utilizando albumina de soro bovino (BSA) e glutaraldeído (GA)	[21]
7.73 μ M	26.5 μ M -150.3 μ M	GBE-Cu	Este trabalho

4.5 Estabilidade e Repetibilidade

A estabilidade do eletrodo foi testada submetendo o GBE-Cu a vários ciclos voltamétricos consecutivos em PBS pH 6,0 com 88,4 μ M de creatinina. Como pode ser visto na Figura 9A, nenhum deslocamento de potencial foi observado e, mesmo após 80 ciclos, as correntes farádicas diminuíram em menos de 6%, indicando uma alta estabilidade eletroquímica do sistema. A repetibilidade do GBE-Cu na detecção de creatinina, foi avaliada por experimentos de voltametria cíclica para cinco diferentes testes, usando um mesmo eletrodo. Em todos os testes realizados foram observadas praticamente as mesmas intensidades de correntes (Figura 9B), com uma variação de apenas 6,4% entre as medidas, demonstrando assim que o eletrodo apresenta boa repetibilidade na detecção de creatinina.

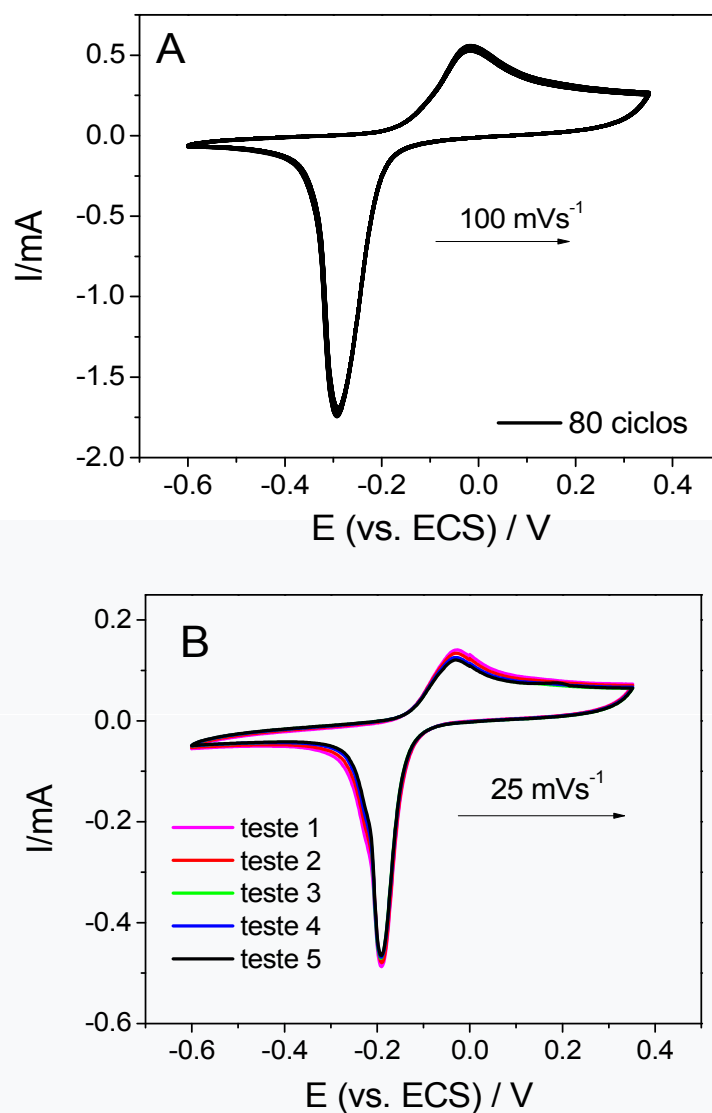
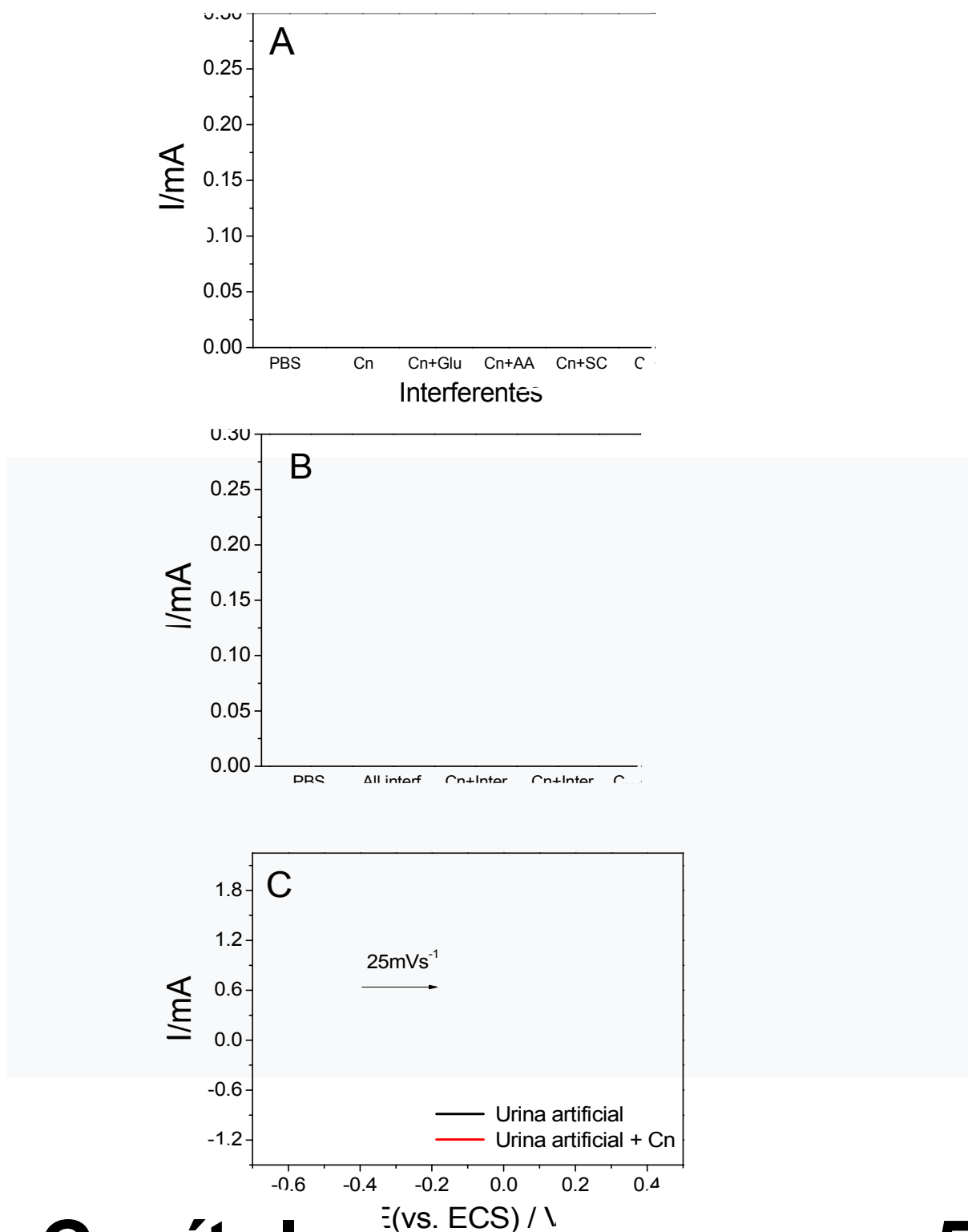


Figura 9: (A) 80 ciclos voltamétricos obtidos para GBE-Cu em solução de PBS 0,1M na presença de 88,4 μM de creatinina. (B) Voltamogramas cíclicos para seis testes diferentes em PBS com 88,4 μM de creatinina, usando um mesmo eletrodo.

