



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS - SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

**(BIO)SENSORES ELETROQUÍMICOS IMPRESSOS EM 3D E NOVOS
FILAMENTOS CONDUTIVOS APLICADOS À QUÍMICA ANALÍTICA**

Orientando: Me. Luiz Ricardo Guterres e Silva

Orientador: Professor Dr. Bruno Campos Janegitz

ARARAS

2024

LUIZ RICARDO GUTERRES E SILVA

**(Bio)sensores eletroquímicos impressos em 3D e novos filamentos
condutivos aplicados a química analítica**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Ciência do Materiais da
Universidade Federal de São Carlos
– Campus Sorocaba, como requisito
para o grau de Doutor em ciência
dos materiais.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz

Bolsista CAPES – Processo nº: 88887.504861/2020-00

ARARAS

2024

Silva, Luiz Ricardo Guterres E

(Bio)sensores eletroquímicos impressos em 3d e novos filamentos condutivos aplicados à química analítica / Luiz Ricardo Guterres E Silva -- 2024. 191f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Bruno Campos Janegitz

Banca Examinadora: Orlando Fatibello-Filho, Marystela Ferreira, Cecilia de Carvalho Castro Silva, Rodrigo

Amorim Bezerra Sa Silva

Bibliografia

1. (Bio)sensores eletroquímicos. 2. Manufatura aditiva. 3. Fabricação de filamentos condutivos. I. Silva, Luiz Ricardo Guterres E. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Luiz Ricardo Guterres e Silva, realizada em 23/02/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz (UFSCar)

Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho (UFSCar)

Profa. Dra. Marystela Ferreira (UFSCar)

Profa. Dra. Cecilia de Carvalho Castro e Silva (Mackenzie)

Prof. Dr. Rodrigo Amorim Bezerra da Silva (UFU)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais.

A Deus, aos meus pais e a todos que
contribuíram para que esse trabalho
fosse realizado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço infinitamente a Deus por ter me dado forças e sabedoria para seguir sempre em frente. A Ele toda honra.

Aos meus pais, meu porto seguro, por todo incentivo e dedicação.

Ao meu orientador, prof. Dr. Bruno Campos Janegitz, pela oportunidade, apoio e confiança.

A minha namorada, Dra. Jéssica Santos Stefano, por todo apoio, parceria e incentivo.

Aos meus amigos de laboratório por toda ajuda prestada.

Um agradecimento especial aos técnicos Yves e Joicy. Ao trabalho impecável e ajudas, as “tias” da limpeza, por sempre manterem o laboratório limpo e agradável.

Aos artigos e diversos trabalhos usados como referências, por todo conteúdo e facilitarem minha vida, em especial aos artigos que apareceram na primeira página de busca.

Ao órgão de fomento CAPES pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

“A vida não merece que a gente se
preocupe tanto.”
Curie, Marie.

Resumo

Os sensores eletroquímicos podem ser empregados para os mais diversos fins de detecção e a modificação destes com compostos biológicos permite a obtenção de biossensores com seletividade para analitos como os vírus. Além disso, a manufatura de sensores eletroquímicos visando a miniaturização e custo reduzido é de suma importância para produzir plataformas analíticas eficientes. Diante disso, a tecnologia de impressão 3D permite a produção de sensores a partir de filamentos condutivos de forma rápida, descentralizada e miniaturizados. Assim, a presente tese apresenta a fabricação de filamentos condutivos e (bio)sensores 3D a partir dos filamentos feito em laboratório e comerciais para detecção de biomarcadores e os vírus SARS-CoV-2 e varíola dos macacos (MKPV). Todos os materiais e sensores desenvolvidos foram caracterizados por técnicas morfológicas, físico-químicas e eletroquímicas. Os (bio)sensores para creatinina e cDNA do SARS-CoV-2 apresentaram um limite de detecção (LD) de 15,0 e 0,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os sensores produzidos a partir dos novos filamentos (grafite e *carbon black*) apresentaram características eletroquímicas satisfatórias quando comparados a sensores produzidos com filamentos comerciais. A aplicação dos (bio)sensores 3D a base de grafite para determinação de ácido úrico e proteína S1 do SARS-CoV-2 apresentaram valores de LD de 0,07 e 1,36 nmol L^{-1} , respectivamente. O biossensor a base de *carbon black* indicou um LD de 2,7 pmol L^{-1} para proteína S1. Para a detecção do MKPV, um dispositivo multiplex baseado em um imunossensor e um genossensor apresentou um LD de 2,9 e 27,0 nmol L^{-1} para a proteína A29 e DNA, respectivamente. Todos os testes de recuperação apresentaram valores de próximos a 100%. Com isso, os sensores 3D apresentaram ser uma ferramenta de alto potencial para detecção de vírus e seus biomarcadores, e a produção de filamentos condutivos em laboratório permitiu a construção de sensores com ótimas características analíticas a base de materiais diversos, sendo uma alternativa viável aos comerciais.

Palavras-chaves: Impressão 3D, filamentos condutivos feitos em laboratório, (bio)sensores eletroquímicos, detecção de vírus, SARS-CoV-2, varíola dos macacos

Abstract

Electrochemical sensors can be employed for diverse detection purposes, and their modification with biological compounds enables the development of biosensors with selectivity for analytes such as viruses. Furthermore, the manufacturing of electrochemical sensors with a focus on miniaturization and cost reduction is of paramount importance for producing efficient analytical platforms. In this context, 3D printing technology facilitates the rapid, decentralized, and miniaturized production of sensors using conductive filaments. Therefore, this thesis presents the fabrication of conductive filaments and 3D (bio)sensors using both laboratory-made and commercial filaments for the detection of biomarkers and viruses, specifically SARS-CoV-2 and Monkeypox virus (MKPV). All developed materials and sensors underwent characterization through morphological, physicochemical, and electrochemical techniques. The (bio)sensors for creatinine and SARS-CoV-2 cDNA exhibited a detection limit (LD) of 15.0 and 0.31 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Sensors produced from the new filaments (graphite and *carbon black*) demonstrated satisfactory electrochemical characteristics compared to sensors produced with commercial filaments. The application of 3D graphite-based (bio)sensors for the determination of uric acid and SARS-CoV-2 S1 protein show LD values of 0.07 and 1.36 nmol L^{-1} , respectively. The *carbon black*-based biosensor indicated a LD of 2.7 pmol L^{-1} for S1 protein. For MKPV detection, a multiplex device based on an immunosensor and a genosensor showed LD values of 2.9 and 27.0 nmol L^{-1} for A29 protein and DNA, respectively. All recovery tests exhibited values close to 100%. Consequently, 3D sensors prove to be a highly potent tool for virus detection and their biomarkers. The laboratory production of conductive filaments enabled the construction of excellent sensors using diverse materials, providing a viable alternative to commercial options.

Keywords: 3D printing, lab-made conductive filaments, electrochemical (bio)sensors, virus detection, SARS-CoV-2, monkeypox virus

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do projeto geral de um genossensor.....	20
Figura 2. Esquema resumido do mecanismo de ação de um aptasensor.....	21
Figura 3. Representação esquemática do imunossensor eletroquímico.....	22
Figura 4. Representação esquemática de uma configuração típica de FDM.....	25
Figura 5. Estrutura do vírus SARS-CoV-2.....	34
Figura 6. Estrutura do vírus da varíola dos macacos.....	37
Figura 7. Ilustração esquemática do conjunto de eletrodos impressos em 3D. Fixação no suporte de plástico rígido e delimitação da área com esmalte incolor. Resumo esquemático da produção do genossensor e etapa de hibridização. A produção do biossensor consiste na etapa de impressão, tratamento químico da superfície, modificação com Au^{3+} ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e modificação da superfície com a sequência de captura ($3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h). A etapa de hibridização é realizada por 30 min após a adição da gota de solução contendo a sequência de cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2 na superfície do genossensor.....	52
Figura 8. MEV das superfícies de eletrodos (a) G-PLA, (b) mapeamento de elemento correspondente de G-PLA, (c) Au/G-PLA (deposição de 400 s), (d) mapeamento de elemento correspondente de Au/G-PLA, (e) Au/G-PLA (deposição de 250 s) e (f) espectros FT-IR de G-PLA (preto) e Au/G-PLA (vermelho) foram registrados dentro da faixa de número de onda de 600 a 4000 cm^{-1}	53
Figura 9. Espectro EDX para Au/G-PLA.....	55
Figura 10. Análises de impedância dos eletrodos G-PLA e Au/G-PLA. (a) magnitude de impedância e correlação de frequência do G-PLA (linha preta) e Au/G-PLA (linha vermelha). (b) mudança de fase e correlação de frequência do G-PLA (linha preta) e Au/G-PLA (linha vermelha). (c) Diagramas de Nyquist do G-PLA (linha preta) e Au/G-PLA (linha vermelha). Parâmetros: G-PLA = 0,6 mV; Au/G-PLA = 9,0 mV. A inserção mostra os respectivos circuitos equivalentes.....	55
Figura 11. (a) Voltamogramas cíclicos da solução em NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (linha preta) e (linha vermelha) CNN $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ usando eletrodo Au/G-PLA. Eletrólito de suporte: NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} , (b) Ilustração esquemática da interação da CNN com AuPs.....	57
Figura 12. (a) Resposta da superfície e (b) curva de nível obtida para otimização das variáveis: concentração de Au^{3+} (mmol L^{-1}) e tempo de eletrodeposição (s) em função da variação de corrente na presença de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ CNN.....	58
Figura 13. (a) Resposta de superfície e (b) curva de nível obtida para a otimização das variáveis: potencial degrau e frequência em função da corrente na presença de CNN $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$	60

- Figura 14.** (a) Voltamogramas de onda quadrada para a adição de oito concentrações de CNN (0,05 a 3,2 mmol L⁻¹) em NaCl 0,5 mol L⁻¹. Parâmetros SWV: -5,0 mV (incremento de potencial); 20 mV (amplitude); 10 Hz (frequência), (b) A curva analítica foi obtida a partir da variação do I_p em função da concentração de CNN.....61
- Figura 15.** Resultados dos testes de recuperações realizados a partir da fortificação de amostras de (a) urina sintética e (b) soro humano com três concentrações conhecidas de CNN (0,1, 0,8 e 2,1 mmol L⁻¹)63
- Figura 16.** Voltamogramas cíclicos obtidos após diferentes tempos de deposição de ouro no sensor G-PLA. (a) (linha preta) 100 s, (linha vermelha) 150 s, (linha azul) 200, (linha rosa) 250 e (linha verde) 300. Todas as análises foram realizadas usando FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ com uma velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹.....65
- Figura 17.** (a) Voltamogramas cíclicos e (b) Gráficos de Nyquist para cada estágio de modificação do sensor e após a hibridização, (linha preta) Au/G-PLA, (linha vermelha) Probe/Au/G-PLA e (linha azul) sequência alvo 50,0 μmol L⁻¹. Todas as análises foram feitas com FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹; CVs foram realizadas com uma velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹66
- Figura 18.** (a) Resposta de superfície e (b) curva de nível obtida para otimização das variáveis: concentração (μmol L⁻¹) e tempo (h) em função da diferença de corrente entre o sinal analítico do sensor e do biossensor na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹.....68
- Figura 19.** Respostas obtidas para diferentes tempos (min) de hibridização da sequência alvo com o genossensor. Os valores de resposta foram obtidos em função da diferença no sinal obtido por CV entre o genossensor na ausência e a presença de 1,0 μmol L⁻¹ da sequência alvo utilizando FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. CVs foram realizadas com velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹69
- Figura 20.** Curva de calibração do genossensor 3D empregando as técnicas (a) CV e (c) EIS, na faixa de 1,0 a 50,0 μmol L⁻¹ e 1,0 a 75,0 μmol L⁻¹ de cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2, respectivamente. (b) Curvas de calibração CV foram obtidas entre a diferença do sinal analítico do genossensor na ausência e presença da sequência alvo empregando. Todos os voltamogramas foram obtidos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. (d) A curva de calibração EIS foi construída a partir dos valores R_{ct} obtidos.....70
- Figura 21.** Voltamogramas cíclicos para (a) reprodutibilidade do genossensor (n = 3) e (b) repetibilidade (n = 20) na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Todos os voltamogramas foram obtidos empregando a velocidade de varredura de potencial: 100 mV s⁻¹.....71
- Figura 22.** (a) Comparação entre sequências-alvo positivas (50 μmol L⁻¹) e negativas (100 μmol L⁻¹). Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. A velocidade de varredura de potencial: 100 mV s⁻¹, (b) Gráfico de coluna de barras referentes as respostas de

corrente de pico para cada etapa analisada.....74

Figura 23. Respostas dos testes de recuperações realizados a partir da fortificação de amostras (a) urina sintética e (b) soro humano com três concentrações de Target (1,0, 25,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....75

Figura 24. Esquema representativo para a produção dos filamentos condutivos a base de grafite e PLA (Gpt-PLA). (A) incorporação de pó de grafite no PLA e sistema de refluxo sob agitação e aquecimento constantes; (B) recristalização do compósito (Gpt-PLA) em etanol; (C) filtração do compósito e lavagem constante com etanol; (D) etapa de secagem na estufa a 50 °C; (E) cortado em pedaços pequenos; (F) etapa de extrusão do compósito e (G) impressão 3D do sensor eletroquímico.....82

Figura 25. Esquema representativo das etapas envolvidas na fabricação do imunossensor.....84

Figura 26. Análises termogravimétricas para PLA bruto, pó de grafite e filamentos de Gpt-PLA contendo 1, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60% em peso de grafite.....85

Figura 27. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} utilizando Gpt-PLA com diferentes cargas de grafite (% em peso) após polimento em lixa; velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}87

Figura 28. (a) Espectros Raman para filamento Gpt-PLA (40% em peso) (linha vermelha) e eletrodo impresso em 3D (linha preta); (b) Espectros FT-IR para PLA bruto, pó de grafite, filamento Gpt-PLA (40% em peso) e eletrodo impresso em 3D.....88

Figura 29. Imagens de MEV dos eletrodos impressos em 3D com filamentos contendo grafite em 40% de peso. Fatores de amplificação de (a) 2000x (b) e 8000x e (c) Imagem do ângulo de contato.....90

Figura 30. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} em (a) Gpt-PLA, CB-PLA e G-PLA após polimento em lixa; (b) Gpt-PLA, CB-PLA e G-PLA após pré-tratamento eletroquímico e; (c) Gpt-PLA antes e depois do tratamento eletroquímico. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}91

Figura 31. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} em eletrodos impressos em 3D de Gpt-PLA, CB-PLA e G-PLA (a) sem tratamento e (b) tratados (exceto Gpt-PLA). Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}94

Figura 32. Voltamogramas cíclicos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}). (a-d) G-PLA não tratado e tratado (e-h), CB-PLA não tratado e tratado; (i-j) Gpt-PLA. Relação das correntes de pico anódicas (■) e catódicas (■) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($V^{1/2}$).....96

Figura 33. Gráficos de Nyquist do Gpt-PLA (■), CB-PLA tratado (■) e G-PLA tratado (■) na presença de solução de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . A faixa de frequência é de 100 kHz a 100 mHz e a amplitude de perturbação de 10 mV.....97

- Figura 34.** Voltamogramas cíclicos para AU $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em BR tampão (pH 2,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em Gpt-PLA e G-PLA e CB-PLA impressos em 3D antes e depois do pré-tratamento eletroquímico. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}100
- Figura 35.** Efeito da amplitude (a), tempo de modulação (c) e incremento de potencial (e) na resposta voltamétrica de AU. Parâmetros DPV em (a): 5 mV (incremento de potencial), 25 ms (tempo de modulação) e 10 mV s^{-1} (velocidade de varredura de potencial). Parâmetros DPV em (c): 5 mV (incremento de potencial), 50 mV (amplitude) e 10 mV s^{-1} (velocidade de varredura de potencial). Parâmetros DPV em (e): 25 ms (tempo de modulação), 50 mV (amplitude) e 10 mV s^{-1} (velocidade de varredura de potencial). Todas as otimizações foram realizadas utilizando AU $30,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão BR $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0) como eletrólito.....102
- Figura 36.** Voltamogramas de pulso diferencial para concentrações crescentes de AU ($0,5$ a $150,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em BR (pH 2,0) $0,1 \text{ mol de tampão L}^{-1}$. Parâmetros DPV: 80 mV (amplitude de modulação); 30 ms (tempo de modulação); 5 mV (incremento de potencial)104
- Figura 37.** Voltamogramas de pulso diferencial para amostras de urina sintética fortificada ($10,0$, $20,0$, $30,0$ e $40,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,0). Parâmetros DPV: 80 mV (amplitude); 30 ms (tempo de modulação); 5 mV (incremento de potencial)106
- Figura 38.** Voltamogramas cíclicos na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após cada etapa de imobilização. Velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1}108
- Figura 39.** Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando o imunossensor fabricado para concentrações crescentes de antígeno ($5,0$, $10,0$, $30,0$, $50,0$ e $75,0 \text{ nmol L}^{-1}$); Velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1}109
- Figura 40.** Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o imunossensor fabricado após a incubação da proteína negativo (BSA $5,74 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e positivo (proteína Spike S1 $5,74 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$); velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} 110
- Figura 41.** Voltamogramas cíclicos registrados para FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o imunossensor após a incubação de saliva sintética com diferentes concentrações de proteína Spike ($5,0$, $10,0$, $30,0$ e $50,0 \text{ nmol L}^{-1}$); velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1}111
- Figura 42.** Esquema representativo de todas as etapas envolvidas na produção dos (a) filamentos condutivos na construção e dispositivo eletroquímico baseado em screen-printed electrodes e (b) preparo do imunossensor eletroquímico.120
- Figura 43.** (a) Análise termogravimétrica para filamentos CB-PLA de diferentes cargas de CB ($5,0$ a $30,0\%$ em peso). (b) Voltamogramas cíclicos registrados para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferroceno metanol em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, usando eletrodos impressos em 3D CB-PLA obtidos de filamentos feitos em laboratório com diferentes cargas de CB (de $20,0$ a $30,0\%$ em massa), e respectivas soluções do branco ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$

de KCl – linhas pontilhadas). Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}121

Figura 44. (a) Voltamogramas cíclicos registrados para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferroceno metanol em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, usando eletrodos impressos em 3D CB-PLA obtidos de filamentos feitos em laboratório contendo 28,5% em massa de CB, ou filamentos comerciais de Proto-pasta, antes e depois do tratamento eletroquímico. As linhas pontilhadas correspondem à solução do branco. (b) Espectros Raman para eletrodos impressos em 3D obtidos com Proto-pasta e CB-PLA 28,5% em massa antes e depois do tratamento eletroquímico de superfície. Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}123

Figura 45. Plots de nyquist para eletrodos impressos em 3D CB-PLA e proto-pasta não tratado e tratado.125

Figura 46. Imagens de MEV para eletrodos impressos em (a) 3D Proto-pasta, (b) eletrodos impressos em 3D Proto-pasta após tratamento eletroquímico de superfície, (c) CB-PLA (28,5% em massa de negro de fumo) e (d) CB-PLA (28,5% em massa de carbon black) após tratamento eletroquímico de superfície, com fatores de amplificação de $5000 \times$. Inserção: respectivas imagens do ângulo de contato.....127

Figura 47. Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes taxas de varredura (10 a 100 mV s^{-1}) no (a) CB-PLA não tratado; (a') CB-PLA tratado; (b) Proto-pasta não tratada e (b') Proto-pasta tratada. Insere: respectivas relações das correntes de pico anódica e catódica versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$).....128

Figura 48. Voltamogramas cíclicos registrados para FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em quatro eletrodos impressos em 3D obtidos com filamentos CB-PLA de diferentes lotes. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}131

Figura 49. Voltametria cíclica registrada na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1}132

Figura 50. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após cada etapa de imobilização (linha preta) CB-PLA, (linha verde) EDC:NHS, (linha azul) anticorpo, (linha roxa) BSA e (linha vermelha) detecção do antígeno na concentração de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} e (b) respectivos valores de corrente de pico para cada etapa.....134

Figura 51. (a) Curva de nível e (b) Resposta superficial obtida para a otimização das variáveis: concentração de anticorpos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e tempo de incubação (min) em função da variação da corrente na presença de anticorpo.135

Figura 52. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o imunossensor fabricado para (a) otimização da concentração de anticorpos ($1,2$; $1,4$; $1,6$ e $1,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (b) otimização do tempo de incubação da proteína spike S1 (30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 150 e

180 min); Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹. Gráficos de coluna de barras para (a') otimizações da concentração de anticorpos e (b') tempo de incubação do antígeno.....137

Figura 53. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ usando o imunossensor fabricado para concentrações crescentes de antígeno (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 nmol L⁻¹). Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹.....138

Figura 54. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos com imunossensor eletroquímico na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, para análise em diferentes dias (**linha preta**) dia 1; (**linha vermelha**) dia 5; (**linha azul**) dia 10; (**linha rosa**) dia 20; (**linha verde**) dia 25; e (**linha roxa**) dia 30. (b) gráfico de barras das respostas analíticas dos imunossensores em dias diferentes.....140

Figura 55. Gráfico de barras da resposta de recuperações em porcentagem do antígeno em amostras de soro humano (a) e saliva sintética (b). Concentrações: amostras 1, 2 e 3; 0,05; 0,1 e 1,0 nmol L⁻¹, respectivamente.143

Figura 56. Esquema representativo da célula eletroquímica e suas medidas. Design dos sensores impressos em forma de pistão e suas respectivas dimensões; célula eletroquímica composta por uma caixa para armazenamento da solução a ser analisada e tampa com quatro entradas para os sensores eletroquímicos com distâncias equivalente entre os sensores.....149

Figura 57. Representação das etapas de modificação dos biossensores. (ET1) sensor sem modificação, adição de EDC:NHS, anticorpo, bloqueio com BSA e detecção do antígeno. (ET2) sensor sem modificação, adição do EDC:NHS, DNA captura e hibridização do DNA alvo para análise.....150

Figura 58. Imagens de MEV da superfície do eletrodo (a) antes do polimento e (b) após o polimento em diferentes magnitudes de amplificação. (a-a' e B'-B') amplificação de 31× e 1000×, respectivamente. (c) Espectros FTIR para CB-rPLA e (d e d') imagem do ângulo de contato para eletrodo não polido e polido, respectivamente. Inserte: imagens reais do sistema multiplex impresso em 3D.....152

Figura 59. Voltamogramas cíclicos registrados com diferentes eletrodos (n = 10) em solução contendo FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹. (b) Gráficos de barras para valores de corrente de pico anódico de diferentes sensores em triplicado (n = 3).....154

Figura 60. Voltamogramas cíclicos registrados em uma solução contendo FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em 0,1 mol L⁻¹, em valores crescentes de velocidade de varredura de potencial (10 a 100 mV s⁻¹). (b) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial.....155

Figura 61. Voltamogramas cíclicos obtidos com ET1 e ET2 na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. (a) Etapas do imunossensor: (●) CB-rPLA; (●) EDC:NHS; (●) Ab; (●) BSA e (●) detecção de antígeno MKPV 0,01 μmol L⁻¹. (b) Etapas do Genossensor: (●) CB-rPLA; (●) EDC:NHS; (●) DNA alvo + bloqueado e (●) detecção de 1,0 μmol L⁻¹ de DNA alvo MKPV. (a') e (b') gráfico de barras das correntes de pico anódica obtidas em cada etapa realizada do imunossensor e genossensor. Velocidade de varredura de potencial 50 mVs⁻¹.....156

Figura 62. Gráficos de Nyquist obtidos na construção do (a) imunossensor e (b) genossensor. Insete: circuito equivalente empregado. Potencial aplicado 0,08 V.....158

Figura 63. Gráficos de barras das respostas às otimizações da etapa de modificação do biossensor com anticorpo e captura de DNA do MKPV. (a-a') otimização da concentração (0,5 a 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e tempo de ancoragem (30 a 120 min) do anticorpo na superfície do imunossensor (WE1). (b-b') otimização da concentração (1,0 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e tempo (15 a 105) de captura de DNA na superfície do genossensor (WE2). Respostas obtidas em função da resposta eletroquímica na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . Resposta eletroquímica obtida após análise do antígeno 0,5 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e DNA alvo. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1}159

Figura 64. Voltamogramas cíclicos para otimizar a hibridização do antígeno e DNA alvo com a superfície do imunossensor e genossensor, respectivamente. Voltamogramas na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} (a) variando tempo de hibridização de 30 a 150 min, concentração de antígeno de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) genossensor variando tempo de hibridização de 15 a 120 min, concentração do DNA alvo 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (a'-b') gráfico de barras para resposta analítica na análise dos analitos de interesse em função da variação do tempo. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1}161

Figura 65. Voltamogramas cíclicos obtidos com sensores ET1 e ET2. (a) ET1: variando a concentração de 0,01 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de antígeno; (b) ET2: variando a concentração de 0,1 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DNA alvo. Curvas de calibração para (a') ET1 e (b') ET2, obtidas para variações na concentração do analito em função de $-AI$. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1}162

Figura 66. Voltamogramas cíclicos obtidos com ET1 e ET2 para testes de interferência na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . (a) imunossensor na presença de (•) CB-rPLA; (•) imunossensor; (•) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína S1 SARS-CoV-2; (•) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína genérica (BSA) e (•) 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de antígeno MKPV. (b) (•) CB-rPLA; (•) genossensor; (•) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA alvo do SARS-CoV-2; (•) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA alvo do Influenza A; e (•) 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA MKPV alvo. (a') e (b') gráfico de barras obtido a partir da corrente de pico anódica de cada análise. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1} 167

Figura 67. Voltamogramas cíclicos obtidos para a análise de amostras de soro humano enriquecidas com concentrações conhecidas de antígeno e DNA alvo da MKPV. Respostas obtidas na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . (a) imunossensor: concentração de antígeno de 1,0; 0,5 e 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (b) genossensor: concentração alvo de DNA 0,1; 10,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1}169

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Matriz de planejamento CCD, níveis reais e normalizados e resposta obtida para Au/G-PLA.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial completa e respectivos resultados obtidos para CNN.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 3. Matriz de planejamento CCD, níveis reais e normalizados e resposta para CNN.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 4. Matriz de planejamento CCD, níveis reais e normalizados e respostas.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 5. Resultado dos efeitos calculados para planejamento 2^3.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 6. Efeito de alguns compostos como possível interferentes na determinação da CNN.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 7. Eletrodos encontrados na literatura para determinação de CNN.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 8. Características eletroquímicas para sensores impressos em 3D.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 9. Parâmetros obtidos a partir da caracterização eletroquímica dos filamentos.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabela 10. Otimização dos parâmetros DPV para detecção de AU.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabela 11. Características analíticas para a detecção de AU usando eletrodo impresso em 3D.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabela 12. Comparação entre as áreas eletroativas calculadas para eletrodos impressos em 3D usando a equação de Randles-Ševčík para processos quase reversíveis, com os respectivos valores de área geométrica e os valores de razão, correspondentes a A_{elet}, dividido pelo A_{geom}. ($n = 3$).....</i>	<i>130</i>
<i>Tabela 13. Imunossensores eletroquímicos relatados na literatura e suas características de desempenho.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabela 14. Resumo das características analíticas dos biossensores ET1 e ET2.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabela 15. Métodos de detecção e características de desempenho para detecção da proteína A29.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabela 16. Características de desempenho de os trabalhos apresentados.....</i>	<i>171</i>

Lista de siglas

AA: Ácido ascórbico

Ab: Anticorpo

ABS: Acrilonitrila butadieno estireno

AU: Ácido úrico

AuPs: Partículas de ouro

BR: Britton-Robinson

CB: Carbon black

CB-PLA: Proto Pasta

CCD: Planejamento de composto central

CNN: Creatinina

CV: Voltametria cíclica

DMF: Dimetilformamida

DP: Desvio padrão

E: Envelope

EIS: Espectroscopia de impedância eletroquímica

Ep: Potencial de pico

FcMeOH: Ferrocenometanol

FDM: Modelagem de deposição fundida

FT-IR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

G-PLA: Black Magic (grafeno – ácido polilático)

Gpt-PLA: Grafite – ácido polilático

HET: Constante de taxa de transferência eletrônica heterogênea

I: Corrente

Ip: Corrente de pico

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

M: Matriz

MA: Manufatura aditiva

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

N: Nucleocapsídeo

PB: Fosfato

PLA: Ácido polilático

Rct: Resistencia à transferência de carga

rGO: Óxido de grafeno reduzido

S: proteínas Spike

SLA: Estereolitografia

SLM: Fusão a laser seletiva

TGA: Análise termogravimétrica

MKPV: Virus varíola dos macacos

Sumário

<i>Capítulo 1</i>	17
1. Introdução	17
1.1 (Bio)sensores eletroquímicos	17
1.2 Impressão 3D	24
1.3 Fabricação de filamentos condutivos	26
1.4 Materiais à base de carbono	29
1.5 Eletrodos impressos em 3D na fabricação de (bio)sensores	30
1.6 Biossensores impressos em 3D para detecção de vírus	31
1.7 Pandemia do vírus SARS-CoV-2	33
1.8 Surto da varíola dos macacos	36
1.9 Biomarcadores para SARS-CoV-2	39
<i>Capítulo 2</i>	42
2. Objetivos	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
(Bio)sensores 3D à base de G-PLA para determinação de creatinina e cDNA do vírus SARS-CoV-2	44
3. Metodologia	45
3.1 Reagentes e soluções	45
3.2 Instrumentos, célula eletroquímica e eletrodos	46
3.3 Caracterização morfológica e eletroquímica	46
3.4 Produção do eletrodo G-PLA	46
3.5 Eletrodeposição e otimização de Au	47
3.6 Otimização dos parâmetros operacionais da técnica SWV	48
3.7 Preparação do biossensor	50

4. Resultados e discussão.....	53
4.1 Caracterização morfológica e eletroquímica	53
4.2 Sensor Au/G-PLA impresso em 3D para detecção de CNN	56
4.2.1 Perfil voltamétrico	56
4.2.2 Otimização e eletrodeposição de Au	58
4.2.3 Otimização das variáveis operacionais da técnica SWV.....	59
4.2.4 Curva analítica para CNN	60
4.2.5 Teste de interferência para CNN	62
4.2.6 Determinação de CNN em amostras biológicas	62
4.2.7 Comparação dos resultados obtidos com a literatura	63
4.3 Biossensor baseado em cDNA para COVID-19	64
4.3.1 Produção do genossensor eletroquímico	64
4.3.2 Perfil voltamétrico do genossensor.....	66
4.3.3 Otimizações na fabricação do genossensor.....	67
4.3.4 Desempenho analítico do genossensor.....	70
4.3.5 Estudo de interferência	73
5. Conclusão específica	75
Capítulo 4.....	77
<i>Novo filamento condutivo baseado em Gpt-PLA e produção dos (bio)sensores para determinação de AU, DA e proteína Spike S1 do vírus SARS-CoV-2.</i>	<i>77</i>
6. Metodologia	78
6.1 Reagentes e soluções.....	78
6.2 Instrumental e aparatos	79
6.3 Fabricação de filamentos condutivos Gpt-PLA.....	81
6.4 Produção do eletrodo Gpt-PLA	83
6.5 Fabricação do biossensor	83

7. Resultados e discussão.....	85
7.1 Caracterização físico-química e eletroquímica dos filamentos condutivos	85
7.2 Determinação voltamétrica de AU	99
7.2.1 Perfil voltamétrico do AU usando Gpt-PLA.....	99
7.2.2 Otimização da técnica de DPV.....	101
7.2.3 Curva analítica para AU	103
7.2.3 Determinação de AU em urina sintética	106
7.4 Imunossensor eletroquímico para determinação de SARS-CoV-2.....	107
7.4.1 Perfil voltamétrico do imunossensor Gpt-PLA	108
7.4.2 Curva analítica para proteína S1.....	109
7.4.3 Teste de interferência do imunossensor	110
7.4.4 Determinação da proteína S1 em saliva sintética	111
8. Conclusão específica	113
<i>Capítulo 5</i>	114
<i>Novo filamento condutor à base de carbon black e PLA para a fabricação aditiva de (bio)sensores eletroquímicos para detecção da proteína spike S1 do vírus SARS-CoV-2</i>	114
8. Procedimento experimental.....	115
8.1 Reagentes e soluções.....	115
8.2 Instrumentos e aparatos	116
8.3 Preparo do compósito, eletrodos e biossensor	117
8.3.1 Construção do biossensor	119
9. Resultados e discussão.....	121
9.2 Detecção eletroquímica da proteína Spike S1 do vírus SARS-CoV-2.....	132
10. Conclusão.....	144
<i>Capítulo 6</i>	146

<i>Dispositivo eletroquímico de alvo duplo fabricado totalmente impresso em 3D para detecção de proteína A29 e DNA do vírus varíola dos macacos humanos.....</i>	<i>146</i>
<i>11. Experimental.....</i>	<i>147</i>
<i>11.1 Reagentes e soluções.....</i>	<i>147</i>
<i>11.2 Aparelhos e medições eletroquímicas</i>	<i>147</i>
<i>11.3 Produção de filamentos reciclados e eletrodos CB-PLA.....</i>	<i>148</i>
<i>11.4 Preparação de imunossensor e genossensor.....</i>	<i>149</i>
<i>12. Resultado e discussão</i>	<i>151</i>
<i>13. Conclusão específica</i>	<i>169</i>
<i>14. Conclusão geral.....</i>	<i>171</i>
<i>15. Perspectivas e desafios para novos trabalhos.....</i>	<i>174</i>
<i>16. Referências.....</i>	<i>175</i>

Capítulo 1

1. Introdução

1.1 (Bio)sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos representam uma importante subclasse de sensores químicos, em que um eletrodo de trabalho é usado como elemento de transdução para detectar compostos eletroativos de interesse. Os sensores eletroquímicos são dispositivos analíticos altamente qualificados para atender aos requisitos desejáveis para realizar detecções de analitos de interesse em diferentes áreas da sociedade devido suas características atrativas (KIMMEL et al., 2012; PRIVETT; SHIN; SCHOENFISCH, 2010). As características dos sistemas de detecção eletroquímica incluem alta sensibilidade e seletividade devido a possibilidade de modificação da superfície, ampla faixa linear de trabalho, requisitos mínimos de infraestrutura, baixo consumo de energia e instrumentação com custo acessível (CHEN; CHATTERJEE, 2013; PRIVETT; SHIN; SCHOENFISCH, 2010).

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica, principalmente devido à alta necessidade de realizar monitoramento e quantificação de analitos de interesse industrial, clínico, ambiental e alimentícia (CHEN; CHATTERJEE, 2013; GOVINDHAN; ADHIKARI; CHEN, 2014; MISHRA et al., 2018). A possibilidade de modificação na superfície dos sensores eletroquímicos com compostos inorgânicos, poliméricos, metálicos ou orgânicos visam melhorar a sensibilidade e a seletividade do dispositivo, ampliando de forma significativa sua aplicabilidade. Ademais, modificação da superfície com compostos biológicos para realizar reações de biorreconhecimento seletivo é uma das práticas mais empregadas para desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos (BRAZACA et al., 2021; JANEGITZ; CANCINO; ZUCOLOTTO, 2014; KIMMEL et al., 2012).

Os biossensores eletroquímicos são uma poderosa ferramenta analítica que combina alta sensibilidade com a alta seletividade dos processos de reconhecimento biológico. Esses dispositivos são classificados de acordo com

o elemento de reconhecimento biológico que o compõem. Os agentes de biorreconhecimento mais comuns encontrados na literatura são, enzimas, proteínas, anticorpo (do inglês *antibody* – Ab), ácidos nucleicos, células, tecidos ou receptores (BRAZACA et al., 2021; ZHAO et al., 2021). Estes compostos reagem seletivamente com o alvo e produz um sinal elétrico proporcional à concentração do analito em estudo (BRAZACA et al., 2021; KIMMEL et al., 2012; MADURAVEERAN; SASIDHARAN; GANESAN, 2018). O sistema de reconhecimento biológico fornece informações do domínio bioquímico, geralmente a concentração de um analito, que são traduzidas por um equipamento em um sinal de saída químico ou físico mensurável. O principal objetivo do sistema de reconhecimento é fornecer ao sensor um alto grau de seletividade para o analito a ser medido (BRAZACA et al., 2021; PUMERA et al., 2007). Os biossensores eletroquímicos são uma excelente opção para a detecção e quantificação de espécies biológicas como bactérias e vírus, uma vez que atrela as qualidades dos sensores eletroquímicos já pontuadas à capacidade de serem empregado em análises clínicas de compostos biológicos com alta exatidão. Na literatura são relatados diversos biossensores eletroquímicos empregados para análise de diferentes vírus, como Zika (TANCHAROEN et al., 2019), HIV (WANG et al., 2015), HBV (AHANGAR; MEHRGARDI, 2017), Dengue (NAVAKUL et al., 2017), Influenza A (DONG et al., 2015), SARS-CoV-2 (VADLAMANI et al., 2020a), entre outros.

Os elementos de biocomplexação são os elementos de biorreconhecimento usados com mais frequência na detecção de vírus, principalmente os respiratórios (ZHAO et al., 2021). Este método de detecção depende da interação de alvos com macromoléculas ou conjuntos moleculares organizados. Os Ab, aptâmeros, ácido nucleicos e peptídeos são elementos de biorreconhecimento mais comuns na detecção de vírus respiratórios (BRAZACA et al., 2021; KUDR et al., 2021; ZHAO et al., 2021). Ademais, de acordo com a literatura também há relatos de polímeros molecularmente impresso na superfície do sensor como elementos de bioreconhecimento (ZHAO et al., 2021). Neste contexto, existem três classes mais exploradas e relatadas na literatura de biossensores eletroquímicos empregados na detecção de vírus, os genossensores, imunossensores e aptassensores

(BRAZACA et al., 2021; ZHAO et al., 2021). Em relação a utilização de material genético, como DNA/RNA, os biossensores a serem empregados são os genossensores ou aptassensores (BRAZACA et al., 2021; DONG et al., 2015; JANEGITZ; CANCINO; ZUCOLOTTO, 2014). Por outro lado, os imunossensores fazem o uso de Ab ou antígenos para realização do biorreconhecimento específico (BRAZACA et al., 2021; MOLLARASOULI; KURBANOGLU; OZKAN, 2019; SKLÁDAL, 1997).

Existem diversas estratégias para detecção dos analitos de interesse empregando biossensores eletroquímicos, os mais comuns utilizados são análise do tipo sanduiche, competitiva e a *label-free*. O método *label-free* é um dos métodos simples e práticos, com alta sensibilidade e seletividade para a espécie de interesse com custos geralmente menores, e a utilização desta estratégia é a mais explorada e encontrada na literatura (BRAZACA et al., 2021; DU et al., 2012). Os biossensores baseado no método de detecção *label-free* são projetados de modo que a biocomplexação (receptor - analito) seja diretamente determinada pela medição das alterações induzidas pela formação do biocomplexo sem a necessidade de um marcador específico (DHAL et al., 2020). Para o monitoramento destas espécies, é comumente empregada a técnica de voltametria cíclica (do inglês *cyclic voltammetry* - CV) ou a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês *electrochemical impedance spectroscopy* – EIS). Estas técnicas são capazes de monitorar com precisão uma variedade de eventos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho, principalmente o decaimento de corrente analítica (análise realizada na presença de uma sonda eletroquímica) e o aumento da resistência a transferência de carga, ambas ocasionadas pelo aumento de material biológico na superfície. Para um biossensor voltamétrico, em que esses fenômenos de biocomplexação na superfície do sensor são observados ao realizar uma CV na presença de uma sonda redox, é denominado de *signal-off*. Para um melhor entendimento, a Figura 1 apresenta o esquema geral de um genossensor *label-free* e seus principais agentes.

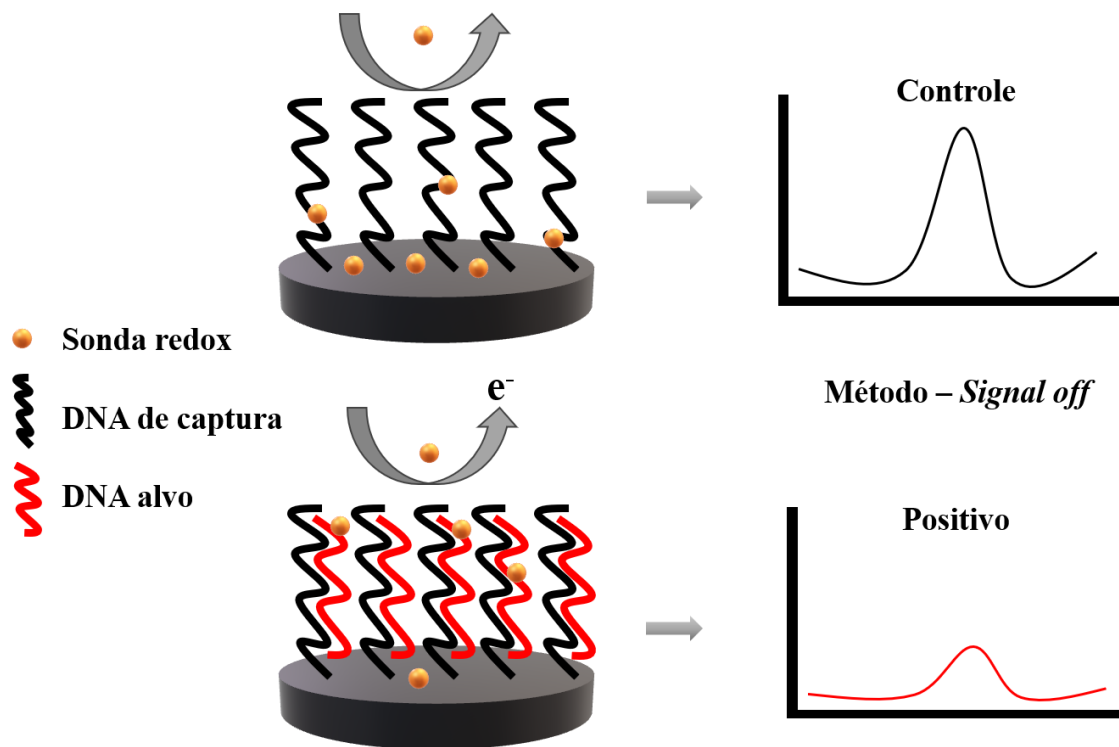


Figura 1. Esquema do projeto geral de um genossensor *label-free*. Para o método *label-free* com um genossensor, tem-se uma sonda redox (molécula de comportamento conhecido que gera o sinal), o DNA de captura e alvo. **Fonte: próprio autor.**

Em um genossensor *label-free* padrão, o ancoramento de um DNA de captura é o princípio fundamental na construção do dispositivo, o qual consiste em uma camada de sondas de DNA de fita simples imobilizadas na superfície do eletrodo (BRAZACA et al., 2021; KHAN et al., 2020; RASHID; YUSOF, 2017). Deste modo, é possível reconhecer o DNA alvo de interesse (pertencente ao vírus a ser detectado) a partir da formação da dupla hélice de DNA. Portanto, é possível monitorar as mudanças na corrente elétrica que ocorrem na superfície do eletrodo à partir da hibridização do DNA de captura com o DNA alvo de interesse, podendo correlacionar a concentração do alvo com a corrente elétrica alterada (RASHID; YUSOF, 2017). Desta forma, à medida que ocorre a hibridização do DNA alvo com o DNA de captura presente na superfície do sensor, um “bloqueio” parcial dos sítios ativos irá ocorrer e esse bloqueio pode ser monitorado empregando uma sonda *redox*. Assim, empregando uma técnica eletroquímica como CV e EIS é possível monitorar as mudanças da superfície e realizar a detecção e quantificação do DNA alvo com

sucesso. A partir de uma montagem simples e fácil é possível obter um genossensor com alta especificidade e desempenho excelente, sendo possível detectar uma série de vírus e tornando-se um potencial dispositivo de aplicação clínica.

Já os aptasensores são baseados em aptâmeros, os quais são nucleotídeos artificiais de fita simples (DNA ou RNA) capazes de se ligar especificamente a um alvo de interesse (EVTUGYN et al., 2020). A Figura 2 apresenta um resumo do método básico de ação de um aptasensor baseado no método de detecção *label-free*.

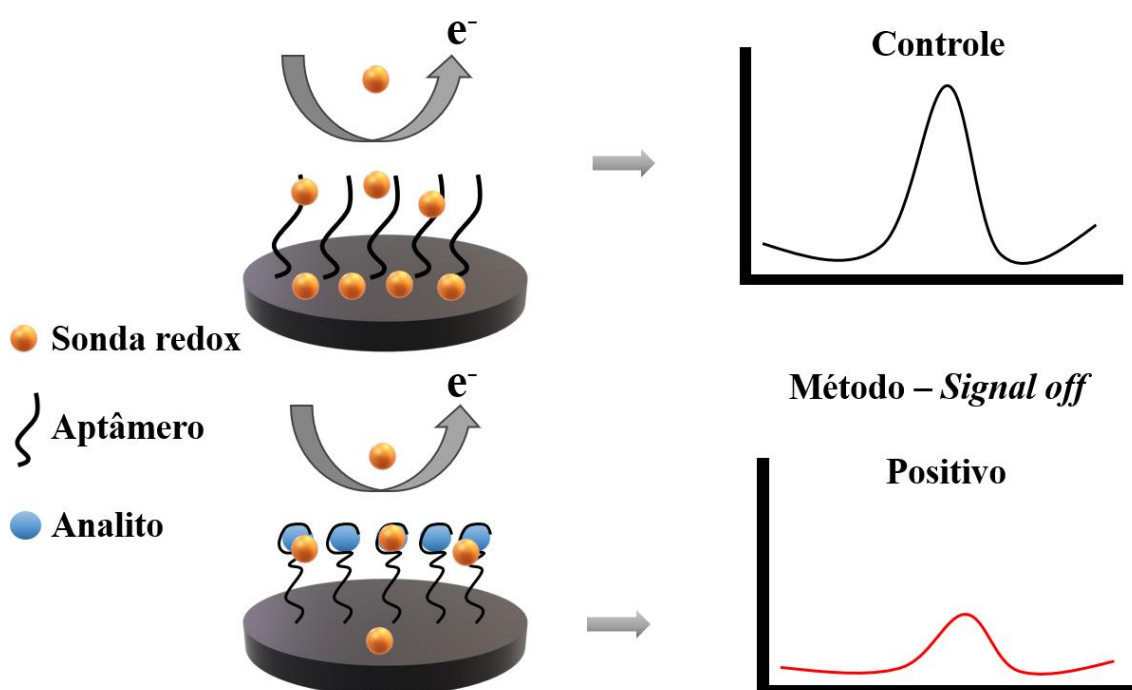


Figura 2. Esquema resumido do mecanismo de ação de um aptasensor *label-free*. **Fonte:** próprio autor.

Como pode-se observar na Ilustração 2, o mecanismo de ação do aptasensor *label-free* é bem semelhante ao de um genossensor. O mecanismo descrito na Figura 2 é referente à mudança na resistência à transferência de carga (R_{ct}) na presença da sonda *redox*. Na presença do analito de interesse a interação com o aptâmero ocorre “bloqueando” parcialmente a superfície do biossensor (EVTUGYN et al., 2020). Deste modo, técnicas como CV e EIS podem ser empregadas com eficiência para o

monitoramento destas mudanças. Assim, é possível correlacionar a mudanças que ocorrem na superfície com a concentração do analito de interesse. Um dos pontos positivos do emprego de aptasensores é a possibilidade de empregar aptâmeros para os mais diversos analitos, tornando-se um dispositivo de fácil preparo e de ampla gama de aplicação (BRAZACA et al., 2021; EVTUGYN et al., 2020).

O princípio de funcionamento dos imunossensores consiste basicamente em converter a informação associada a uma reação imunoquímica em um sinal de corrente mensurável. Essa classe de biossensores empregam um Ab ou antígeno como elemento de biorreconhecimento, que geralmente é imobilizado na superfície do sensor eletroquímico (BRAZACA et al., 2021; KONDZIOR; GRABOWSKA, 2020; SKLÁDAL, 1997). A Figura 3 apresenta um esquema representativo de imunossensor baseado no método de detecção *label-free*.

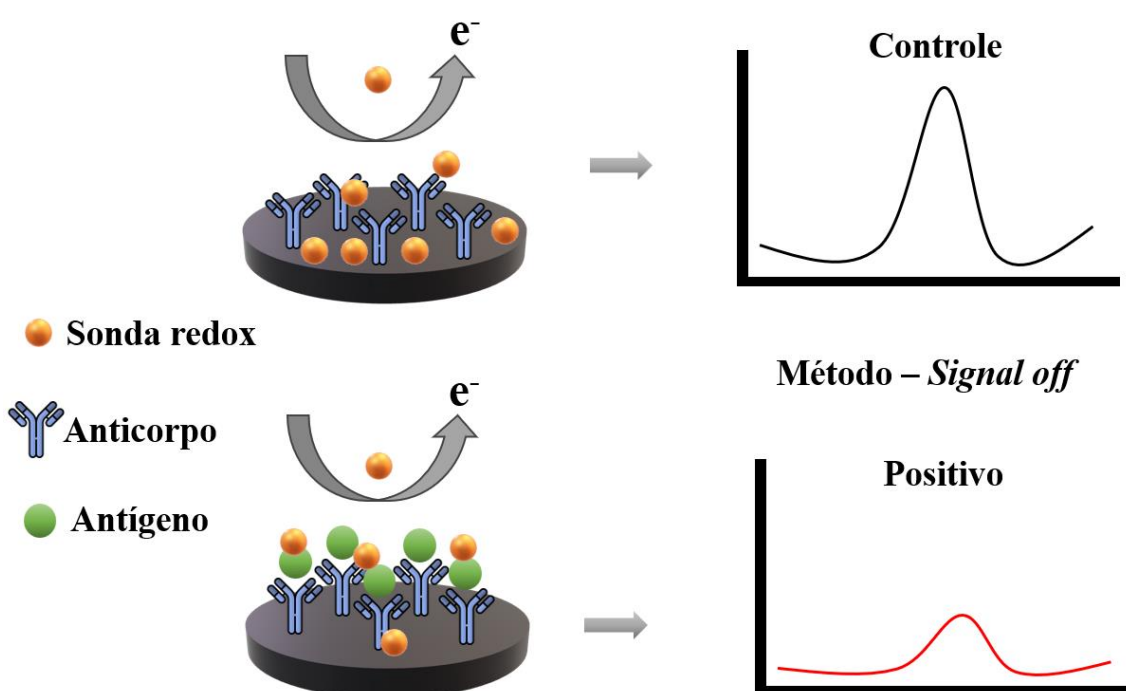


Figura 3. Representação esquemática de um imunossensor eletroquímico *label-free*. **Fonte:** próprio autor.

Ao usar o Ab como elemento de biorreconhecimento, o imunossensor pode detectar especificamente o antígeno de interesse. O imunoensaio eletroquímico *label-free* mede diretamente a mudança no sinal eletroquímico

que é percebido após o reconhecimento específico antígeno-Ab (SKLÁDAL, 1997; ZHANG et al., 2019). A partir deste biorreconhecimento ocorre o mesmo efeito já discutido nas duas classes anteriores, um “bloqueio” parcial da superfície à medida que vai aumentando a concentração do antígeno. Com isso, é possível mensurar a concentração do analito de interesse em função da alteração do sinal analítico do sistema. Neste caso, a partir do emprego de uma sonda *redox*, é possível monitorar essas alterações e detectar e quantificar o vírus de interesse.

A busca pelo desenvolvimento de novos tipos de (bio)sensores eletroquímicos com características estruturais e analíticas atrativas têm se intensificado nos últimos anos (HAYAT; MARTY, 2014). Atualmente, existem diversos tipos de eletrodos utilizados em determinações analíticas, sendo desenvolvidos cada vez mais dispositivos com maior robustez, que permitem o uso de metodologias mais simplificadas (CARDOSO et al., 2020b; THIYAGARAJAN et al., 2014). Adaptações no tamanho e arranjo dos eletrodos permitem a utilização dos sensores eletroquímicos de forma mais prática e simples em análises em campo ou clínicas, e também na coleta do analito para determinação posterior. Desta forma, estes sistemas podem fornecer ao operador não só instrumentos mais econômicos, com respostas sensíveis e seletivas, mas também praticidade de uso e simplicidade do sinal analítico. Novos tipos de sensores eletroquímicos vêm ganhando cada vez mais espaço, como os eletrodos impressos (do inglês *screen printed electrodes* – SPEs) (HONEYCHURCH; HART, 2003). Ademais, tem os sensores à base de papel (ATAIDE et al., 2020), sensores descartáveis à base de materiais de baixo custo (STEFANO et al., 2022c), como os fabricados com tintas (CAMARGO et al., 2021), pasta de carbono (ASADIAN; GHALKHANI; SHAHROKHIAN, 2019) ou a lápis (ORZARI et al., 2018), os sensores fabricados a laser (LAHCEN et al., 2020) e os fabricados a partir da tecnologia de impressão 3D (CARDOSO et al., 2020b).

1.2 Impressão 3D

No universo da tecnologia de impressão 3D, existem vários métodos para garantir a impressão do material desejado, porém existe três métodos que se destacam e são mais empregados para fabricação de dispositivos e aparatos analíticos (CARDOSO et al., 2020b; STEFANO et al., 2022a). Estes métodos são, a estereolitografia (do inglês *stereolithography* – SLA), fusão a laser seletiva (do inglês *selective laser melting* – SLM) e a modelagem de deposição fundida (do inglês *fused deposition modeling* – FDM) (CARDOSO et al., 2020b; MUÑOZ; PUMERA, 2020). O método SLA é baseado em uma formulação de resina fotopolimerizável controlada por alinhamento óptico para deposição camada por camada até que o objeto desejado seja formado. A SLA é altamente difundido em relação à fabricação de aparatos analíticos com os mais variados designs. Entretanto, esta tecnologia de impressão 3D ainda não foi utilizada para a fabricação de sensores eletroquímicos (CARDOSO et al., 2020b). A SLM utiliza pó metálico para fabricação do objeto desejado. Porém, para utilização deste método de impressão é necessário que o operador tenha um cuidado especial devido sua complexidade e, além disso, a utilização da mesma requer um alto custo comparadas a SLA e FDM (AMBROSI; PUMERA, 2016; CARDOSO et al., 2020b; STEFANO et al., 2022a). Entretanto, a fabricação de sensores eletroquímicos pelo método de impressão 3D por SLM é reportado na literatura ao contrário da SLA, principalmente na produção de eletrodos metálicos. Dentre os diferentes trabalhos relatados na literatura envolvendo a produção de sensores eletroquímicos por impressão 3D a base do método SLM, um trabalho do grupo do professor Pumera foi pioneiro demonstrando a aplicação desta tecnologia (AMBROSI; MOO; PUMERA, 2016). No artigo de Ambrosi, Moo e Pumera, os autores desenvolveram um eletrodo impresso em 3D de aço inoxidável e demonstraram sua potencialidade como eletrodo por uma série de testes eletroquímicos. Porém, de acordo com Stefano e colaboradores, o método mais empregado na fabricação de sensores eletroquímicos é o método de impressão por FDM devido sua simplicidade e custos altamente reduzidos (CARDOSO et al., 2020b; STEFANO et al., 2022b).

O método de impressão 3D por FDM é capaz de produzir estruturas tridimensionais complexas, e vem sendo muito utilizada por pesquisadores para o desenvolvimento de novos sensores ou biossensores (STEFANO et al., 2022a). Na impressão por FDM, um polímero termoplástico, usualmente acrilonitrila butadieno estireno (ABS) ou ácido polilático (PLA), é aquecido até atingir um estado semifundido e então é expelido através de um bico metálico fino, sendo depositado em forma de camada sobre camada (do inglês, *layer-by-layer*) em um substrato. O bico se move em diferentes direções do plano (x, y e z), em alguns casos, a mesa se move no eixo z, formando então as camadas de impressão do polímero termoplástico enquanto uma pressão constante é aplicada (MAZZANTI; MALAGUTTI; MOLLICA, 2019; STEFANO et al., 2022a). A Figura 4 apresenta uma representação esquemática de uma configuração típica de impressão 3D por FDM.

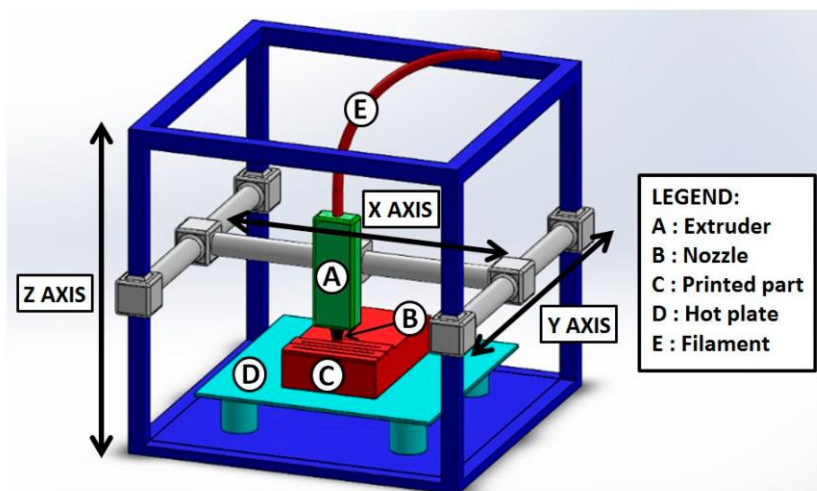


Figura 4. Representação esquemática de uma configuração típica de modelagem de deposição fundida. Reprodução com permissão (MAZZANTI; MALAGUTTI; MOLLICA, 2019).

Uma vez depositado o material de impressão (filamento), a solidificação do material ocorre criando as camadas de impressão sólidas, e ao fim do processo, obtém-se a estrutura com o formato desejado. Este processo ocorre de maneira completamente automatizada, o que minimiza possíveis erros no processo de fabricação, e para a impressão, necessita-se apenas do desenho da estrutura a ser impressa, o qual é desenvolvido por um software

especializado (MAZZANTI; MALAGUTTI; MOLLICA, 2019; STEFANO et al., 2022a).

Em relação aos sistemas eletroanalíticos, estes podem ser considerados ainda um desafio para impressão 3D uma vez que a obtenção de materiais condutores é essencial. Porém, o uso de FDM para a produção de objetos 3D permite a extrusão de filamentos compósito, atribuindo por exemplo condutividade elétrica ao material impresso por meio do uso de materiais condutivos para a impressão (AMBROSI; PUMERA, 2016; CARDOSO et al., 2020b). Neste contexto, ocorreu uma expansão na aplicabilidade da impressão 3D na química analítica, possibilitando a impressão de substratos condutivos. Portanto, tais substratos podem servir como eletrodos em análises eletroquímicas por exemplo, o que torna possível a análise de compostos eletroativos por meio de técnicas simples e de baixo custo (AMBROSI; PUMERA, 2016; CARDOSO et al., 2020b).

Há poucos filamentos condutivos disponíveis no mercado, e não é relatada a fabricação destes filamentos no Brasil para comercialização, se fazendo necessária a importação deste material para uso no país. Além disso, os filamentos disponíveis comercialmente possuem um custo um pouco elevado. Desta forma, a obtenção de filamentos condutivos é restrita, e em casos nos quais a importação é dificultada, como o vivenciado nos últimos anos devido à pandemia da COVID-19, o material se torna indisponível, dificultando o acesso por pesquisadores e, portanto, os trabalhos desenvolvidos devem ser interrompidos. Neste contexto, a busca por novas metodologias para produção de filamentos condutivos feitos em laboratórios torna-se um foco de pesquisa de grande potencial e relevância, podendo contribuir fortemente no avanço de desenvolvimento de novos tipos de sensores eletroquímicos impressos em 3D de alta qualidade com um custo reduzido.

1.3 Fabricação de filamentos condutivos

Os filamentos condutivo mais empregados para produção de sensores eletroquímicos e reportados na literatura envolvem o uso dos polímeros

termoplásticos PLA e ABS, os quais são responsáveis por estruturar o material a ser impresso, e agentes condutores como grafeno ou negro de fumo (do inglês - *carbon black* - CB) (STEFANO et al., 2021; STEFANO; SILVA; JANEGITZ, 2022). O PLA é muito explorado por se tratar de um biopolímero (polímero biodegradável), sendo obtido de fontes renováveis, consistindo em uma nova geração de materiais para fabricar dispositivos eletroquímicos verdes. Portanto, ele é ambientalmente amigável, além de possuir custo acessível e pode ser produzido em larga escala. Este termoplástico é muito usado, e atualmente, pode-se encontrar filamentos condutivos comerciais no mercado contendo grafeno, o G-PLA (Black Magic[®]) e CB, o CB-PLA (Protopasta[®]). Neste contexto, a diversos trabalhos na literatura que estão descritos o uso destes filamentos para produção de sensores eletroquímicos.

Os filamentos condutivos obtidos comercialmente são uma excelente opção para aplicação na construção de objetos condutivos. Entretanto, estes filamentos são de uso genérico para construção de qualquer objeto 3D com capacidade de conduzir corrente elétrica e não de aplicação específica para sensores eletroquímicos. Outro ponto importante é que, para a utilização dos sensores impressos em 3D a partir de filamentos condutivos comerciais é necessário realizar um pré-tratamento, seja ele físico, químico ou eletroquímico. Esta etapa de pré-tratamento tem como objetivo remover excesso de material isolante (PLA) da superfície do sensor e expor o material condutivo para melhorar as propriedades eletroquímicas do sensor. Nesse contexto, encontra-se na literatura diferentes estratégias abordando técnicas que variam desde um simples polimento mecânico (CARDOSO et al., 2018), tratamentos químicos e eletroquímicos (BROWNE et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2019; KALINKE et al., 2020), imersão em solvente (MANZANARES PALENZUELA et al., 2018), até técnicas mais elaboradas como digestão da matriz polimérica (no caso de biopolímeros como o PLA) explorado por Manzanares-Palenzuela *et al.* (MANZANARES-PALENZUELA et al., 2019). (STEFANO et al., 2021; STEFANO; SILVA; JANEGITZ, 2022).

Em 2019, Foster e colaboradores observaram que 20% (m/m) de grafeno em um filamento de PLA apresenta condutividade suficiente para a fabricação de anodos para baterias de Li em um estudo variando a quantidade

de grafeno de 1 a 40% (m/m) (FOSTER et al., 2019). Um ano depois, Foster e colaboradores propuseram a fabricação de um filamento condutivo contendo nanografite. Os autores relataram a utilização deste novo filamento em duas plataformas diferentes, uma para a impressão de macroeletrodos e a outra para estruturas na forma de favo de mel para a determinação simultânea de cádmio e chumbo (FOSTER et al., 2020). Eles estudaram diferentes proporções de grafite e PLA, e observaram que quantidades acima de 20% de grafite no filamento apresentam maior condutividade. Por outro lado, mais de 25% do material condutivo proporcionou um filamento quebradiço, portanto 25% de grafite foi eficiente no desenvolvimento dos sensores. Em ambos os trabalhos, os filamentos-compósito foram obtidos de forma semelhante: Primeiramente foi feita a mistura do material condutivo com xileno, essa mistura foi aquecida (sob refluxo) por 3 h, em seguida, o PLA foi adicionado à mistura e deixado por mais 3 h. Ao fim desse processo, uma mistura homogênea foi obtida e recristalizada em metanol e levada para secagem. Esta etapa de lavagem e secagem tem objetivo de retirar totalmente os solventes utilizados, uma vez que o metanol lava e carrega os solventes, e o mesmo é evaporado durante a secagem. Após secagem, o material foi extrusado, formando os filamentos prontos para impressão 3D.

O PLA é o material polimérico termoplástico mais empregado para produção de filamentos condutivos, principalmente por suas características de ser atóxico, biodegradável e obtidos de fontes naturais a partir do amido advindo de culturas agrícolas, como milho, cana-de-açúcar e beterraba. Além disso, o PLA em natura (sua forma de pellets) para utilização para fabricar filamento tem o custo extremamente baixos, custando por volta de 70 reais o quilo e podendo obter de forma extremamente fácil em território nacional, dispensando a necessidade de importação. Diante disso, o PLA se torna o material termoplástico “ideal” para utilização em conjunto com material condutor para fabricação de filamentos condutivos.

1.4 Materiais à base de carbono

É possível empregar uma grande variedade de materiais condutivos na construção de sensores eletroquímicos, e neste aspecto, o uso de materiais à base de carbono, tais como grafeno, grafite e CB, é muito atrativo (ATAIDE et al., 2022; CAMARGO et al., 2021; SILVA et al., 2017). O grafeno atraiu enorme atenção das comunidades científicas teóricas e experimentais nas últimas décadas devido à sua nanoestrutura única e propriedades extraordinárias. Neste contexto, o grafeno tornou-se um material novo e muito promissor para a diversas áreas da química e física. Alguns tipos de grafeno têm extraordinárias propriedades de transporte eletrônico e alta atividade eletrocatalítica, em conjunto com uma alta área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e têm sido investigadas como materiais de eletrodos em dispositivos optoeletrônicos, supercapacitores, e dispositivos eletroquímicos, como sensores e biossensores (CAMARGO et al., 2021; EVTUGYN et al., 2020). O grafite é um dos alótropos de carbono mais comuns e simples, o qual consiste em folhas bidimensionais de grafeno empilhadas. No grafite, os átomos de carbono possuem hibridização sp^2 , e este material se apresenta como um ótimo condutor de eletricidade, porém com uma área de superfície baixa ($40 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) comparada com outros materiais de carbono. O CB é um material nanoestruturado amplamente utilizado em diversos processos industriais (SILVA et al., 2017). Este nanomaterial apresenta um conjunto de propriedades notáveis, incluindo alta área superficial ($254 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), alta condutividade térmica e elétrica e custo muito baixo. Vários estudos exploraram a aplicabilidade do CB em campos eletroquímicos. Dados mostraram que eletrodos modificados à base de CB apresentam rápida transferência de carga e uma área superficial relativamente alta (SILVA et al., 2017). Desta forma, grafeno, grafite, e CB são ótimas opções para a fabricação de sensores e biossensores eletroquímicos, conseqüentemente são ótimos candidatos a comporem filamentos condutivos produzidos em laboratório.

Até o momento, poucos trabalhos reportando a síntese de filamentos condutivos são observados na literatura, assim, o desenvolvimento destes filamentos condutivos ainda é um desafio. Neste aspecto, o desenvolvimento de novos filamentos condutivos apresenta uma grande potencialidade,

possibilitando reduzir o custo da produção, desenvolver filamentos otimizados para aplicação na eletroquímica e criar uma linha de suplementação própria (STEFANO et al., 2021, 2022a; STEFANO; SILVA; JANEGITZ, 2022). Para tal, o uso de quantidades adequadas de material termoplástico e condutivo deve ser empregado, de forma que permita que o estado semifundido durante a impressão seja atingido, para que não haja entupimento dos bicos da impressora. Maiores quantidades de material condutivo podem garantir uma melhor resposta analítica. Porém, a quantidade de material condutivo empregada para produção do filamento deve ser sempre estudada e otimizada, pois quantidades excessivas podem impactar de forma negativa o material final desejado (STEFANO et al., 2021). Ao aumentar excessivamente a quantidade de material condutor, conseqüentemente diminuirá a quantidade do material termoplástico, que confere característica de maleabilidade. Deste modo, adicionar altas cargas de material condutivo torna o filamento quebradiço, tornando dificultosa a impressão dos eletrodos finais. A fabricação de novos filamentos condutivos não se resume apenas em aumentar indiscriminadamente a quantidade de material condutivo, e sim equilibrar a quantidade deste material com a do polímero termoplástico empregado. Sempre é preciso manter características necessárias para fabricação de objetos impressos em 3D, como maleabilidade e capacidade de impressão. Neste sentido, ainda há muito a se pesquisar e aprimorar na fabricação de filamentos condutivos e de eletrodos impressos 3D.

1.5 Eletrodos impressos em 3D na fabricação de (bio)sensores

Na literatura, alguns trabalhos relatam o uso de eletrodos impressos em 3D para a fabricação de sensores e biossensores. Rocha *et al.* (ROCHA et al., 2020a), por exemplo, desenvolveram um filamento condutivo contendo 25% de nanografite em uma base de PLA para a determinação de manganês(II) utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial por redissolução catódica. Posteriormente o sensor desenvolvido teve seu desempenho comparado com eletrodos impressos (do inglês *screen printed electrodes* – SPEs) na análise de amostras de água de torneira. Eles obtiveram um limite de

detecção de $1,6 \text{ nmol L}^{-1}$ ($0,09 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e uma faixa linear de $9,1 \text{ nmol L}^{-1}$ a $2,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Estes resultados foram comparáveis aos obtidos usando-se SPEs, mostrando que o eletrodo fabricado pode ser utilizado para análises *in loco* de amostras de água.

Katseli e colaboradores (2019) (KATSELI; ECONOMOU; KOKKINOS, 2019) desenvolveram um dispositivo eletroquímico completo impresso em 3D empregando o filamento condutivo comercial a base de PLA e CB. Eles utilizaram este dispositivo como uma plataforma analítica simples, portátil, rápida, de baixo custo e ecologicamente amigável para a determinação de mercúrio utilizando-se a técnica de voltametria por redissolução anódica e cafeína utilizando-se voltametria de pulso diferencial. Ademais, os autores mostraram a possibilidade de se modificar o dispositivo com glicose oxidase formando assim um biossensor para a detecção enzimática de peróxido de hidrogênio.

Marzo e colaboradores (2020) (LÓPEZ MARZO; MAYORGA-MARTINEZ; PUMERA, 2020) utilizaram uma enzima para modificar a superfície de um eletrodo de G-PLA para realizar a detecção enzimática de peróxido de hidrogênio. Para tal, nanopartículas de ouro (AuNps) foram utilizadas para facilitar o processo de transferência de elétrons. Outro trabalho que descreveu o desenvolvimento de um biossensor usando um eletrodo de G-PLA foi o de Palenzuela e coautores (MANZANARES-PALENZUELA et al., 2019). Eles desenvolveram um novo tratamento de superfície para remoção do excesso de PLA da superfície do eletrodo impresso. O tratamento de superfície foi por digestão utilizando uma enzima, e em seguida utilizaram o eletrodo para a determinação de 1-naftol via imobilização da enzima fosfatase.

1.6 Biossensores impressos em 3D para detecção de vírus

A construção de biossensores eletroquímicos é altamente vantajosa como já citados anteriormente. Porém, em relação à detecção eletroquímica de vírus a partir de biossensores impressos em 3D, a técnica de impressão 3D ainda é pouco utilizada. Os biossensores impressos em 3D apresentam um grande potencial a ser explorado. Eles atrelam a qualidade da impressão 3D

como a facilidade de criar dispositivos completos, miniaturizados e totalmente projetados aos objetivos desejados com as qualidades dos biossensores eletroquímicos. Desta forma, os biossensores impressos em 3D podem ser uma grande ferramenta no auxílio do desenvolvimento de testes clínicos de aplicação rápida e *in loco*. Neste contexto, um interessante trabalho foi desenvolvido por Martins *et al.* (MARTINS *et al.*, 2021). Nele é apresentado pela primeira vez um imunossensor eletroquímico, baseado em eletrodo obtido por impressão 3D usando filamento comercial contendo PLA e CB, para a detecção da nucleoproteína do Hantavírus Araucaria através da imobilização direta de Ab do Hantavírus na superfície do eletrodo 3D. As propriedades da superfície do filamento juntamente com os grupos oxigenados presentes se mostraram adequados para o ancoramento da biomolécula por ligação covalente diretamente na superfície do filamento. O filamento usado possuía cerca de 20% (m/m) de carbono em sua composição, e possibilitou a detecção do Hantavírus com um limite de detecção de $22,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo aplicado na detecção do vírus em soro humano diluído. Muñoz e Pumera (MUÑOZ; PUMERA, 2021) relataram uma abordagem geral interessante para desenvolver um imunossensor impresso em 3D para COVID-19. Neste trabalho, um sensor G-PLA impresso em 3D foi empregado após um tratamento de superfície realizado em duas etapas de aproximadamente 3 h de duração, uma etapa química e uma eletroquímica. Posteriormente ao pré tratamento emprego, o imunossensor produzido com a incorporação de nanopartículas, imobilização de cisteamina e glutaraldeído. Por fim, o Ab foi incubado por 1 h sobre os grupos aldeídos e os sítios inespecíficos foram bloqueados com albumina sérica bovina (BSA). Os autores detectaram a proteína *Spike* do vírus com um LOD de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, em uma faixa linear de 1,0 a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A detecção eletroquímica aliada à impressão 3D fornece uma ferramenta poderosa, simples, rápida e de baixo custo para a detecção de vírus. Assim, o uso de biossensores impressos em 3D como plataforma para detecção de doenças virais é promissor e tem ganhado espaço para o crescimento e desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa. Portanto, pode-se observar

que o uso da impressão 3D em eletroquímica e a possibilidade da fabricação de eletrodos condutivos proporcionou a impressão de eletrodos com diferentes propriedades (PUMERA, 2019). No entanto, há muito a ser explorado no sentido de construção de novos dispositivos condutivos impressos 3D e no uso destes dispositivos, especialmente para fins de biossensoriamento. O desenvolvimento de biossensores aprimorados e de baixo custo vem se mostrando cada vez mais importante, um exemplo disto é o surgimento e reaparecimento de vírus altamente contagiosos como é o caso do SARS-CoV-2 e a varíola dos macacos.

1.7 Pandemia do vírus SARS-CoV-2

Em 2019 o mundo inteiro foi surpreendido pelo início do que viria ser uma nova pandemia mundial, causada por um vírus respiratório (RIBEIRO et al., 2020). Este vírus denominado Coronavírus 2 ou Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), que causa a doença coronavírus 2019 (COVID-19) foi relatada inicialmente em Wuhan, na China (RIBEIRO et al., 2020). De acordo o jornal O Globo e o consórcio de veículos de imprensa, o Brasil já registrou mais de 38 milhões casos e mais de 830.000 mortes por coronavírus até o dia 27 de agosto de 2023. Já, em um aspecto mundial, segundo o Google Noticiais até o dia 22 de janeiro de 2024 o mundo já registrou mais de 690 milhões de casos e mais de 6,9 milhões mortes causadas pelo COVID-19.

Uma das principais estratégias para combater a pandemia é aplicação de métodos para detecção da COVID-19 de forma rápida e em grande escala. Os principais ensaios para detecção da COVID-19 utilizados no começo da pandemia foram: imunofluorescência (BUCHHOLZ et al., 2013), ensaio de micro-arranjo de proteína (REUSKEN et al., 2013), ensaio de amplificação isotérmica mediado por alça de transcrição reversa (SHIRATO et al., 2018; STRANIERI et al., 2017), ensaio de placa viral (PANKAJ, 2013), ensaio de hemaglutinação (PANKAJ, 2013), citometria de fluxo viral (LIU et al., 2015) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ZUO et al., 2004). Entretanto, estes métodos por possuem uma série de desvantagens como: preço, longo tempo de análise e a necessidade de um operador qualificado para aplicação

(BRAZACA et al., 2021; RIBEIRO et al., 2020). Ademais, para testes da COVID-19 o indivíduo precisa sair do confinamento para realizar o exame médico. Com isso, o risco de entrar em contato com o vírus no processo ou transmitir, aumenta drasticamente. Portanto, desenvolver novas plataformas de biossensoriamento para vírus é de suma importância, principalmente se estas plataformas oferecerem praticidade e fácil operação.

A possibilidade de criar genossensores e imunossensores eletroquímicos para a detecção da COVID-19 é de grande vantagem para o desenvolvimento de novos testes rápidos. Para os imunossensores, a gama de analitos de interesse é ampla, uma vez que existem quatro principais proteínas estruturais as quais podem ser usadas para a detecção de corona vírus em geral, sendo eles o nucleocapsídeo (N), as proteínas *Spike* (S), matriz (M) e envelope (E), e dentre estes, as proteínas S e N são capazes de diferenciar os diferentes tipos de coronavírus (EISSA; ZOUROB, 2021; SRIVASTAVA et al., 2021). A Figura 5 apresenta a estrutura do vírus, e as principais proteínas encontradas no SARS-CoV-2.

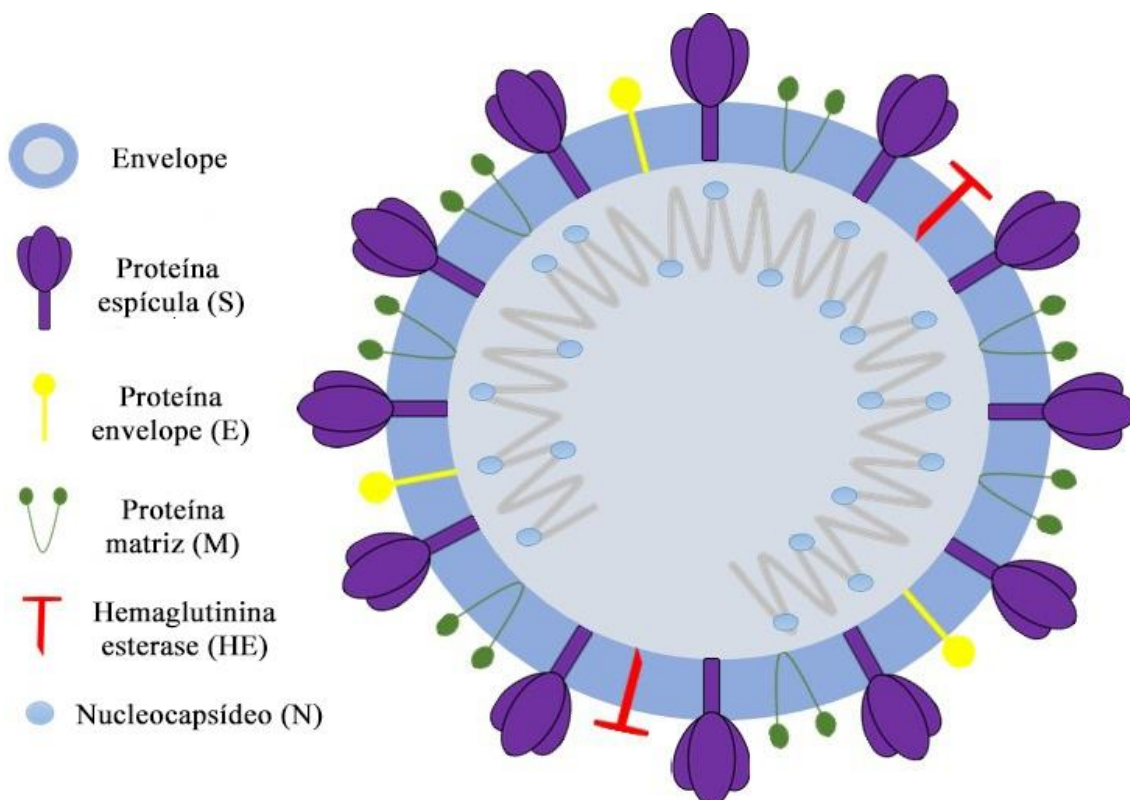


Figura 5. Estrutura do vírus SARS-CoV-2. **Fonte:** próprio autor

Na literatura são relatados diferentes tipos de biossensores eletroquímico para detecção de SARS-CoV-2. Através da imobilização do nucleocapsídeo (N) em um eletrodo SPE modificado com fibras de carbono funcionalizado através da redução de sal de diazônio, Eissa e Zourob (EISSA; ZOUROB, 2021) desenvolveram um imunossensor eletroquímico para a detecção de COVID-19. Um ensaio competitivo foi realizado e a técnica de voltametria de onda quadrada foi usada para a detecção da proteína N, proporcionando um limite de detecção de $0,8 \text{ pg mL}^{-1}$. Fabiani e colaboradores (FABIANI et al., 2021) também desenvolveram um imunossensor para SARS-CoV-2, eles se basearam na detecção das proteínas S e N em saliva, combinando o uso de esferas magnéticas, que funcionaram como suporte para a cadeia imunológica, e SPEs modificados com CB.

Em relação a genossensores para a detecção eletroquímica do vírus, Alafeef *et al.* (ALAFEEF et al., 2020) propuseram um genossensor em papel para análises rápidas (< 5 minutos), de baixo custo e ultrasensível para a detecção do material genético do SARS-CoV-2. O biossensor desenvolvido trata-se de uma plataforma à base de grafeno e AuNps cobertas com oligonucleotídeos altamente específicos (ssDNA) tendo como alvo o nucleocapsídeo. O biossensor proporcionou análises sensíveis com um limite de detecção de $6,9 \text{ cópias } \mu\text{L}^{-1}$ em amostras clínicas e seletivas.

Na literatura há alguns relatos do uso de impressão 3D na fabricação de biossensores eletroquímicos para detecção da COVID-19, como imunossensor e genossensor. O imunossensor criado por Ali e colaboradores (ALI et al., 2020) foi desenvolvido usando o método de impressão 3D por jato de aerossol, criando um arranjo de eletrodos microcapilares de ouro, seguido pela funcionalização de nanoflocos de óxido de grafeno reduzido (rGO) e imobilização dos antígenos. Neste trabalho, foi feita a detecção da proteína S e um limite de detecção de $2,8 \text{ fmoL L}^{-1}$. No trabalho de Crevillen e colaboradores (2021) foi relatado a utilização de uma caneta impressora 3D conjunto com filamentos condutivos a base de grafeno e PLA para produção de um genossensor. Eles usaram a adsorção de fitas simples de DNA na superfície para detecção da sequência do gene N do vírus SARS-CoV-2. O genossensor

apresentou alta sensibilidade e resposta rápida, com um limite de detecção de 15,0 nmol L⁻¹ (CREVILLEN et al., 2022).

O emprego de técnicas eletroanalíticas possibilita o desenvolvimento de diferentes tipos de classes de biossensores, com metodologias de análise diretas, rápidas, com baixo custo e com menor influência de interferentes, permitindo o seu uso *in loco* (BRAZACA et al., 2021; KIMMEL et al., 2012; RIBEIRO et al., 2020). Ademais, buscar outras alternativas para detectar doenças, virais ou não, é de suma importância. A busca por testes alternativos capazes de indicar problemas de saúde em estágios precoce de forma simples, rápida e barata se tornou uma questão relevante. Neste contexto, a detecção de biomarcadores de doenças ganhou destaque nos últimos anos, sendo uma alternativa altamente promissora capaz de indicar infecções e problemas de saúde de forma rápida e em estágios iniciais.

1.8 Surto da varíola dos macacos

A varíola dos macacos é uma doença viral zoonótica causada pelo vírus de mesmo nome, que é uma das espécies de uma grande família de vírus de DNA de fita dupla (família Poxviridae), pertencente ao gênero Orthopoxvirus (MAULDIN et al., 2022; QUARLERI; DELPINO; GALVAN, 2022). O poxvírus comumente possui o tamanho entre 200– 450 nm de comprimento e em forma de “ovo” ou “tijolo”, que podem ser encontradas em amostras biológicas de pacientes infectados por microscopia eletrônica de transmissão. As partículas virais consistem em uma estrutura complexa, contendo um núcleo, corpos laterais e membrana externa, coberta por um E externo de lipoproteínas (CANN, 2015; CHMEL et al., 2022; KOZLOV, 2022; MCFADDEN, 2005). A superfície externa da partícula do vírus é responsável por proteger o genoma do ácido nucléico contra danos e também pelo reconhecimento e interação com as células hospedeiras. Vários vírus desse grupo são conhecidos por causar doenças infecciosas entre humanos, como o vírus da varíola (varíola), vírus da varíola bovina, vírus vaccínia e vírus da varíola dos macacos. A Figura X apresenta uma concepção do vírus e sua estrutura.

Estrutura do vírus varíola dos macacos

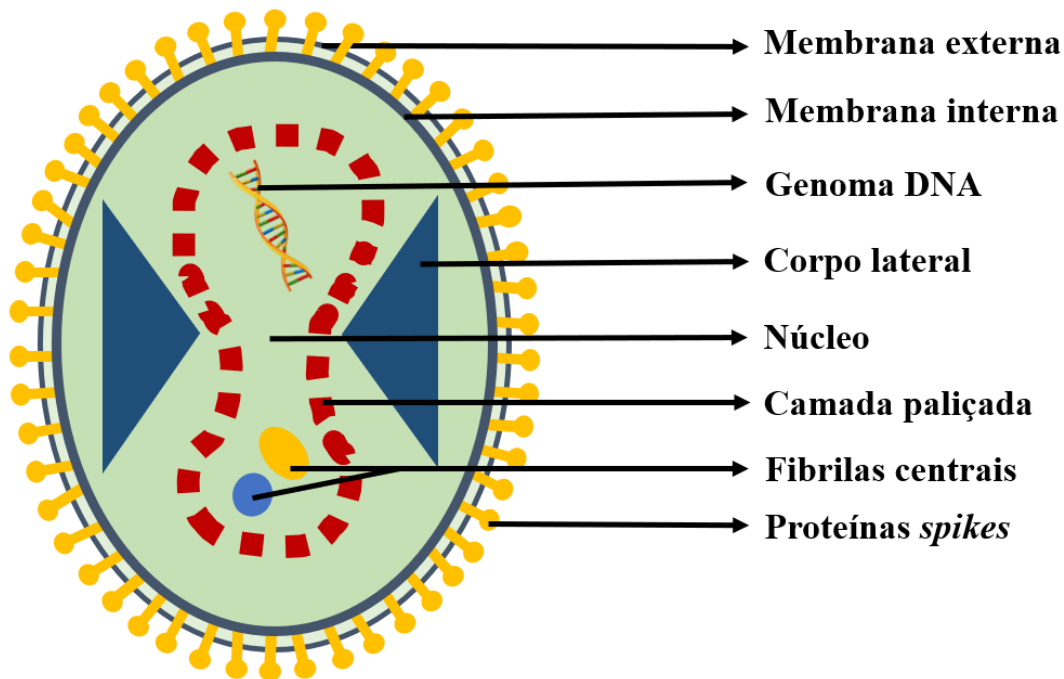


Figura 6. Estrutura do vírus SARS-CoV-2. **Fonte:** próprio autor

A varíola dos macacos é considerada uma doença negligenciada até o momento, a qual foi identificada pela primeira vez na República Democrática do Congo em 1970, causando inúmeros surtos no continente africano (JEZEK et al., 1987). No entanto, em maio de 2022, pesquisadores constataram a presença desse vírus em humanos nos Estados Unidos da América e, desde então, foi relatado em mais de 28 países e territórios não endêmicos, principalmente em vários países europeus e no território brasileiro (MINHAJ et al., 2022). No Brasil, já foi constatado milhares de casos, tornando-se assim uma preocupação de saúde pública eminente (STEFANO et al., 2023). Embora tenha sido considerado um vírus de baixo potencial pandêmico, em comparação ao COVID-19, o aumento do número de casos vem causando grande preocupação à Organização Mundial da Saúde (OMS) e autoridades sanitárias de diversos países (STEFANO et al., 2023). Diante disso, é de suma importância mencionar, que uma lição que a pandemia da COVID-19 ensinou, é a necessidade extrema de realização de testes em massa, que sejam capazes de apontar o resultado em pouco tempo e com alta confiabilidade,

para que as medidas necessárias sejam tomadas, por meio dos pacientes ou das autoridades de saúde.

A detecção do vírus da varíola dos macacos pode ser realizada em conjunto com técnicas de amplificação, como reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real ou convencional, que permite a diferenciação entre os diferentes poxvírus (JIANG et al., 2022). Tal teste é considerado um teste padrão ouro devido à sua alta sensibilidade e especificidade e foi recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para confirmação da infecção pelo vírus da varíola dos macacos (World Health Organization). Ademais, outros métodos mais relatados na literatura para realização do monitoramento de infecções pelo vírus da varíola dos macacos são: RPA, LAMP, ELISA e CRISPR-Cas (LI et al., 2010; RIZK et al., 2022; STEFANO et al., 2023). Apesar destes testes serem altamente qualificados e eficazes, eles ainda apresentam algumas desvantagens cruciais. Dentre as principais vantagens as que mais se destacam é a necessidade de equipamento e operador especializado, e tempos longos para obtenção do resultado em alguns casos. Tais desvantagens limitam a aplicação destes testes, principalmente em países e regiões de baixa infraestrutura, como no caso de países africanos, latino americano e diversas regiões carentes do Brasil. Neste contexto, buscar desenvolver novos tipos de testes para o vírus da varíola dos macacos que solucione esses problemas é de extrema importância.

O desenvolvimento de testes necessita também apresentar novas vantagens como, praticidade da aplicação e interpretação dos resultados, capacidade de miniaturização e portabilidade para aplicação *in loco*, baixo custo e rapidez das respostas (STEFANO et al., 2023). Possuir tais características tornam-se fundamental para contribuir com a saúde pública no controle de um vírus de possibilidades pandêmicas, além de colaborar para um acesso mais humanizado a testes para detecção de uma doença viral, principalmente a populações mais carentes e marginalizadas. Diante disso, os sistemas eletroquímicos apresentam um alto potencial para o biossensoriamento de vírus, apresentando todas as qualidades desejadas para um novo meio de testagem.