4.6 Estudo dos interferentes e análise em amostra de urina artificial

Para aplicações práticas, não apenas a sensibilidade do eletrodo deve ser levada em consideração, mas também a seletividade. A Figura 10A apresenta as correntes de oxidação obtidas para GBE-Cu em PBS pH 6,0 após a adição de 88,4 μM de cada uma das espécies comumente interferentes (glicose - Glu, ácido ascórbico - AA, cloreto de sódio - SC e ureia - U) na presença de 88,4 μM de creatinina. Observa-se que os interferentes em questão não tiveram influência significativa na detecção de creatinina, uma vez que a corrente do pico de oxidação é apenas levemente afetada pelas espécies interferentes. A porcentagem de interferência de cada molécula testada na resposta da creatinina foi de 3,4%, 6,4%, 5,9% e 1,5%, respectivamente. Além disso, na Figura 10B, é possível observar que mesmo na presença de todos os interferentes (Glu, AA, SC e U) ao mesmo tempo no meio eletrolítico, a adição consecutiva de 88,4 μM de creatinina promove um aumento linear na corrente do pico de oxidação. Assim, o eletrodo fornece seletividade e sensibilidade suficientes para uma aplicação prática.

Como prova de conceito, o eletrodo GBE-Cu foi usado com sucesso para detectar creatinina em uma amostra de urina artificial. Como pode ser visto na Figura 10C, o eletrodo foi sensível à presença de creatinina com um aumento nas correntes de oxidação semelhante ao observado nos testes em PBS, mostrando que o eletrodo é promissor para aplicações práticas na detecção de creatinina em urina.



Capítulo

5

Figura 10: Estudo de interferência na resposta da creatinina: (A) na presença de cada interferente (glicose, ácido ascórbico, cloreto de sódio e uréia, respectivamente); e (B) na presença de todos os interferentes ao mesmo tempo; (C) Voltamogramas cíclicos na amostra de urina artificial na ausência e na presença da creatinina

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez a fabricação e aplicação de um sensor eletroquímico reprodutível e de baixo custo à base de carbono grafite de pilhas comuns descarregadas, na determinação eletroquímica de creatinina em urina artificial. O eletrodo GBE-Cu obtido apresentou bom desempenho de repetibilidade na detecção de creatinina, com limites de detecção e quantificação de 7,73 μM e 25,79 μM , respectivamente. Além disso, foram observadas alta estabilidade eletroquímica e seletividade na presença dos principais interferentes, tornando o eletrodo desenvolvido um forte candidato para aplicações práticas na detecção e quantificação de creatinina em amostras de urina.

REFERÊNCIAS

Aguiar, L. K. de, Prado, R. R., Gazzinelli, A., & Malta, D. C. (2020). Fatores associados à doença renal crônica: inquérito epidemiológico da Pesquisa Nacional de Saúde. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 23. doi:10.1590/1980-549720200044

Anirudhan, T. S., Deepa, J. R., & Stanly, N. (2019). Fabrication of a molecularly imprinted silylated graphene oxide polymer for sensing and quantification of creatinine in blood and urine samples. *Applied Surface Science*, 466, 28–39. doi:10.1016/j.apsusc.2018.10.001

Baio, J. A. F., Ramos, L. A., & Cavaleiro, E. T. G. (2014). Construção de eletrodo de grafite retirado de pilha comum: Aplicações didáticas. *Química Nova*, 37(6), 1078–1084. doi.org/10.5935/0100-4042.20140151

Bastos, M. G., Bregman, R., & Kirsztajn, G. M. (2010). Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 56(2), 248–253. doi:10.1590/s0104-42302010000200028

Birdsall, W. J., & Weber, B. A. (1990). Copper(I) and copper(II) complexes of creatinine. *Journal of Coordination Chemistry*, 22(3), 205–208. doi.org/10.1080/00958979009408216