Neste contexto, segundo Stefano et al., (STEFANO et al., 2023) vários analitos específicos podem ser aplicados para a detecção de MKPV, como proteínas e material genético. Dentre diversas proteínas, destacam-se I1L, M1R e A29. A proteína A29, em particular, destaca-se por ser um dos analitos mais comuns para identificação de MKVP (RCHEULISHVILI et al., 2023), sendo altamente conservada entre os poxvírus. A A29 é uma proteína de fusão presente no E (camada entre a membrana interna e externa) do vírus que se liga à heparina da superfície celular e é um alvo para anticorpos neutralizantes (RCHEULISHVILI et al., 2023). Portanto, o desenvolvimento de sensores específicos para a proteína A29 pode permitir a detecção direta do MKPV sem a necessidade de pré-tratamento das amostras. Quanto à detecção de material genético, embora muitas vezes exija extração e amplificação por PCR, seu uso ainda é extremamente viável, sendo comumente aplicado pelas principais agências globais de controle de doenças (Test procedure: Monkeypox virus generic real-time PCR test). Além disso, os genossensores fornecem métodos altamente específicos e alternativos aos já utilizados regularmente em centros de análise (BRAZACA et al., 2021; KHANMOHAMMADI et al., 2020).

1.9 Biomarcadores para SARS-CoV-2

A realização do monitoramento de biomarcadores em clínicas ou até mesmo em pontos de atendimento, bem como em pesquisas laboratoriais, tem sido amplamente empregado nos últimos anos. Essa preocupação a respeito de monitorar e estudar novos métodos de detecção dos biomarcadores é devido a sua presença em determinados níveis ser um forte indicativo de alterações/distúrbios no organismo humano. Neste contexto, desenvolver dispositivos capazes de realizar o monitoramento de biomarcadores é crucial para contribuir com a saúde pública (BOLLELLA et al., 2017; GEVAERD et al., 2022; SILVA et al., 2022a). Além disso, em comparação de custos, analisar biomarcadores é mais vantajoso que criar plataformas de detecção de vírus por exemplo. Deste modo, desenvolver dispositivos eletroquímicos impressos em 3D torna-se uma importante fonte de pesquisa pois atrela as vantagens da impressão 3D com sensores eletroquímicos para detectar biomarcadores. Esta

pode se tornar uma alternativa eficaz e de alto potencial para o mundo das análises clínicas.

Um biomarcador é uma biomolécula alvo que pode ser encontrada no sangue ou em outro fluido corporal e está ligada a uma indicação de um processo saudável ou não saudável (BOLLELLA et al., 2017; CAMPUZANO; YÁNEZ-SEDEÑO; PINGARRÓN, 2017; GEVAERD et al., 2022). O uso de biomarcadores para análises clínicas é menos dispendioso e mais conveniente do que avaliar diretamente a "doença final", com o benefício adicional de poder testar e determinar em menos tempo espécies de marcadores, o qual geralmente se manifestam de antemão. A detecção de biomarcadores para SARS-CoV-2 pode ser uma abordagem interessante para melhorar o diagnóstico clínico. O COVID-19 tem sido comumente associado a danos renais, que podem ser diagnosticados por níveis elevados de creatinina (CNN) e ácido úrico (AU) (DENG et al., 2022; LI et al., 2012; WERION et al., 2020).

A CNN é produzida nos músculos a partir da creatina, liberada na corrente sanguínea e excretada pelos rins (LI et al., 2012). A medição dos níveis de CNN no sangue ou na urina humana é clinicamente essencial porque os níveis refletem parcialmente o estado da função renal e muscular e altos níveis de CNN (maiores que 150,0 ou 500,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) indicam mau funcionamento dos rins (JACOBI et al., 2008; LAD; KHOKHAR; KALE, 2008; LI et al., 2012). Valores abaixo de 40,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ são indicativos de diminuição da massa muscular (BISHOP, 2020; LAD; KHOKHAR; KALE, 2008). Por outro lado, o UA é um metabólito liberado no soro sanguíneo como produto final do catabolismo da purina (VERMA et al., 2019). Altas concentrações de UA no corpo humano são associadas a várias doenças, tais como disfunções renais, diabetes, colesterol alto, obesidade, dentre outras (KANG et al., 2002; LAKSHMI et al., 2011; VERMA et al., 2019). De acordo com a literatura, o AU pode ser encontrado em uma faixa de concentração de 0,12 a 0,38 mmol L^{-1} no soro sanguíneo e esse valor deve ser inferior a 4,50 mmol L^{-1} por dia na urina (BALLESTA-CLAVER et al., 2011; ROSSINI et al., 2018).

A partir do apresentado e discorrido acima, é notório que o desenvolvimento e aprimoramento de dispositivos de análise clínica são altamente desejados, principalmente dispositivos que atrelem características

como baixo custo, simples operação e interpretação das respostas. Neste contexto, os sensores eletroquímicos tornam-se um candidato ideal, principalmente quando acoplado à tecnologia de impressão 3D, pois permite a fabricação descentralizada e rápida de sensores de alta qualidade. Porém, não basta só produzir sensores capazes de realizar as análises clínicas desejáveis, é também necessário otimizar todo o processo desde a matéria prima ao dispositivo final, como o desenvolvimento de novos filamentos condutivos. Ademais, fabricar sensores portáteis e miniaturizados capazes de serem empregados na própria residência do paciente é altamente vantajoso pois torna-se uma peça de inclusão capaz de ser aplicado em locais mais carentes, não só contribuindo com a saúde pública, mas também com uma sociedade mais justa e inclusiva.

Capítulo 2

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver sensores e biossensores impressos em 3D para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e varíola dos macacos, e os biomarcadores CNN e AU. Ademais, também foi objetivado produzir um novo filamento condutivo a base de grafite e PLA, bem como CB. A presente tese foi dividida em quatro capítulos de resultados discutidos (capítulos 3 a 6), referente a quatro trabalhos distintos produzidos. O capítulo 3 é a respeito da aplicação de um filamento condutivo comercial à base de grafeno para o desenvolvimento de um sensor e um genossensor eletroquímico. O capítulo 4 e 5 é a produção de dois novos filamentos condutivos um à base de grafite e outro a base de CB e suas aplicações como (bio)sensores, respectivamente. O capítulo 6 é o desenvolvimento de um sistema multiplex impresso totalmente em 3D composto por dois biossensores produzidos com filamentos feitos em laboratório ultra flexível a base de CB para imuno e geno detecção do vírus varíola dos macacos.

2.2 Objetivos específicos

Capítulo 3: (Bio)sensores 3D à base de G-PLA para determinação de creatinina e cDNA do vírus SARS-CoV-2

Desenvolver um sensor e um genossensor eletroquímico a partir de filamento condutivo comercial à base de grafeno e PLA para a detecção de CNN e do cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2. Para tal, o sensor impresso em 3D será modificado com partículas de ouro (AuPs) para detecção de CNN e posteriormente com cDNA de captura para detecção do SARS-CoV-2. Por fim, os (bio)sensores serão empregados na análise de amostra biológicas reais e sintéticas enriquecidas com os analitos de interesse.

Capítulo 4: Novo filamento condutivo baseado em Gpt-PLA e produção (bio)sensores para determinação de ácido úrico e proteína *Spike S1* do vírus SARS-CoV-2.

Fabricar um novo filamento condutivo baseado em grafite e PLA com alta carga de material condutivo para produção de sensores eletroquímicos impressos em 3D prontos para uso. Posteriormente almeja-se aplicar os sensores produzidos a partir do novo filamento para detecção do biomarcador AU em amostras de urina sintética. Por fim, realizar a fabricação de um imunossensor eletroquímico impresso em 3D para detecção da proteína *Spike* (S1) do vírus SARS-CoV-2 em amostra de saliva sintética.

Capítulo 5: Novo filamento condutivo baseado de *carbon black* e PLA para a fabricação aditiva de um biossensor eletroquímico covalente para detecção da proteína *spike S1* do vírus SARS-CoV-2.

Empregando a mesma rota de produção de filamentos condutivos do capítulo 4, foi fabricado um filamento a base de CB e PLA otimizado. O novo filamento foi empregado para construção de um imunossensor eletroquímico portátil para detecção da proteína *spike S1* do vírus SARS-CoV-2 em amostra de soro humano e saliva sintética. Para tal, todo procedimento de construção e detecção da proteína de interesse foram totalmente otimizados por método multivariado e univariado.

Capítulo 6: Dispositivo eletroquímico de alvo duplo fabricado totalmente impresso em 3D para detecção de DNA e proteína A29 do vírus varíola dos macacos .

Aplicação de filamentos condutivos ultra flexíveis feitos em laboratórios a base de CB e PLA reciclado para desenvolvimento de uma plataforma eletroquímica de dupla análise para detecção portátil da proteína A29 e DNA alvo do vírus varíola dos macacos. Para tal, a etapa de construção dos biossensores e etapa de detecção foram totalmente otimizados por experimentos univariados.

Capítulo 3

*(Bio)sensores 3D à base de G-PLA para determinação de creatinina e
cDNA do vírus SARS-CoV-2*

3. Metodologia

3.1 Reagentes e soluções

Água ultrapura de um sistema Milli-Q Plus (Millipore Corporation®, Darmstadt, Alemanha) foi usada para preparar todas as soluções aquosas. Cloreto de sódio (NaCl) (99%, Vetec®, Brasil) foi utilizado como eletrólito suporte em análises voltamétricas para determinação de CNN. A modificação do eletrodo foi realizada com ácido cloroáurico – HauCl_4 (99%, Sigma-Aldrich®, USA) em ácido sulfúrico - H_2SO_4 (95%, Vetec®, Brasil). Os testes de interferência foram realizados com glicose, ácido ascórbico (AA) (Sigma-Aldrich®, EUA), ácido úrico (AU) (99%, Sigma-Aldrich®, EUA) e glutathiona reduzida (98%, Sigma-Aldrich®, EUA). Uma solução estoque de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CNN foi utilizada como padrão analítico.

Ambas as amostras sintéticas (urina e saliva) foram preparadas seguindo protocolos da literatura (ROMONTI et al., 2016). A urina sintética foi produzida com NaCl (99%, Vetec®, Brasil), cloreto de potássio – KCl (99%, Vetec®, Brasil), cloreto de cálcio dihidratado (99%, Vetec®, Brasil), sulfato de sódio anidro (99%, Vetec®, Brasil), fosfato monopotássico (99%, Vetec®, Brasil), cloreto de amônio (99%, Vetec®, Brasil) e uréia (99%, Dinâmica®, Indaiatuba, Brasil). A saliva sintética foi preparada com NaCl (99%, Vetec®, Brasil), fosfato de sódio dibásico (99%, Vetec®, Brasil), cloreto de potássio ($\geq 99\%$, Vetec®, Brasil), tiocianato de potássio (99%, Vetec®, Brasil) e ureia (ROMONTI et al., 2016). O soro humano foi adquirido da Sigma-Aldrich®, EUA.

Para o desenvolvimento do biossensor e posterior análise, foram adquiridos 2-mercaptoetanol e Tampão salino Tris 10x (Sigma-Aldrich®, EUA). Foram obtidas três sequências de DNA (EXXTEND®, Paulínia, Brasil): a sequência de captura, ou sonda (Thiol C6-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA), obtida a partir do gene ORF1ab, a sequência alvo (TAGCCGGCAGCACAAGACATCT) e a sequência controle negativo alvo (TGACTACAGAAGTGGCTTTTG). A sonda eletroquímica empregada nas análises de biossensoriamento foi o ferrocenometanol – FcMeOH (97%, Sigma-Aldrich®, EUA).

3.2 Instrumentos, célula eletroquímica e eletrodos

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm® (Eco Chemie, Holanda) operado utilizando o software NOVA (versão 2.1.4), que também foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados. A correção de linha base foi usada para detecção voltamétrica de CNN para melhor resolução de pico, usando o algoritmo “*moving average*”, com tamanho de janela definido como 2.

Para fabricação do dispositivo eletroquímico uma impressora 3D modelo Sethi3D S3 (Campinas, Brasil) foi utilizada. Os filamentos empregados foram o filamento condutivo (dopado com grafeno) adquirido da Black Magic® 3D (New York, NY, EUA) e filamento não condutivo, o PLA (Sethi3D® (Campinas, Brasil)).

3.3 Caracterização morfológica e eletroquímica

Para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), modelo Thermo Fisher Scientific Prisma E com tecnologia ColorSEM e espectroscopia de raios-X (EDX) com dispersão de energia integrada foi usado para adquirir imagens. As imagens foram obtidas para G-PLA e Au/G-PLA. A espectroscopia de infravermelho foi realizada por um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Bruker® ALPHA II entre 4000 e 600 cm^{-1} .

Análises de EIS foram realizadas para entender os diferentes efeitos de superfície provocados pela adição de Au no eletrodo impresso em 3D. Cada estudo foi realizado aplicando seus valores específicos de potencial de circuito aberto (0,6 e 9,0 mV para eletrodos G-PLA e Au/G-PLA, respectivamente), medidos após 300 s de estabilização, com um ajuste χ^2 de 0,04367 (G-PLA) e 0,0272 (Au/G-PLA).

3.4 Produção do eletrodo G-PLA

Os eletrodos de referência, eletrodo de trabalho e contra eletrodo foram confeccionados em impressora 3D, com desenho baseado em SPEs comerciais. O eletrodo de trabalho consiste em um círculo de 4 mm de

diâmetro, o contra eletrodo em um semicírculo de 9 mm, que foi colocado ao redor do eletrodo de trabalho. Por fim, o eletrodo de referência em um semicírculo menor para preencher o espaço ao redor do eletrodo de trabalho, conforme apresentado na Figura 7. Os eletrodos foram impressos em 3D usando um filamento G-PLA comercial, e os desenhos foram projetados usando o software Blender e, finalmente, importados pelo software Simplify3D, que controla a impressora 3D e impressos a 190 °C.

Para expor o material condutivo e remover o excesso de PLA da superfície do sensor eletroquímico, foi realizado um pré-tratamento químico no mesmo, de acordo com um procedimento já descrito na literatura (SILVA et al., 2020). Inicialmente os três tipos eletrodos foram imersos completamente em dimetilformamida (DMF) por 15 minutos. Em seguida os eletrodos foram lavados com etanol para remover o PLA degradado e possibilitar a recristalização do material. Por fim, os eletrodos foram colocados para secar a temperatura ambiente até a completa secagem (12 h). Após o tratamento dos eletrodos, os mesmos foram fixados em um suporte (folha de plástico rígido), com o auxílio de uma fita adesiva dupla face. A área dos eletrodos foi então delimitada com esmalte incolor (aproximadamente até a metade do contato elétrico). Uma ilustração do modelo do sensor eletroquímico impresso e processo de acoplagem dele a base de plástico rígido é apresentada na Figura 7.

3.5 Eletrodeposição e otimização de Au

A otimização da eletrodeposição de Au na superfície do eletrodo de G-PLA foi realizada com o planejamento de composto central de 2^2 (CCD) com três réplicas no ponto central. A eletrodeposição de Au foi realizada aplicando $-0,6$ V fixo por um tempo pré-determinado. As respostas usadas na otimização foram obtidas a partir da resposta analítica na presença de CNN ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em solução de NaCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) empregando análise por voltametria de onda quadrada (do inglês *square wave voltammetry* - SWV) com os parâmetros operacionais padrão do software (incremento de potencial (5 mV); amplitude de

modulação (20 mV) e frequência (15 Hz)). Nesta etapa, as variáveis de interesse (tempo de deposição (X_1) e concentração de Au^{3+} (X_2)) foram estudadas em uma faixa de 47 a 683 s, e 0,76 a 9,25 mmol L⁻¹. A superfície de resposta obtida foi então utilizada para o estabelecimento das melhores condições para eletrodeposição. O layout experimental do procedimento 2² CCD com os experimentos realizados, variáveis e seus respectivos níveis reais e normalizados, e resposta do sinal analítico da CNN (corrente) estão descritos na Tabela 1. Os parâmetros de SWV foram definidos em 5 mV (incremento de potencial), 20 mV (amplitude) e 10 Hz (frequência) para todas as análises e realizadas subsequentemente.

Tabela 1. Matriz de planejamento CCD, níveis reais e normalizados e resposta obtida para Au/G-PLA. **Fonte: próprio autor**

EXP	M	X_1	X_2	X_1^2	X_2^2	X_1X_2	ΔI_{CNN} (μA)
1	1	-1	-1	1	1	1	2,3
2	1	1	-1	1	1	-1	50
3	1	-1	1	1	1	-1	11
4	1	1	1	1	1	1	13
5	1	-1.4142	0	2	0	0	28
6	1	1.4142	0	2	0	0	1.4
7	1	0	-1.4142	0	2	0	33
8	1	0	1.4142	0	2	0	49
9	1	0	0	0	0	0	46
10	1	0	0	0	0	0	43
11	1	0	0	0	0	0	44

3.6 Otimização dos parâmetros operacionais da técnica SWV

A pré-otimização dos parâmetros operacionais (incremento de potencial; amplitude e frequência) da técnica SWV foi realizada inicialmente empregando o planejamento fatorial completo 2³ em uma faixa de 2 a 10 mV, 20 a 60 mV e 6 a 34 Hz, respectivamente. Este procedimento avaliou a significância das três variáveis da SWV em uma solução contendo CNN 3,0 mmol L⁻¹ em NaCl 0,5 mol L⁻¹. A Tabela 2 apresenta todo o planejamento fatorial completo 2³

(variáveis e seus respectivos níveis reais e normalizados, e resposta de sinal analítico CNN). Os experimentos na Tabela 3 foram realizados em ordem aleatória (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Posteriormente, as duas variáveis significativas (incremento de potencial e frequência) foram otimizadas aplicando um CCD de 2^2 na faixa de 1 a 7 mV e 6 a 34 Hz, em uma solução de CNN $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em NaCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A matriz de 2^2 CCD da etapa de otimização pode ser encontrada na Tabela 3.

Tabela 2. Matriz de planejamento fatorial completa e respectivos resultados obtidos para CNN.
Fonte: próprio autor

EXP	M	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	CNN (μA)
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	63
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	8,3
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	46
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	8,8
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	8,5
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	8,5
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	7,5
8	1	1	1	1	1	1	1	1	8,6

Tabela 3. Matriz de planejamento CCD, níveis reais e normalizados e resposta para CNN.
Fonte: próprio autor

EXP	M	X ₁	X ₂	X ₁ ²	X ₂ ²	X ₁ X ₂	CNN (μA)
1	1	-1	-1	1	1	1	49
2	1	1	-1	1	1	-1	5,1
3	1	-1	1	1	1	-1	1,6
4	1	1	1	1	1	1	3,9
5	1	-1.4142	0	2	0	0	8,4
6	1	1.4142	0	2	0	0	31
7	1	0	-1.4142	0	2	0	1,4
8	1	0	1.4142	0	2	0	8,1
9	1	0	0	0	0	0	32
10	1	0	0	0	0	0	33
11	1	0	0	0	0	0	34

3.7 Preparação do biossensor

O biossensor foi preparado utilizando o sensor G-PLA previamente modificado com Au por eletrodeposição. Para o desenvolvimento do biossensor, o tempo de deposição de Au também foi otimizado, e a otimização foi realizada por meio de experimentos univariados aplicando $-0,6$ V constantemente com concentração fixa de Au^{3+} $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O tempo de deposição variou de 100 a 300 s e a técnica de CV foi selecionada para a análise empregando a sonda *redox* FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O eletrodo modificado com ouro, Au/G-PLA, foi a base para a imobilização de uma concentração específica da sequência de captura do cDNA pelo método de gotejamento (deixar uma gota da solução de interesse sobre o sensor por um tempo pré-determinado). Para tal, o tempo de imobilização e a concentração foram otimizados. A imobilização do cDNA de captura ocorre porque os grupos tiol presentes na fita de cDNA se ligam às AuPs presentes na superfície do sensor impresso em 3D, permitindo que a fita de captura seja ancorada. Inicialmente, uma solução contendo $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência de captura e $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol em $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão TRIS foi preparada como solução estoque. Todas as diluições subsequentes foram realizadas com água ultrapura seguindo protocolo prévio da literatura (BRAZACA et al., 2017). O método de otimização foi multivariado, usando o delineamento por CCD, empregando uma faixa de 1,0 a 7,0 de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$) da sequência de captura (X_1) e tempo de ancoragem (h) na superfície do sensor (X_2) para ambos os parâmetros. As variáveis, seus respectivos níveis reais e normalizados, e suas respostas de sinal analítico (diferença de corrente entre o sinal Au/G-PLA para o genossensor empregando FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz de planejamento CCD, níveis reais e normalizados e respostas. **Fonte:** próprio autor

EXP	M	X_1	X_2	X_1^2	X_2^2	X_1X_2	$\Delta I_{\text{probe}} (\mu\text{A})$
1	1	-1	-1	1	1	1	2,6
2	1	1	-1	1	1	-1	1,0
3	1	-1	1	1	1	-1	2,1
4	1	1	1	1	1	1	1,2
5	1	-1.4142	0	2	0	0	2,8

6	1	1.4142	0	2	0	0	1,1
7	1	0	-1.4142	0	2	0	1,7
8	1	0	1.4142	0	2	0	1,1
9	1	0	0	0	0	0	1,8
10	1	0	0	0	0	0	1,8
11	1	0	0	0	0	0	1,7

Para a análise da sequência alvo, uma gota contendo a biomolécula foi gentilmente adicionada na superfície do genossensor. Deste modo, a sequência alvo hibridiza com a sequência de captura imobilizada na superfície do eletrodo. O tempo de hibridação foi otimizado por experimentos univariados, variando o tempo de 30 a 180 min com uma concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência alvo. A produção do genossensor, bem como a etapa de hibridação (determinação da sequência alvo), podem ser observadas na Figura 7. Além disso, um vídeo das etapas de produção do biossensor pode ser acessado pelo QR na Figura 7.

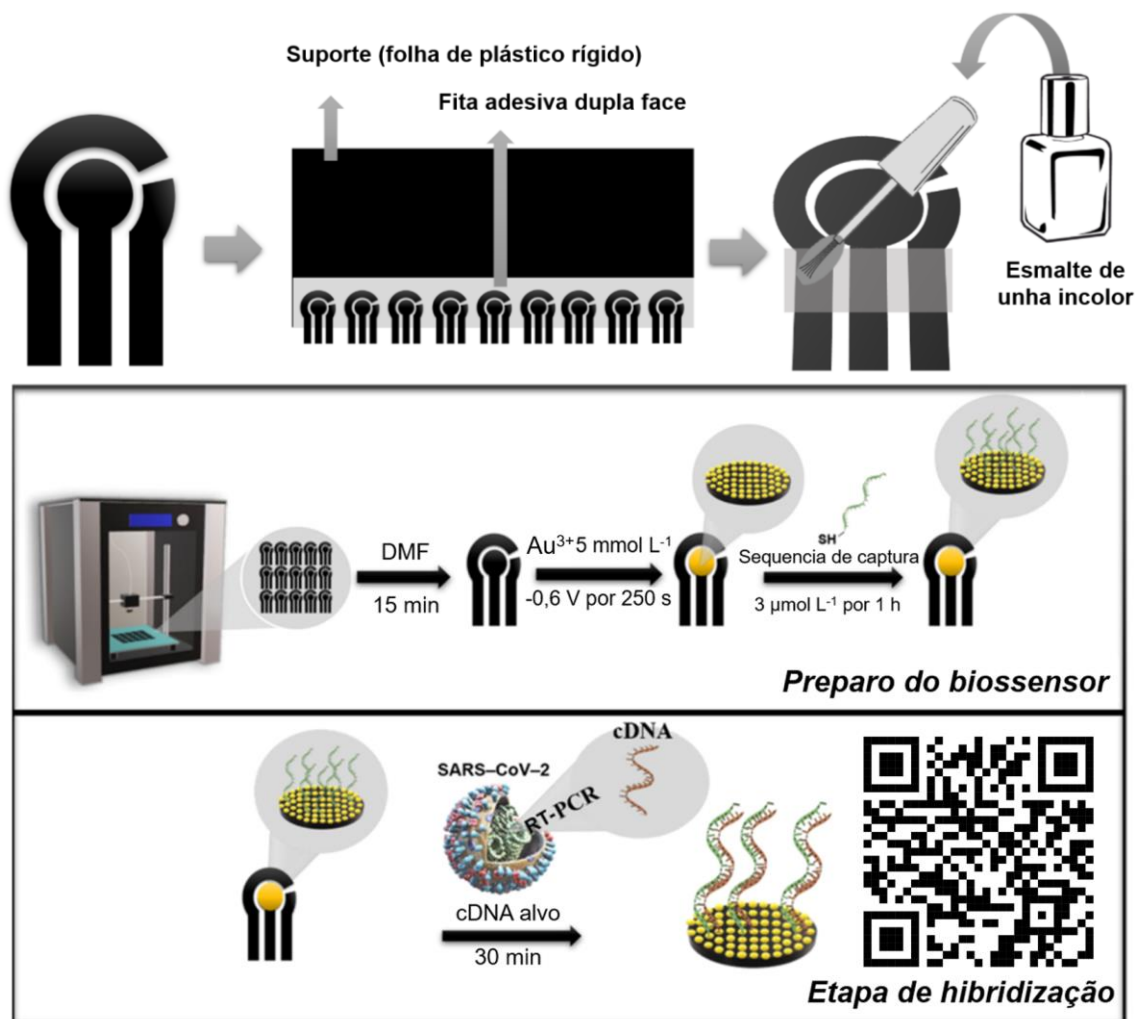


Figura 7. Ilustração esquemática do conjunto de eletrodos impressos em 3D. Fixação no suporte de plástico rígido e delimitação da área com esmalte incolor. Reprodução com permissão (SILVA et al., 2022b). Ilustração esquemática da produção do biossensor e etapa de hibridização. A produção do biossensor consiste na etapa de impressão, tratamento químico da superfície, modificação com Au^{3+} ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e modificação da superfície com a sequência de captura ($3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h). A etapa de hibridização é realizada por 30 min após a adição da gota de solução contendo a sequência de cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2 na superfície do biossensor. Reprodução com permissão (SILVA et al., 2022b).

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização morfológica e eletroquímica

As imagens da superfície dos eletrodos G-PLA e Au/G-PLA (400 e 250 s de deposição) foram caracterizadas e obtidas por MEV, afim de observar a morfologia dos sensores e a modificação com partículas de ouro. Também foram registrados espectros Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) dos sensores G-PLA e Au/G-PLA dentro da faixa de número de onda de 600 a 4000 cm^{-1} . A Figura 8 apresenta imagens de MEV obtidas para os eletrodos propostos e os espectros FT-IR.

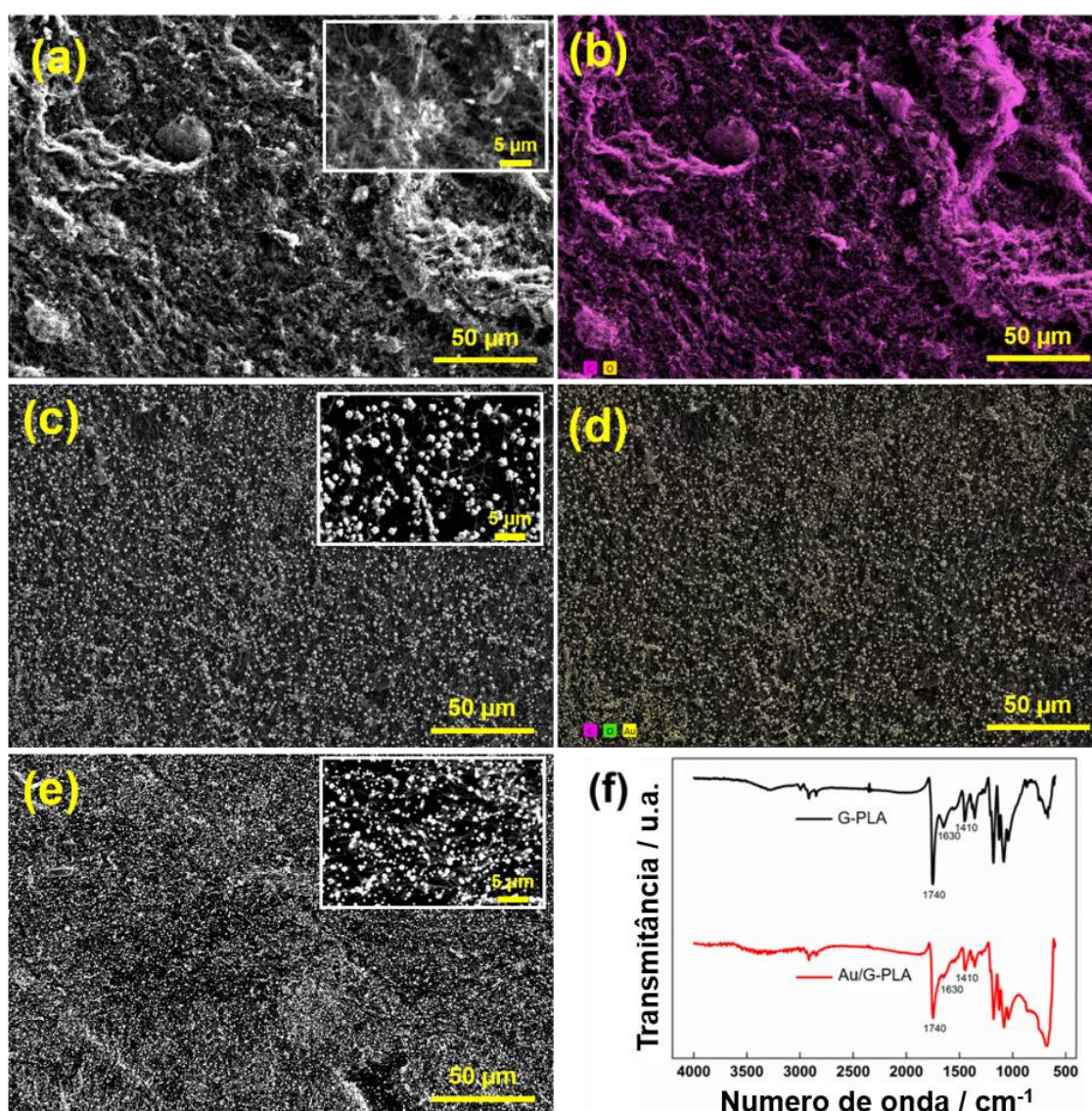


Figura 8. MEV das superfícies de eletrodos (a) G-PLA, (b) mapeamento de elemento correspondente de G-PLA, (c) Au/G-PLA (deposição de 400 s), (d) mapeamento de elemento

correspondente de Au/G-PLA, (e) Au/G-PLA (deposição de 250 s) e (f) espectros FT-IR de G-PLA (preto) e Au/G-PLA (vermelho) foram registrados dentro da faixa de número de onda de 600 a 4000 cm^{-1} . **Fonte: próprio autor**

A Figura 8a apresenta a morfologia da superfície obtida pela análise MEV do eletrodo G-PLA. Pode-se observar uma superfície não uniforme, com grandes irregularidades superficiais, provavelmente causadas pela exposição do material grafeno após o tratamento da superfície. As imagens da superfície de Au/G-PLA mostram como esperado, as partículas de ouro (AuPs) presentes na superfície do sensor após eletrodeposição. As AuPs apresentaram uma boa distribuição por toda a superfície do sensor e em diferentes tempos de deposição (400 e 250 s) mostraram diferentes distribuição e número de AuPs na superfície. Portanto, a otimização deste parâmetro se fez necessária para cada tipo de aplicação desejada (sensor e biossensor). O mapeamento de elementos na Figura 8b aponta apenas a presença de carbono e oxigênio na superfície. Entretanto, na Figura 8d a presença de Au pode ser observada de forma predominante.

Os espectros FT-IR referentes ao eletrodo G-PLA apresentam picos característicos em 1410, 1630 e 1740 cm^{-1} , que podem estar associados a ligações C-H₂, C=C (anel aromático) e C=O (carboxila/carbonila), respectivamente (YI; ZHANG, 2018). Essas bandas são observadas devido à presença de PLA na superfície do eletrodo. Após a deposição de Au na superfície do G-PLA, os picos relacionados às ligações C=O, C=C e C-H₂, apresentaram uma mudança na intensidade (diminuição), indicando coordenação entre as ligações e as partículas de Au (YAGATI et al., 2020). Assim, o FT-IR confirma que a eletrodeposição de Au ocorreu com sucesso na superfície do G-PLA. Por fim, o espectro EDX obtido para o eletrodo Au/G-PLA é apresentado na Figura 9. O EDX demonstra a presença de carbono, oxigênio e Au no sensor, com porcentagens atômicas de 64,8%; 32,1% e 3,1%, respectivamente. Deste modo, o EDX confirma novamente que as partículas presentes nas imagens de MEV são realmente Au.

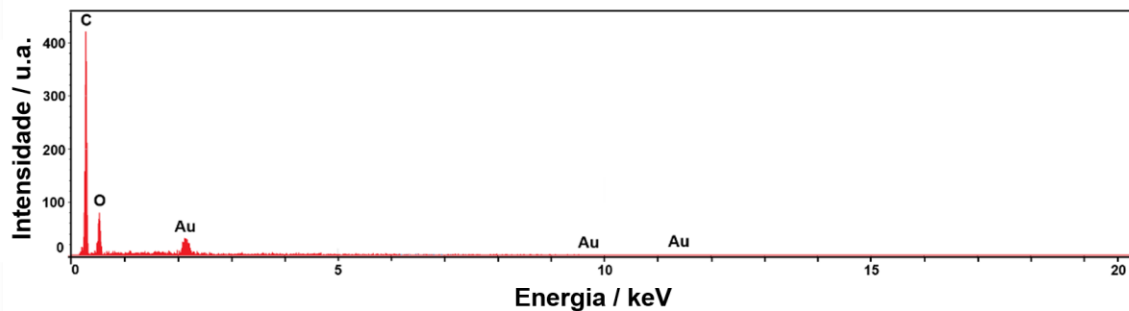


Figura 9. Espectro EDX para Au/G-PLA. Fonte: próprio autor

Dando seqüência nas caracterizações dos eletrodos G-PLA e Au/G-PLA. A Figura 10 apresenta os gráficos de Bode para ambos os eletrodos (G-PLA e Au/G-PLA) e o diagrama de Nyquist desses sistemas. A inserção apresenta todas as informações de interesse, incluindo os circuitos de Randles modificados equivalentes.

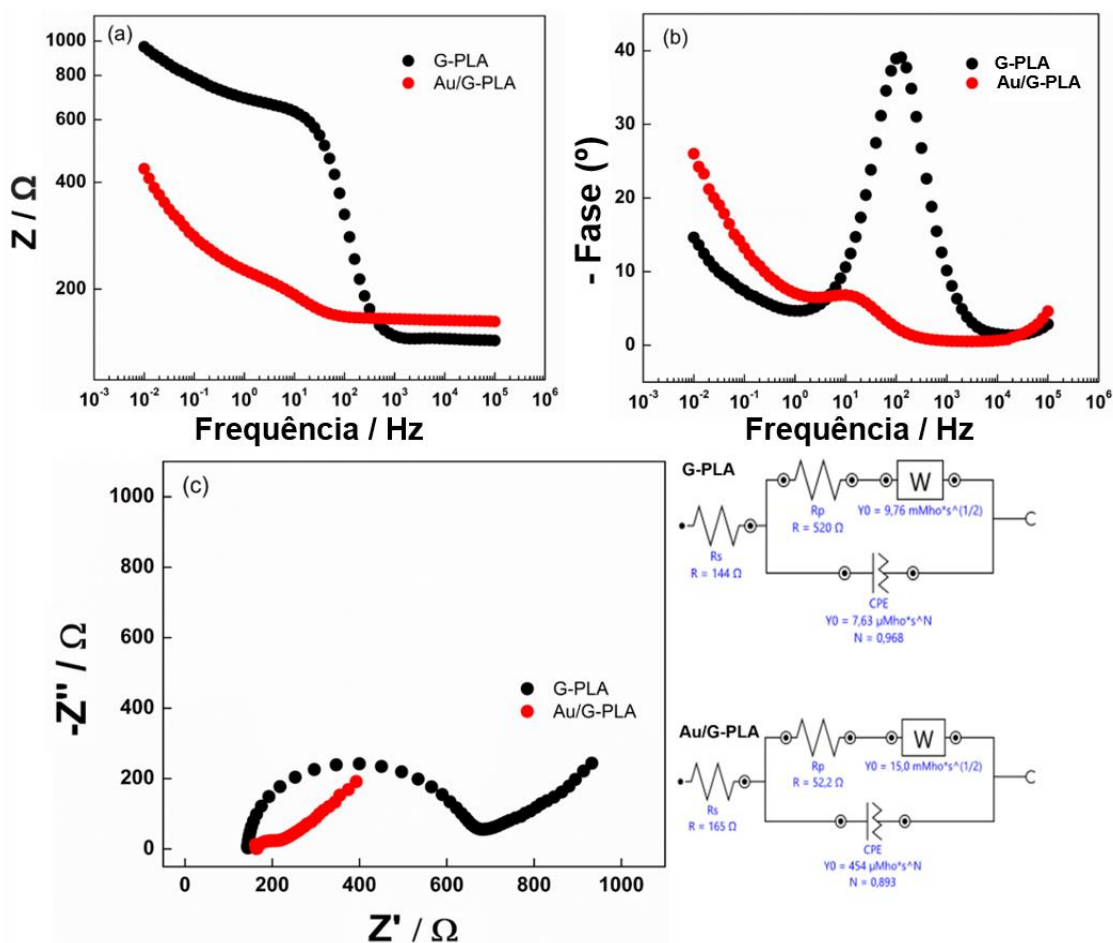


Figura 10. Análises de impedância dos eletrodos G-PLA e Au/ G-PLA. (a) magnitude de impedância e correlação de frequência do G-PLA (linha preta) e Au/G-PLA (linha vermelha).

(b) mudança de fase e correlação de frequência do G-PLA (**linha preta**) e Au/G-PLA (**linha vermelha**). (c) Diagramas de Nyquist do G-PLA (**linha preta**) e Au/G-PLA (**linha vermelha**). Parâmetros: G-PLA = 0,6 mV; Au/G-PLA = 9,0 mV na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. A inserção mostra os respectivos circuitos equivalentes. **Fonte: próprio autor**

Nas Figuras 10a e 10b, em frequências mais altas, há uma pequena mudança na resistência do eletrólito (R_s , de 165 para 144 Ω). No entanto, considerando a diferença de potencial aplicada, os resultados sugerem que a eletrodeposição de Au não tem efeito de carga significativo na formação da dupla camada. Ambos os sistemas apresentaram máximos em valores de fase inferiores a $\pi/2$ °, o que indica uma impedância controlada principalmente pelo fator de resistência, principalmente após a eletrodeposição de Au. Na Figura 10c, o sistema Au/G-PLA mostra uma R_{ct} consideravelmente menor do que o eletrodo não modificado. O processo capacitivo menor sugere que o primeiro pode ser mais sensível a reações eletroquímicas do que o eletrodo não modificado.

4.2 Sensor Au/G-PLA impresso em 3D para detecção de CNN

4.2.1 Perfil voltamétrico

Para observar se as AuPs presentes na superfície do sensor respondem há CNN, a resposta eletroquímica do Au/G-PLA foi avaliada por CV na presença e ausência de CNN 2,0 mmol L⁻¹ em NaCl 0,5 mol L⁻¹. A Figura 11 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos. Todos os voltamogramas foram obtidos na janela de potencial de -1,0 a 1,0 V com velocidade de varredura de potencial de 100 mv s⁻¹.

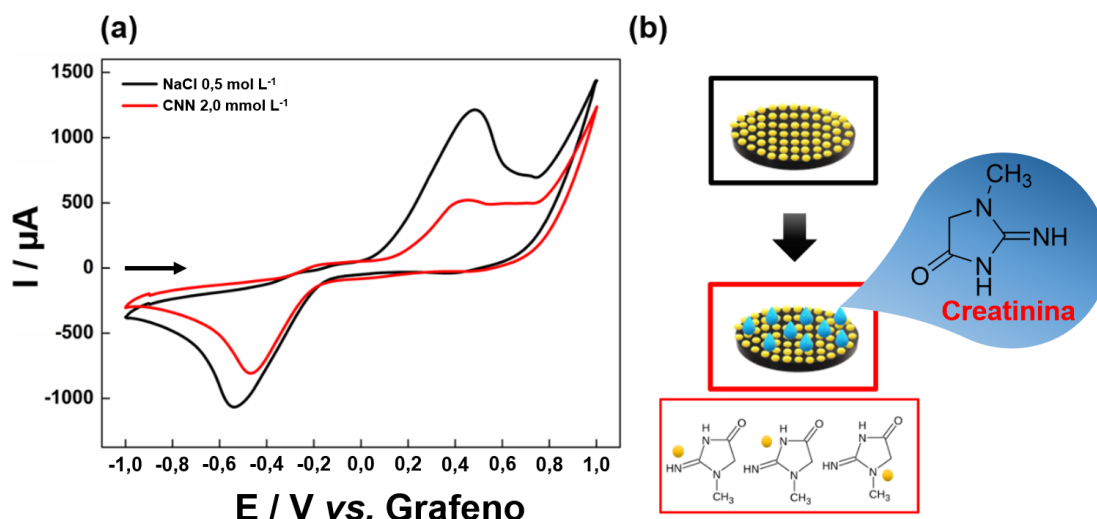


Figura 11. (a) Voltamogramas cíclicos da solução em NaCl 0,5 mol L⁻¹ (linha preta) e (linha vermelha) CNN 2,0 mmol L⁻¹ usando eletrodo Au/G-PLA. Eletrólito de suporte: NaCl 0,5 mol L⁻¹. Velocidade de varredura de potencial: 100 mV s⁻¹, (b) Ilustração esquemática da interação da CNN com AuPs. **Fonte: próprio autor**

Na Figura 11 é possível observar que a resposta eletroquímica do eletrodo Au/G-PLA na ausência de CNN apresentou voltamogramas com a presença de um pico catódico (-0,5 V) e um anódico (0,4 V) com alta intensidade de corrente, o qual correspondem ao Au presente na superfície do eletrodo. Entretanto, na presença de CNN 2,0 mmol L⁻¹, o sinal de corrente Au decai significativamente, demonstrando que a interação entre o Au presente na superfície do sensor e CNN está ocorrendo com sucesso (Figura 13b). Segundo a literatura, a CNN contém três grupos de nitrogênio em sua estrutura, e o Au presente na superfície do eletrodo pode se ligar aos nitrogênios ricos em elétrons através da interação entre os átomos de N-Au (CHI et al., 2010; CUI et al., 2007). É importante observar que as amins primárias são geralmente usadas para modificar a superfície dos eletrodos de Au (principalmente AuPs), e o anel de nitrogênio de aromáticos híbridos exibe uma afinidade de ligação mais forte para metais (GITTINS; EDITION; 2001; HE; NANOTECHNOLOGY; 2014). Portanto, a determinação eletroquímica de CNN é possível usando o eletrodo proposto empregando o método *signal-off*, o qual consiste em determinar uma espécie de interesse devido a complexação e perda de sinal do sensor.

4.2.2 Otimização e eletrodeposição de Au

A otimização da eletrodeposição de Au no sensor G-PLA foi realizada com base na resposta de corrente que sofreu a maior alteração na presença de CNN (diferença entre o sinal Au/G-PLA na ausência e presença de CNN). Deste modo, as variáveis concentração e tempo de deposição foram estudadas aplicando o planejamento experimental CCD. A partir das respostas apresentadas na Tabela 2, foi possível construir uma superfície de resposta e a curva de nível (Figura 12) para obter as melhores condições para a eletrodeposição, e obter os melhores parâmetros para produção do Au/G-PLA para determinação CNN.

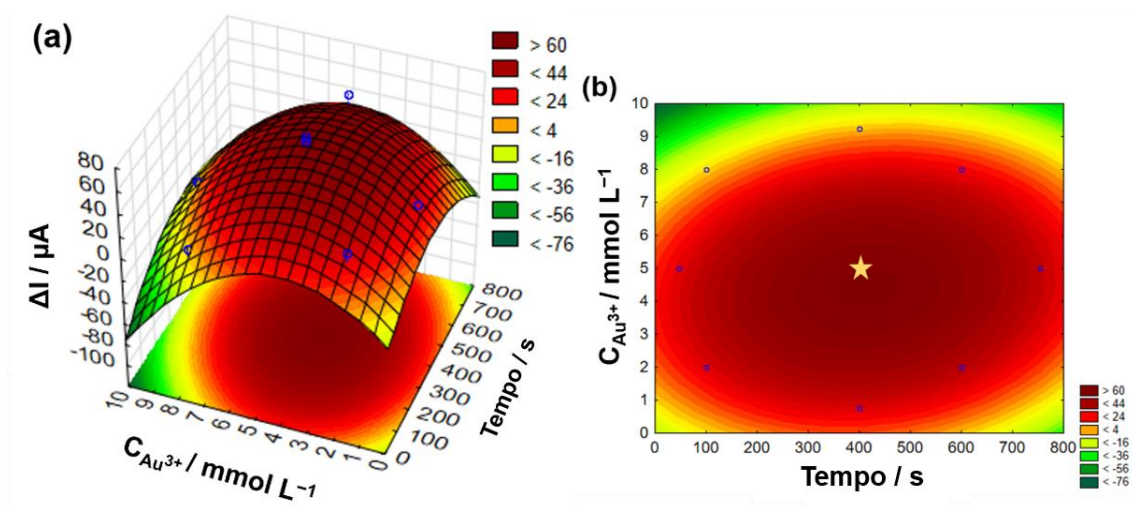


Figura 12. (a) Resposta da superfície e (b) curva de nível obtida para otimização das variáveis: concentração de Au^{3+} ($mmol L^{-1}$) e tempo de eletrodeposição (s) em função da variação de corrente na presença de CNN $3,0 mmol L^{-1}$. **Fonte: próprio autor**

Analisando a Figura 12, identificou-se a região de corrente “máxima” (marcada pela estrela na Figura 12b), mostrando uma região estabilizada com um intervalo ótimo de trabalho para as variáveis envolvidas. Os valores ótimos escolhidos para o desenvolvimento de Au/G-PLA em relação a determinação de CNN foram $5,0 mmol L^{-1}$ e 400 s para concentração de Au^{3+} e tempo de eletrodeposição, respectivamente. Assim, todos os sensores impressos em 3D subsequentes foram modificados empregando uma solução de Au^{3+} e aplicando um potencial constante de $-0,6 V$ por 400 s.

4.2.3 Otimização das variáveis operacionais da técnica SWV

Com base nas condições otimizadas para eletrodeposição de Au, foi realizado uma triagem das variáveis da SWV (incremento de potencial, amplitude e frequência), afim de observar quais variáveis apresentavam significância na determinação de CNN. Para tal, a triagem foi realizada aplicando o planejamento fatorial completo (2^3). Os efeitos calculados (incremento de potencial (X_1), amplitude (X_2) e frequência (X_3)) das respostas obtidas na Tabela 3 podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado dos efeitos calculados para planejamento 2^3 . **Fonte: próprio autor**

Variáveis	Efeitos		
X_1	-22.70	-22.25	-23.15
X_2	-4.350	-3.900	-4.800
X_3	-23.25	-22.80	-23.70
X_1X_2	4.650	5.100	4.200
X_1X_3	23.25	23.70	22.80
X_2X_3	3.900	4.350	3.450
$X_1X_2X_3$	-4.100	-3.650	-4.550

A partir da Tabela 5, foi observado que o efeito calculado da variável amplitude de modulação (X_2) foi considerado insignificante, embora não tenha passado pelo valor “zero” no intervalo de confiança. No entanto, o efeito calculado desse parâmetro apresentou um valor próximo ao valor do efeito de terceira ordem calculado (X_{123}) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; ZIEGEL, 2000), que por sua vez é considerado desprezível. Ao comparar o efeito da variável amplitude com os das outras variáveis, o efeito calculado para amplitude é significativamente menor. Com isso, a variável amplitude de modulação foi fixada em 20 mV, o qual corresponde aos experimentos no ponto central e indicou a maior corrente obtidas nos experimentos realizados. Assim, as outras duas variáveis (incremento de potencial e frequência) foram selecionadas e estudadas aplicando o planejamento experimental CCD.

A partir das respostas obtidas e apresentadas na Tabela 3, foi gerado o modelo e a construção da superfície de resposta e da curva de nível, ilustrando

o comportamento da corrente de pico na presença de CNN em relação à frequência \times incremento de potencial. A Figura 13 apresenta a superfície de resposta e a curva de nível obtida. Analisando a Figura 13, foi identificada a região de sobreposição para máximo ΔI de CNN. Assim, os valores ótimos selecionados são 5 mV e 10 Hz para incremento de potencial e frequência, respectivamente.

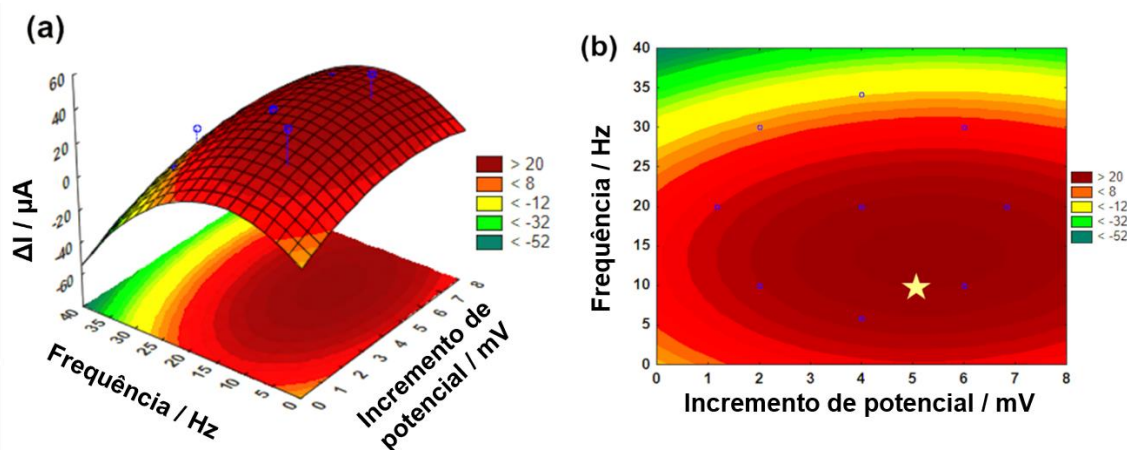


Figura 13. (a) Resposta de superfície e (b) curva de nível obtida para a otimização das variáveis: incremento de potencial e frequência em função da corrente na presença de CNN $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$. **Fonte: próprio autor**

4.2.4 Curva analítica para CNN

A partir das condições previamente otimizadas da SWV, uma curva analítica para CNN foi construída em uma faixa de concentração entre $0,05$ e $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 14). Para tal, os voltamogramas foram registrados na janela de potencial de $1,0$ a $-0,2 \text{ V}$, com os parâmetros da técnica SWV: incremento de potencial -5 mV , amplitude 20 mV e frequência de 10 Hz .

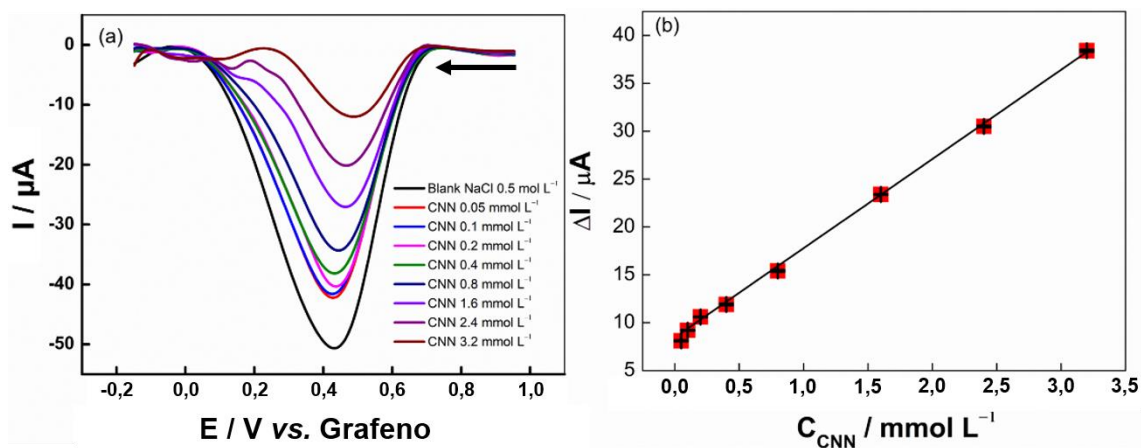


Figura 14. (a) Voltamogramas de onda quadrada para a adição de oito concentrações de CNN (0,05 a 3,2 mmol L⁻¹) em NaCl 0,5 mol L⁻¹. Parâmetros SWV: -5,0 mV (incremento de potencial); 20 mV (amplitude); 10 Hz (frequência), (b) A curva analítica foi obtida a partir da variação do I_p em função da concentração de CNN. **Fonte: próprio autor**

A partir da curva gerada, o R² obtido foi de 0,998 na faixa de concentração de 0,05 a 3,2 mmol L⁻¹, que forneceu a equação $\Delta I (\mu A) = 8,46 + 9,318 \times C_{CNN} (\text{mmol L}^{-1})$. Os valores de precisão (%DPR – desvio padrão relativo) intra-eletrodo (n = 3) e intra-dia (n = 3) foram de 4,1% e 3,7%, respectivamente, obtidos para medições usando uma concentração de 0,1 mmol L⁻¹ CNN. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as fórmulas $LD = (3,3 \times DP_{\text{intercept}})/b$ e $LQ = 3 \times LD$, onde DP_{intercept} é o desvio padrão (DP) de três curvas analíticas construídas na faixa linear proposta e b é a sensibilidade da curva de calibração obtida a partir do valor médio das triplicatas. Os valores de LQ e LD foram estimados em 0,05 e 0,015 mmol L⁻¹, respectivamente. O LD encontrado para o procedimento proposto pode determinar CNN, apresenta níveis baixos o suficiente para indicar problemas de saúde que acontece em níveis menores de 0,040 mmol L⁻¹ e em níveis superiores a 150 μmol L⁻¹, como comprometimento renal grave, levando à diálise ou transplante (BISHOP, 2020; JACOBI et al., 2008; LAD; KHOKHAR; KALE, 2008). Deste modo, o sensor impresso em 3D torna-se um potencial alternativa para o controle de CNN, uma vez que possui características de desempenho satisfatórias para o controle do analito de interesse.

4.2.5 Teste de interferência para CNN

Devido a CNN ser um composto presente no organismo humano, análises da mesma esta suscetível a possíveis interferentes que podem prejudicar os diagnósticos realizados. Diante disso, um estudo de interferência foi realizado para avaliar a possível interferência causada por outras espécies no sinal de SWV. O estudo foi realizado registrando voltamogramas de SWV na presença de glicose, AA, AU e glutathiona reduzida, na proporção de 1:5 (CNN:interferente) de forma individual de cada interferente na presença de CNN $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$. A Tabela 6 apresenta todas as respostas analíticas obtidas para este estudo.

Tabela 6. Efeito de alguns compostos como possível interferentes na determinação da CNN.
Fonte: próprio autor

Interferentes	Proporção (0,7:3,5 mmol)	Resposta (μA)	Resposta (%)
CNN	-	15,1	-
Glicose	1:5	$14,3 \pm 0,7$	95 ± 5
AA	1:5	17 ± 1	109 ± 7
AU	1:5	$13,8 \pm 0,3$	91 ± 2
Glutathiona	1:5	$14,7 \pm 0,2$	97 ± 1

É possível observar que a resposta de corrente da CNN obtida na presença dos interferentes variou de 94,70 a 109,9%. Portanto, não foram observadas mudanças significativas no sinal analítico da CNN, obtendo resultados de acordo com os apresentados por Fava et al. 2020 (FAVA et al., 2020). Diante dos resultados obtidos, o sensor impresso em 3D torna-se mais promissor ainda devido a não constatação de interferência de diversas moléculas que estão presentes no organismo humano.

4.2.6 Determinação de CNN em amostras biológicas

Para verificar a eficácia do sensor impresso em 3D proposto e o método desenvolvido, um teste de recuperação analítica foi empregado. Tal teste, tem como objetivo verificar a precisão do procedimento e a possibilidade de

interferência da matriz (urina sintética e soro humano). Para esta etapa, a amostra de urina sintética e soro humano foi enriquecida com três diferentes concentrações de CNN (0,10; 0,80; e 2,10 mmol L⁻¹). Os valores de recuperação são apresentados na Figura 15.

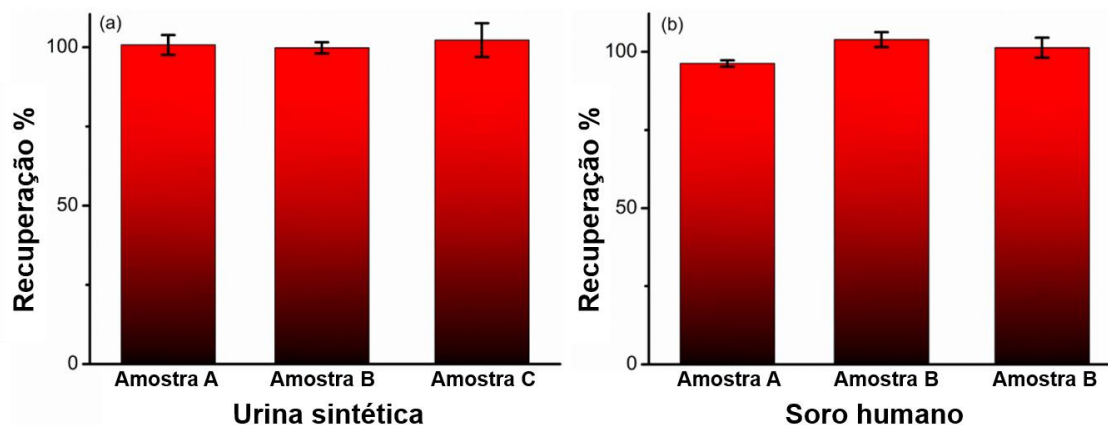


Figura 15. Resultados dos testes de recuperações realizados a partir da fortificação de amostras de (a) urina sintética e (b) soro humano com três concentrações conhecidas de CNN (0,1, 0,8 e 2,1 mmol L⁻¹). **Fonte: próprio autor**

Na Figura 15 é possível observar que o protocolo desenvolvido proporcionou um desempenho analítico satisfatório para detecção de CNN, pois os resultados de recuperação foram adequados. Os valores obtidos indicaram recuperação na faixa de 98,0 a 103,0% e 95,0 a 105,0% em urina sintética e soro humano, respectivamente. Deste modo, diante dos valores de LD obtidos com o sensor Au/G-PLA e pela confirmação do teste de recuperação, a potencialidade do sensor para o monitoramento e quantificação de CNN em urina e soro humano é reforçado.

4.2.7 Comparação dos resultados obtidos com a literatura

A partir de uma revisão da literatura, foi possível encontrar diversos trabalhos envolvendo a detecção eletroquímica de CNN empregando sensores enzimáticos e não-enzimática. Diante disso, a Tabela 7 apresenta uma comparação entre as características analíticas do eletrodo impresso em 3D proposto no presente trabalho e outros sensores baseados nas plataformas

não enzimáticas e enzimáticas (biossensores) para detecção de CNN. Porém, vale ressaltar que não foram encontrados trabalhos envolvendo sensores impressos em 3D.

Tabela 7. Eletrodos encontrados na literatura para determinação de CNN. **Fonte: próprio autor**

Eletrodo	Técnica	Faixa linear (mmol L⁻¹)	LD (mmol L⁻¹)	Ref.
CdSe QDs	DPV	0,44 – 8,84	0,23	(HOOSHMAND; ES'HAGHI, 2017)
Transducer	CA	0,05 – 1,00	0,027	(KOZITSINA et al., 2009)
SPE	SWV	0,37 – 3,60	0,0086	(CHEN et al., 2006)
GE - EPPG	LSV	0 – 7,50 0 – 6,00	0,80 0,26	(RANDVIIR; KAMPOURIS; BANKS, 2013)
PEDOT/β-CD/GCE	CA	0,10 - 100	0,05	(NARESH KUMAR et al., 2011)
Fe ³⁺ /p-a	DPV	0,10 – 6,5	0,043	(FAVA et al., 2020)
Au/G-PLA	SWV	0,050 – 3,2	0,015	Este trabalho

Pode-se observar na Tabela 7 que os trabalhos comparados apresentam características analíticas similares, como faixas lineares e LODs. No entanto, alguns dos trabalhos publicados requerem eletrodos modificados com enzimas para a detecção de CNN ou modificações mais complexas, tornando-os mais trabalhosos e mais caros do que o eletrodo impresso em 3D proposto. O bom desempenho analítico do eletrodo impresso em 3D torna sua aplicação atrativa, uma vez que é possível a produção em larga escala, a um custo relativamente baixo. O eletrodo proposto é simples de preparar e fornece análise rápida.

4.3 Biossensor baseado em cDNA para COVID-19

4.3.1 Produção do genossensor eletroquímico

Inicialmente, para a produção do genossensor foi utilizado a eletrodeposição de Au empregando o tempo de deposição de 400 s na presença de Au³⁺ 5,0 mmol L⁻¹. Entretanto, utilizando esses parâmetros alguns problemas surgiram. O sinal analítico do FcMeOH (sonda *redox* empregada

para o monitoramento da presença de cDNA do SARS-CoV-2) não apresentou um sinal analítico definido (corrente de pico de oxidação e redução). Diante disso, a deposição de ouro foi novamente otimizada em função do sinal analítico da sonda FcMeOH, buscando uma resposta mais bem definida com melhor resolução. Porém, como a concentração de ouro utilizada anteriormente se mostrou uma condição ideal para este fim, apenas o tempo de deposição foi otimizado. A faixa de tempo de deposição de Au estudada variou de 100 a 300 s, aplicando um potencial constante de -0.6 V. A análise foi realizada por CV na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1} e os voltamogramas obtidos podem ser vistos na Figura 16.

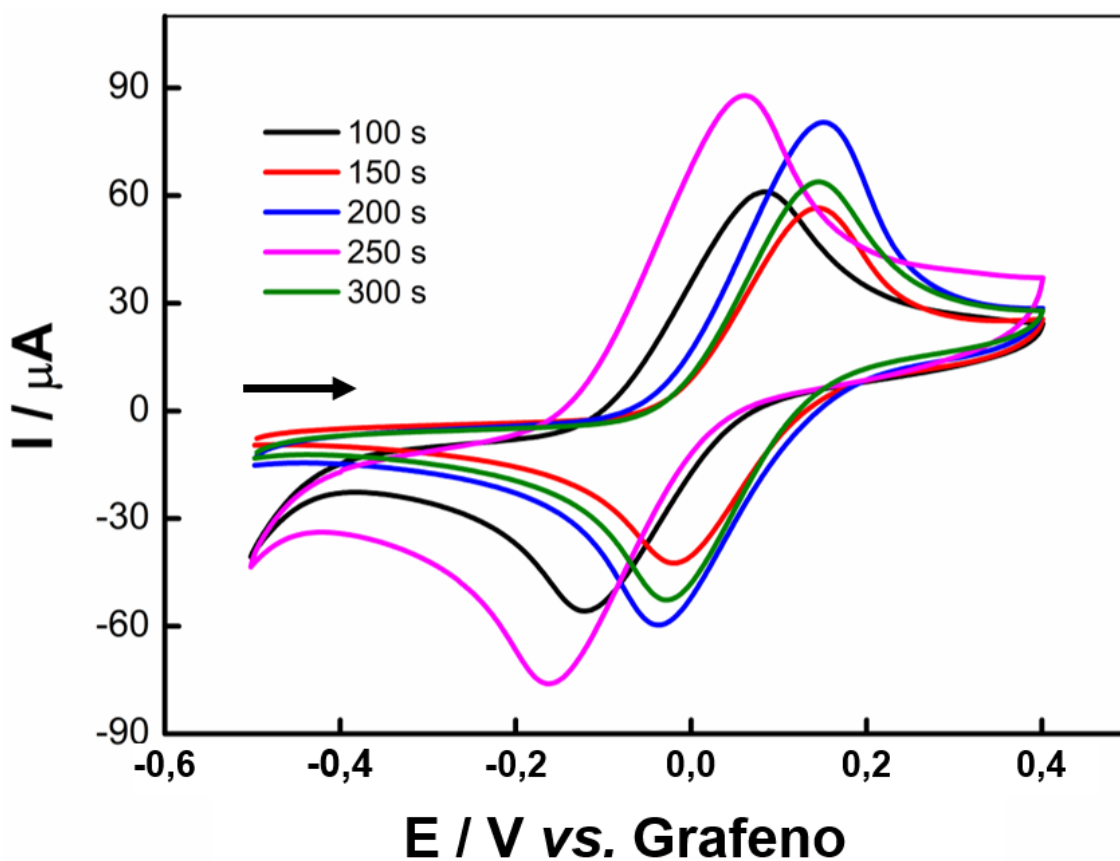


Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos após diferentes tempos de deposição de ouro no sensor G-PLA. (a) (linha preta) 100 s, (linha vermelha) 150 s, (linha azul) 200, (linha rosa) 250 e (linha verde) 300. Todas as análises foram realizadas usando FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com uma velocidade de 100 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

Na Figura 16, observa-se que há um aumento constante da corrente de pico à medida que o tempo de deposição aumenta, chegando em uma corrente máxima no tempo de 250 s para deposição de Au. Ademais, a resposta analítica do tempo de 250 s apresenta a maior intensidade de corrente e uma boa resolução gráfica. Já, no tempo de 300 s pode-se observar um decaimento na corrente de pico. O tempo de 250 s foi considerado um tempo ótimo para modificação do sensor impresso em 3D com Au, com a concentração e potencial de deposição previamente fixados em $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $-0,6 \text{ V}$, respectivamente. Assim, para construção de todos os genossensores posteriores esses parâmetros serão empregados para produção do sensor Au/G-PLA.

4.3.2 Perfil voltamétrico do genossensor

Para realizar o monitoramento de cada etapa de modificação medidas de CV e EIS foram realizadas antes e após a imobilização de uma sequência de captura ($3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ por 1 h) na superfície do Au/G-PLA usando uma solução de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos e os gráficos de Nyquist podem ser vistos na Figura 17.

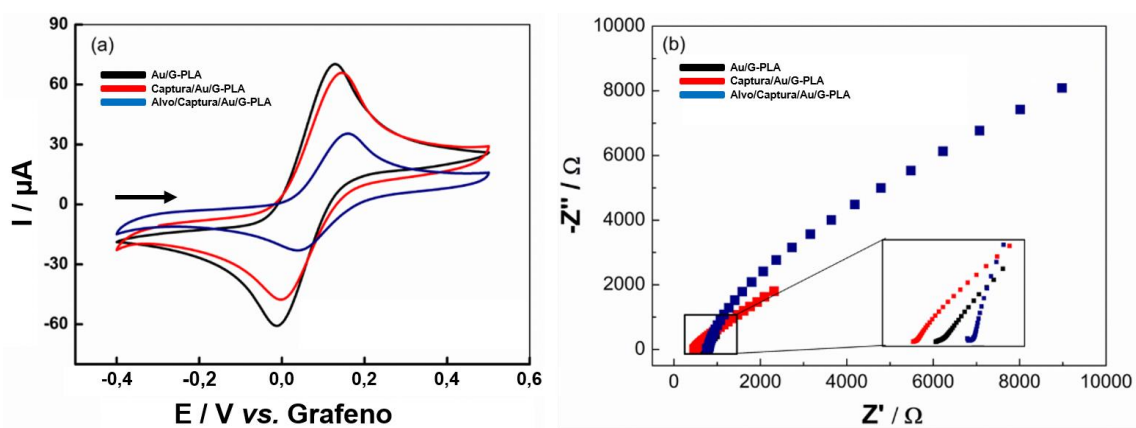


Figura 17. (a) Voltamogramas cíclicos e (b) Gráficos de Nyquist para cada estágio de modificação do sensor e após a hibridização, (**linha preta**) Au/G-PLA, (**linha vermelha**) Probe/Au/G-PLA e (**linha azul**) sequência alvo $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Todas as análises foram feitas com FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; CVs foram realizadas com uma velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

A Figura 17a apresenta os picos de oxidação e redução da sonda *redox* FcMeOH obtidas utilizando o sensor Au/G-PLA, genossensor e após a hibridização com $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ do alvo cDNA do vírus SARS-CoV-2 (Alvo/Captura/G-PLA). As correntes de pico obtidas foram de aproximadamente $65,0$ e $-55,0 \mu\text{A}$ para oxidação e redução sensor Au/G-PLA, respectivamente. Entretanto, ao realizar a mesma leitura com o genossensor desenvolvido, o mesmo apresentou correntes de pico de oxidação e redução de $62,0$ e $-47,0 \mu\text{A}$, respectivamente, ocorrendo um leve decaimento na resposta analítica após a imobilização da sequência de captura na superfície do eletrodo. Porém, após hibridização com $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência alvo (cDNA) do vírus SARS-CoV-2, os valores de pico diminuíram consideravelmente (decaimento de aproximadamente 55% no sinal analítico) devido a um bloqueio parcial do eletrodo pelo material biológico depositado. Um comportamento semelhante também pode ser observado pelas medidas de EIS (Figura 17b), os ajustes foram realizados usando um circuito de Randles. Um aumento nos valores de R_{ct} após o material biológico ser depositado na superfície do sensor foi observado. O sensor Au/G-PLA apresentou um R_{ct} de 200Ω , o biossensor de $1,04 \text{ k}\Omega$ e após hibridização com $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sequência alvo um aumento para $8,76 \text{ k}\Omega$. Diante destes resultados, pode-se inferir que o genossensor foi montado com sucesso. Ademais, o genossensor responde à sequência alvo, atestando a ocorrência do processo de hibridação após o decaimento considerável de corrente na presença da mesma.

4.3.3 Otimizações na fabricação do genossensor

As etapas para a fabricação do biossensor (imobilização da sequência de captura e hibridação da sequência alvo) foram otimizadas para obter os melhores parâmetros possíveis. Diante disso, inicialmente, a concentração e o tempo de imobilização da sequência de captura foram otimizados pela técnica CV considerando a diferença entre o I_{pa} obtido de Au/G-PLA para Probe/Au/G-PLA, na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A partir das respostas apresentadas na matriz CCD (Tabela 4), foi possível construir a

superfície de resposta e a curva de nível (Figura 18) para obter as melhores condições para a modificação do genossensor.

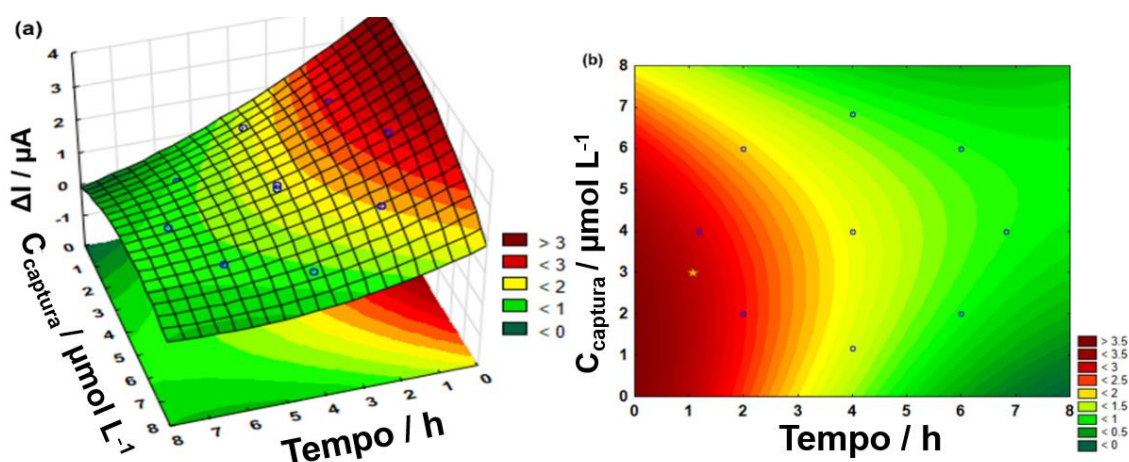


Figura 18. (a) Resposta de superfície e (b) curva de nível obtida para otimização das variáveis: concentração ($\mu mol L^{-1}$) e tempo (h) em função da diferença de corrente entre o sinal analítico do sensor e do biossensor na presença de FcMeOH $1,0 mmol L^{-1}$ em KCl $0,1 mol L^{-1}$. **Fonte:** próprio autor

Na Figura 18 foi identificada a região de máxima corrente, marcada pela “estrela em amarelo”, mostrando uma região estabilizada com um intervalo ótimo de trabalho para as variáveis envolvidas. Os valores ótimos escolhidos para o genossensor foram $3,0 \mu mol L^{-1}$ e $1 h$ para a concentração da sequência de captura e tempo de modificação (tempo de repouso da gota contendo a sequência de captura sobre a superfície do sensor), respectivamente.

Sob condições ótimas, o tempo de hibridização foi então investigado. Para isso, os eletrodos foram incubados em uma concentração de sequência alvo de $1,0 \mu mol L^{-1}$ em períodos que variaram de 30 a 180 min, com a análise realizada imediatamente após o tempo estipulado. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 19.

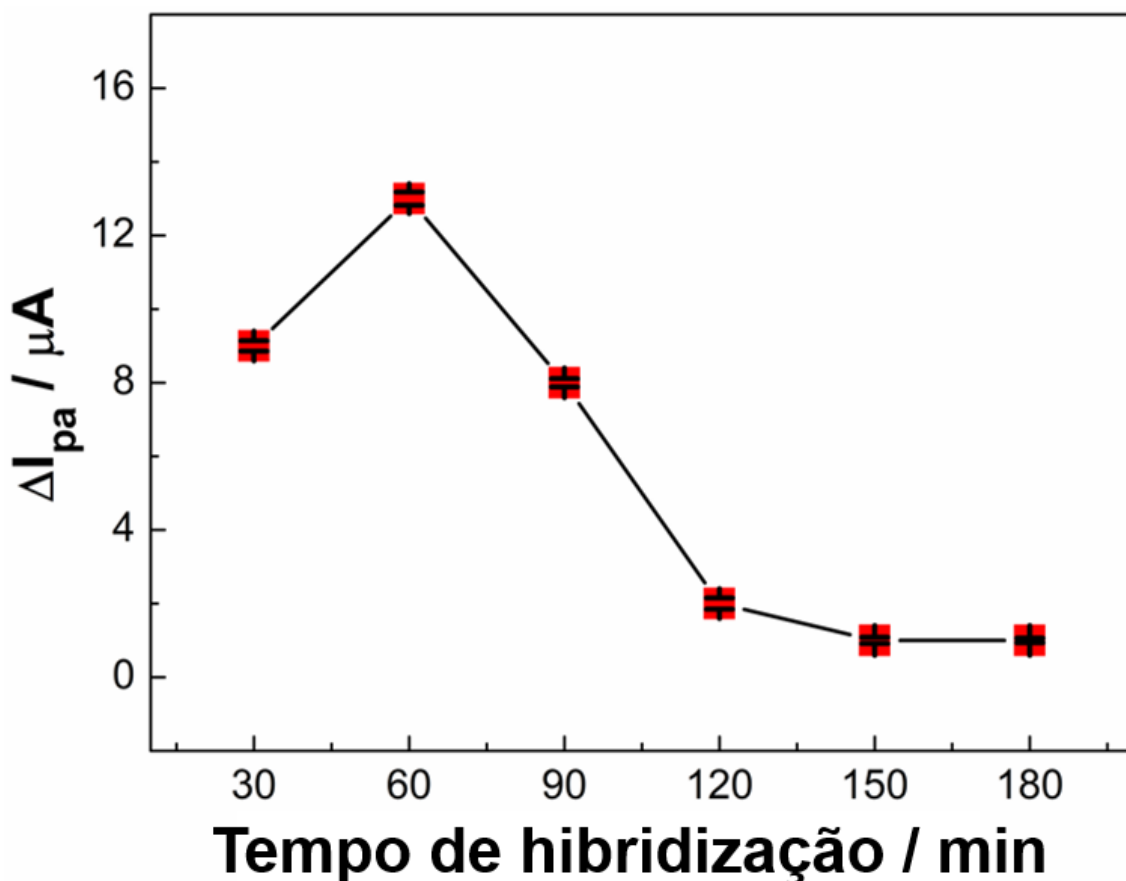


Figura 19. Respostas obtidas para diferentes tempos (min) de hibridização da sequência alvo com o genossensor. Os valores de resposta foram obtidos em função da diferença no sinal obtido por CV entre o genossensor na ausência e na presença de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência alvo utilizando FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. CVs foram realizadas com velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

Na Figura 19, observa-se que uma variação de corrente significativa na resposta analítica após hibridização com a sequência de alvo do vírus SARS-CoV-2 após empregar tempos de 30 e 60 min de hibridização. Porém, a partir de 60 min, observa-se uma variação menor no ΔI_{pa} , demonstrando que tempos de hibridização maiores que 60 min não são efetivos. Portanto, 60 min foi escolhido como o tempo ideal de hibridização para estudos posteriores. O menor tempo foi escolhido visando uma produção rápida e em larga escala.

4.3.4 Desempenho analítico do genossensor

A aplicação do genossensor para detectar a sequência alvo do vírus SARS-CoV-2 foi estudada com base nas técnicas de CV e EIS. A técnica de CV foi estudada na faixa de potencial de $-0,4$ a $0,5$ V (vs. Grafeno) com velocidade de varredura de potencial de 100 mV s^{-1} . O genossensor foi testado na presença de diferentes concentrações da sequência alvo em uma faixa de $1,0$ a $50,0$ e $1,0$ a $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, para CV e EIS, respectivamente. As correntes de pico anódicas foram medidas na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para cada adição da sequência alvo em diferentes concentrações na superfície do genossensor, a resposta de corrente anódica para FcMeOH diminuiu, o que indicou que o genossensor respondeu a diferentes concentrações do cDNA do vírus. Com isso, uma curva analítica foi obtida pelas diferentes técnicas (CV e EIS). Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 20.

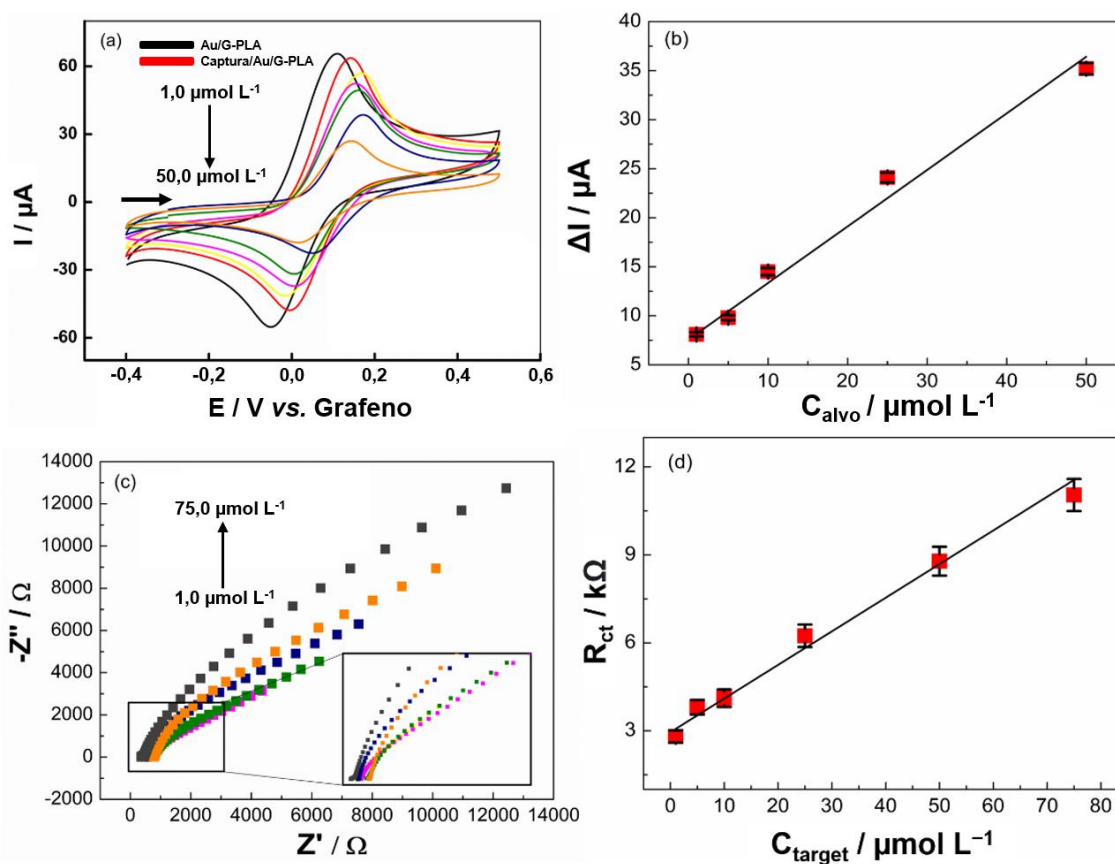


Figura 20. Curva de calibração do genossensor 3D empregando as técnicas (a) CV e (c) EIS, na faixa de $1,0$ a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0$ a $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2,

respectivamente. (b) Curvas de calibração CV foram obtidas entre a diferença do sinal analítico do genossensor na ausência e presença da sequência alvo empregando. Todos os voltamogramas foram obtidos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. (d) A curva de calibração EIS foi construída a partir dos valores R_{ct} obtidos. **Fonte: próprio autor**

A curva analítica obtida pela técnica CV apresentou comportamento linear, com valor de R² de 0,982 no intervalo de 1,0 a 50,0 μmol L⁻¹. Porém, em maiores concentrações do alvo uma saturação da superfície foi observada, não ocorrendo uma variação significativa e nem linear na resposta da corrente quantificáveis. A equação obtida por CV foi $\Delta I (\mu A) = -8,536 + 0,583 \times C_{\text{alvo}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, com sensibilidade de 0,583 μA μmol⁻¹ L. Os LD e LQ obtidos foram 0,31 e 0,95 μmol L⁻¹, respectivamente. As respostas obtidas por EIS também forneceram um comportamento linear, com um valor de R² de 0,987 na faixa de 1,0 a 75,0 μmol L⁻¹ (os gráficos de Nyquist foram ajustados com circuito de Randles). Entretanto, em concentrações mais altas, um comportamento semelhante ao obtido por CV foi observado. A equação obtida pelo EIS foi $R_{\text{ct}} (\text{k}\Omega) = 2,977 + 0,115 \times C_{\text{target}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, com uma sensibilidade de 0,115 kΩ μmol⁻¹ L. Os valores LD e LQ encontrados foram 0,30 e 0,93 μmol L⁻¹, respectivamente. Os valores de LD e LQ foram obtidos de forma idêntica aos obtidos para CNN. Por fim, foi realizado testes de reprodutibilidade e repetibilidade do genossensor. Todas as análises foram registradas por CV na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de potencial de 100 mV s⁻¹ após a hibridização com 5,0 μmol L⁻¹ de sequência alvo do cDNA do vírus SARS-CoV-2. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 21.

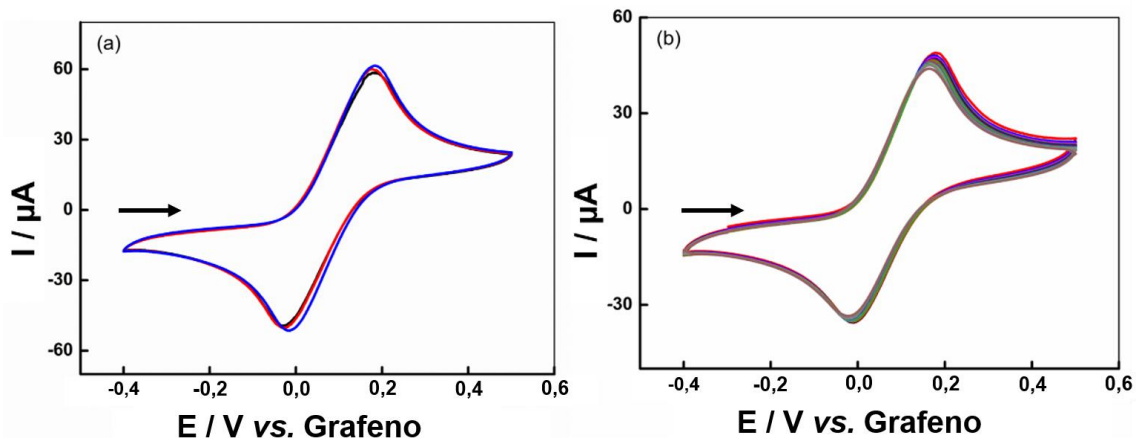


Figura 21. Voltamogramas cíclicos para (a) reprodutibilidade do genossensor ($n = 3$) e (b) repetibilidade ($n = 20$) na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Todos os voltamogramas foram obtidos empregando a velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} .

Fonte: próprio autor

A reprodutibilidade e repetibilidade do genossensor foram calculadas usando a técnica CV (Figura 21). O teste de repetibilidade foi realizado a partir de sucessivas análises em sequência com o genossensor, e o de reprodutibilidade foi construindo três genossensores distintos. A reprodutibilidade do genossensor (Figura 21a) apresentou um DPR de 1,16% ($n = 3$; $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ sequencia alvo) e repetibilidade (Figura 21b) de 1,14% ($n = 20$; $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Estes resultados demonstram que a montagem do genossensor 3D é reprodutível fornecendo um dispositivo de biossensoriamento com uma boa repetibilidade, podendo ser utilizado por consecutivas análises.

É de suma importância mencionar que, para a aplicação do genossensor na detecção do SARS-CoV-2 em um cenário real, algumas etapas operacionais devem ser levadas em consideração. Essas etapas são; 1) coleta de amostra; 2) extração de RNA; 3) conversão e amplificação do material genético por RT-PCR e 4) análise da amostra com o genossensor desenvolvido. No entanto, as etapas 1 a 3 são as mesmas para o atual protocolo de detecção de SARS-CoV-2 baseados em PCR, com o genossensor sendo comumente substituído por eletroforese em gel (DUBÉ et al., 2011; YU; MASLOVA; HSING, 2017). Portanto, o genossensor é uma alternativa à eletroforese em gel, mantendo as mesmas etapas iniciais sem adicionar etapas operacionais e mantendo o

mesmo protocolo inicial que já é amplamente utilizado. Vale ressaltar que essas etapas não são exclusivas deste trabalho, e o genossensor eletroquímicos baseados na detecção de cDNA são suscetíveis ao mesmo procedimento (ARNAOUT et al., 2020; BUSTIN, 2017; JANEGITZ; CANCINO; ZUCOLOTTO, 2014; KHAN et al., 2020). Ao considerarmos uma amostra com concentração de material genético igual ao LD do kit de PCR mais eficiente do mercado (100 cópias/mL), seriam necessários aproximadamente 40 ciclos de PCR para amplificar o cDNA para atingir o LD do genossensor desenvolvido no presente trabalho (ARNAOUT et al., 2020; BUSTIN, 2017). Isso mostra que, embora a amplificação seja necessária, o método é viável, pois 40 ciclos levam em torno de 45 minutos para serem concluídos. Assim, mesmo diante da necessidade de amplificação, o genossensor ainda se apresenta como um potencial dispositivo analítico que possa auxiliar na detecção do vírus SARS-CoV-2.

4.3.5 Estudo de interferência

Para avaliar a especificidade do genossensor em detectar a sequência de cDNA alvo do vírus do SARS-CoV-2, foi realizado um teste de interferência com uma sequência alvo negativo (sequência de DNA do vírus Influenza A) e na presença da sequência alvo (positiva) de cDNA do vírus SARS-CoV-2. A Figura 22 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos. Para as análises realizadas foram incubadas $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência negativa e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência positiva. As leituras foram realizadas pela técnica de CV na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} .