Boobphahom, S., Ruecha, N., Rodthongkum, N., Chailapakul, O., & Remcho, V. T. (2019). A copper oxide-ionic liquid/reduced graphene oxide composite sensor enabled by digital dispensing: non-enzymatic paper-based microfluidic determination of creatinine in human blood serum. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2019.07.029

Cánovas, R., Cuartero, M., & Crespo, G. A. (2019). Modern Creatinine (Bio)Sensing: Challenges of Point-Of-Care Biosensing Platforms. *Biosensors and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2019.01.048

Castañeda, Locksley F. et al. (2017). Graphite felt as a versatile electrode material: Properties, reaction environment, performance and applications. *Electrochimica Acta*, v. 258, p. 1115–1139, doi.org/10.1016/j.electacta.2017.11.165

Chen, C. H., & Lin, M. S. (2012). A novel structural specific creatinine sensing scheme for the determination of the urine creatinine. *Biosensors and Bioelectronics*, 31(1), 90–94. doi.org/10.1016/j.bios.2011.09.043

Chen, J. C., Kumar, A. S., Chung, H. H., Chien, S. H., Kuo, M. C., & Zen, J. M. (2006). An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 115(1), 473–480. doi.org/10.1016/j.snb.2005.10.015

Chen, P., Peng, Y., He, M., Yan, X. C., Zhang, Y., & Liu, Y. N. (2013). Sensitive electrochemical detection of creatinine at disposable Screen-Printed carbon electrode mixed with ferrocenemethanol. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(7), 8931–8939.

Ciou, D.-S., Wu, P.-H., Huang, Y.-C., Yang, M.-C., Lee, S.-Y., & Lin, C.-Y. (2020). Colorimetric and amperometric detection of urine creatinine based on the ABTS radical cation modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 128034. doi:10.1016/j.snb.2020.128034

Coutinho, C. F. B., Coutinho, L. F. M., & Mazo, L. H. (2009). Estudo do comportamento eletroquímico de substâncias complexantes utilizando eletrodo de cobre. *Química Nova*, 32(1), 228–233. doi:10.1590/s0100-40422009000100038

Debnath, M., Chatterjee, J., & Biswas, K. (2020). Development of a Disposable Blood Creatinine Sensor. 2020 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC). doi:10.1109/i2mtc43012.2020.9129506

Diouf, A., Motia, S., El Alami El Hassani, N., El Bari, N., & Bouchikhi, B. (2017). Development and characterization of an electrochemical biosensor for creatinine detection in human urine based on functional molecularly imprinted polymer. *Journal*

of Electroanalytical Chemistry, 788, 44–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.01.06>

Dunea, G. (1968). Serum Creatinine. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 204(2), 163. doi:10.1001/jama.1968.03140150067018

Fossati, P., Ponti, M., Possani, G., Tarengi, G., Melzid'eril, G. V., Prencipe, L. (1994). A step forward in enzymatic measurement of creatinine. *Clinical Chemistry*, (40)1, 130 – 137. doi.org/10.1093/clinchem/40.1.130

Garcia-Barajas, M., Trejo-Dominguez, A. M., Ledesma-Garcia, J., Arriaga, L. G., Contreras, L. A., Galindo-de-la-Rosa, J., ... Guerra-Balcazar, M. (2019). CuAg electrode for creatinine microfluidic fuel cell based self-powered electrochemical sensor. 2019 19th International Conference on Micro and Nanotechnology for Power Generation and Energy Conversion Applications (PowerMEMS). doi:10.1109/powermems49317.2019.6154740

Grabowska, I., Chudy, M., Dybko, A., & Brzozka, Z. (2005). Determination of creatinine in clinical samples based on flow-through microsystem. *Analytica Chemistry Acta*, 540(1), 181–185. doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.021

Han, P., Xu, S., Feng, S., Hao, Y., & Wang, J. (2016). Direct determination of creatinine based on poly(ethyleneimine)/phosphotungstic acid multilayer modified electrode. *Talanta*, 151, 114–118. doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.017