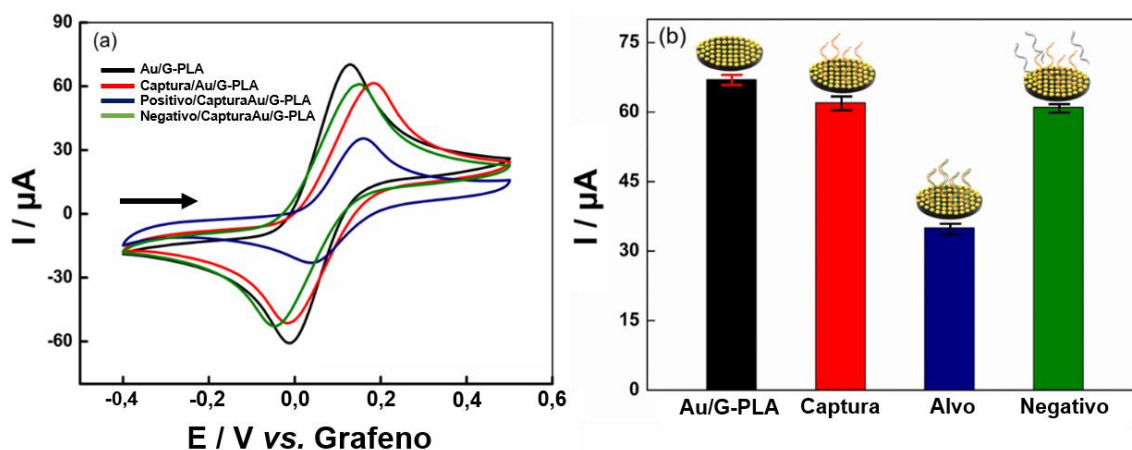


Figura 22. (a) Comparação entre sequências-alvo positivas ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e negativas ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} , (b) Gráfico de coluna de barras referentes as respostas de corrente de pico para cada etapa analisada. **Fonte: próprio autor**

A partir da Figura 22, observa-se que na presença da sequência de DNA de controle negativo não há nenhuma mudança significativa no sinal analítico em relação ao sinal do genossensor. Por outro lado, após adicionar $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência alvo causou uma queda acentuada na corrente de pico (aproximadamente 50%), pois as sequências alvo hibridizam com a sequência de captura. A hibridização da sequência alvo positiva com a sequência de captura é muito maior do que a sequências negativas, pois essas não possuem a especificidade necessária para que ocorra a hibridação. Esse comportamento é atribuído à sua complementaridade com a sequência de captura. Portanto, a sequência de cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2 pode ser detectada com boa seletividade. Ademais, o vírus influenza apresenta sintomas semelhantes em um indivíduo infectado ao SARS-CoV-2, portanto, o DNA desse vírus foi escolhido para ser usado como uma sequência negativa.

Por fim, para demonstrar a aplicabilidade do genossensor, foi realizada a análise da sequência alvo em saliva sintética e soro humano por meio de testes de recuperação com a fortificação das amostras com três diferentes concentrações ($1,0$, $25,0$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). As respostas analíticas foram obtidas após 30 minutos de incubação das amostras na superfície do genossensor impresso em 3D e as respostas dos valores de recuperação (expressos em %) podem ser vistos na Figura 23. Todos as análises foram

realizadas pela técnica de CV na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com velocidade de 100 mV s^{-1} .

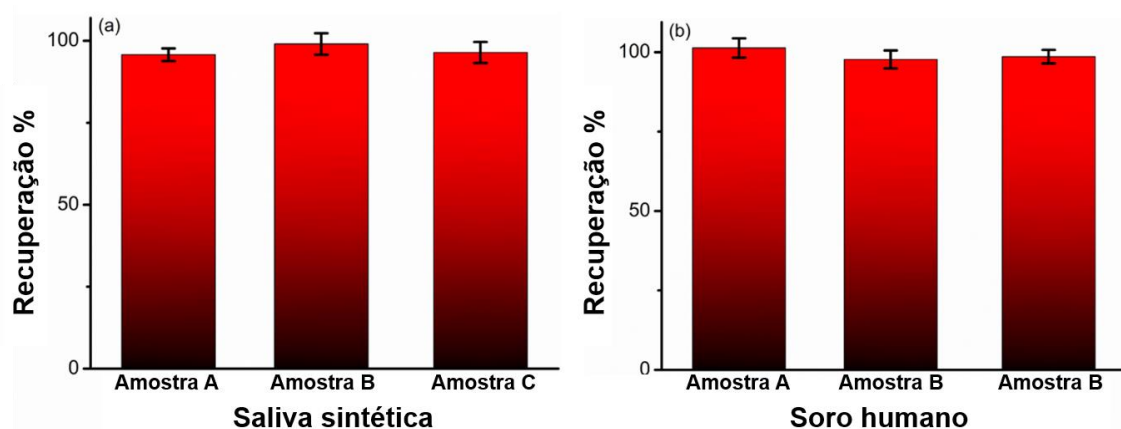


Figura 23. Respostas dos testes de recuperações realizados a partir da fortificação de amostras (a) urina sintética e (b) soro humano com três concentrações de Target ($1,0$, $25,0$ e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). **Fonte:** próprio autor

Os valores de recuperação obtidos variaram de 96,0 a 102,0% para saliva sintética e 97,0 a 101,0% para soro humano. Portanto, o genossensor proposto mostra-se adequado para análise de amostras, possuindo bom potencial para determinar as características do vírus SARS-CoV-2, de forma simples, rápida e utilizando materiais de baixo custo.

5. Conclusão específica

O desenvolvimento de um sensor e um genossensor eletroquímico impresso em 3D foi alcançado com sucesso. A plataforma analítica impressa em 3D possibilitou a detecção tanto do biomarcador CNN, quanto do cDNA do vírus SARS-CoV-2 com eficiência. A detecção de CNN foi realizada com sucesso, permitindo a detecção de baixas concentrações deste analito ($\text{LD} = 0,016 \text{ mmol L}^{-1}$) com alta sensibilidade ($9,318 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$) em amostras de urina sintética e soro humano, fornecendo valores de recuperação adequados, que variou de 96,0 a 101,0%. A imobilização do material biológico na plataforma desenvolvida proporcionou a fabricação de um genossensor eletroquímico rápido para detecção do SARS-CoV-2, com LD de $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e sensibilidade de $0,583 \mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$. As análises em amostras de saliva

sintética e soro humano fortificados indicaram valores de recuperação de 95,0 a 105,0%. O desenvolvimento de um teste eletroquímico rápido para COVID-19, combinado com a determinação de um biomarcador, fornece resultados mais informativos, como o nível de agressividade da doença, permitindo melhor manejo e tratamento em uma população infectada. Além disso, a plataforma impressa em 3D tem a vantagem de miniaturização, fácil fabricação, custo relativamente baixo e fácil manuseio. Porém, é importante ressaltar que apesar de todas as vantagens citadas, ainda há espaços para melhorias na produção de sensores e biossensores impressos em 3D, tais como a produção laboratorial de filamentos condutivos. A produção dos próprios filamentos em laboratório permitiria fabricação deste material totalmente otimizado para o objetivo final e daria independência pros laboratórios, uma vez que não necessitariam mais de importação de alguns tipos de filamentos e não ficariam a mercê da disponibilidade em mercado para da continuidade em suas pesquisas.

Capítulo 4

Novo filamento condutivo baseado em Gpt-PLA e produção dos (bio)sensores para determinação de AU e proteína Spike S1 do vírus SARS-CoV-2.

6. Metodologia

6.1 Reagentes e soluções

Água ultrapura de um sistema Milli-Q Plus (Millipore Corporation®, Darmstadt, Alemanha) foi usada para preparar todas as soluções aquosas. KCl (99%), etanol (99,5%), FcMeOH (97%), ácido úrico (99%), cloridrato de DA (99%), hexaaminorutênio (III) cloreto (98%), cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (98%) e N-hidroxissuccinimida (NHS) (98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Acetona (99,5%) e cloreto de sódio (99% p/p) da Synth (Diadema, Brasil). Clorofórmio (99,8%) da Qhemis (Indaiatuba, Brasil), hidróxido de sódio (98%) e fosfato de sódio dibásico (99%) da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). Albumina de Soro Bovino (BSA) da Fisher Chemical™ (Hampton, EUA), e fosfato de potássio dibásico (98%) da Cinética (Jandira, Brasil). Para o diagnóstico de COVID-19, foi utilizado uma proteína recombinante SARS-CoV-2 *Spike* (S1) como antígeno e um Ab *Spike* (S1 Ab) do vírus SARS-CoV-2 (Sino Biological, EUA).

Uma solução tampão Britton-Robinson (BR) 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) foi usada como eletrólito suporte para detecção de ácido úrico (AU), conforme descrito na literatura (CARDOSO et al., 2020a). A solução é composta por uma mistura de 0,04 mol L⁻¹ ácido bórico (99,5%) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), e ácidos acético (99,7% v) e fosfórico (85%) da Dinâmica (Indaiatuba, Brasil). Soluções estoque de AU foram preparadas antes dos experimentos, após dissolução (5,0 mmol L⁻¹) em hidróxido de sódio 0,01 mol L⁻¹, seguida de diluição em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0) com base em trabalhos anteriores da literatura (CAETANO et al., 2018). Uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (PBS; pH = 7,0) foi utilizada para a detecção de DA, seguindo a literatura (KU; PALANISAMY; CHEN, 2013)v. A solução estoque de DA (5,0 mmol L⁻¹) foi preparada antes dos experimentos por dissolução em PBS. Para a construção da curva de calibração, a solução estoque foi novamente diluída em diferentes concentrações em PB.

A urina sintética foi preparada seguindo a literatura com adaptações (BROOKS; KEEVIL, 1997). A urina foi composta por uma mistura de 170,0

mmol L⁻¹ de ureia (99%), 2,5 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio dihidratado (≥99%), 10,0 mmol L⁻¹ de sulfato de sódio anidro (99%), 0,4 mmol L⁻¹ de ácido úrico (99%) e 7,0 mmol L⁻¹ de CNN (≥98,5%) da Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA; 1,1 mmol L⁻¹ de ácido láctico (85%), 2,0 mmol L⁻¹ de ácido cítrico (99,5%) e 25,0 mmol L⁻¹ de cloreto de amônio (99,5%) da Dinâmica Química (Indaiatuba, Brasil) e cloreto de sódio 90,0 mmol L⁻¹ (99%) da Synth (Diadema, Brasil). Hidróxido de sódio (0,1 mol L⁻¹) foi adicionado (1:1000 v/v) para solubilizar o AU, e a solução final foi diluída 40 vezes em solução tampão BR (para detecção de AU), e 10 vezes em PB (para detecção de DA). Para análise DA, a urina sintética foi adicionada com 3 concentrações diferentes de DA (5,0, 20,0 e 40,0 μmol L⁻¹), que estavam dentro da faixa de trabalho linear.

A saliva sintética foi preparada seguindo a literatura com adaptações (ROMONTI et al., 2016). A saliva foi composta por uma mistura de 0,7 g L⁻¹ de cloreto de sódio (99%), 1,2 g L⁻¹ de cloreto de potássio (≥99% p/p), 0,26 g L⁻¹ de fosfato de sódio dibásico (99%), 0,33 g L⁻¹ de tiocianato de potássio e 1,3 g L⁻¹ de ureia (99%), solubilizados em água, com um volume final de 100 mL. Para análise de SARS-CoV-2, a saliva sintética foi fortificada com 4 concentrações diferentes de proteína (S1) (5,0, 10,0, 30,0 e 50,0 nmol L⁻¹), que estavam dentro da faixa de trabalho linear.

6.2 Instrumental e aparatos

Para a impressão das estruturas e eletrodos utilizados neste trabalho foi utilizada uma impressora 3D Sethi3D S3 (Campinas, Brasil), controlada pelo software Simplify 3D™, para confecção das estruturas pela técnica FDM. Uma extrusora Filmaq3D® (Curitiba, Brasil) foi utilizada para a extrusão dos compósitos obtidos.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT204 Metrohm (Eco Chemie) gerenciado pelo software NOVA (versão 2.14), que também foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados. Foi utilizada correção de linha base para detecção voltamétrica de AU e DA para melhor visualização dos picos, o tratamento foi

feito com o algoritmo “*moving average*”, com janela de tamanho 2, disponível no software NOVA (versão 2.14).

Para a caracterização dos materiais, foi realizada análise termogravimétrica (TGA) utilizando um TGA 55 da TA INSTRUMENTS, em aumento gradual de temperatura de 10 °C por minuto, variando de 25 a 1000 °C sob atmosfera oxidante. Os espectros Raman foram obtidos em um LabRam HR Evolution Spectrophotometer (HORIBA), usando um laser de 532 nm a 50 mW de potência na faixa de 4000 a 100 cm^{-1} . A análise de espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier foi realizada usando um espectrofotômetro Tensor II (Bruker). A microscopia eletrônica de varredura do modelo Prisma E da Thermo Fisher Scientific com tecnologia ColorSEM e espectroscopia de raios-X de energia dispersiva integrada foi usada para a aquisição de imagens. As imagens do ângulo de contato foram obtidas após uma alíquota de água deionizada ser adicionada na superfície célula eletroquímica, envolvendo a superfície dos três eletrodos. As imagens dos ângulos de contato foram obtidas em um aparato fabricado em laboratório, lançando-se uma gota de água deionizada na célula eletroquímica, envolvendo a superfície dos três eletrodos. Após 10 s de inserção da gota, as imagens foram obtidas, e o ângulo entre a tangente traçada na fase líquida (gota de água) e a superfície do substrato foi medido ($n = 3$), utilizando um aparelho previamente descrito na literatura (DA SILVA et al., 2020b).

Para estudos iniciais (caracterizações eletroquímicas e comparação com filamentos comerciais), uma célula eletroquímica cilíndrica convencional impressa em 3D, semelhante à desenvolvida por Cardoso et al. (CARDOSO et al., 2018). A célula impressa em 3D foi confeccionada com filamento de ABS, e consistia em um recipiente cilíndrico, com tampa contendo furos para o acoplamento de um contra eletrodo padrão (fio Pt) e um eletrodo de referência (Ag|AgCl|KCl(sat.)). A base do cilindro apresentava um orifício para posicionamento do eletrodo de trabalho (placa impressa em 3D), sobre uma placa de aço inoxidável para contato elétrico e sob um O-ring de borracha para definir a área do eletrodo em $0,18 \text{ cm}^2$ e evitar vazamento de soluções. O suporte inferior e os parafusos foram impressos em 3D em ABS e foram

usados para montar a célula. Os ensaios eletroquímicos referentes a detecção de AU, DA e proteína S1 do vírus SARS-CoV-2 foram realizados usando o desenho da célula apresentado na Fig. 1G, usando uma alíquota de 150 µL de soluções. Gpt-PLA foi usado como referência e contra eletrodos, e Gpt-PLA, ou comercial (Black magic[®], USA (G-PLA) e/ou Proto pasta[®], USA (CB-PLA)) como eletrodos de trabalho. O eletrodo de trabalho (estrutura circular) apresentou diâmetro de 4 mm (área geométrica de 0,13 cm²).

6.3 Fabricação de filamentos condutivos Gpt-PLA

O PLA utilizado para fabricar os filamentos compósitos foi obtido *in natura* na forma de pellets, da 3DLAB (Minas Gerais, Brasil) e o pó de grafite foi obtido da Fisher Chemical[™] (Hampton, EUA). Filamentos de grafite-PLA (Gpt-PLA) foram facilmente fabricados após a solubilização da matriz (PLA) e incorporação de pó de grafite.

Primeiramente, o pó de grafite (em composição variada, de 1 a 60% em peso) foi disperso em 200 mL de uma mistura de acetona e clorofórmio (3:1 v/v), para solubilização do material termoplástico, conforme relatado na literatura, sob agitação magnética e aquecimento a temperaturas de até 70 °C durante 30 min (ROCHA et al., 2020b). Embora o uso do clorofórmio ainda proporcione um grau de toxicidade ao processo de fabricação, sua proporção é diminuída, diminuindo o grau de risco. Para tal, é empregado um sistema de refluxo (Figura 24A) para evitar o escape de solventes, e no banho de aquecimento foi utilizado óleo vegetal comercial, adquirido no comércio local. Uma quantidade adequada de PLA (totalizando 30 g de PLA e grafite) foi adicionada à mistura e mantida sob constante agitação e aquecimento por 3 h. O aquecimento melhora a incorporação do grafite na matriz do PLA, pois garante a dissolução do polímero. Em seguida, foi obtido uma mistura homogênea e imediatamente recristalizada pela transferência de todo o conteúdo para um recipiente contendo 800 mL de etanol (Figura 24B), obtendo-se um compósito Gpt-PLA uniforme. O compósito foi filtrado, sendo lavado com

etanol como mostrado na Figura 24C, e deixado para secar a 50 °C, durante a noite (Figura 24D).

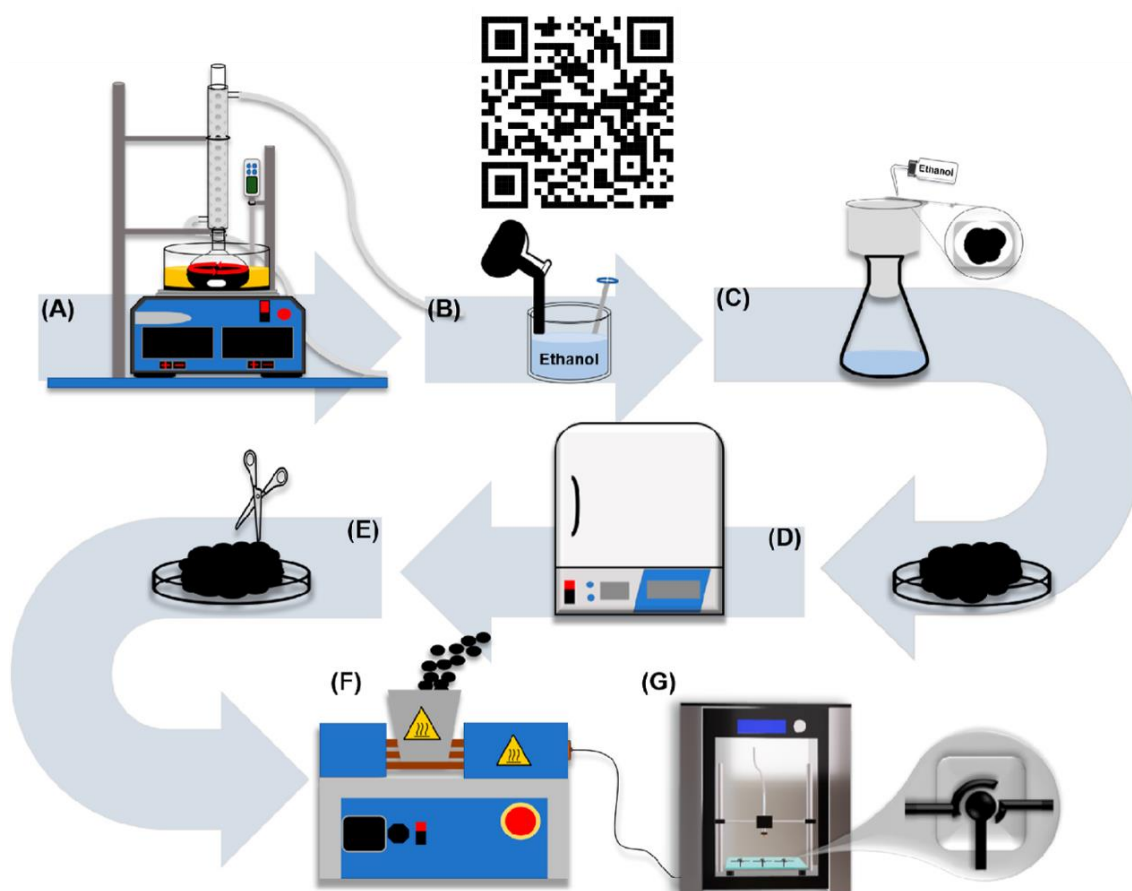


Figura 24. Esquema representativo para a produção dos filamentos condutivos a base de grafite e PLA (Gpt-PLA). (A) incorporação de pó de grafite no PLA e sistema de refluxo sob agitação e aquecimento constantes; (B) recristalização do compósito (Gpt-PLA) em etanol; (C) filtração do compósito e lavagem constante com etanol; (D) etapa de secagem na estufa a 50 °C; (E) cortado em pedaços pequenos; (F) etapa de extrusão do compósito e (G) impressão 3D do sensor eletroquímico. Reprodução com permissão (STEFANO et al., 2021).

Os filamentos foram então obtidos após o corte do compósito em pequenos pedaços (<2 cm), com o auxílio de uma tesoura, previamente limpa com etanol (Figura 24E), e os pedaços foram posteriormente colocados na extrusora Filmaq3D® (Figura 24F), que foi operada a uma temperatura de 200 °C para formação dos filamentos condutivos. Ademais, um vídeo curto (QR code na Figura 24) apresenta o processo de fabricação dos filamentos condutivos e produção dos sensores.

6.4 Produção do eletrodo Gpt-PLA

Os filamentos obtidos foram utilizados para impressão 3D dos eletrodos (contra eletrodo, eletrodo de referência e trabalho), originalmente desenhados conforme apresentado na Figura 24G, usando software apropriado (Blender[®]), e uma base não condutiva também foi impressa usando PLA para o acoplamento dos eletrodos (Figura 24G), formando um sistema de três eletrodos. A célula eletroquímica foi então composta pelo sistema de três eletrodos, onde uma alíquota de solução (150 µL) foi colocada na superfície dos eletrodos, fechando o sistema eletroquímico. Todas as análises foram realizadas após polimento mecânico simples dos eletrodos, utilizando lixas úmidas obtidas em lojas locais, até obter superfícies lisas, lixa d'água com granulometria 1200.

Após obtidos os eletrodos, as caracterizações eletroquímicas e definição dos filamentos a serem utilizados em relação à massa do grafite empregada em % foi realizada. Todos os ensaios eletroquímicos realizados para detecção de AU, DA e proteína *Spike* do vírus SARS-CoV-2 foram realizados usando a célula eletroquímica apresentada na Fig. 24G. O Gpt-PLA foi usado como eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo. O eletrodo de trabalho (estrutura circular) apresentou diâmetro de 4 mm (área geométrica de 0,13 cm²). Todos os sensores foram impressos com uma temperatura de 210 °C, mesa aquecida a 65 °C e velocidade de extrusão de 900 mm/min. Para comparação dos resultados, foram utilizados eletrodos impressos em 3D de forma idêntica e obtidos com filamentos comerciais à base de grafeno (Black Magic[®]) e CB (Proto Pasta[®]). As células foram impressas com filamento termoplástico PLA não condutivo, da Sethi3D (Campinas, Brasil).

6.5 Fabricação do biossensor

Para o diagnóstico de COVID-19, uma proteína recombinante SARS-CoV-2 *Spike* (S1) foi usada como antígeno e um Ab SARS-CoV-2 *Spike* (S1 AC). Para preparar o imunossensor, inicialmente, os Ab foram ligados

covalentemente à superfície do eletrodo, utilizando 20 μL de uma solução contendo EDC 10,0 mmol L^{-1} e NHS 20,0 mmol L^{-1} em PBS 1x ($\text{pH} = 7,4$), depositados diretamente na superfície do eletrodo por 1 h. Em seguida, foi feita a imobilização de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução de Ab (20 μL) em PBS 1x ($\text{pH} = 7,4$) por 1 h. Por fim, 20 μL de solução de BSA (1% m/v) em PBS 1x ($\text{pH} = 7,4$) foi adicionado na superfície e deixado de repouso por 30 min para bloquear quaisquer locais de interação disponíveis no Gpt-PLA. A Figura 9 apresenta um esquema representativo das etapas envolvidas na fabricação do imunossensor. O eletrodo foi lavado após cada etapa com PBS 1x e seco ao ar. Depois disso, o imunossensor estava pronto para a detecção da proteína *Spike* do vírus. A detecção foi realizada após 30 min de incubação de diferentes concentrações de antígeno diluído em PBS 1x ($\text{pH} = 7,4$). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente. A Figura 25 apresenta um resumo geral da produção do imunossensor e método de detecção.

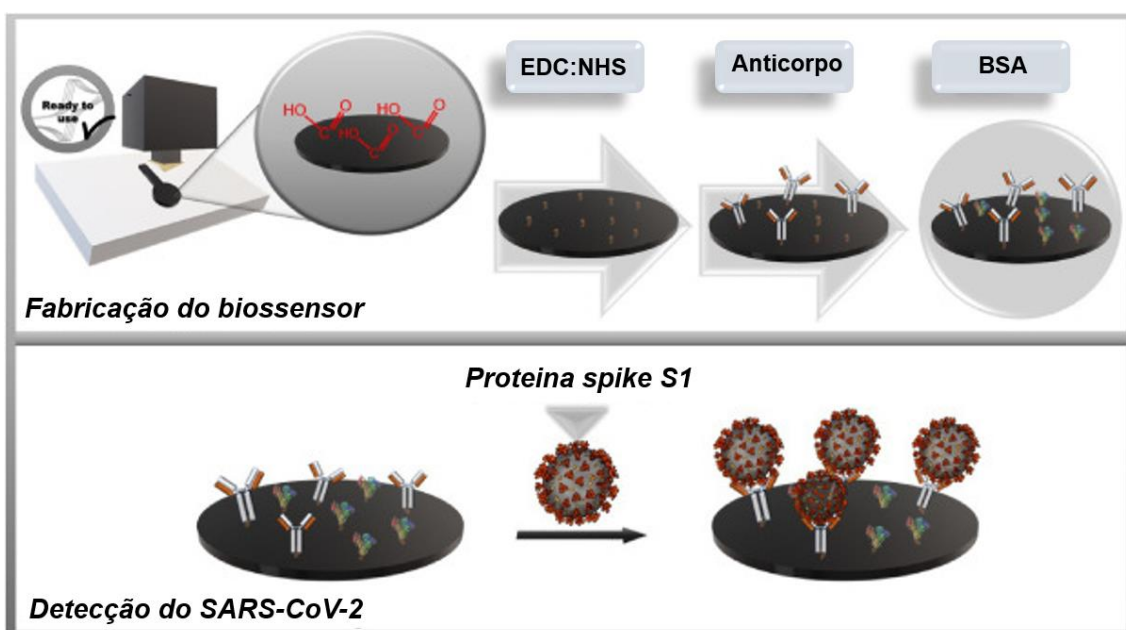


Figura 25. Esquema representativo das etapas envolvidas na fabricação do imunossensor. Reprodução com permissão (STEFANO et al., 2021). Produção do sensor impresso em 3D; ligação covalente do EDC:NHS (1 h de deposição da gota); imobilização do Ab (1 h de imobilização); bloqueio dos sítios não específicos com BSA (30 min) e por fim, detecção da proteína *Spike* S1 do vírus SARS-CoV-2 (tempo de ligação Ab – proteína, 30 min).

7. Resultados e discussão

7.1 Caracterização físico-química e eletroquímica dos filamentos condutivos

Primeiramente, os filamentos foram produzidos através da incorporação de diferentes quantidades de grafite (1, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60% em peso). A análise TGA foi realizada para entender a estabilidade térmica e a temperatura mínima para impressão dos filamentos projetados, e também para validar a incorporação de porcentagem de massa de grafite nas matrizes de PLA (Figura 26).

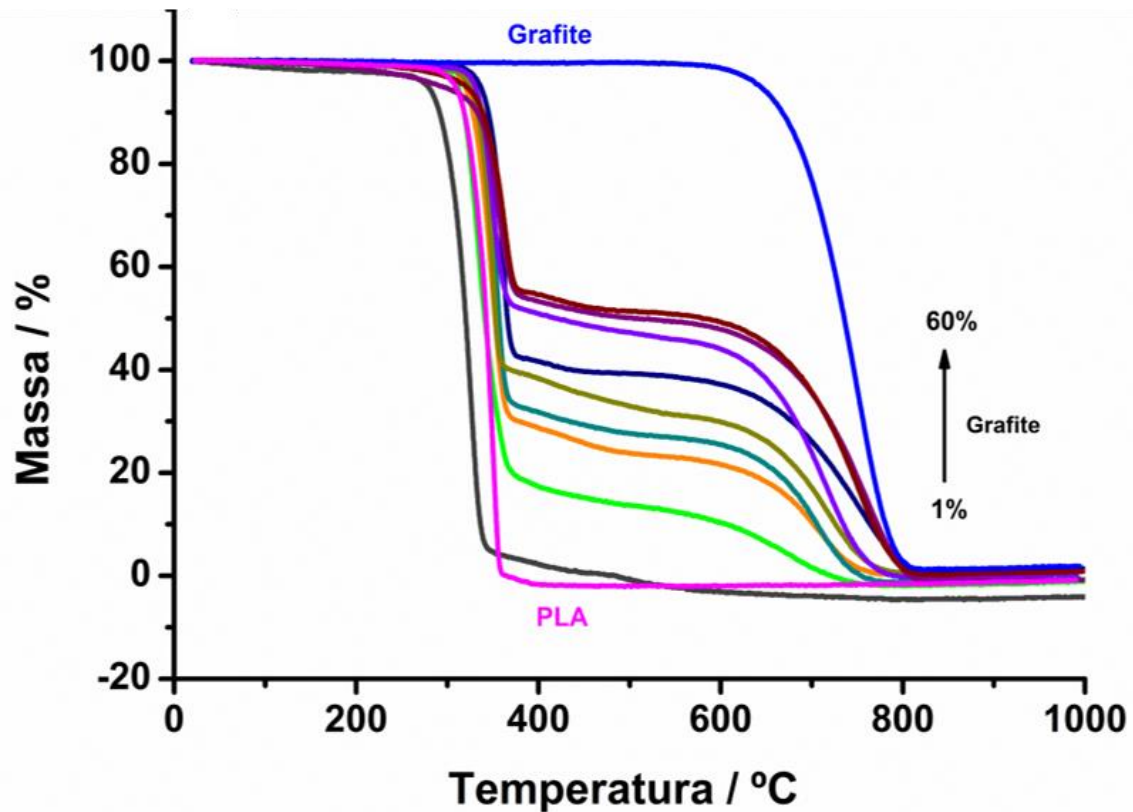


Figura 26. Análises termogravimétricas para PLA bruto, pó de grafite e filamentos de Gpt-PLA contendo 1, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60% em peso de grafite. **Fonte: próprio autor**

Como pode ser visto nos resultados de TGA na Figura 26, para o polímero bruto, uma perda de massa ocorre em torno de 300 °C e corresponde à decomposição do PLA em dióxido de carbono, monóxido de carbono e outros oligômeros cíclicos até a unidade monomérica (GNANASEKARAN et al., 2017;

SIGNORI; COLTELLI; BRONCO, 2009). Porém, após a adição de cargas condutivas de grafite, os filamentos apresentaram uma leve melhora na estabilidade térmica. Segundo a literatura, a presença de material condutivo na matriz polimérica aumenta a condução de calor, conseqüentemente, inibe a emissão de produtos de decomposição durante a degradação (GNANASEKARAN et al., 2017; KIM; JEONG, 2010). O filamento contendo grafite não se decompôs antes de 300 °C, o que indicou que uma temperatura de impressão de 200 °C é adequada para a impressão 3D dos eletrodos.

Para avaliar a resposta eletroquímica dos sensores impressos em 3D a partir dos filamentos condutivos produzidos, foi empregado uma célula eletroquímica convencional descrita no trabalho de Cardoso e colaboradores (CARDOSO et al., 2018). Voltamogramas cíclicos foram produzidos usando uma placa impressa em 3D como eletrodo de trabalho, um fio de Pt como contra eletrodo e Ag|AgCl|KCl(sat.) como eletrodo de referência. Para as análises, foi empregado $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Os voltamogramas cíclicos foram realizados para os filamentos com composições de 30 a 50% em peso de grafite (Figura 27). Ademais, menores quantidades de grafite apresentaram comportamento não condutivo, enquanto um material com mais de 50% apresentou uma capacidade de impressão muito baixa, devido à alta rigidez e comportamento quebradiço.

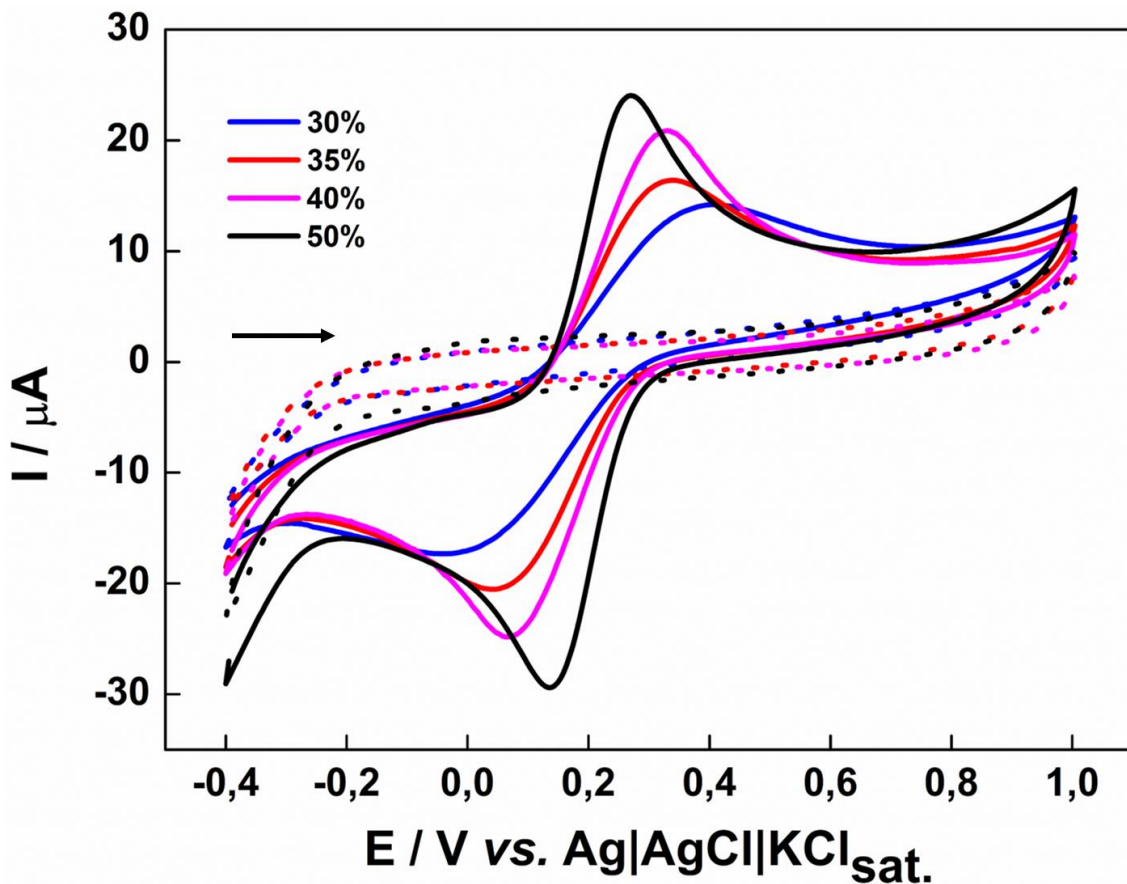


Figura 27. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando Gpt-PLA com diferentes cargas de grafite (% em peso) após polimento em lixa; velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

A partir da Figura 27, observa-se que o eletrodo impresso com o filamento que contia 50% em peso de grafite apresentou melhor reversibilidade (menor ΔE_p , correspondendo a 136 mV), bem como melhor resposta de corrente. Entretanto, este compósito não foi escolhido devido a dificuldades de impressão, por apresentar uma estrutura altamente quebradiça, uma vez que a quantidade de material condutivo incorporado na matriz polimérica é alta. Por outro lado, o filamento contendo 40% em peso o grafite forneceu uma resposta de corrente satisfatória, porém a reversibilidade do processo foi afetada negativamente (ΔE_p maior, correspondendo a 264 mV), sendo possível observar uma cinética de transferência de elétrons mais lenta. Nesse sentido, pode-se observar que quanto maior a quantidade de PLA (menor a de grafite), menor a cinética de transferência de elétrons, proporcionando voltamogramas com maior separação pico a pico. Diante disso, o filamento com melhores

características, considerando uma boa capacidade de ser empregado na impressão 3D de dispositivos analíticos, atrelado a boa resposta eletroquímica foi o de 40% em massa de grafite. Este filamento foi utilizado para imprimir todos os eletrodos, e as caracterizações físico-químicas foram realizadas para este material. Ademais, todos os experimentos em relação detecção de AU, DA e proteína *Spike S1* do vírus SARS-CoV-2 foram realizadas com eletrodos obtidos com filamentos contendo 40% de grafite em massa.

As primeiras caracterizações realizadas do material neste trabalho são referentes a busca pelo entendimento da estrutura dos filamentos e eletrodos produzidos. Deste modo, inicialmente foram realizadas caracterizações empregando as técnicas de Raman e FT-IR. Os espectros Raman e FT-IR do filamento e do eletrodo impresso em 3D são apresentados na Figura 28.

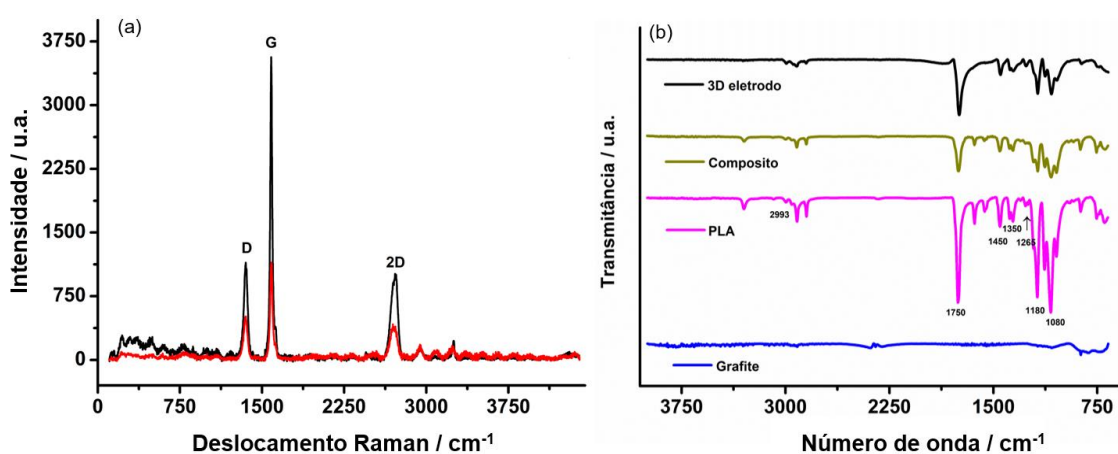


Figura 28. (a) Espectros Raman para filamento Gpt-PLA (40% em peso) (**linha vermelha**) e eletrodo impresso em 3D (**linha preta**); (b) Espectros FT-IR para PLA bruto, pó de grafite, filamento Gpt-PLA (40% em peso) e eletrodo impresso em 3D. **Fonte: próprio autor**

As características mais proeminentes nos espectros Raman (Figura 28a) para todos os materiais gráfiticos são a presença das bandas vibracionais D (1350 cm^{-1}), G (1585 cm^{-1}) e 2D (2715 cm^{-1}). A banda G no espectro Raman está relacionada com a presença de vibração de estiramento no plano dos átomos de carbono sp^2 (CANÇADO et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2016). As bandas vibracionais D e G indicam a presença de defeitos, como redes de carbono sp^3 e sp , vacâncias, sítios de bordas e hetero átomos. O sinal 2D está associado ao modo de combinação das bandas D e G em materiais gráfiticos

(CANÇADO et al., 2004; REICH; THOMSEN, 2004). Pode-se observar na Figura 28a que o eletrodo impresso em 3D forneceu bandas de maior intensidade do que o filamento. Isso pode ser atribuído ao fato de o eletrodo ter sido previamente polido e, portanto, as partículas de grafite ficam mais expostas em comparação ao filamento. Os espectros FT-IR foram obtidos para a análise da composição da superfície dos materiais utilizados para a síntese do compósito (PLA e grafite), e para o compósito e eletrodos obtidos (para observar mudanças após os processos de extrusão e impressão 3D). Os espectros de FT-IR obtidos são apresentados na Figura 28b, cujos resultados mostram a impressão digital característica do PLA, com picos relacionados a grupos carboxílicos e carbonílicos, e ligações C-H, C=C e C-O-C. Os picos observados entre 2800 e 3000 cm^{-1} referem-se a estruturas alifáticas (compostos de C-H) presentes no PLA (DOS SANTOS et al., 2019; WENG et al., 2013). Os picos entre 1000 e 1800 cm^{-1} são característicos de compostos oxigenados. A vibração dos grupos carboxila e/ou carbonila do PLA é detectada em 1732 e 1450 cm^{-1} (WENG et al., 2013). Observa-se um pico intenso muito baixo em 1580 cm^{-1} referente às vibrações do grupo C=C devido à hibridização sp^2 do grafite (ȚUCUREANU; MATEI; AVRAM, 2016). Os picos em 1180 e 1080 cm^{-1} são atribuídos à vibração de alongamento do grupo C-O-C presente no PLA (LAVIN-LOPEZ et al., 2016). Como pode ser visto, os picos do material PLA são observados nas estruturas do compósito e do eletrodo, porém, com intensidade bem menor, pois apenas 60% do material final é PLA. A presença de grupos carboxílicos na superfície do eletrodo, observada pela análise FT-IR, possibilitou a construção do imunossensor sem a necessidade de modificação posterior do eletrodo com AuNps, como frequentemente relatado na literatura (BRAZACA et al., 2019; LAYQAH; EISSA, 2019; MUÑOZ; PUMERA, 2021).

Dando sequência nas caracterizações realizadas, para melhor entendimento da superfície do sensor impresso em 3D a partir de filamentos condutivos produzidos no presente trabalho, imagens de MEV do eletrodo Gpt-PLA foram registradas após dois fatores de amplificação (2000 e 8000x). Foi realizada uma medida de ângulo de contato para avaliar a hidrofiliabilidade do

sensor produzido. As imagens obtidas por MEV e ângulo de contato podem ser vistas na Figura 29.

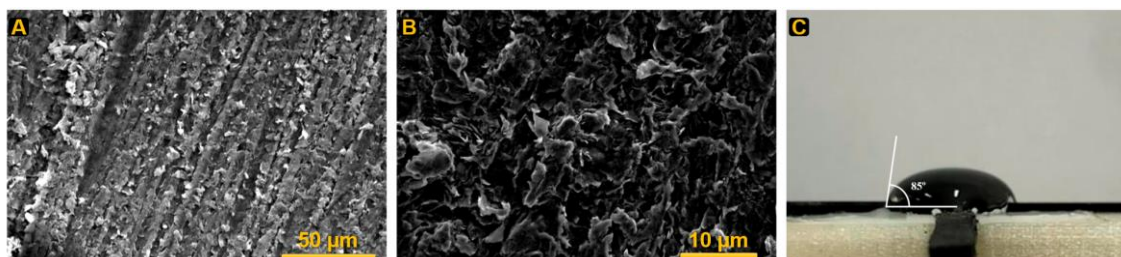


Figura 29. Imagens de MEV dos eletrodos impressos em 3D com filamentos contendo grafite em 40% de peso. Fatores de amplificação de (a) 2000x (b) e 8000x e (c) Imagem do ângulo de contato. **Fonte: próprio autor**

É possível observar as folhas de grafite bem distribuídas na superfície do sensor (Figura 29a-b). As folhas de grafite de formato irregular e com muitas arestas podem ser observadas, proporcionando uma superfície não uniforme como esperado para compósitos termoplásticos, o que pode fornecer sítios ativos capazes de melhorar a interação das espécies com a superfície do eletrodo (FOSTER et al., 2020; KRUPA; CHODAK, 2001). O ângulo de contato foi medido para as superfícies de eletrodos impressos em 3D, este parâmetro fornece informações sobre o comportamento de hidrofobicidade de uma superfície. Sabe-se que os materiais grafíticos apresentam características hidrofóbicas, porém, devido à presença de grupos oxigenados da matriz do filamento compósito (PLA), confirmado pela análise de FT-IR, o PLA contribui para uma superfície mais hidrofílica (CAMARGO et al., 2020). Como o compósito apresenta uma quantidade um pouco maior de PLA, o material apresentou um ângulo de contato tendendo mais para um comportamento hidrofílico ($85^{\circ} \pm 1,2^{\circ}$).

Voltamogramas cíclicos foram registrados para eletrodos de trabalho Gpt-PLA em uma célula convencional (descrita no procedimento experimental) para avaliar o desempenho dos filamentos compósitos obtidos, usando a sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos e comparar com os filamentos condutivos comerciais existentes, eletrodos de trabalho a base de grafeno (black magic) e

CB (proto pasta) também foram impressos em 3D com design idêntico aos impressos com filamento condutivo desenvolvido neste trabalho. Ademais, foram realizados testes em sensores tratados e não tratados para obter resultados e compreensão mais profunda da eficiência dos sensores. O tratamento eletroquímico consistiu na aplicação de potencial 1,4 V por 200 s seguidos pela aplicação de -1,0 V por 200 s com o sensor na presença de uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ (RICHTER et al., 2019b). Todos os voltamogramas cíclicos obtidos são apresentados na Figura 30.