Hooshmand, S., & Es'haghi, Z. (2017). Microfabricated disposable nanosensor based on CdSe quantum dot/ionic liquid-mediated hollow fiber-pencil graphite electrode for simultaneous electrochemical quantification of uric acid and creatinine in human samples. *Analytica Chimica Acta*, 972, 28–37. doi:10.1016/j.aca.2017.04.035

Isildak, I., Cubuk, O., Altikatoglu, M., Yolcu, M., Erci, V., & Tinkilic, N. (2012). A novel conductometric creatinine biosensor based on sensitive to solid state contact

ammonium PVC-NH membrane.

Biochemical Engineering Magazine, 34-38. doi.org/10.1016/j.bej.2011.10.013

Jagadeesan, M. S., Movlaee, K., Krishnakumar, T., Leonardi, S. G., & Neri, G. (2019). One-step microwave-assisted synthesis and characterization of novel CuO nanodisks for non-enzymatic glucose sensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. doi:10.1016/j.jelechem.2019.01.024

Karimi-Maleh, H., Karimi, F., Alizadeh, M., & Sanati, A. L. (2019). Electrochemical Sensors, a Bright Future in the Fabrication of Portable Kits in Analytical Systems. *The Chemical Record*. doi:10.1002/tcr.201900092

Katz, E., Lötzbeyer, T., Schlereth, D. D., Schuhmann, W., & Schmidt, H.-L. (1994). Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at gold and platinum electrode surfaces modified with a monolayer of pyrroloquinoline quinone. Effect of Ca^{2+} cations. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 373(1-2), 189–200. doi:10.1016/0022-0728(94)03328-5

Killard, A. J., & Smyth, M. R. (2000). Creatinine biosensors: principles and designs. *Trends in Biotechnology*, 18(10), 433–437. doi:10.1016/s0167-7799(00)01491-8

Kumar, P., Jaiwal, R., & Pundir, C. S. (2017). An amperometric amperometric biosensor based on nanoparticles of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 537, 41-49, doi: 10.1016/j.ab.2017.08.022

Kumar, P., Kamboj, M., Jaiwal, R., & Pundir, C. S. (2019). Fabrication of an improved amperometric creatinine biosensor based on enzymes nanoparticles bound to Au electrode. *Biomarkers*, 1–30. doi:10.1080/1354750x.2019.1682045

Lad, U., Khokhar, S., & Kale, G. M. (2008). Electrochemical Creatinine Biosensors. *Analytical Chemistry*, 80(21), 7910–7917. doi:10.1021/ac801500t

Lewińska, I., Tymecki, Ł., & Michalec, M. (2019). An alternative, single-point method for creatinine determination in urine samples with optoelectronic detector. *Critical*

comparison to Jaffé method. *Talanta*, 195, 865–869. doi:10.1016/j.talanta.2018.12.003

Liu, T., Fu, B., Chen, J., Yan, Z., & Li, K. (2018). A non-enzymatic electrochemical sensor for detection of sialic acid based on a porphine/graphene oxide modified electrode via indicator displacement assay. *Electrochimica Acta*, 269, 136–143. doi:10.1016/j.electacta.2018.02.132

Lowinsohn, Denise; Bertotti, Mauro. *Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments*. Quimica Nova, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006. doi.org/10.1590/s0100-40422006000600029

Lv, S., Zhang, K., Zeng, Y., & Tang, D. (2018). Double Photosystems-Based “Z-Scheme” Photoelectrochemical Sensing Mode for Ultrasensitive Detection of Disease Biomarker Accompanying Three-Dimensional DNA Walker. *Analytical Chemistry*, 90(11), 7086–7093. doi:10.1021/acs.analchem.8b01825

Mafatle, T. J., & Nyokong, T. (1996). Electrocatalytic oxidation of cysteine by molybdenum(V) phthalocyanine complexes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 408(1-2), 213–218. doi:10.1016/0022-0728(95)04519-8

Magalhães, J. M. C. S., & Machado, A. A. S. C. (2002). Array of potentiometric sensors for the analysis of creatinine in urine samples. *The Analyst*, 127(8), 1069–1075. doi:10.1039/b201173e

Mascini, M., & Palleschi, G. (1982). Determination of creatinine in clinical samples with a creatininase reactor and an ammonia probe. *Analytica Chimica Acta*, 136, 69–76. doi:10.1016/s0003-2670(01)95364-4

Matsushima, J. T., Santos, L. C. D., Couto, A. B., Baldan, M. R., Neidenêi, G. F., (2012). Influência do eletrólito na eletrodeposição de nanopartículas de Cu sobre eletrodo de diamante dopado com Boro. *Química Nova*, Vol. 35, No. 1, 11-16. doi:10.1590/S0100-40422012000100003

McCreery, R. L. (2008). Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. *Chemical Reviews*, 108(7), 2646–2687. doi:10.1021/cr068076m

Meyerhoff, M., & Rechnitz, G. A. (1976). An activated enzyme electrode for creatinine. *Analytica Chimica Acta*, 85(2), 277–285. doi:10.1016/s0003-2670(01)84692-4

Monošík, R., Stred'anský, M., & Šturdík, E. (2012). Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26(1), 22–34. doi:10.1002/jcla.20500

Moses, P. R., Wier, L., & Murray, R. W. (1975). Chemically modified tin oxide electrode. *Analytical Chemistry*, 47(12), 1882–1886. doi:10.1021/ac60362a043

Mouchrek Filho, V. E., Chierice, G. O., & Marques, A. L. B. (1999). Estudo voltamétrico do complexo de cobre(II) com o ligante vermelho de alizarina S, adsorvido na superfície do eletrodo de grafite pirolítico. *Química Nova*, 22(3), 312–314. doi.org/10.1590/s0100-40421999000300004

Naveen, M. H., Gurudatt, N. G., & Shim, Y.-B. (2017). Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: A review. *Applied Materials Today*, 9, 419–433. doi:10.1016/j.apmt.2017.09.001

Niazpour, F., Bahiraei, A., Esfahani, E. N., Abdollahi, M., Bandarian, F., & Razi, F. (2019). Comparison of glomerular filtration rate estimation using Jaffé and enzymatic creatinine assays in diabetic patients. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. doi:10.1007/s40200-019-00462-7

Nieh, C. H., Tsujimura, S., Shirai, O., & Kano, K. (2013). Amperometric biosensor based on reductive H₂O₂ detection using pentacyanoferrate-bound polymer for

creatinine determination. *Analytica Chemical Acta*, 767(1), 128–133. doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.052

Pandey, I., Bairagi, P. K., & Verma, N. (2018). Electrochemically grown polymethylene blue nanofilm on copper-carbon nanofiber nanocomposite: An electrochemical sensor for creatinine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 277, 562–570. doi:10.1016/j.snb.2018.09.036

Pannell, M. J., Doll, E. E., Labban, N., Wayu, M. B., Pollock, J. A., & Leopold, M. C. (2018). Versatile sarcosine and creatinine biosensing schemes utilizing layer-by-layer construction of carbon nanotube-chitosan composite films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 814, 20–30. doi:10.1016/j.jelechem.2018.02.023

Pedrozo-Peñafiel, M. J., López, T., Gutiérrez-Beleño, L. M., Da Costa, M. M., Larrudé, D. G., & Aucelio, R. Q. (2020). Voltammetric determination of creatinine using a gold electrode modified with Nafion mixed with graphene quantum dots-copper. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 114561. doi:10.1016/j.jelechem.2020.114561

Pereira, A. C., Santos, A. D. S., & Kubota, L. T. (2002). Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quimica Nova*, 25(6A), 1012–1021. doi.org/10.1590/s0100-40422002000600019