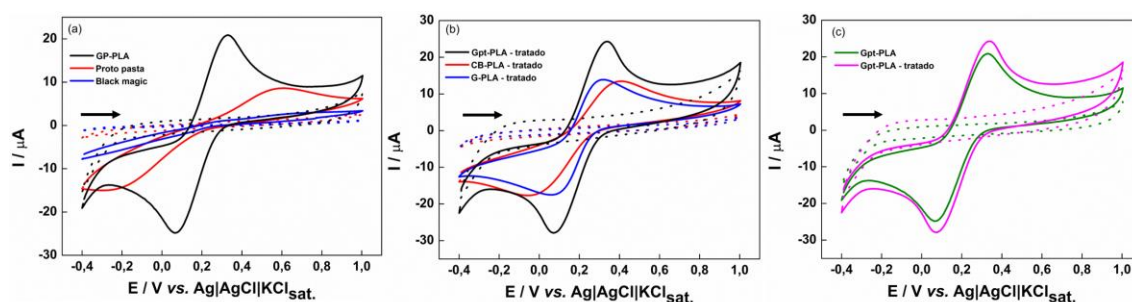


Figura 30. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ em (a) Gpt-PLA, CB-PLA e G-PLA após polimento em lixa; (b) Gpt-PLA, CB-PLA e G-PLA após pré-tratamento eletroquímico e; (c) Gpt-PLA antes e depois do tratamento eletroquímico. Os gráficos pontilhados são os respectivos brancos de cada análise. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹. **Fonte: próprio autor**

Como pode ser visto na Figura 30a, o eletrodo Gpt-PLA, sem tratamento, proporcionou uma melhor resposta eletroquímica quando comparado aos filamentos comerciais G-PLA e CB-PLA. Assim, algumas características eletroquímicas envolvendo as respostas dos sensores impressos em 3D de filamentos condutivos *lab-made* e comercial foram sumarizadas e podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8. Características eletroquímicas para sensores impressos em 3D. **Fonte: próprio autor**

Filamentos	I_{pa} / μA	I_{pc} / μA	I_{pa} / I_{pc}	ΔE_p / mV
G-PLA	0,54	-0,17	3,18	869
G-PLA tratado*	15,10	-13,50	1,12	260
CB-PLA	5,67	-4,18	1,36	904
CB-PLA tratado *	12,20	-11,00	1,11	466

Gpt-PLA	19,80	-18,90	1,05	264
Gpt-PLA tratado *	20,50	-20,60	0,995	267

*Pré-tratamento eletroquímico: aplicação de +1,4 V por 200 s, seguida da aplicação de -1,0 V por 200 s, na presença de NaOH 0,5 mol L⁻¹.

A partir dos resultados presentes na Tabela 8, observa-se que uma maior resposta de corrente, com uma relação de corrente (I_{pa}/I_{pc}) mais próxima da unidade (0,995) foi obtida para o sensor produzido com o novo filamento condutivo Gpt-PL. Este comportamento indica uma melhor reversibilidade do processo nesta superfície (grafite/PLA) em comparação com os eletrodos G-PLA e CB-PLA. Este resultado já era esperado para filamentos comerciais, uma vez que foi demonstrado na literatura que essas superfícies requerem um pré-tratamento superficial para remover o excesso de PLA não condutivo das superfícies dos eletrodos (GUSMÃO et al., 2019; KALINKE et al., 2020). Pois, de acordo com a literatura os filamento G-PLA e contém CB-PLA 8% e 21% de material condutivo em massa, respectivamente (FOSTER et al., 2017; STEFANO; SILVA; JANEGITZ, 2022). Este resultado permite concluir que o uso de maiores concentrações de material condutivo no filamento fabricado pode estar relacionado com a melhoria do desempenho do eletrodo Gpt-PLA impresso em 3D sem pré-tratamento. Pois, neste caso observa-se a presença de quantidades menores de polímeros, que podem “bloquear” os sítios ativos, o que proporciona uma cinética de transferência de elétrons mais lenta (RANDVIIR, 2018). Para examinar também o efeito da ativação de superfície no desempenho de eletrodos impressos em 3D, um pré-tratamento eletroquímico foi realizado com todos os eletrodos sob avaliação (Gpt-PLA, G-PLA e CB-PLA).

A Figura 30b apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ em eletrodos Gpt-PLA, G-PLA e CB-PLA tratados eletroquimicamente. Após o tratamento eletroquímico, observa-se que ocorreu uma melhora significativa das respostas eletroquímicas para os eletrodos G-PLA e CB-PLA, incluindo maiores correntes de pico, menor relação I_{pa}/I_{pc} e menor ΔE_p (Tabela 9), indicando a melhor reversibilidade do processo *redox* nessas superfícies após o tratamento. Entretanto, o Gpt-PLA ainda apresentou respostas eletroquímicas superiores,

mesmo quando comparado à resposta obtida com o eletrodo Gpt-PLA não tratado. Porém, o tratamento de superfície não proporcionou um aumento significativo na resposta analítica do Gpt-PLA (Figura 30c), não ocorrendo variação significativa na corrente de pico e na separação de potencial. Este comportamento pode estar associado a quantidade de PLA em massa no eletrodo, o qual é menor quando comparada aos outros (produzidos com filamentos comerciais). Portanto, o novo sensor obtido a partir do filamento condutivo proposto neste trabalho mostrou-se eficaz e nenhum tratamento de superfície foi necessário para a obtenção de respostas eletroquímicas satisfatórias. Uma hipótese provável para o Gpt-PLA não necessitar de ativação é que ele apresenta uma quantidade elevada de material condutivo em sua matriz (40% em peso). Nesse sentido, uma simples etapa de polimento da superfície do eletrodo para retirar o excesso de PLA é suficiente para empregar esse material como sensor eletroquímico. Deste modo, devido a menor quantidade de polímero na superfície do eletrodo, os efeitos na ativação com NaOH não são tão evidentes. Ademais, como pode ser observado na Figura 30b-c, maiores concentrações de PLA no eletrodo proporcionam uma melhora na resposta eletroquímica de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ após a ativação do NaOH. Em contrapartida, quanto menor a quantidade de PLA no eletrodo, menos eficaz é o tratamento com NaOH.

Para aprofundar o estudo a resposta da resposta eletroquímica do sensor produzido a partir do novo filamento aqui proposto, uma sonda eletroquímica diferente foi empregada para avaliar novamente as respostas dos sensores produzidos a partir dos diferentes filamentos condutivos (Gpt-PLA, G-PLA e CB-PLA). Como a resposta CV depende fortemente da sonda eletroquímica empregada, o uso da sonda *redox* $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ foi empregado. Voltamogramas cíclicos foram registrados com velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} para a sonda *redox* eletroquímica $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a Figura 31 apresenta os resultados obtidos.

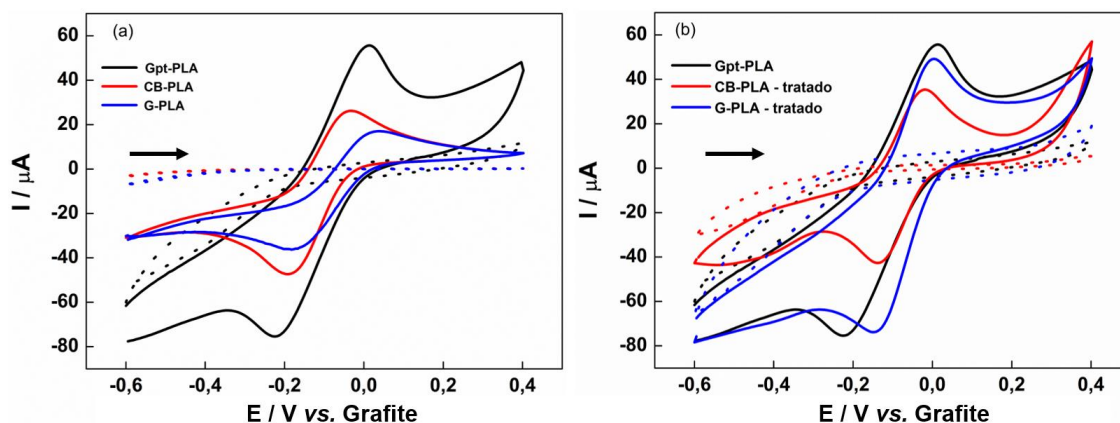


Figura 31. Voltamogramas cíclicos para $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em eletrodos impressos em 3D de Gpt-PLA, CB-PLA e G-PLA (a) sem tratamento e (b) tratados (exceto Gpt-PLA). Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

Como pode ser visto nas Figura 31a, o comportamento eletroquímico obtido com os filamentos comerciais CB-PLA e G-PLA sem tratamento de superfície é superior ao observado com $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, com picos de oxidação e redução bem definidos e menor ΔE_p , apresentando melhor reversibilidade dos processos. Esta resposta está de acordo com o relatado na literatura, que mostra que o uso de CB-PLA apresenta um comportamento eletroquímico quase ideal para sonda *redox* $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, mesmo para eletrodos não tratados, com valores de ΔE_p variando de 85 a 95 mV em velocidade de varredura de potencial de 25 mV s^{-1} (VANĚČKOVÁ et al., 2020). Um maior valor de ΔE_p foi encontrado no presente trabalho para CB-PLA, porém as CVs foram realizadas empregando 50 mV s^{-1} .

Ao comparar CB-PLA e G-PLA com Gpt-PLA, uma resposta de corrente superior é observada para o último, embora um ΔE_p ligeiramente maior seja observado (236 mV, quando comparado a 222 e 161 mV para G-PLA e CB-PLA, respectivamente). Após serem submetidos ao tratamento eletroquímico de superfície, o desempenho dos eletrodos CB-PLA e G-PLA foi significativamente melhorado (Figura 31b). Observa-se diminuição significativa da ΔE_p para G-PLA e CB-PLA, atingindo 153 e 116 mV, respectivamente. Além disso, pode-se observar um aumento considerável na corrente de pico para G-PLA, porém, a corrente de pico obtida nesta superfície é comparável ao Gpt-PLA sem tratamento de superfície, confirmando que o desempenho do Gpt-

PLA é adequado para diferentes sondas *redox*, sem serem submetidas a tratamentos de superfície.

A partir deste momento, todas as caracterizações eletroquímicas realizadas e os experimentos analíticos com os analitos de interesse foram utilizados o design de célula eletroquímica e eletrodos, de acordo com o ilustrado na Figura 24G. A caracterização eletroquímica foi realizada para avaliar os eletrodos G-PLA e CB-PLA e comparar com o Gpt-PLA, utilizando a célula de três eletrodos desenvolvida (Figura 24G). Para estes testes foi empregado a sonda eletroquímica FcMeOH, pois foram observados picos mais bem definidos, especialmente para G-PLA e CB-PLA não tratados. Um estudo usando CV foi realizado utilizando os sensores impressos em 3D de G-PLA e CB-PLA tratados e não tratados, e com o sensor de Gpt-PLA não tratado (apenas lixamento) em uma faixa de 0,01 a 0,1 V s⁻¹ na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Os respectivos voltamogramas e gráficos de correntes de pico anódicas e catódicas em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial podem ser observados na Figura 32.

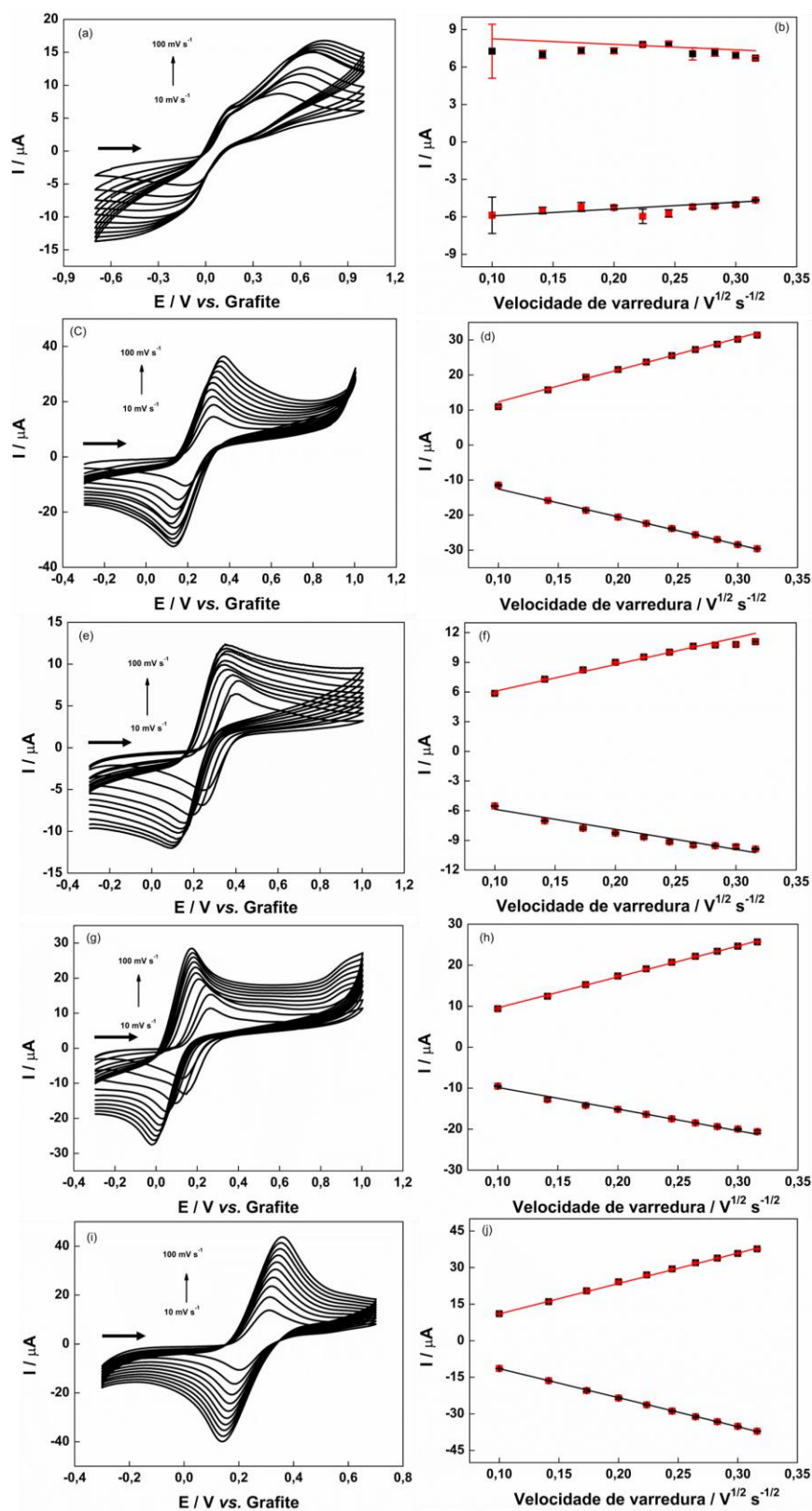


Figura 32. Voltamogramas cíclicos na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}). (a-d) G-PLA não tratado e tratado (e-h), CB-PLA não tratado e tratado; (i-j) Gpt-PLA. Relação das correntes de pico anódicas (■)

e catódicas (■) versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($V^{1/2}$). **Fonte: próprio autor**

A partir da Figura 32, observa-se um comportamento linear foi observado para todas as superfícies, exceto G-PLA não tratado, que não seguiu uma tendência, provavelmente devido à má exposição do grafeno na superfície do eletrodo pela presença de material polimérico que pode “bloquear” os sítios ativos. Por fim, a técnica EIS foi empregada para avaliar a R_{ct} . Os gráficos de Nyquist obtidos para Gpt-PLA não tratado e G-PLA e CB-PLA tratados comercialmente são mostrados na Figura 33.

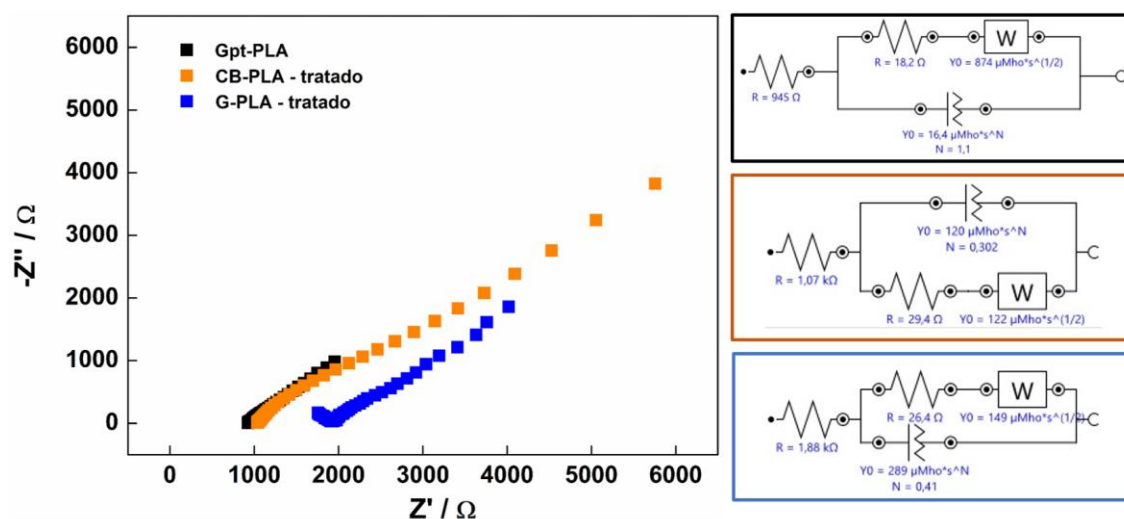


Figura 33. Gráficos de Nyquist do Gpt-PLA (■), CB-PLA tratado (■) e G-PLA tratado (■) na presença de solução de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, com um potencial aplicado de 0,2 V. A faixa de frequência é de 100 kHz a 100 mHz e a amplitude de perturbação de 10 mV. Respectivos circuitos equivalentes e valores obtidos. **Fonte: próprio autor**

A partir dos resultados obtidos nas Figuras 32 e 33, os dados eletroquímicos (área eletroativa, R_{ct} e constante de taxa de transferência eletrônica heterogênea (HET) k_{obs}^0) foram sumarizados na Tabela 9. A área eletroquimicamente ativa da superfície dos eletrodos foi obtida pela equação de Randles-Sevcík, e o coeficiente de difusão para FcMeOH foi de $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, previamente relatado na literatura (AMATORE et al., 2007; CHEN; KÄTELHÖN; COMPTON, 2019). O R_{ct} foi obtido empregando um circuito de Randles. Ademais, HET k_{obs}^0 foi determinada pelo método de Nicholson para

as superfícies estudadas usando a sonda *redox* FcMeOH e dados CV e obtidos a partir dos valores de R_{ct} obtidos (NICHOLSON, 1965; RANDVIIR; BANKS, 2013).

Tabela 9. Parâmetros obtidos a partir da caracterização eletroquímica com os filamentos propostos e comerciais. **Fonte: próprio autor**

Filamento condutivo	$k^0_{obs} \times 10^{-6} /$		$\Delta E_p /$ V	R_{ct} / Ω	Área de superfície eletroquimicamente ativa /	
	$cm s^{-1}$				mm ²	%
	CV	EIS				
G-PLA tratado*	6,1	10,1	0,196	26,4	10,26 ± 0,07	81,6 ± 0,5
CB-PLA tratado*	5,0	9,1	0,166	29,4	10,26 ± 0,06	81,6 ± 0,5
Gpt-PLA	7,5	14,6	0,173	18,2	16,72 ± 0,03	133,0 ± 0,2

*Pré-tratamento eletroquímico: aplicação de +1,4 V por 200 s, seguida da aplicação de -1,0 V por 200 s, na presença de NaOH 0,5 mol L⁻¹.

Pode-se observar que os eletrodos G-PLA e CB-PLA apresentaram uma área de superfície eletroquimicamente ativa semelhante após o pré-tratamento, enquanto o Gpt-PLA forneceu uma maior área de superfície eletroquimicamente ativa do que ambos. Em relação a HET, maior valor de k^0_{obs} foi observado para o eletrodo Gpt-PLA proposto (sem tratamento de superfície) usando ambos os métodos, indicando uma cinética HET mais rápida em comparação com os eletrodos G-PLA e CB-PLA (com tratamento de superfície), o que resultou em melhores voltamogramas cíclicos obtidos nesta superfície (BROWNSON; KELLY; BANKS, 2015). Embora os valores de k^0_{obs} obtidos de CV e EIS devam teoricamente apresentar os mesmos valores, pode ser observada uma redução considerável nos valores de k^0_{obs} de EIS para valores determinados de CV (até 49% de diminuição). Isso pode ser atribuído às matrizes poliméricas dos eletrodos, uma vez que as correntes estão sendo afetadas pela presença dos polímeros capazes de “bloquear” os sítios ativos do material condutivo, proporcionando assim uma cinética de transferência de elétrons mais lenta (RANDVIIR, 2018). A partir dos valores de R_{ct} , pode-se inferir que o eletrodo Gpt-PLA não tratado apresentou menor R_{ct} , logo, a transferência de elétrons é favorecida nesta superfície, de acordo com o valor de k^0_{obs} obtido. O eletrodo G-PLA tratado também forneceu uma superfície com

R_{ct} ligeiramente menor do que o eletrodo CB-PLA tratado, bem como k_{obs}^0 mais alto, indicando que o processo *redox* é favorecido usando o eletrodo G-PLA tratado em comparação com o G-PLA e CB-PLA.

A caracterização eletroquímica mostrou o desempenho superior dos eletrodos fabricados com o filamento compósito fabricado, com maior área de superfície eletroquimicamente ativa observada, reversibilidade satisfatória para as sondas *redox* estudadas. A HET apresentou-se mais rápido e valores de R_{ct} mais baixos para o Gpt-PLA aos sensores impressos com filamentos comerciais, com a vantagem de ser um filamento pronto para uso (não é necessária nenhuma etapa de pré-tratamento). Além disso, o filamento condutivo é um material fabricado em laboratório, de fabricação simples e custo relativamente baixo. Deste modo, a aplicabilidade do material proposto foi avaliada para a determinação de diferentes biomarcadores (AU e DA) em amostras de urina sintética usando técnicas voltamétricas.

7.2 Determinação voltamétrica de AU

7.2.1 Perfil voltamétrico do AU usando Gpt-PLA

O ácido úrico é uma espécie relevante em fluidos biológicos, sendo este uma molécula de defesa não enzimática do estresse oxidativo no corpo humano (PELUSO; RAGUZZINI, 2016). Os níveis sanguíneos anormais de AU podem indicar alguma fisiopatologia renal (EJAZ et al., 2013). Por esse motivo, a determinação da AU foi selecionada como prova de conceito. A Figura 34 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para AU 1,0 mmol L⁻¹ em tampão BR (pH 2,0) usando os eletrodos Gpt-PLA, G-PLA e CB-PLA não tratados e tratados.

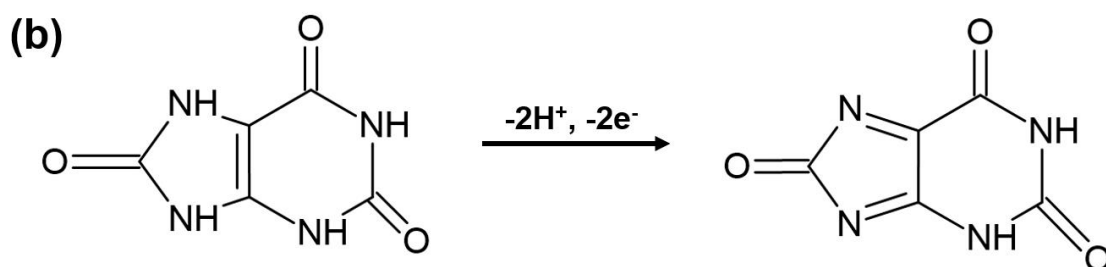
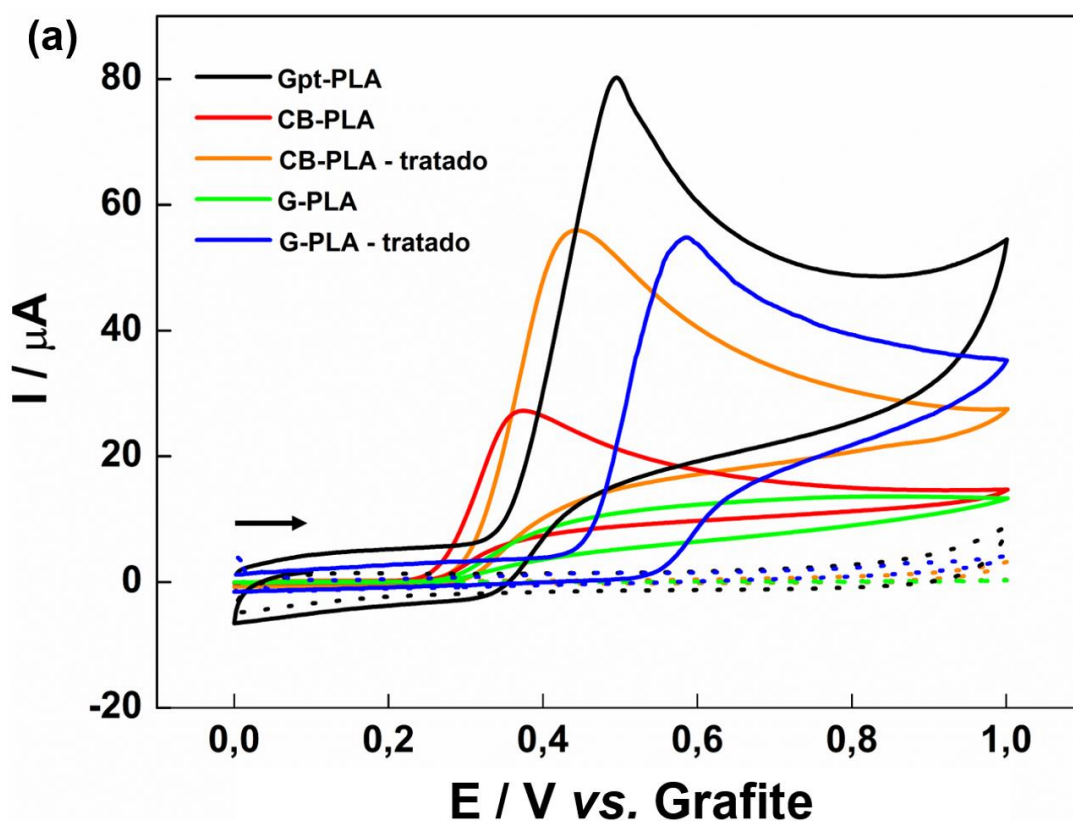


Figura 34. (a) Voltamogramas cíclicos para AU 1,0 mmol L⁻¹ em BR tampão (pH 2,0) 0,1 mol L⁻¹ em Gpt-PLA e G-PLA e CB-PLA impressos em 3D antes e depois do pré-tratamento eletroquímico. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s⁻¹. (b) Mecanismo de oxidação do AU. **Fonte: próprio autor**

Como pode ser visto na Figura 34a, os voltamogramas cíclicos dos eletrodos fabricados com filamentos de G-PLA e CB-PLA não tratados exibiu ondas mal definidas para AU. Esses resultados estão de acordo com estudos na literatura que mostraram a necessidade do procedimento de ativação de sensores impressos em 3D para remover a matriz isolante de PLA (CARDOSO et al., 2020a; KALINKE et al., 2020; RICHTER et al., 2019a; SILVA et al., 2020). Quando os eletrodos impressos em 3D usando filamentos comerciais

(G-PLA e CB-PLA) foram submetidos a um tratamento eletroquímico, uma resposta de melhora significativa foi alcançada (RICHTER et al., 2019a). Após o tratamento, uma corrente de pico duas vezes maior foi obtida para o eletrodo CB-PLA e uma melhora impressionante para o eletrodo G-PLA (o pico mal definido antes do tratamento da superfície) foi observada. A Figura 34a também mostrou um pico bem definido para AU em torno de +0,5 V e desempenho superior (resposta de corrente 1,4 vezes maior) do filamento compósito produzido (Gpt-PLA) sem tratamento em comparação com filamentos de G-PLA e CB-PLA após tratamento eletroquímico de superfície. Ademais, na Figura 34b é apresentado o possível mecanismo de oxidação do ácido úrico, o qual envolve dois prótons e dois elétrons (LV et al., 2019; MAZZARA et al., 2021; TURKKAN et al., 2021).

7.2.2 Otimização da técnica de DPV

Diante dos resultados expressados e discutidos acima o eletrodo Gpt-PLA impresso em 3D foi empregado para a quantificação de AU usando voltametria de pulso diferencial (DPV). Os parâmetros operacionais da DPV foram sistematicamente otimizados (testes univariados), usando uma solução contendo AU $30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ BR tampão (pH 2,0) como eletrólito suporte. A Figura 35 apresentam os voltamogramas obtidos empregando a técnica de DPV, bem como a correlação corrente de pico vs. os parâmetros amplitude, tempo de modulação e incremento de potencial estudados.

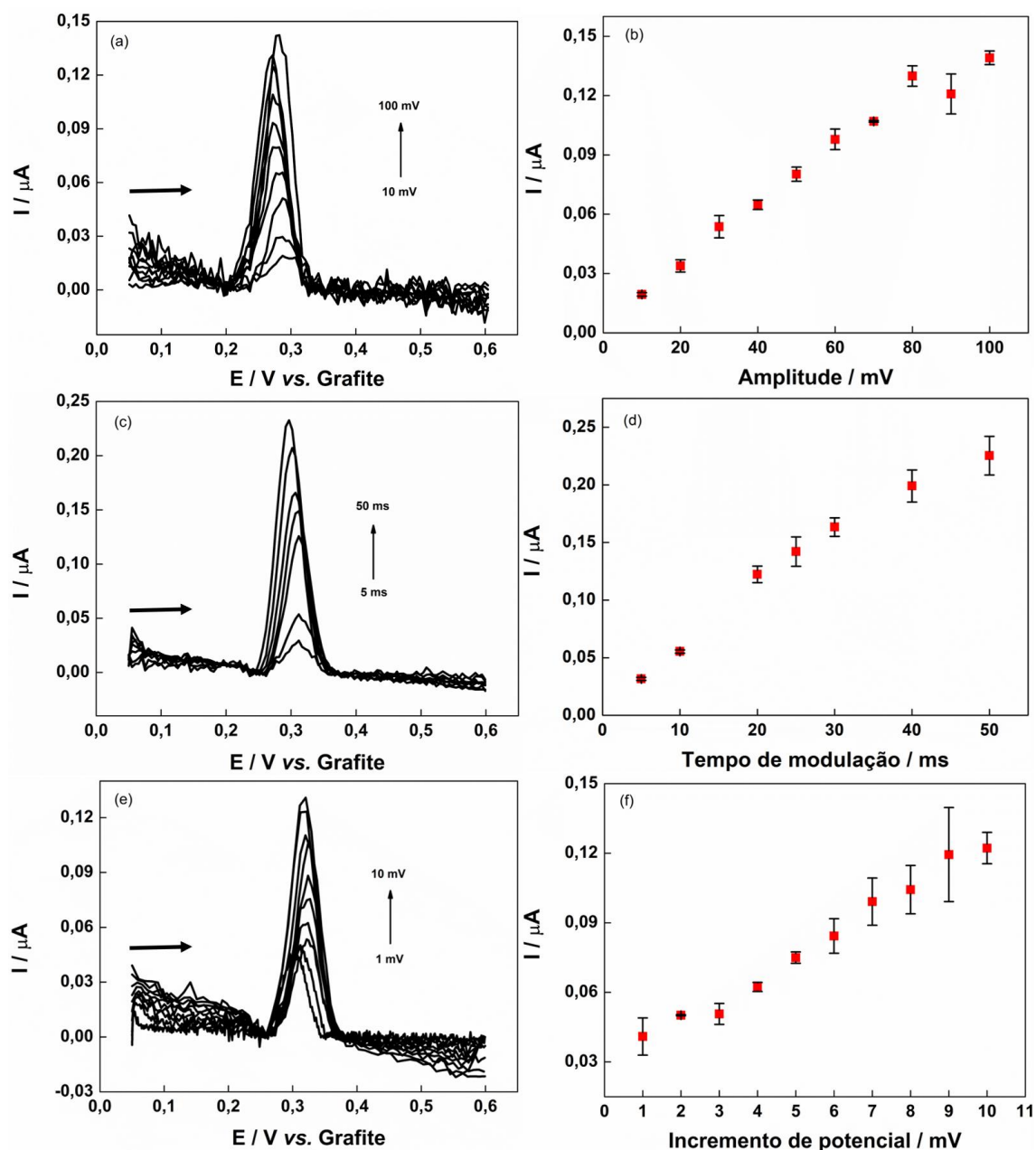


Figura 35. Efeito da amplitude (a), tempo de modulação (c) e incremento de potencial (e) na resposta voltamétrica de AU. Parâmetros DPV em (a): 5 mV (incremento de potencial), 25 ms (tempo de modulação) e 10 mV s⁻¹ (velocidade de varredura de potencial). Parâmetros DPV em (c): 5 mV (incremento de potencial), 50 mV (amplitude) e 10 mV s⁻¹ (velocidade de varredura de potencial). Parâmetros DPV em (e): 25 ms (tempo de modulação), 50 mV (amplitude) e 10 mV s⁻¹ (velocidade de varredura de potencial). Todas as otimizações foram realizadas utilizando AU 30,0 μmol L⁻¹ em tampão BR 0,12 mol L⁻¹ (pH 2,0) como eletrólito.

Fonte: próprio autor

Para melhor sumarizar os dados obtidos a partir do estudo de otimização dos parâmetros da DPV, a Tabela 10 apresenta faixa estudada e valores ótimos obtidos.

Tabela 10. Otimização dos parâmetros DPV para detecção de AU. **Fonte: próprio autor**

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Tempo de modulação / ms	5 – 50	30
Incremento de potencial / mV	1 – 10	5
Amplitude / mV	10 – 100	80

A partir da Figura 35, observa-se que nas faixas estudadas para os parâmetros da DPV, as respostas analíticas geraram voltamogramas bem definidos e à medida que os valores dos parâmetros aumentam não há um alargamento significativo da altura de meio pico. Diante disso, os principais parâmetros de escolha dos valores analisados foi intensidade de corrente de pico e DP. De acordo com esses resultados, a melhor condição para determinação de AU por DPV foi obtida usando incremento de potencial de 5 mV, amplitude de 80 mV e tempo de modulação de 30 ms. Com isso, tais valores dos parâmetros da DPV foram empregados para todos os testes realizados subsequentemente.

7.2.3 Curva analítica para AU

A partir da técnica de DPV otimizada, uma curva analítica foi construída na faixa de 0,5 a 150,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme mostrado na Figura 36. Valores inferiores a 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e superiores há 150,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não apresentaram linearidade satisfatória e não foram consideradas.

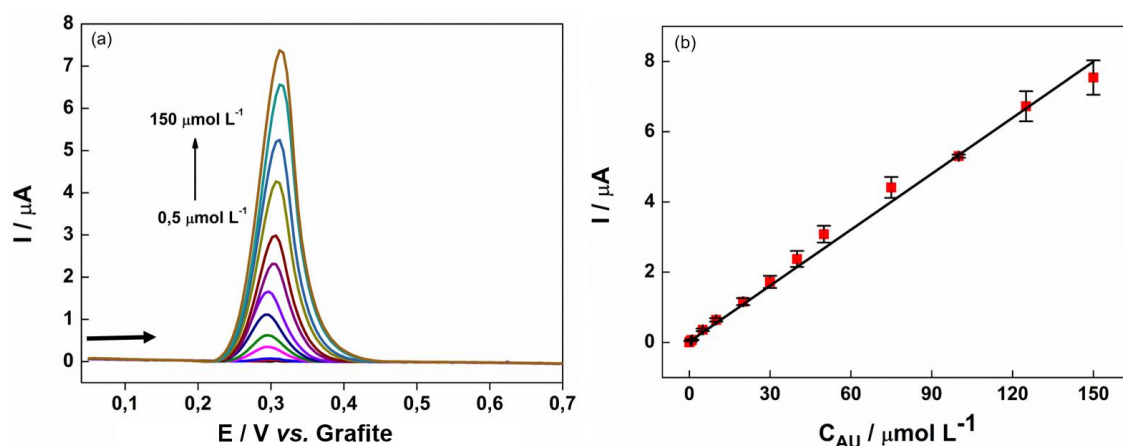


Figura 36. Voltamogramas de pulso diferencial para concentrações crescentes de AU (0,5 a 150,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em BR (pH 2,0) 0,1 mol de tampão L^{-1} . Parâmetros DPV: 80 mV (amplitude de modulação); 30 ms (tempo de modulação); 5 mV (incremento de potencial). **Fonte: próprio autor**

A partir desta curva analítica construída, os valores do LD e LQ obtidos foram 0,07 e 0,23 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, com a sensibilidade de 0,05 $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$. A Tabela 11 resume os parâmetros analíticos obtidos a partir dos dados mostrados na Figura 36.

Tabela 11. Recursos analíticos para a detecção de AU usando eletrodo impresso em 3D. **Fonte: próprio autor**

Características	Valor
Faixa linear / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,5 - 150,0
R^2	0,998
Sensibilidade / $\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$	0,05
LQ / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,23
LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,07
Intra-eletrodos (DPR, n = 13)	4,8%
Inter-eletrodos (DPR, n = 5)	12,0%

Os LD e LQ foram calculados de acordo com as fórmulas $\text{LD} = (3,3 \times \text{DP}_{\text{intercept}})/b$ e $\text{LQ} = 3 \times \text{LD}$. A curva apresentou um R^2 de 0,998 demonstrando uma boa linearidade das respostas obtidas. A equação da reta obtida foi $I(\mu\text{A}) = 0,02 + 0,05 \times C_{\text{AU}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. A precisão inter-eletrodos também foi avaliada com base na medição do pico de corrente para diferentes eletrodos (n = 5) na

presença de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ UA (também mostrado na Tabela 12). Os valores de RSD foram $<12\%$, o que indica alta precisão na construção do sensor Gpt-PLA impresso em 3D para determinação de AU. Por fim, a repetibilidade do sensor foi avaliada após 13 registros de DPV consecutivos de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ UA (apresentado na Tabela 12), e um RSD $<5\%$ foi obtido.

Na literatura, há alguns relatos da detecção eletroquímica de AU empregando sensores impressos em 3D. Ho, Ambrosi e Pumera (2018) (HO; AMBROSI; PUMERA, 2018) exibiram a construção de eletrodo impresso em metal 3D modificado eletroquimicamente com uma camada de ouro para determinação de AU em solução aquosa usando a técnica DPV. Os autores obtiveram uma faixa linear entre $0,1$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ com um valor de LD de $84,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Depois disso, Cardoso e colaboradores relataram a determinação simultânea de AU e nitrito em amostras de fluidos biológicos usando eletrodos de G-PLA impressos em 3D (CARDOSO et al., 2020a). Os autores destacaram que a resposta eletroquímica do AU foi relativamente pobre no eletrodo impresso em 3D não tratado devido à alta quantidade de PLA. Portanto, para a construção dos sensores, o eletrodo impresso em 3D foi submetido ao tratamento mecânico e imersão em DMF. Após a ativação, os autores obtiveram uma boa faixa linear de $10,0$ a $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um LD de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando a técnica DPV. Embora os autores tenham alcançado bons resultados usando a técnica de impressão 3D para construção de eletrodos em ambos os trabalhos, procedimentos de ativação ou modificação da superfície do eletrodo foram necessários para obter resultados satisfatórios para detecção de AU. Por outro lado, o filamento Gpt-PLA mostrou-se um material promissor para a construção de um sensor de UA sem a necessidade de tratamento com solventes orgânicos tóxicos ou procedimentos caros.

O AU pode ser encontrado em uma faixa de concentração de $0,12$ a $0,38 \text{ mmol L}^{-1}$ no soro sanguíneo e esse valor deve ser inferior a $4,50 \text{ mmol L}^{-1}$ por dia na urina (BALLESTA-CLAVER et al., 2011; ROSSINI et al., 2018). Assim, o LD ($0,07 \mu\text{mol L}^{-1}$) obtido para este novo sensor é útil para a detecção de AU nestes tipos de amostras.

7.2.3 Determinação de AU em urina sintética

Como prova de conceito, uma amostra de urina sintética foi analisada pelo método de adição padrão, no qual a amostra foi diluída 40 vezes no eletrólito suporte. Deste modo, a amostra de urina sintética possui uma concentração inicial de AU de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A análise foi realizada sob condições otimizadas de DPV, e a urina sintética diluída foi então fortificada com concentrações crescentes de AU ($10,0$ a $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 37, bem como a respectiva curva de adição padrão.

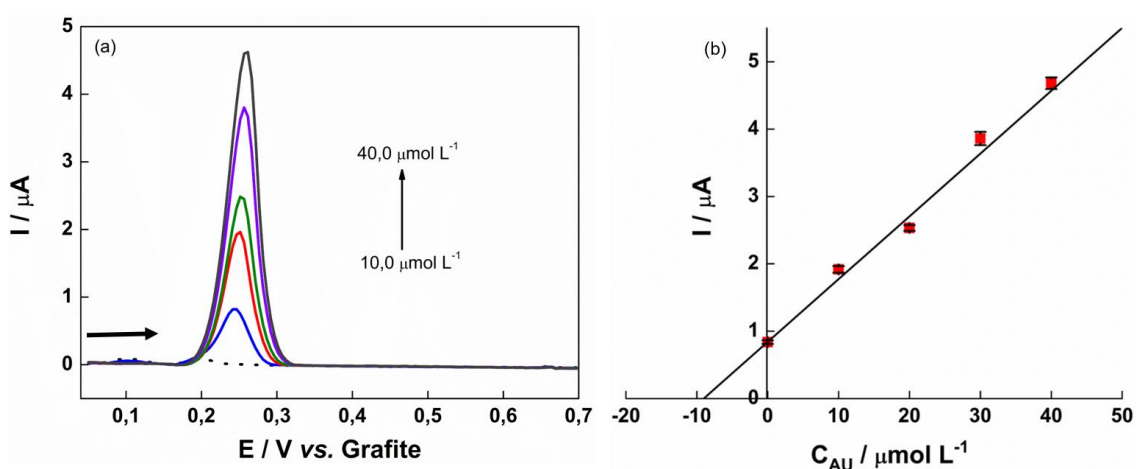


Figura 37. Voltamogramas de pulso diferencial para amostras de urina sintética fortificada ($10,0$, $20,0$, $30,0$ e $40,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH } 2,0$). Parâmetros DPV: 80 mV (amplitude); 30 ms (tempo de modulação); 5 mV (incremento de potencial). **Fonte: próprio autor**

A parti da Figura 37, observa-se que o potencial de pico (E_p) sofreu um leve deslocamento para potenciais mais negativo em relação a curva analítica levantada apenas no eletrólito de suporte. Este deslocamento pode estar possivelmente associado a matriz em que foram realizadas as análises. Porém, tal deslocamento não interferiu de maneira significativa nos resultados gerados. Na figura 38b é possível observar que as análises na amostra dopada responderam de forma linear, com um R^2 de $0,994$, bem próximo do encontrando empregando apenas eletrólito de suporte (Figura 37b). A partir da curva construída a equação da reta obtida foi $I(\mu\text{A}) = 0,840 + 0,094 \times C_{AU} (\mu\text{mol}$

L⁻¹). Diante disso, a concentração estimada de AU foi obtida com a extrapolação da reta, obtendo-se um valor de 9,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na amostra de urina sintética. Este valor corresponde a um valor de recuperação satisfatório de 90,1% na urina sintética. Este resultado demonstra a eficácia do sensor visto que a recuperação apresentou um valor próximo ao original. A urina sintética foi preparada com diferentes tipos de sais e compostos orgânicos, sendo isenta de interferências, demonstrando que não há efeito matriz significativo para análise na amostra proposta.

7.4 Imunossensor eletroquímico para determinação de SARS-CoV-2

Para mostrar a versatilidade do Gpt-PLA, foram realizados estudos para o desenvolvimento de um imunossensor para o diagnóstico de COVID-19 baseado no sensor impresso em 3D Gpt-PLA. A CV foi utilizada para avaliar a resposta de cada etapa de imobilização e a resposta do imunossensor final para a proteína *Spike* do vírus. Todas etapas sem exceção foram monitoradas utilizando FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} , pois à medida que cada etapa de modificação do imunossensor impresso em 3D é realizada a resposta analítica gerada é alterada.

Como a superfície do Gpt-PLA já fornecia ligações funcionais suficientes com grupos carboxílicos disponíveis conforme observado pela análise de FT-IR, a ligação do EDC-NHS foi possível diretamente na superfície do Gpt-PLA, eliminando assim as etapas anteriores para a fabricação do imunossensor. Os grupos OH do ácido carboxílico foram então ligados covalentemente às ligações duplas presentes no EDC-NHS, ativando os grupos COOH de superfície para um rápido acoplamento covalente ao elemento de biorreconhecimento amino-funcionalizado (BEDUK et al., 2021; SAM et al., 2010). Em seguida, o Ab da proteína S1, rico em grupos carboxílicos, foi imobilizado no eletrodo, liberando o ligante NHS intermediário. O bloqueio do eletrodo foi feito com solução de BSA (1% m/v), evitando interações não específicas (BEDUK et al., 2021). Em seguida, o imunossensor estava pronto para uso, ou seja, com poucas etapas de fabricação, foi construído um imunossensor simples.