Persson, B. (1990). A chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide based on a phenothiazine derivative, 3- β -naphthoyl-toluidine blue O. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 287(1), 61–80. doi:10.1016/0022-0728(90)87160-I

Pugia, M. J., Lott, J. A., Wallace, J. F., Cast, T. K., & Bierbaum, L. D. (2000). Assay of creatinine using the peroxidase activity of copper-creatinine complexes. *Clinical Biochemistry*, 33(1), 63–70. doi:10.1016/s0009-9120(99)00086-7

Pundir, C. S., Kumar, P., & Jaiwal, R. (2018). Biosensing methods for determination of creatinine: a review. *Biosensors and Bioelectronics*.

doi:10.1016/j.bios.2018.11.031

Pundir, C. S., Yadav, S., & Kumar, A. (2013). Creatinine sensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 42–52. doi:10.1016/j.trac.2013.04.013

Rana, A., Baig, N., & Saleh, T. A. (2019). Electrochemically pretreated carbon electrodes and their electroanalytical applications – A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. doi:10.1016/j.jelechem.2018.12.019

Randviir, E. P., Kampouris, D. K., & Banks, C. E. (2013). An improved electrochemical creatinine detection method via a Jaffe-based procedure. *Analyst*, 138(21), 6565–6572. <https://doi.org/10.1039/c3an01431b>

Rao, H., Lu, Z., Ge, H., Liu, X., Chen, B., Zou, P., Wang, Y. (2017). Electrochemical creatinine sensor based on a glassy carbon electrode modified with a molecularly imprinted polymer and a Ni@polyaniline nanocomposite. *Microchimica Acta*, 184(1), 261–269. doi:10.1007/s00604-016-1998-x

Raveendran, J., Resmi, P. E., Ramachandran, T., Nair, B. G., & Satheesh Babu, T. G. (2017). Fabrication of a disposable non-enzymatic electrochemical creatinine sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 243, 589–595. doi.org/10.1016/j.snb.2016.11.158

Reddy, K. K., & Gobi, K. V. (2013). Artificial molecular recognition material based biosensor for creatinine by electrochemical impedance analysis. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 183, 356–363. doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.015

Romão-Junior JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J Bras Nefrol*. 2004;26(3 Suppl 1):1-3.

Rothermel, Sergej et al (2016) Graphite Recycling from Spent Lithium-Ion Batteries. *ChemSusChem*, v. 9, n. 24, p. 3473–3484, doi.org/10.1002/cssc.201601062

Serafín, V., Hernández, P., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2013). Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode. *Electrochemical Acta*, 97, 175–183. doi:10.1016/j.electacta.2013.03.005

Silva, L. P., Lourencao, B. C., & Fatibello-Filho, O. (2015). *Simultaneous voltammetric determination of amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in synthetic urine samples using a boron-doped diamond electrode*. *Química Nova*. Doi:10.5935/0100-4042.20150077

Sittiwang, J., & Unob, F. (2016). Paper-based Platform for Urinary Creatinine Detection. *Analytical Sciences*, 32(6), 639–643. doi:10.2116/analsci.32.639

Slot, C. (1965). Plasma Creatinine Determination A New and Specific Jaffe Reaction Method. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 17(4), 381–387. doi:10.3109/00365516509077065

Soldatkin, A. P., Montoriol, J., Sant, W., Martelet, C., & Jaffrezic-renault, N. (2020). Biossensor sensível à creatinina baseado em ISFETs e creatinina desiminase imobilizados na membrana da BSA. 1–12.

Souza, M. de F. B. (1997). Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. *Química Nova*, 20(2), 191–195. doi:10.1590/s0100-40421997000200011

Stefan, R. (2003). Determinação simultânea de creatina e creatinina usando biossensores amperométricos. 1–9.

Stefan, R. I., & Bokretsion, R. G. (2006). Determinação da creatina e creatinina usando um eletrodo à base de pasta de diamante. 31, 1–9.

Sununta, S., Rattanarat, P., Chailapakul, O., & Praphairaksit, N. (2018). Microfluidic Paper-based Analytical Devices for Determination of Creatinine in Urine Samples. *Analytical Sciences*, 34(1), 109–113. doi:10.2116/analsci.34.109

Tajarrood, N., Rofouei, M. K., Masteri-Farahani, M., & Zadmard, R. (2016). A quantum dot-based fluorescence sensor for sensitive and enzymeless detection of creatinine. *Analytical Methods*, 8(30), 5911–5920. doi:10.1039/c6ay01609j

Tiwari, A., & Shukla, S. K. (2009). Chitosan-g-polyaniline: a creatine amidinohydrolase immobilization matrix for creatine biosensor. *Express Polym. Lett.*, 3 (9), 553-559.

Torrinha, Álvaro et al (2018). Biosensing based on pencil graphite electrodes. *Talanta*, v. 190, n. July, p. 235–247, doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.086

Tseng, C.-C., Yang, R.-J., Ju, W.-J., & Fu, L.-M. (2018). Microfluidic paper-based platform for whole blood creatinine detection. *Chemical Engineering Journal*, 348, 117–124. doi:10.1016/j.cej.2018.04.191

Tsuchida, T., & Yoda, K. (1983). Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. *Clinical Chemistry*, 29(1), 51–55.

Walsh, D. A., & Dempsey, E. (2002). Comparison of electrochemical, electrophoretic and spectrophotometric methods for creatinine determination in biological fluids. *Analytica Chemistry Acta*, 459(2), 187–198. doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00110-1

Wang, J., & Golden, T. (1989). Permselectivity and ion-exchange properties of Eastman-AQ polymers on glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 61(13), 1397–1400. doi:10.1021/ac00188a018

WANG, Yuqin et al. (2017) Facile growth of Cu₂O hollow cubes on reduced graphene oxide with remarkable electrocatalytic performance for non-enzymatic glucose detection. *New Journal of Chemistry*, v. 41, n. 17, p. 9223–9229, doi.org/10.1039/c7nj01952a

Wen, T., Zhu, W., Xue, C., Wu, J., Han, Q., Wang, X., Jiang, H. (2014). Novel electrochemical sensing platform based on magnetic field-induced self-assembly of Fe₃O₄@Polyaniline nanoparticles for clinical detection of creatinine. *Biosensors and Bioelectronics*, 56, 180–185. doi.org/10.1016/j.bios.2014.01.013

Yadav, S. (2012). Construction and evaluation of a creatinine biosensor based on c MWCNT PANI composite film coated Pt electrode.

Yadav, S., Kumar, A., & Pundir, C. S. (2011). Amperometric creatinine biosensor based on covalently coimmobilized enzymes onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film. *Analytical Biochemistry*, 419(2), 277–283. doi.org/10.1016/j.ab.2011.07.032

Yang, P., Wang, X., Ge, C., Fu, X., Liu, X. Y., Chai, H., ... Chen, K. (2019). Fabrication of CuO nanosheets-built microtubes via Kirkendall effect for non-enzymatic glucose sensor. *Applied Surface Science*. doi:10.1016/j.apsusc.2019.07.197

ZHANG, Wenli et al (2016). Carnation-like CuO Hierarchical Nanostructures Assembled by Porous Nanosheets for Nonenzymatic Glucose Sensing. *Electroanalysis*, v. 28, n. 9, p. 2214–2221, doi.org/10.1002/elan.201600132

Zhybak, M., Beni, V., Vagin, M. Y., Dempsey, E., Turner, A. P. F., & Korpan, Y. (2016). Creatinine and urea biosensors based on a novel ammonium ion-selective

copper-polyaniline nano-composite. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 505–511. doi:10.1016/j.bios.2015.10.009

Graphical Abstract