7.4.1 Perfil voltamétrico do imunossensor Gpt-PLA

Medições voltamétricas cíclicas foram obtidas para FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, após cada etapa de fabricação do imunossensor: Gpt-PLA, Gpt-PLA/EDC-NHS, Gpt-PLA/EDC-NHS/AC e Gpt-PLA/EDC-NHS/AC/BSA, e após a adição de 50,0 nmol L⁻¹ de antígeno. Todos os voltamogramas registrados em cada uma das etapas podem ser observados na Figura 38.

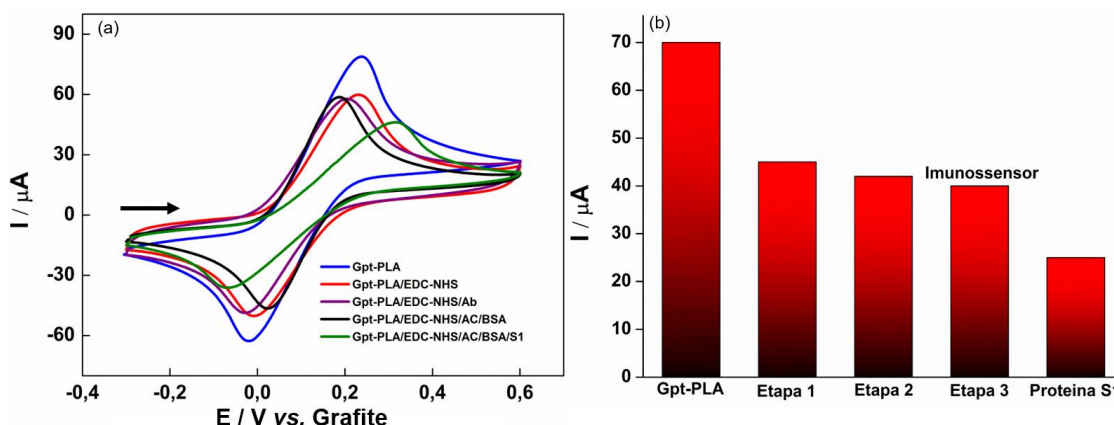


Figura 38. Voltamogramas cíclicos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ após cada etapa de imobilização. Velocidade de varredura de potencial 100 mV s⁻¹. **Fonte:** próprio autor

É possível observar que, inicialmente, a resposta analítica do Gpt-PLA gera picos de oxidação e redução referente a presença da sonda *redox* FcMeOH bem definidos, e fornecem altas respostas de corrente de pico. Porém, após ancorar os compostos EDC-NHS na superfície do sensor 3D, as respostas de corrente de pico sofreram uma redução expressivas, tendo um decaimento de aproximadamente 30%. Este comportamento pode ser relacionado ao bloqueio de sítios ativos específicos causados pelas moléculas de EDC-NHS ligadas na superfície do eletrodo. Já, após a imobilização de AC e BSA não afetou significativamente os valores de corrente de pico. Por outro lado, após realizar a imobilização do antígeno com Ab presente na superfície do sensor é possível observar diminuição significativa na resposta de corrente de pico. Uma diminuição na reversibilidade do processo *redox* é observada com a separação pico a pico. Diante disso, a detecção do antígeno foi possível

devido à reação específica da proteína *Spike* (antígeno) com o Ab ligado ao imunossensor. O aumento da concentração de antígeno proporcionou uma estrutura mais volumosa na superfície do eletrodo, dificultando o processo de transferência de elétrons e, conseqüentemente, diminuindo a resposta eletroquímica da sonda *redox* (FcMeOH) (BEDUK et al., 2021). Portanto, a queda nos valores de pico de corrente na presença do antígeno atesta o bom funcionamento do imunossensor fabricado para a detecção da proteína S1 do vírus SARS-CoV-2.

7.4.2 Curva analítica para proteína S1

A partir da confirmação que é possível produzir um imunossensor eletroquímico para detecção da proteína *Spike* S1 do vírus SARS-CoV-2 com eletrodos impressos em 3D a base de filamentos condutivo de Gpt-PLA uma curva analítica para a proteína *Spike* foi construída. Para tal, a partir do imunossensor pronto, a proteína *Spike* S1 foi incubada na superfície do sensor por 30 minutos antes de cada análise, empregando diferentes concentrações crescentes de antígeno (5,0 a 75,0 nmol L⁻¹). A Figura 39 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Todos os voltamogramas foram registrados empregando a velocidade de varredura de potencial de 50 mV s⁻¹ imediatamente o final do tempo de incubação para cada concentração empregada no presente estudo.

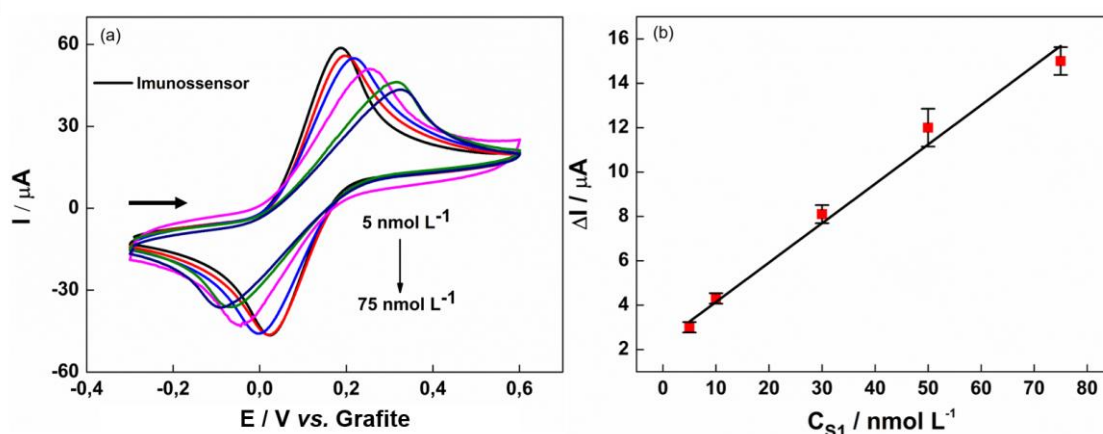


Figura 39. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ utilizando o imunossensor fabricado para concentrações crescentes de antígeno

(5,0, 10,0, 30,0, 50,0 e 75,0 nmol L⁻¹); Velocidade de varredura de potencial: 100 mV s⁻¹.

Fonte: próprio autor

A curva analítica apresentada na Figura 39 tem relação entre a concentração de antígeno (nmol L⁻¹) e a razão da corrente de pico de oxidação entre a última etapa de modificação (BSA) – o analito ($\Delta\mu\text{A}$). Com isso, foi observado comportamento linear na faixa de concentração de 5,0 a 75,0 nmol L⁻¹, com um R² de 0,995. Este resultado demonstra que o imunossensor impresso em 3D tem capacidade de gerar respostas lineares para proteína S1 do vírus SARS-CoV-2. A equação da reta obtida foi $\Delta I(\mu\text{A}) = 2,37 + 0,18 \times C_{S1}$ (nmol L⁻¹). Os LD e LQ foram calculados com a mesma formula já expressa anteriormente. O imunossensor baseado em Gpt-PLA forneceu um valor de LD de 1,36 nmol L⁻¹ (0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), LQ de 4,5 nmol L⁻¹ (0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e uma sensibilidade de 0,17 $\mu\text{A nmol}^{-1} \text{ L}$ (0,01 $\mu\text{A mg}^{-1} \text{ mL}$).

7.4.3 Teste de interferência no imunossensor

Para observar a seletividade do imunossensor desenvolvido, um teste de controle negativo foi realizado pela incubação de uma proteína inespecífica (BSA) na concentração de 75,0 nmol L⁻¹ (5,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 30 min na superfície do imunossensor 3D. A Figura 40 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ com o imunossensor após incubação da proteína negativa e após incubação do controle positivo (proteína *Spike S1*) na mesma concentração.

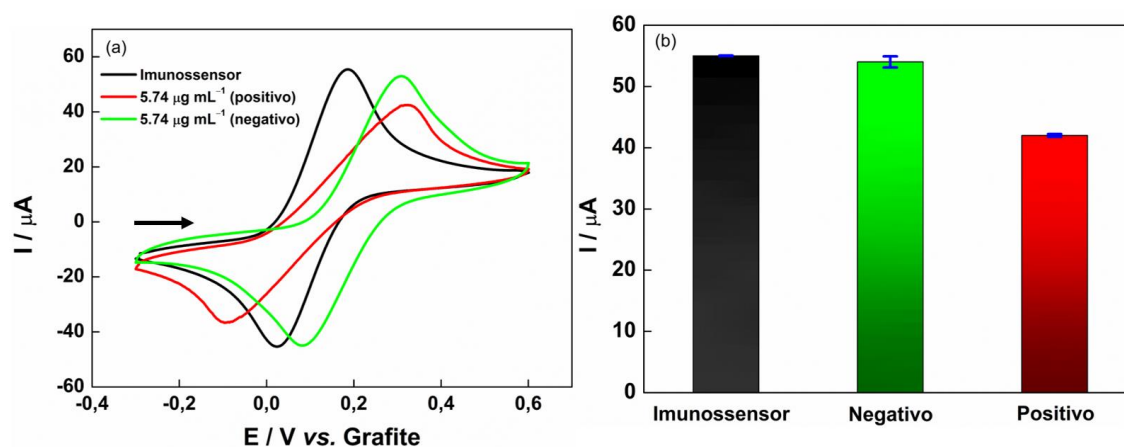


Figura 40. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o imunossensor fabricado após a incubação da proteína negativo (BSA $5,74 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e positivo (proteína *Spike* S1 $5,74 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$); velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

A partir da Figura 40 é possível observar que a resposta eletroquímica do imunossensor após a incubação da proteína de controle negativo não gera quaisquer decaimentos significativos de corrente. Por outro lado, após a incubação da proteína *Spike* do vírus, ocorre um decaimento expressivo na corrente, atestando que o imunossensor está respondendo apenas ao antígeno desejado. Diante disso, o imunossensor desenvolvido a partir de filamentos condutivos *lab-made* de grafite e PLA em conjunto com a tecnologia de impressão 3D apresenta uma boa seletividade para a proteína de interesse do vírus SARS-CoV-2, apresentando-se como um potencial método alternativo para testagens.

7.4.4 Determinação da proteína S1 em saliva sintética

Para demonstrar a aplicabilidade do imunossensor, foi realizada a análise da proteína em amostras fortificadas de saliva sintética ($n = 4$) com diferentes concentrações. A Figura 41 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos com o imunossensor na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após a incubação de diferentes concentrações ($5,0, 10,0, 30,0$ e $50,0 \text{ nmol L}^{-1}$) de proteína *Spike* preparada em saliva sintética na superfície do imunossensor.

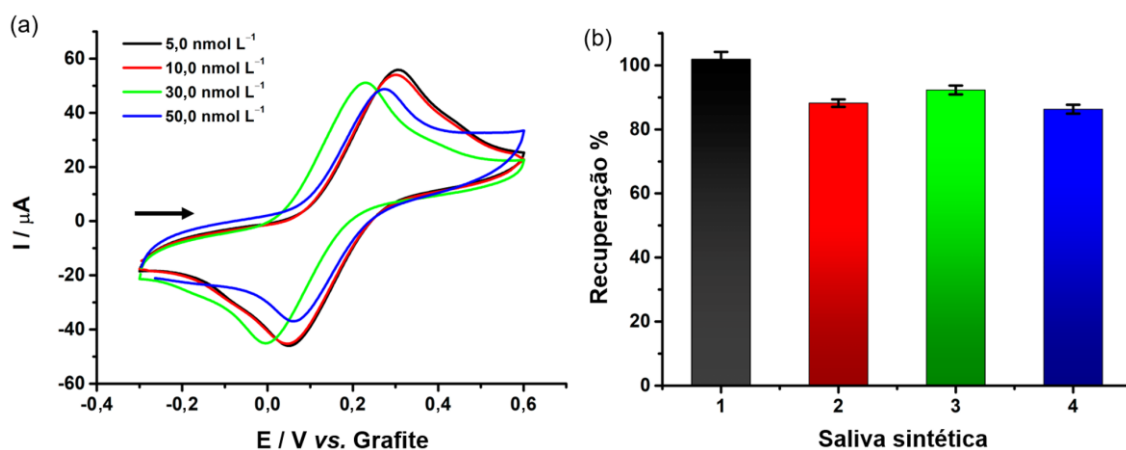


Figura 41. Voltamogramas cíclicos registrados para FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregando o imunossensor após a incubação de saliva sintética com diferentes concentrações de proteína *Spike* (5,0, 10,0, 30,0 e $50,0 \text{ nmol L}^{-1}$); velocidade de varredura de potencial: 100 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor**

É possível observar uma leve alteração no perfil dos voltamogramas cíclicos na saliva, o que provavelmente ocorreu devido à complexidade da amostra em comparação com a solução tampão, uma vez que a diversos compostos salinos na mesma. Porém, a resposta de corrente é mantida, garantindo a análise com recuperação adequada. Os valores de recuperação obtidos variaram de $86,3 \pm 2,7\%$ a $96,1 \pm 10,2\%$, atestando a adequação do imunossensor para testes em saliva.

Na literatura para nosso conhecimento, apenas dois trabalhos na relataram o uso de eletrodos impressos em 3D para a detecção de SARS-CoV-2. Munoz e Pumera (2021) (MUÑOZ; PUMERA, 2021) relataram uma abordagem geral interessante para a bio-funcionalização de um eletrodo impresso em 3D para criar um imunossensor para COVID-19. Neste trabalho, um sensor G-PLA impresso em 3D foi empregado após um tratamento de superfície em duas etapas, primeiro foi realizada uma ativação química durante 3 h usando DMF, seguida por uma ativação eletroquímica durante 300 s em solução PBS. A montagem do imunossensor foi iniciada com a incorporação de AuNps após imersão do eletrodo em solução de HAuCl_4 por 1 h seguida de imersão em solução de NaBH_4 . Em seguida, o eletrodo foi imerso em solução de cisteamina por 2,5 horas e, posteriormente por 1 hora em glutaraldeído. O Ab foi incubado por 1 h sobre os grupos aldeídos e, finalmente, foi realizado o bloqueio com BSA durante 30 min, fornecendo o imunossensor final. Os autores detectaram a proteína *Spike* do vírus com um LOD de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, em uma faixa linear de 1,0 a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Um método diferente de impressão 3D foi empregado por Ali e colaboradores (2020) (AZAHAR ALI et al., 2021) para o desenvolvimento do imunossensor para COVID-19. Os autores usaram o método de impressão 3D por jato de aerossol, criando uma matriz de eletrodos microcapilares de ouro, seguido pela funcionalização de nanoflakes de rGO e imobilização dos antígenos. Neste trabalho, a proteína S foi detectada com

limite de detecção de $2,8 \text{ fmol L}^{-1}$. Respostas rápidas foram obtidas e a regeneração do sensor foi possível após imersão por 1 min em uma solução de baixo pH.

8. Conclusão específica

Diante dos resultados discutidos acima, é possível inferir que o (bio)sensor eletroquímico impresso em 3D obtido com o novo filamento Gpt-PLA pode ser usado com sucesso no monitoramento de diferentes biomarcadores e para o biossensoriamento do vírus SARS-CoV-2. A plataforma pronta para uso elimina etapas adicionais, como a necessidade de pré-tratamento da superfície, iguais as relatadas nos trabalhos anteriormente citados. Adicionalmente, quanto à fabricação do imunossensor, também é dispensada a necessidade de imobilização de nanopartículas metálicas. Deste modo, proporciona uma plataforma bioanalítica mais simples e funcional com excelente desempenho analítico, incluindo baixos limites de detecção e quantificação e excelente sensibilidade. Para análise de AU e DA os LD obtidos foram $0,07$ e $0,11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Já, o imunossensor apresentou um LD de $1,36 \text{ nmol L}^{-1}$. As análises das amostras sintéticas propostas apresentaram ótimos valores de recuperações variando de 85 a 105% em todas as análises realizadas. Diante disso, comprovou-se a versatilidade do filamento fabricado para a construção de (bio)sensores. A possibilidade de produzir biossensores contribui significativamente para o desenvolvimento de novos testes no ponto de atendimento, melhorando ainda mais os exames médicos de triagem e colaborando com possíveis políticas de saúde pública. Porém, apesar da fabricação laboratorial de filamentos condutivos ter demonstrado um grande potencial, esta área ainda tem muito a que ser explorada, principalmente na utilização de novos materiais condutivos. Substituir o grafite por um novo material que forneça características vantajosas para fabricação de filamentos, como flexibilidade e custo menor pode ser um novo passo a ser dado que apresenta um potencial altamente promissor.

Capítulo 5

*Novo filamento condutor à base de carbon black e PLA para a
manufatura aditiva de (bio)sensores eletroquímicos para detecção da
proteína spike S1 do vírus SARS-CoV-2*

8. Procedimento experimental

8.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico, não sendo necessária nenhuma etapa de purificação previamente ao seu uso. Água ultrapura, foi obtida de um sistema de purificação Milli Q[®], da Millipore (MA, EUA), com resistividade elétrica igual ou maior que 18,0 MΩ cm, a qual foi utilizada no preparo de todas as soluções. Cloreto de potássio ($\geq 99\%$ m/m), etanol (99,5% v/v) e ferroceno metanol (97% m/m) foram obtidos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, EUA). Acetona (99,5% v/v) da empresa Synth[®] (Diadema, Brasil), clorofórmio (99,8% v/v) proveniente da empresa Qhemis[®] (Indaiatuba, Brasil), e hidróxido de sódio (98% m/m), dimetilformamida (DMF) (99,8% v/v) e ferricianeto de potássio (99% m/m) obtidos da Dinâmica[®] (Indaiatuba, Brasil) também foram utilizados neste trabalho.

N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidroxiclorigida (EDC) (98% m/m), e N-hidroxissuccinimida (NHS) (98% m/m), obtidos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, EUA), foram utilizados na construção do imunossensor. Albumina sérica bovina (BSA) da Fisher Chemical[®] (Hampton, EUA), foi utilizada no bloqueio dos sítios não específicos do imunossensor. Para o diagnóstico da COVID-19, o anticorpo da proteína *spike* S1 do vírus SARS-CoV-2 (S1 Ab) foi utilizado na construção do imunossensor, e a proteína recombinante do vírus SARS-CoV-2 *spike* S1 foi usada como antígeno, ambas obtidas da Sino Biological[®] (Wayne, EUA).

A análise da proteína recombinante do vírus foi realizada em amostras de soro humano, obtido da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, EUA) e saliva sintética, preparada com base na literatura após adaptações (ROMONTI et al., 2016) a qual foi composta por uma mistura de 0,7 g L⁻¹ de cloreto de sódio (99% m/m), 1,2 g L⁻¹ de cloreto de potássio (99% m/m), 0,26 g L⁻¹ de fosfato de sódio dibásico (99% m/m), 0,33 g L⁻¹ de tiocianato de potássio e 1,3 g L⁻¹ de ureia (99% m/m), todos obtidos da Vetec[®] e dissolvidos em água. Para a análise do SARS-CoV-2, o soro humano foi diluído em tampão fosfato salino 1x (PBS 1x), em proporção de 1:100. O PBS 1x foi preparado a partir de uma mistura de

cloreto de sódio (99% m/m, proveniente da Vetec[®]) (137 mmol L⁻¹), cloreto de potássio (2,7 mmol L⁻¹), fosfato de sódio dibásico (10 mmol L⁻¹), e dihidrogenofosfato de potássio (1,8 mmol L⁻¹, da Vetec[®]). As amostras foram fortificadas com três concentrações diferentes do antígeno, sendo estas 0,05; 0,1 e 1,0 nmol L⁻¹.

8.2 Instrumentos e aparatos

As medidas eletroquímicas para caracterização dos materiais obtidos foram realizadas utilizando-se um potenciostato portátil μ STAT i-400 (Metrohm DropSens[®], Espanha), o qual também foi empregado na aquisição dos dados. Os testes referentes à análise do vírus SARS-CoV-2 foram todos realizados por um laptop com sistema operacional Windows 10[®] (Intel core I5 e 8.0 GB RAM), através do software Dropview 8400[®]. Para a impressão em 3D das estruturas e eletrodos utilizados neste trabalho, uma impressora Sethi3D S3 Sethi[®] (Campinas, Brasil) controlada pelo software Simplify 3D[™] foi utilizada. A obtenção das imagens a ser impressas foi realizada a partir do software Blender[®]. Uma extrusora Filmaq3D[®] (Curitiba, Brasil) foi utilizada para a produção dos filamentos a partir dos compósitos fabricados.

Imagens de MEV foram obtidas utilizando um equipamento da Thermo Fisher Scientific[®], modelo Prisma E com tecnologia ColorSEM e integrado com espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX) para a obtenção dos espectros de EDX. A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada utilizando-se um equipamento TGA 55 da TA INSTRUMENTS[®], com programa de aquecimento de temperatura gradual de 10 °C por minuto, variando de 25 a 1000 °C sob atmosfera oxidante. Os espectros de Raman foram adquiridos com um equipamento LabRam HR Evolution Spectrophotometer (HORIBA[®], Japão), usando um laser de argônio a 50 mW de potência, em uma faixa de 3500 a 70 cm⁻¹. As imagens de ângulo de contato foram obtidas com o auxílio da câmera de um smartphone, e um aparato para medida de ângulo de contato produzido em laboratório e previamente reportado na literatura (DA SILVA et al., 2020a). Para tal, foi feita a adição de uma gota de água deionizada na

superfície do eletrodo, e após 10 s a imagem foi coletada, sendo medido o ângulo de contato entre a gota e a superfície.

Para as medidas eletroquímicas, dois tipos de célula eletroquímica foram construídos. A primeira foi utilizada para a caracterização dos eletrodos por CV, e consistia de uma célula em formato cilíndrico construída por impressão em 3D a partir de filamentos de PLA ou ABS (acrilonitrila butadieno estireno), similar à apresentada por Cardoso et al. 2018 (CARDOSO et al., 2018). Nesta célula, o eletrodo de trabalho, em forma de placa, foi inserido na base da célula e mantido fixo com o auxílio de parafusos também impressos em 3D. Uma placa de aço inoxidável foi utilizada para manter o contato elétrico do eletrodo com o potenciostato, e um anel de borracha foi utilizado para delimitar a área do eletrodo de trabalho que ficava em contato com a solução ($0,23 \text{ cm}^2$), além de prevenir possíveis vazamentos. Para inserção dos eletrodos de referência ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}_{(\text{sat.})}$) e o contra eletrodo (fio de Pt), uma tampa contendo furos foi acoplada na parte superior da célula.

Para os testes eletroquímicos relacionados à detecção do vírus SARS-CoV-2, uma base para acoplamento dos eletrodos foi impressa em 3D a partir de filamentos compostos por ABS. Neste sistema, os eletrodos foram acoplados à base, e uma alíquota de eletrólito suporte ($100 \mu\text{L}$) foi adicionada à superfície, recobrando os três eletrodos, possibilitando as análises com pequenos volumes de solução. A Figura 42 apresenta um esquema resumido do dispositivo eletroquímico totalmente impresso em 3D fabricado.

8.3 Preparo do compósito, eletrodos e biossensor

CB (VULCAN® XC-72R) da empresa Cabot (São Paulo, Brasil) e PLA na forma de pellets em natura, proveniente da 3DLAB (Minas Gerais, Brasil) foram utilizados para a obtenção do material compósito utilizado na manufatura dos filamentos para impressão em 3D. Para comparação dos resultados alcançados utilizando os filamentos produzidos em laboratório, filamentos comerciais baseados em CB e PLA (denominados Proto-Pasta®, obtidos da empresa Proto-Pasta, Vancouver, EUA)

A obtenção do material compósito a ser utilizado na fabricação dos filamentos foi realizada em laboratório e foi baseada na dissolução do polímero PLA, incorporação do material condutor, e posterior recristalização do polímero, dando origem ao compósito. Para isto, o CB sólido foi inicialmente disperso em 250 mL de uma mistura de solventes (acetona e clorofórmio, 4:1 v/v) durante 10 min sob agitação magnética (1500 rpm) em um sistema sob refluxo para evitar escape dos solventes. O sistema em refluxo foi composto por um banho de aquecimento usando óleo vegetal obtido em comércios locais, além de um termômetro para a medida da temperatura do sistema, a qual foi mantida constante em aproximadamente 70 °C. Além disso, um balão de fundo redondo com capacidade para 500 mL de soluções, uma coluna de refluxo e um agitador magnético com chapa aquecedora foram utilizados. Após 10 min de dispersão do CB, os pellets de PLA foram inseridos no balão contendo a dispersão, sendo que a quantidade total de sólidos utilizados no preparo foi de 30 g (8,55 g de CB, e 21,45 g de PLA). Após inserção do PLA, o sistema foi mantido sob agitação e aquecimento por mais 3 h em refluxo. Em seguida, todo o conteúdo do balão foi vertido em um béquer contendo 800 mL de etanol para que ocorresse a recristalização do PLA com o material de carbono incorporado. Após mistura com um bastão de vidro, o compósito foi então filtrado em um sistema a vácuo, sendo constantemente lavado com etanol para garantir a recristalização completa e remoção de possíveis resíduos de acetona e clorofórmio utilizados na solubilização do PLA. O compósito lavado foi então levado para secagem em uma estufa a 50 °C durante a noite (aproximadamente 12 h). A Figura 42b resume todo o processo envolvido na produção do compósito.

O compósito obtido foi então particionado em pequenos pedaços (< 2 cm) e inserido na extrusora, operada a 180°C para dar origem ao filamento compósito que continha 28,5% (m/m) de CB e 71,5% (m/m) de PLA (CB-PLA). Os filamentos foram utilizados na impressão em 3D dos eletrodos empregados para construção do biossensor a partir da técnica FDM, utilizando-se um bico de 0,4 mm, aquecido a uma temperatura de 240 °C, com aquecimento da mesa de impressão a 75 °C. A altura da camada foi de 0,1 mm, e a velocidade de

impressão utilizada foi de 500,0 mm/min. O eletrodo de trabalho foi impresso com uma área de trabalho de 4,0 mm, e um cabo para 2,0 cm de comprimento. Previamente a seu uso, todos os eletrodos obtidos foram polidos com lixa d'água (granulometria 1200) umedecida com água deionizada até a obtenção de superfície mais lisa e homogênea, sem marcas de impressão.

8.3.1 Construção do biossensor

Para o preparo do imunossensor para a detecção da proteína *spike* S1 do vírus SARS-CoV-2, os anticorpos específicos para interação com a proteína de interesse foram ligados de forma covalentemente à superfície do eletrodo de trabalho. O eletrodo foi modificado com EDC:NHS, através do gotejamento de 10 μL de uma solução contendo 10,0 mmol L^{-1} EDC e 20,0 mmol L^{-1} NHS em PBS 1 \times (pH = 7,4). Após 60 min de imobilização, o eletrodo foi cuidadosamente enxaguado, e uma nova alíquota de 10 μL de solução foi inserida sobre a superfície do eletrodo, desta vez contendo 1,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do anticorpo em PBS 1 \times (pH = 7,4). Após 60 min, os anticorpos foram imobilizados na superfície, e o eletrodo cuidadosamente enxaguado para posterior bloqueio dos sítios ativos do CB-PLA com BSA (1% m/v) em PBS 1 \times (pH = 7,4) por 30 min. Após cuidadoso enxague com PBS 1 \times (pH = 7,4) e posterior secagem ao ar, o biossensor estava pronto para uso. A etapa de imobilização do anticorpo na superfície do sensor passou por um processo de otimização multivariada, de forma a avaliar a melhor concentração e tempo de incubação dos anticorpos. Para isto, um planejamento do composto central foi realizado, com as variáveis estudadas em uma faixa de 0,6 a 2,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 36 a 144 min, para concentração e tempo de incubação, respectivamente.

A determinação da proteína S1 do vírus foi realizada após a incubação da mesma em diferentes concentrações (diluída em PBS 1 \times ; pH 7,4) por um tempo de 60 min. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente. A Figura 42 apresenta as etapas envolvidas na fabricação do compositivo à base de CB, dispositivo eletroquímico e preparo do

imunossensor, e uma ilustração do sistema eletroquímico usado para as análises.

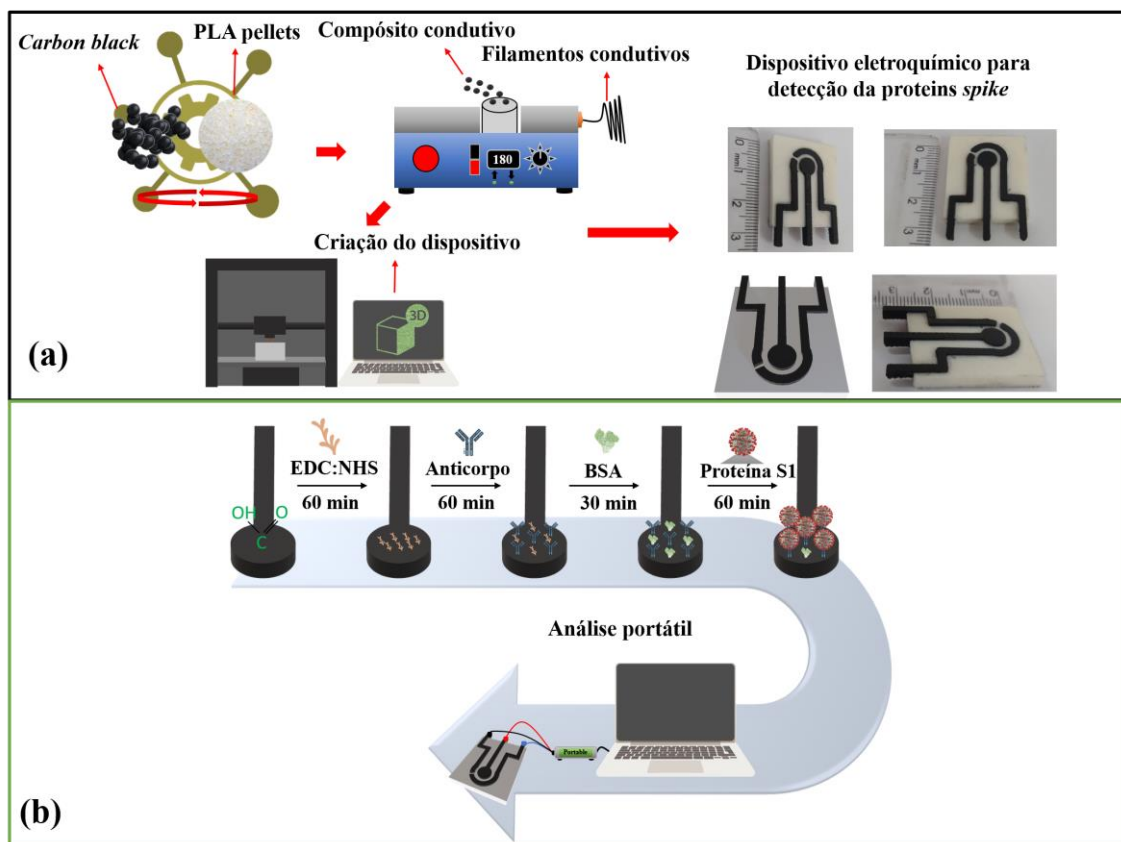


Figura 42. Esquema representativo de todas as etapas envolvidas na produção dos filamentos, sensores e biossensores. (a) produção do compósito composto por CB e PLA pelo método de solvente, extrusão dos filamentos condutivos e impressão dos sensores eletroquímicos impressos em 3D. (b) construção dos biossensores eletroquímicos específicos para a proteína S1, incluindo as etapas de ligação covalente do EDC:NHS na superfície do sensor, ancoragem do anticorpo específico, bloqueio dos sítios inativos com BSA e por fim, detecção da proteína S1 baseado em sinal *off* a partir da interação da mesma com o anticorpo. **Fonte: próprio autor.**

9. Resultados e discussão

Para obtenção de um compósito condutivo otimizado para fabricação de eletrodos impressos em 3D, foram produzidos filamentos condutivos de composições variadas de CB (5,0 a 30,0% em peso). O comportamento voltamétrico de cada sensor produzidos com os filamentos contendo diferentes massas de CB incorporada no PLA foi confirmada por TGA, e o efeito da temperatura em cada compósito pode ser visto na Figura 43.

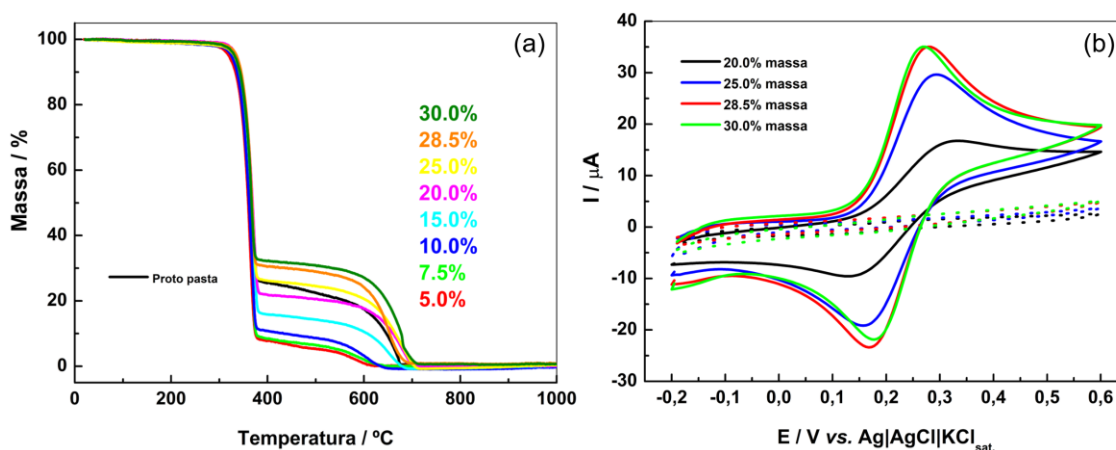


Figura 43. (a) Análise termogravimétrica para filamentos CB-PLA de diferentes cargas de CB (5,0 a 30,0% em peso). (b) Voltamogramas cíclicos registrados para FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, usando eletrodos impressos em 3D CB-PLA obtidos de filamentos feitos em laboratório com diferentes cargas de CB (de 20,0 a 30,0% em massa), e respectivas soluções do branco (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ I – linhas pontilhadas). Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor.**

Na Figura 43a é possível observar que a perda de massa do CB-PLA ocorreu em duas etapas, sendo que a primeira perda é aproximadamente em $350 \text{ }^\circ\text{C}$ o qual corresponde à decomposição do PLA, e a perda completa é observada em $600 \text{ }^\circ\text{C}$ devido à combustão do CB presente no compósito (KALINKE et al., 2022; STEFANO et al., 2021). Pode-se observar que a perda de massa depende da quantidade de CB de cada compósito, indicando que a incorporação de CB em diferentes proporções foi realizada com sucesso. Além disso, a curva TGA para o filamento comercial a base de CB (proto-pasta)

indica cargas de CB entre 20,0 e 25,0%, concordando com a composição real do mesmo (<22% em peso de CB) (KATSELI et al., 2020).

Os estudos voltamétricos empregando uma sonda redox (FcMeOH) foram conduzidos para avaliar o comportamento eletroquímico dos eletrodos fabricados a partir dos compósitos produzidos com diferentes cargas de CB e a influência do tratamento eletroquímico de superfície. Compósitos com cargas de CB inferiores a 20,0% em massa não forneceram resposta eletroquímica, e aqueles com composição de carga superior a 30,0% apresentaram respostas eletroquímicas iguais aos com massa de 28,5 a 30,0% de CB. Além disso, filamentos contendo massa superior a 30% de CB apresentou dificuldade em produção e também na etapa de impressão, devido ao alto volume de CB. Neste último caso, devido à elevada quantidade de CB empregada, a mistura de CB com PLA e os solventes empregados em sua solubilização proporcionou uma solução altamente viscosa, dificultando a dissolução do PLA e, conseqüentemente, a obtenção do compósito. Diante disso, a Figura 43b apresente apenas os voltamogramas obtidos para eletrodos impressos em 3D CB-PLA contendo 20,0; 25,0; 28,5 e 30,0% em peso de CB. Na Figura 43b, é possível observar uma melhora na resposta eletroquímica com o aumento da carga do CB de 20,0 para 28,5% em massa. Este aumento de carga de CB proporcionou uma corrente de pico duas vezes maior e um processo mais reversível, com um ΔE_p de 110 mV em contraste com os 202 mV do eletrodo contendo apenas 20,0% em peso. O eletrodo contendo maior percentual de massa (30,0% em peso) não proporcionou diferenças significativas no comportamento eletroquímico em comparação a 28,5%. Portanto, eletrodos produzidos a partir de um compósito/filamento otimizado contendo uma carga de CB de 28,5% em peso, foi selecionada para estudos subsequentes.

A avaliação do efeito do tratamento de superfície no compósito CB-PLA obtido e uma comparação com o filamento comercial de CB (Proto-pasta) foram caracterizado por CV e espectroscopia Raman e são apresentados na Figura 44. O tratamento eletroquímico consistiu na aplicação de potencial 1.4 V por 200 s seguidos pela aplicação de -1.0 V por 200 s com o sensor na presença de uma solução de NaOH 0.5 mol L⁻¹ (RICHTER et al., 2019b). Os

voltamogramas cíclicos na Figura 44a mostram que a ativação superficial utilizando solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ promove um aumento significativo na resposta eletroquímica, para ambos os eletrodos impressos em 3D. Embora seja observada uma resposta satisfatória para a sonda redox FcMeOH usando os eletrodos não tratados, o tratamento eletroquímico de superfície melhorou a resposta, proporcionando respostas de corrente quase duas vezes maiores em ambos os casos. Além disso, observa-se melhor reversibilidade do processo para ambos os casos (eletrodos tratados), com considerável diminuição na separação pico a pico, especialmente para CB-PLA (diminuição de 40 mV no ΔE_p). Essa melhoria pode ser atribuída à exposição das partículas de CB, previamente relatada na literatura [8].

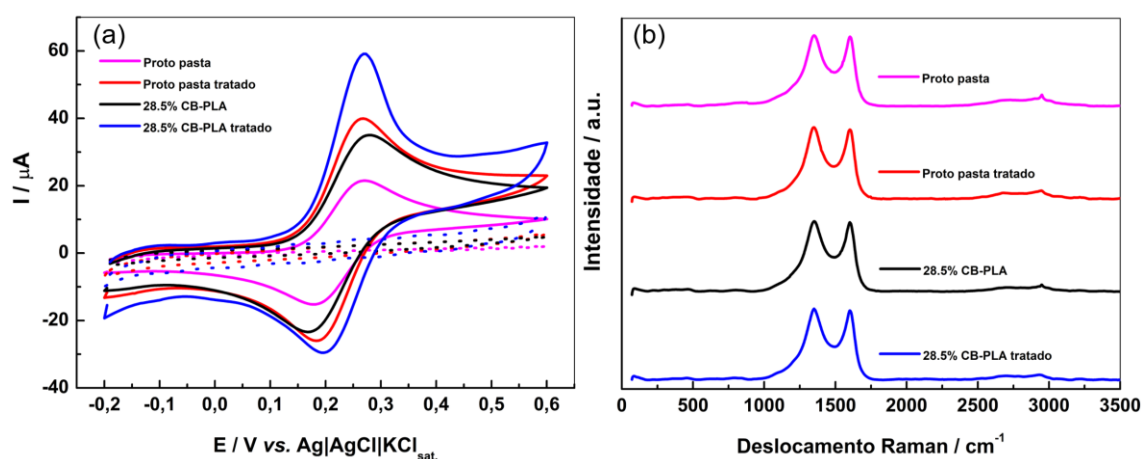


Figura 44. (a) Voltamogramas cíclicos registrados para FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹, usando eletrodos impressos em 3D CB-PLA obtidos de filamentos feitos em laboratório contendo 28,5% em massa de CB, ou filamentos comerciais de Proto-pasta, antes e depois do tratamento eletroquímico. As linhas pontilhadas correspondem à solução do branco. (b) Espectros Raman para eletrodos impressos em 3D obtidos com Proto-pasta e CB-PLA 28,5% em massa antes e depois do tratamento eletroquímico de superfície. Voltamogramas cíclicos obtidos com velocidade de varredura de potencial de 50 mV s⁻¹. **Fonte: próprio autor.**

As medições Raman foram realizadas para eletrodos CB-PLA impressos em 3D, obtidos do filamento fabricado contendo 28,5% em peso de CB, e de

filamentos comerciais. Além disso, o efeito do tratamento de superfície nos espectros Raman também foi avaliado para ambos os eletrodos. A Figura 44b mostra os espectros obtidos. Os picos principais, típicos de materiais à base de CB, são observados em todos os casos. A banda D (1350 cm^{-1}) está relacionada à presença de defeitos na estrutura e hibridização sp^3 , e a banda G em 1600 cm^{-1} está associada à presença de carbono sp^2 (CARDOSO et al., 2020c; LI et al., 2023). Os defeitos estruturais foram calculados com base na relação ID/IG para cada eletrodo. A partir do ID/IG, os valores obtidos (Proto-pasta: 1,12 e 1,13 antes e depois do tratamento, respectivamente; CB-PLA: 1,10 e 1,14 antes e depois do tratamento, respectivamente). Diante disso, é possível inferir que o tratamento eletroquímico em ambos os eletrodos investigados não inseriu defeitos estruturais, uma vez que não foram observadas alterações significativas na intensidade da razão. Este resultado está de acordo com a literatura, onde eletrodos impressos em 3D foram obtidos usando filamentos baseados em CB, seja pelo uso de uma impressora de mesa 3D ou de uma impressora de caneta 3D, e em ambos os casos, nenhum defeito estrutural foi inserido após o tratamento eletroquímico (CARDOSO et al., 2020c). Além disso, valores ID/IG semelhantes foram obtidos para ambos os eletrodos, portanto, o número de defeitos estruturais nos eletrodos obtidos com o filamento feito em laboratório é o mesmo observado para eletrodos impressos em 3D a partir de filamentos comerciais. Este resultado indica que filamentos fabricados em laboratório, empregando o procedimento descrito neste trabalho, podem substituir os filamentos obtidos comercialmente.

Experimentos realizados por EIS mostraram que menor valor de resistência ao valor de transferência de carga (R_{ct}) foi observado após ativação eletroquímica das superfícies (de $66,4$ a $37,2\ \Omega$ para CB-PLA, e de $132,0$ a $39,7\ \Omega$ para Proto-Pasta), mostrando que a transferência de elétrons é favorecida após o tratamento de superfície. A Figura 45 mostra os gráficos de Nyquist para eletrodos impressos em 3D CB-PLA e Protopasta, antes e depois do tratamento eletroquímico, na presença de $\text{FcMeOH } 1,0\text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1\text{ mol L}^{-1}$. A resposta eletroquímica dos eletrodos impressos em 3D CB-PLA obtidos a partir dos filamentos feitos em laboratório foi superior quando

comparadas a eletrodos produzidos com filamento comercial. Um aumento de 48% no valor da corrente de pico é observado para CB-PLA quando ambos os eletrodos são tratados. A maior carga de CB no eletrodo CB-PLA pode explicar esse comportamento. O CB-PLA possui 7% mais material condutor que o Proto-pasta, o que pode facilitar o processo de transferência de elétrons. Estudos EIS revelaram um valor R_{ct} menor para CB-PLA, especialmente quando ambos os eletrodos não são tratados (66,4 Ω para CB-PLA e 132,0 Ω para Proto-pasta), o que pode indicar possivelmente uma presença reduzida de polímero. Além disso, um valor R_{ct} ligeiramente inferior foi observado para eletrodos CB-PLA tratados (37, Ω) quando comparados aos eletrodos tratados de filamento comercial (39,7 Ω).

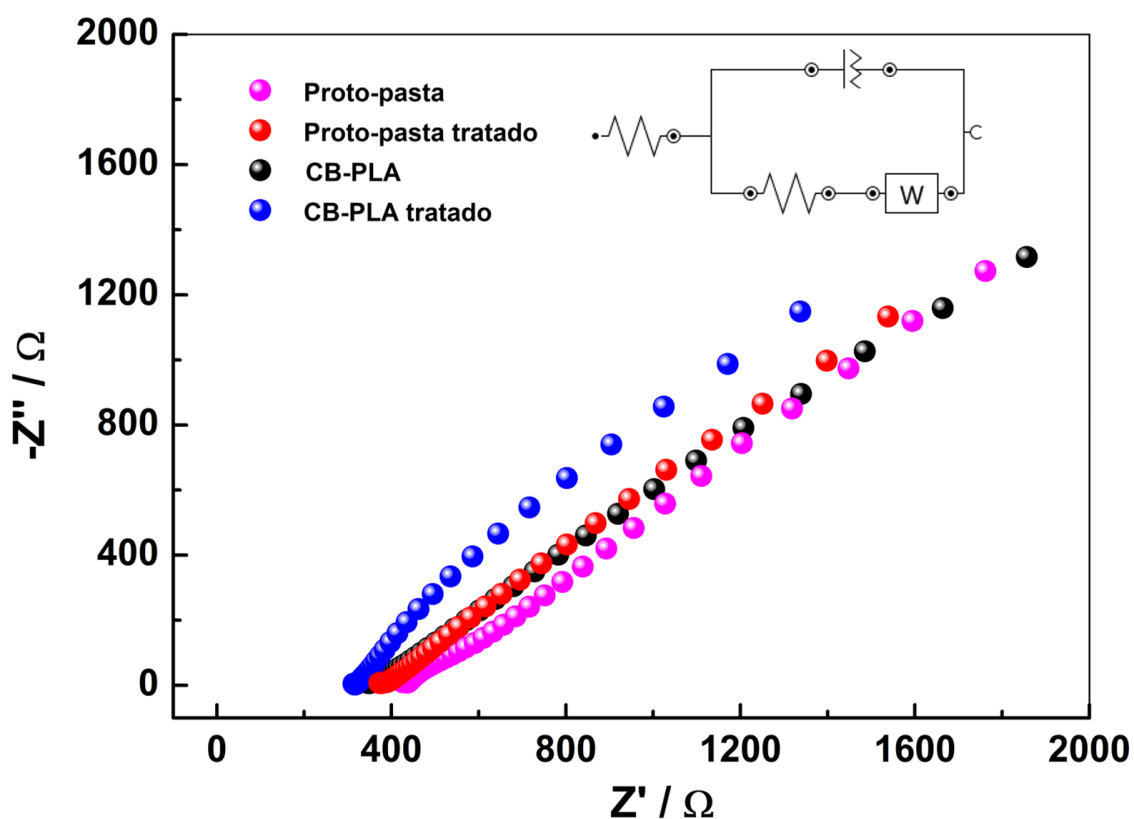


Figura 45. Plots de nyquist para eletrodos impressos em 3D CB-PLA e proto-pasta não tratado e tratado. Potencial aplicado 0,22 V na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹. Insert: circuito equivalente empregado. **Fonte:** próprio autor.

A caracterização morfológica foi realizada para a investigação das superfícies dos eletrodos impressas em 3D através da obtenção de imagens de MEV. A Figura 46 apresenta a morfologia do eletrodo impresso em 3D com filamentos comercial e feito em laboratório, ambos antes e depois do tratamento de superfície. Observa-se, que em ambos os casos o tratamento superficial possibilitou possivelmente mais sítios ativos em ambas os eletrodos, evidenciando a retirada do excesso de PLA. Estes possíveis sítios ativos são capazes de melhorar a interação das espécies (composto/analito de interesse) com a superfície, o que pode corroborar o aumento nas respostas de corrente observadas por estudos voltamétricos cíclicos anteriores. Ambos os eletrodos apresentaram morfologia de superfície comparável, devido à composição semelhante. A remoção do PLA foi confirmada pelas medidas do ângulo de contato (figuras inseridas). Como pode ser observado, as estruturas AM apresentaram comportamento mais hidrofílico (valores de ângulo de contato inferiores a 90°), o que era esperado devido à presença de grupos oxigenados na matriz PLA, relatados anteriormente na literatura (STEFANO et al., 2021). Além disso, a diminuição do ângulo de contato após o tratamento, de 72° para 63° no Proto-pasta e de 60° para 55° no CB-PLA, indica que ocorreu a exposição do CB em ambas as superfícies. Como CB é um material altamente amorfo, com grande número de espécies oxigenadas em sua estrutura (SILVA et al., 2017), um caráter hidrofílico pode ser atribuído a este material. Portanto, para materiais contendo maior quantidade de CB, ocorre uma diminuição no ângulo de contato. O mesmo fato pode explicar os valores reduzidos de ângulo de contato do CB-PLA em comparação ao eletrodo fabricado com filamento comercial, que possui 7% a menos de polímero em sua composição.

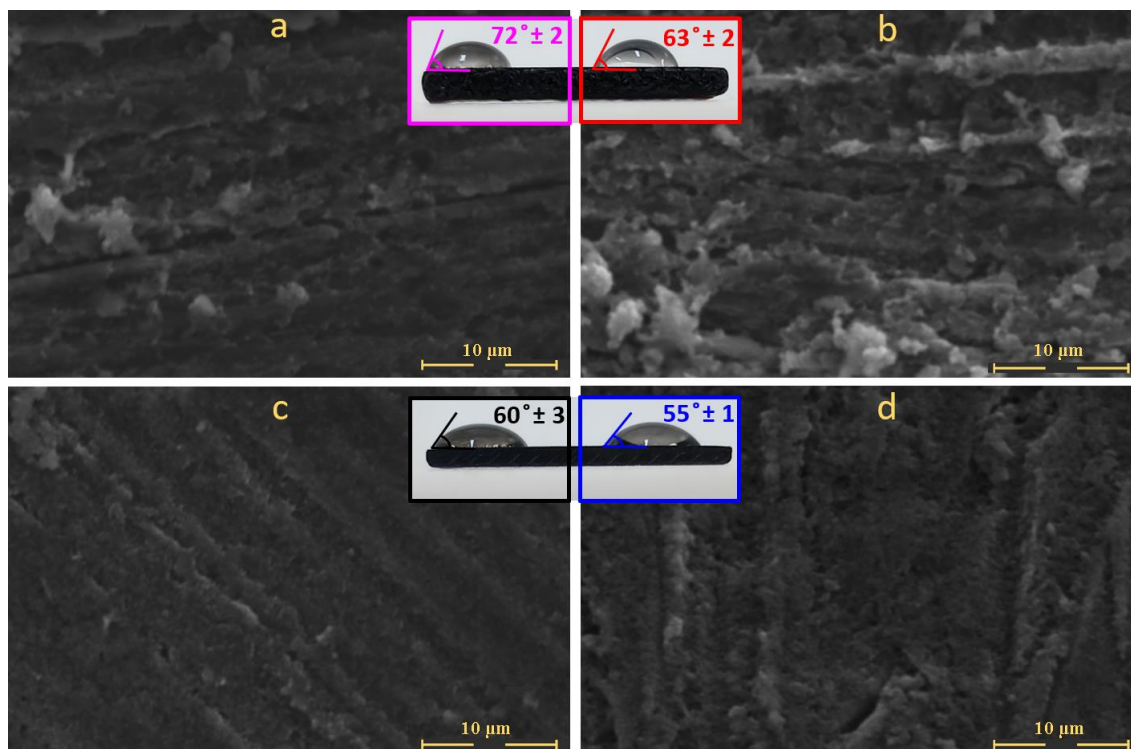


Figura 46. Imagens de MEV para eletrodos impressos em (a) 3D Proto-pasta, (b) eletrodos impressos em 3D Proto-pasta após tratamento eletroquímico de superfície, (c) CB-PLA (28,5% em massa de CB) e (d) CB-PLA (28,5% em massa de CB) após tratamento eletroquímico de superfície, com fatores de amplificação de 5000 ×. Inserção: respectivas imagens do ângulo de contato.

Fonte: próprio autor.

A área eletroativa dos eletrodos impressos em 3D (filamento feito em laboratório e comercial, antes e depois do tratamento de superfície) foi avaliada por medidas de CV em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}) na presença de $\text{FcMeOH } 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e estimada seguindo a equação de Randles-Ševčík para um processo quase reversível. A **Figura 47** mostra os voltamogramas obtidos e os respectivos gráficos das correntes de pico anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial.

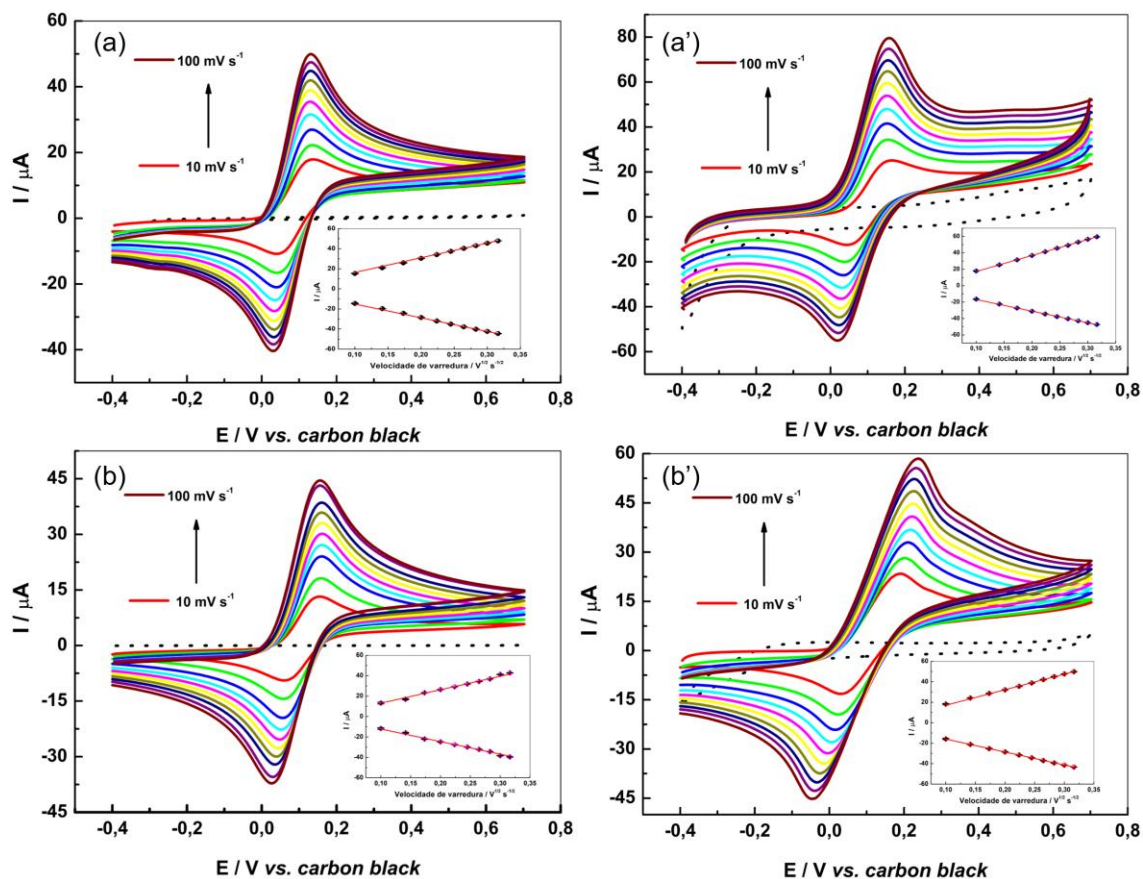


Figura 47. Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ em diferentes taxas de varredura (10 a 100 mV s⁻¹) no (a) CB-PLA não tratado; (a') CB-PLA tratado; (b) Proto-pasta não tratada e (b') Proto-pasta tratada. Insete: respectivas relações das correntes de pico anódica e catódica versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$). **Fonte: próprio autor.**

Um comportamento linear foi observado para os eletrodos impressos em 3D CB-PLA e Proto-pasta (mesmo sem tratamento de superfície), com um r^2 para todos os sensores (não tratado e tratado) maior de 0,99, mostrando que o processo de transporte de massa é controlado por difusão. Os valores de área de superfície eletroativa calculados para CB-PLA (filamento feito em laboratório) antes e depois do tratamento de superfície (Figura 47a-a') foram $21,11 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ e $26,8 \pm 0,1 \text{ mm}^2$, respectivamente. Os valores de área eletroativa para os eletrodos a partir de filamentos comerciais calculado foram $19,1 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ e $20,4 \pm 0,3 \text{ mm}^2$ antes e depois do tratamento de superfície

(Figura 47b-b'), respectivamente. Como pode ser observado, o tratamento eletroquímico proporcionou aumento na área eletroativa dos eletrodos, confirmando a exposição do CB após o tratamento. Este aumento foi mais acentuado nos eletrodos impressos em 3D CB-PLA (aumento de 27%) do filamento comercial (aumento de 7%), mostrando uma melhor exposição do CB nesta superfície. Este fato provavelmente se deve à maior quantidade de CB na superfície deste eletrodo. Por fim, para todas as superfícies estudadas, os valores da área superficial eletroativa foram superiores à área superficial geométrica dos eletrodos (12,57 mm²) devido à rugosidade dos eletrodos, que é mais pronunciada nos eletrodos tratados. A Tabela 12 apresenta a relação entre os valores da área superficial eletroativa e da área geométrica ($A_{\text{proporção}} = A_{\text{eletr.}}/A_{\text{geom.}}$).

Na Tabela 12, os valores da área superficial eletroativa foram superiores à área superficial geométrica dos eletrodos (12,57 mm²). Isso pode ser atribuído a uma distribuição homogênea das partículas de CB na superfície dos eletrodos, responsável por fornecer uma condutividade elétrica eficiente em grande parte da superfície do eletrodo. Além disso, a rugosidade dos eletrodos proporciona o aumento do valor da área de superfície eletroativa em comparação com o valor geométrico. Esta rugosidade pode ser indicada pela razão entre os valores da área superficial eletroativa e da área geométrica ($A_{\text{razão}} = A_{\text{elect.}}/A_{\text{geom.}}$). Como pode ser observado na Tabela 12, para todas as superfícies, os valores de $A_{\text{razão}}$ foram superiores a 1,5, reforçando a evidência de superfícies rugosas, conforme observado nas imagens de MEV. Além disso, ocorreu aumento da razão da área (eletroativa/geométrica) após o tratamento, tanto para comercial quanto para CB-PLA, mostra a remoção do PLA da superfície. Além disso, os valores percentuais mais elevados para CB-PLA indicam uma possível superfície mais rugosa nos eletrodos CB-PLA.

Tabela 12. Comparação entre as áreas eletroativas calculadas para eletrodos impressos em 3D usando a equação de Randles-Ševčík para processos quase reversíveis, com os respectivos valores de área geométrica e os valores de razão, correspondentes a $A_{\text{elet.}}$ dividido pelo $A_{\text{geom.}}$ ($n = 3$). **Fonte: próprio autor.**

Eletrodo	$A_{\text{eletroativa}} / \text{mm}^2$	$A_{\text{geométrica}} / \text{mm}^2$	$A_{\text{razão}}$
CB-PLA	$21,1 \pm 0,1$	12,6	$1,7 \pm 0,1$
CB-PLA tratado	$26,8 \pm 0,1$	12,6	$2,1 \pm 0,1$
Proto-pasta	$19,1 \pm 0,1$	12,6	$1,5 \pm 0,1$
Proto-pasta tratado	$20,4 \pm 0,3$	12,6	$1,6 \pm 0,1$

A constante HET, k_0 , foi determinada pelos dados EIS dos valores R_{ct} para as superfícies estudadas usando $\text{FcMeOH } 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ como sonda redox, empregando a equação:

$$R_{\text{ct}} = \frac{RT}{F^2 k_0 C}$$

Onde R é a constante do gás, T é a temperatura, F é a constante de Faraday e C é a concentração das espécies eletroativas. Maiores valores de k_0 foram obtidos para CB-PLA ($4,01 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), em comparação aos eletrodos impressos em 3D com filamento comercial ($2,02 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), indicando uma cinética de transferência de elétrons mais rápida quando o filamento fabricado em laboratório é usado. Após o tratamento eletroquímico de superfície, o HET é aumentado para ambos os eletrodos, pois a remoção do polímero isolante da superfície facilita os processos de transferência de elétrons, e um valor de k_0 maior é observado para CB-PLA tratado ($7,16 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) em comparação com o eletrodo obtido com filamento comercial tratado ($6,71 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$). Demonstrando que mesmo após o tratamento o eletrodo impresso em 3D a partir de filamentos condutivos feitos em laboratório possui uma resposta superior aos produzidos com filamentos comerciais.

A precisão batelada a batelada (filamentos fabricado em momentos diferentes) dos sensores também foi avaliada. A Figura 48 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com quatro eletrodos tratados impressos em 3D a partir de filamentos CB-PLA fabricados separadamente. As correntes de pico anódicas forneceram um RSD de apenas 4,6%, além disso foi obtido um RSD 6,2% e 3,7% para os potenciais de pico de oxidação e redução, respectivamente. Este resultado demonstra que os filamentos preparados em diferentes processos são capazes de gerar sensores eletroquímicos reproduzíveis, garantindo assim as respostas analíticas mesmo utilizando filamentos condutivos obtidos através de diferentes processos de produção do mesmo.

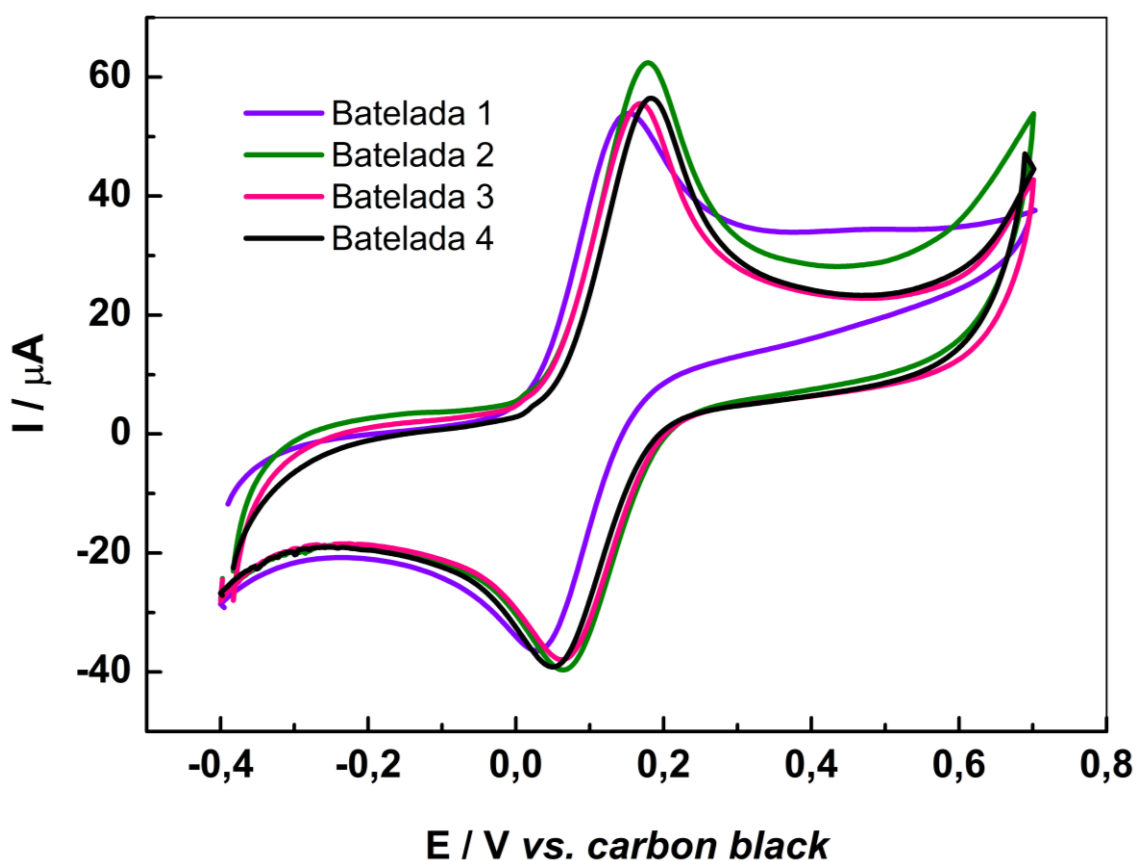


Figura 48. Voltamogramas cíclicos registrados para FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em quatro eletrodos impressos em 3D obtidos com filamentos CB-PLA de diferentes lotes. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} .

Fonte: próprio autor.

9.2 Detecção eletroquímica da proteína *Spike S1* do vírus SARS-CoV-2

Para observar o perfil voltamétrico do sensor CB-PLA, a técnica CV foi empregada na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 49 mostra os voltamogramas obtidos. A resposta voltamétrica mostrou um pico de oxidação e um pico de redução nos potenciais de $+0,13$ e $-0,01$ V, respectivamente, correspondendo a um ΔE_p de $0,131$ V. É de suma importância ressaltar que todos os testes realizados com o dispositivo eletroquímico desenvolvido para detecção da proteína *Spike S1* são realizados com os três tipos de eletrodos totalmente impressos com os filamentos condutivos feitos em laboratório a base de CB.

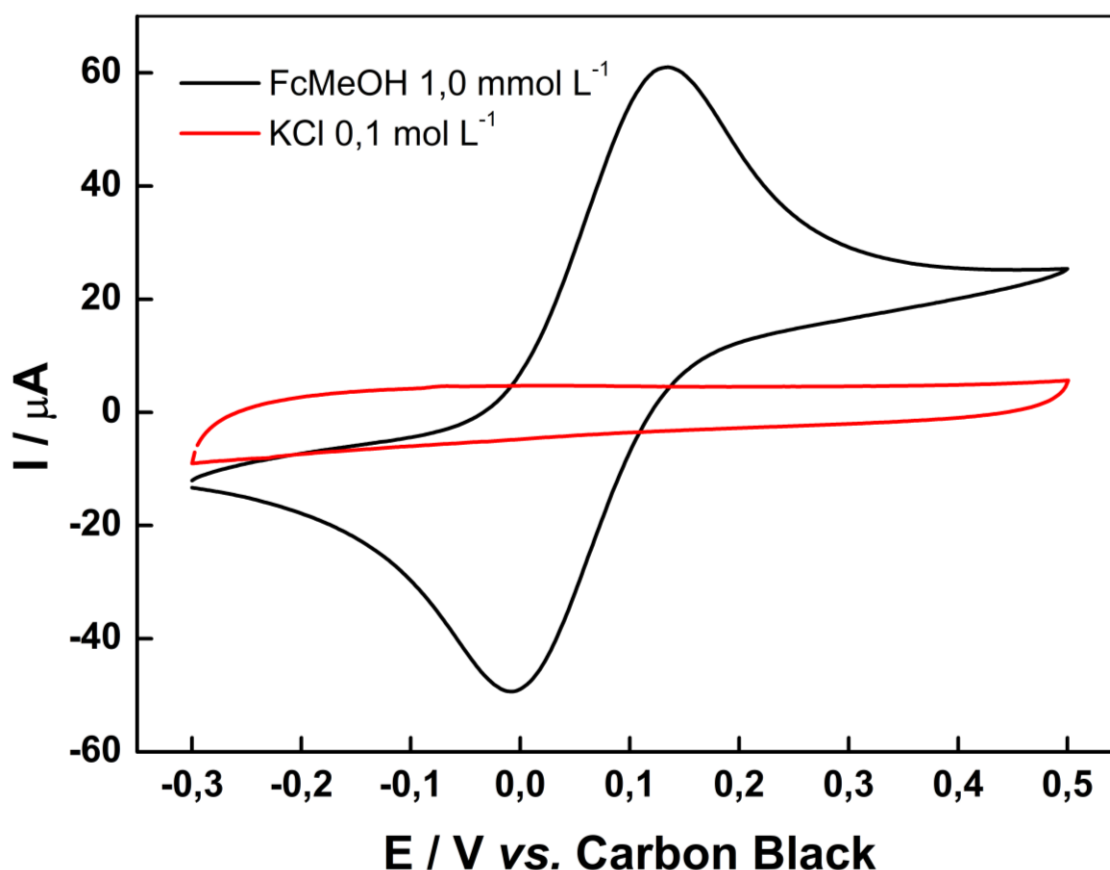


Figura 49. Voltametria cíclica registrada na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . **Fonte:** próprio autor.

É possível observar na Figura 49 algumas diferenças de potencial de oxidação e redução do FcMeOH, devido ao uso de um *pseudo* referência

impresso em 3D. Porém, ΔE_p de 0,131 V é semelhante ao ΔE_p apresentado anteriormente na etapa de caracterização do material, estas pequenas diferenças podem ser atribuídas ao estilo de célula eletroquímica e ao eletrodo de referência utilizado. Ademais, o pico catódico é ligeiramente menor em intensidade em comparação com o pico anódico, mostrando uma razão entre a corrente de pico catódica e anódica de 1,07. Assim, a resposta do sensor na presença da sonda redox apresentou um comportamento quase reversível, comumente relatado na literatura para FcMeOH utilizando eletrodos impressos em 3D. Com isso, é possível observar que mesmo sem a aplicação de qualquer tratamento superficial, e a partir de apenas um simples processo de polimento mecânico é possível ancorar os materiais biológicos, uma vez que o sensor proposto apresentou uma resposta eletroquímica na presença do redox proposto.

Para o monitoramento de cada etapa envolvida na produção do imunossensor e análise da proteína *spike* S1 foram realizadas análises por CV. Para tal, foi empregando uma solução de FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ preparada em KCl 0,1 mol L⁻¹, a uma velocidade de varredura de potencial de 50 mV s⁻¹. Os voltamogramas foram registados após cada fase de preparação do biossensor, ligação do EDC:NHS, imobilização do anticorpo específico, bloqueio dos sítios não ligantes com BSA e a detecção da proteína *spike* S1 do vírus. A ligação direta do EDC:NHS à superfície do sensor foi possível devido à presença de grupos carboxílicos na superfície do sensor, previamente relatados na literatura [19,27]. A possibilidade de ligação covalente direta de EDC:NHS no eletrodo é de suma importância, pois evita etapas adicionais que envolvem modificação com outros materiais, economizando tempo na preparação do biossensor e fornecendo uma plataforma de biossensor mais simples e de menor custo (BEDUK et al., 2021). A Figura 50 apresenta as respostas voltamétricas obtidas bem como as correntes de pico de cada etapa realizada.

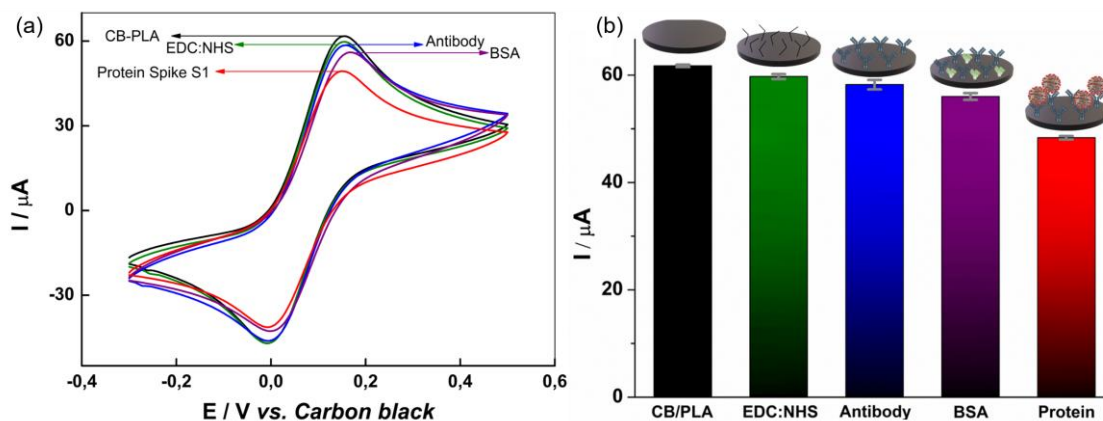


Figura 50. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após cada etapa de imobilização (linha preta) CB-PLA, (linha verde) EDC:NHS, (linha azul) anticorpo, (linha roxa) BSA e (linha vermelha) detecção do antígeno na concentração de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} e (b) respectivos valores de corrente de pico para cada etapa. **Fonte: próprio autor.**

Na Figura 50 é possível observar os picos típicos de oxidação e redução da sonda redox. Quando as modificações foram ocorrendo na superfície do sensor CB-PLA, a corrente de pico diminuiu. Essa diminuição de corrente é causada pela deposição do material na superfície do CB-PLA, o que resultou em um “bloqueio” parcial dos sítios ativos do sensor eletroquímico. Além disso, na última etapa após a incubação de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$ da proteína *Spike S1* do vírus SARS-CoV-2, ocorreu um decaimento mais acentuado da corrente de pico, demonstrando a eficiência do sensor na detecção do antígeno de interesse, a partir da reação de interação proposta (antígeno-anticorpo). Assim, a partir da diferença de corrente de pico na ausência (e na presença de antígeno, é provável que seja possível correlacionar com a concentração de antígeno.

Após a confirmação do sucesso da construção do imunossensor, foi realizada a otimização da etapa de imobilização do anticorpo na superfície do CB-PLA. A avaliação das demais etapas, como ligação e bloqueio de EDC:NHS com BSA, não foi realizada, pois são bem conhecidas e amplamente

relatadas na literatura com concentrações e tempos fixos, essas etapas não foram otimizadas (BRAZACA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2020). O EDC:NHS foi fixado em EDC 10,0 mmol L⁻¹ e NHS 20,0 mmol L⁻¹ em PBS 1x (pH = 7,4), e solução de BSA (1% m/v) em PBS 1x (pH = 7,4), com tempos de deposição de 1 hora e 30 minutos, respectivamente. A imobilização do anticorpo foi otimizada para duas variáveis, a concentração (µg mL⁻¹) e o tempo de incubação (min) do anticorpo. Para isso foi utilizada a otimização multivariada CCD. Todas as respostas de corrente de pico utilizadas para a construção da resposta de superfície foram a diferença entre a corrente de pico do CB-PLA na presença e ausência de anticorpos. Para monitorar as diferenças de corrente (-ΔI), utilizou-se FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ como sonda eletroquímica. A Figura 51 mostra a superfície de resposta obtida na otimização da concentração do anticorpo e do tempo de incubação.

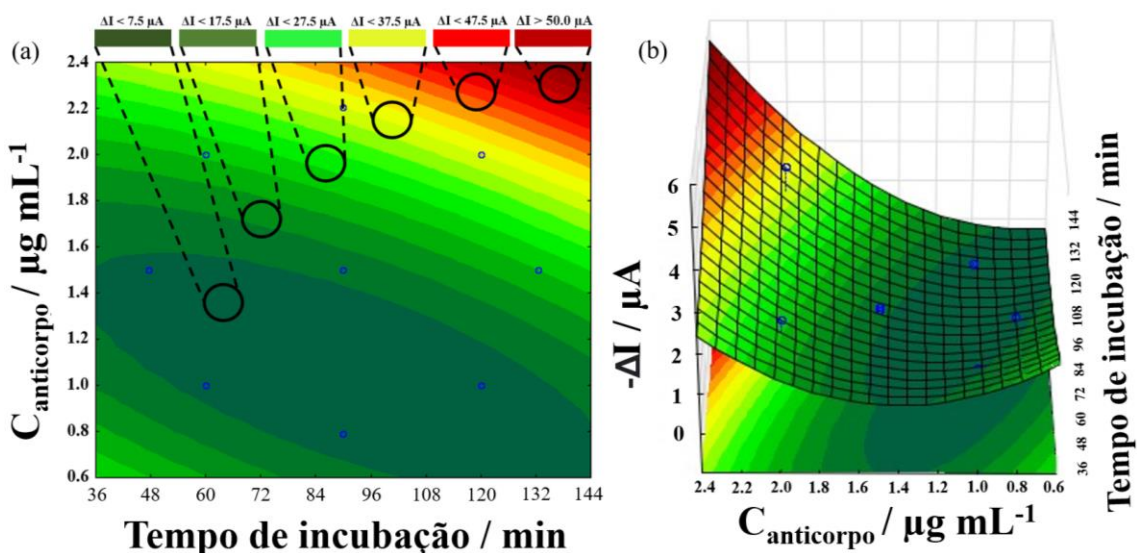


Figura 51. (a) Curva de nível e (b) Resposta superficial obtida para a otimização das variáveis: concentração de anticorpos (µg mL⁻¹) e tempo de incubação (min) em função da variação da corrente na presença de anticorpo.

A Figura 51 mostra que à medida que a concentração e o tempo de incubação do anticorpo aumentam, há um decaimento de corrente mais acentuado assim, observa-se uma maior variação de corrente. Porém, longos tempos de incubação não são favoráveis do ponto de vista de testes clínicos,

uma vez que o tempo de produção do sensor será maior, e aumentar indiscriminadamente a concentração de anticorpos aumenta o custo de produção do imunossensor. Além disso, um expressivo decaimento de corrente possivelmente sugere que há um maior “bloqueio” parcial dos sítios ativos. O bloqueio excessivo dos sítios ativos pode dificultar a análise, pois é necessário ter sítios ativos suficientes para monitorar as interações entre o receptor e o antígeno com a sonda redox proposta. Outro ponto a considerar é que o excesso de anticorpos na superfície do sensor, após se ligar a concentrações muito baixas de proteína, pode saturar a superfície e prejudicar o desempenho do imunossensor. Considerando isso, é possível observar que o tempo de 60 min de incubação proporciona uma variação relativamente satisfatória na resposta de corrente (ΔI). Ademais, o estudo referente à concentração de anticorpos não foi satisfatório para indicar com precisão o melhor valor de concentração, porém foi possível selecionar uma faixa mais estreita de concentrações de anticorpos para avaliar a quantidade de anticorpo na presença do antígeno. Assim, utilizando o tempo de incubação selecionado, e para avaliar a resposta do imunossensor na presença do antígeno (proteína spike S1), foi realizada uma nova otimização da concentração de anticorpos utilizando otimização univariada após a incubação do antígeno.

Para o estudo da concentração de Ab, foi utilizada uma concentração de antígeno de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$, e o anticorpo foi avaliado nas concentrações de 1,2, 1,4, 1,6 e $1,8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando um tempo de incubação de 60 minutos para o anticorpo e 30 minutos para o antígeno. Utilizando o valor de concentração que proporcionou melhor resposta, também foi avaliado o tempo de incubação do antígeno (30, 60, 90, 120, 150 e 180 min). Todas as etapas de otimização foram monitoradas por CV na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 52 mostra respostas de corrente de pico para otimização univariada da concentração de anticorpo na presença do antígeno e do tempo de incubação do antígeno.

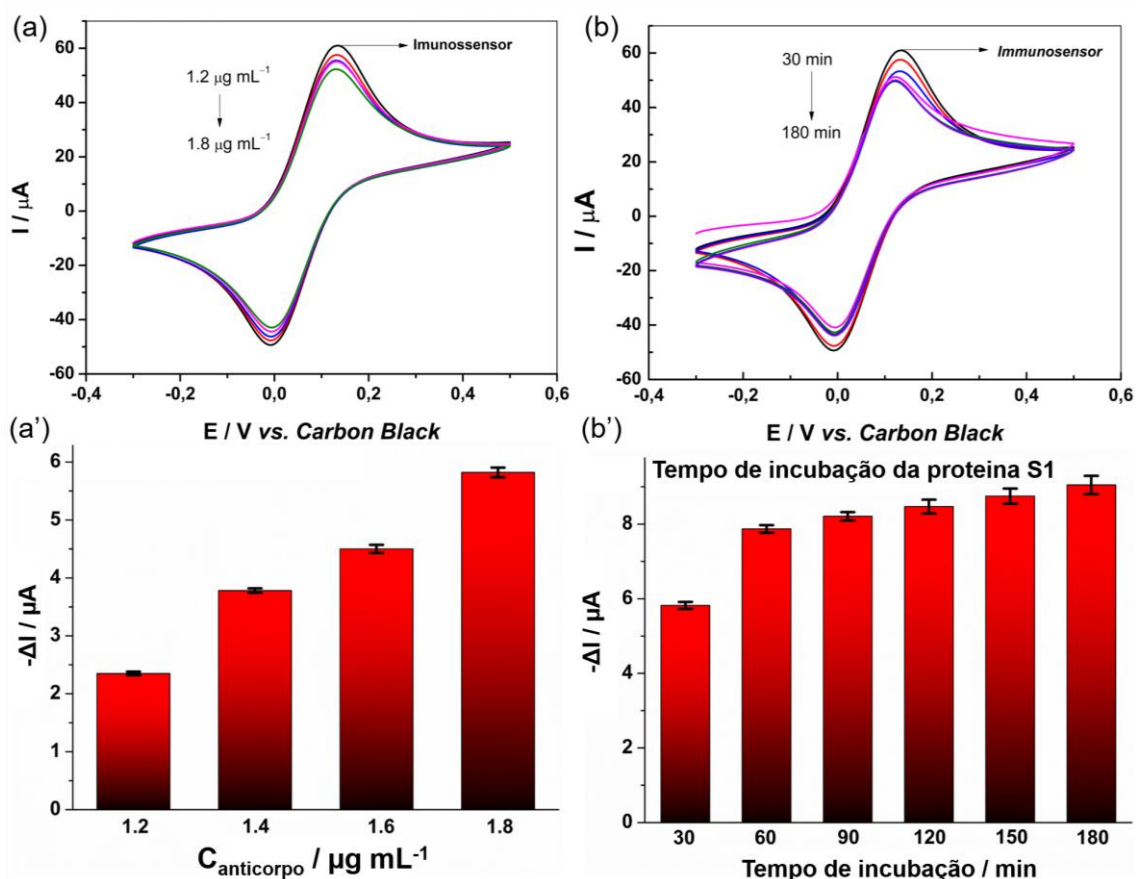


Figura 52. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ usando o imunossensor fabricado para (a) otimização da concentração de anticorpos ($1,2; 1,4; 1,6$ e $1,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (b) otimização do tempo de incubação da proteína *spike* S1 ($30; 60; 90; 120; 150$ e 180 min); Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . Gráficos de coluna de barras para (a') otimizações da concentração de anticorpos e (b') tempo de incubação do antígeno. **Fonte: próprio autor.**

Pode ser visto na Figura 52a que à medida que a concentração de anticorpos aumenta, há um aumento nos valores de $-\Delta I$. Assim, a concentração de $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$ de anticorpo foi escolhida para novos experimentos. Em relação ao tempo de incubação (Figura 52b), notou-se comportamento semelhante, onde o aumento do tempo de complexação entre o receptor (anticorpo) e o antígeno (proteína *spike* S1) proporcionou maior variação nos valores de corrente de pico. Porém, por mais de 60 min de incubação, o aumento nos

valores de $-\Delta I$ não é significativo, e o tempo de 60 min foi escolhido como o tempo ideal para a incubação do anticorpo na superfície do sensor.

A partir das etapas otimizadas no preparado imunossensor proposto, o mesmo foi aplicado na detecção da proteína *spike* S1 do vírus SARS-CoV-2. Para isso, foi construída uma curva analítica variando a concentração do antígeno (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 nmol L^{-1}). Cada concentração incubada foi monitorada usando CV na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . A Figura 53 apresenta os voltamogramas obtidos para cada concentração analisada e a respectiva curva analítica obtida.

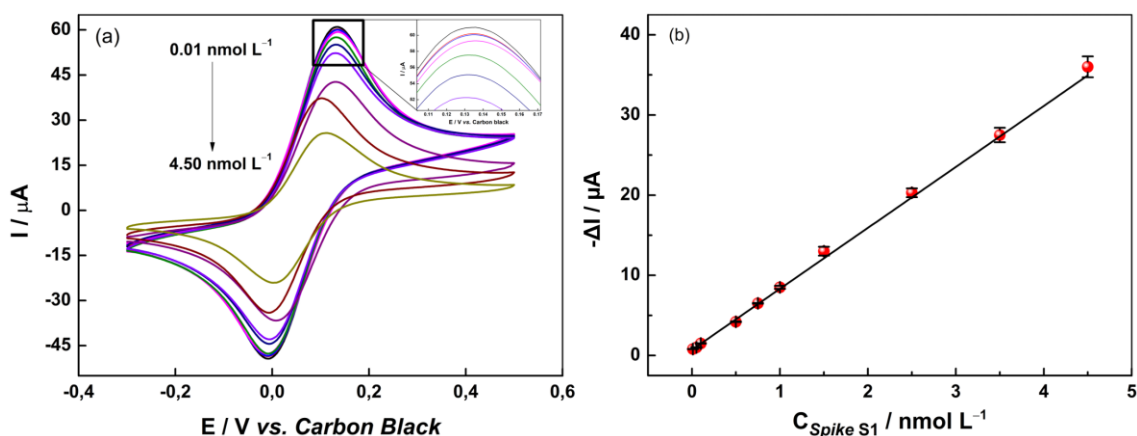


Figura 53. Voltamogramas cíclicos registrados na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} usando o imunossensor fabricado para concentrações crescentes de antígeno (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 nmol L^{-1}). Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor.**

De acordo com a Figura 53a, é possível observar que à medida que a concentração de antígeno aumenta há um decaimento de corrente proporcionalmente maior. Com isso, indicando que concentrações mais elevadas de antígeno proporcionaram mais bloqueio da superfície do eletrodo, dificultando a transferência de carga e diminuindo assim a corrente de pico. Diante disso, foi possível construir uma curva analítica com as concentrações 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5 e 4,5 nmol L^{-1} (Figura 53b). A

construção da curva analítica foi realizada a partir da coleta dos valores da corrente de pico anódica, pois proporcionou melhor linearidade que os valores da corrente de pico catódica ($R^2 = 0,817$), o que foi considerado para estudos. A curva construída apresentou comportamento linear, com R^2 de 0,997 para valores de corrente de pico anódico, demonstrando que o imunossensor proposto é capaz de responder linearmente a concentrações dentro da faixa de trabalho proposta. A equação da curva obtida foi $-\Delta I (\mu A) = 0,707 + C_{\text{antigen}} (\text{nmol L}^{-1}) \times 7,606$. O LD e LQ foram calculados de acordo com o seguinte: $\text{LOD} = 3,3 \times \text{DP}_{\text{intercept}}/s$ e $\text{LQ} = 3 \times \text{LD}$, onde DP é o desvio padrão do intercepto da curva de calibração, e “s” é a sensibilidade (inclinação) da curva de calibração. Os valores LD e LQ calculados foram 2,7 e 8,9 pmol L^{-1} , respectivamente.

Foram realizados testes de reprodutibilidade da construção do imunossensor e estabilidade das análises. Para o teste de reprodutibilidade, foram construídos 5 imunossensores diferentes e as análises foram realizadas em cada biossensor na presença de 1,0 nmol L^{-1} do antígeno. Para o teste de estabilidade do imunossensor, foram realizadas 10 varreduras consecutivas no mesmo biossensor, na presença de 1,0 nmol L^{-1} do antígeno, que foram realizadas na presença de FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} . Os testes de reprodutibilidade e estabilidade apresentaram DPR de 3,75 e 1,34%, respectivamente. A Figura 54 mostra os resultados obtidos, nos quais os eletrodos foram mantidos em temperatura baixa (aproximadamente 3 °C), em um comportamento próprio dentro de um freezer e livres de umidade.

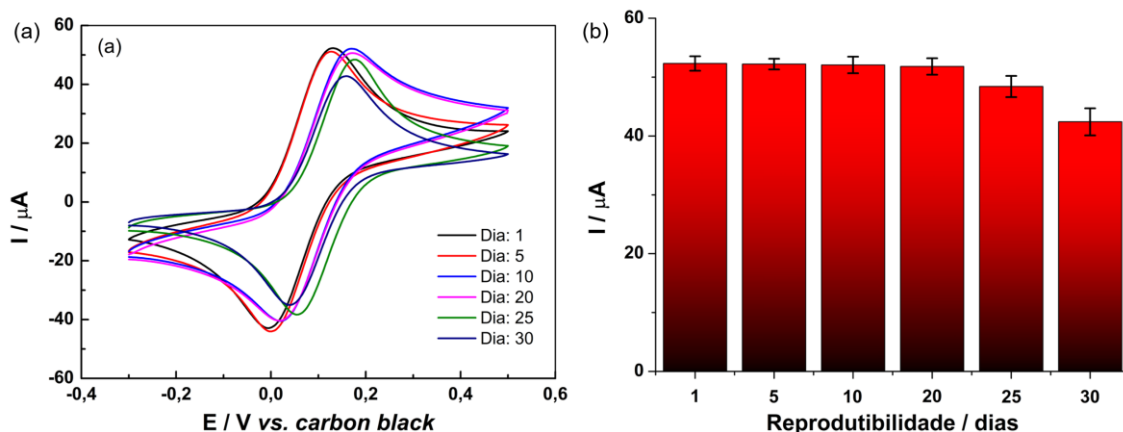


Figura 54. (a) Voltamogramas cíclicos obtidos com imunossensor eletroquímico na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para análise em diferentes dias (**linha preta**) dia 1; (**linha vermelha**) dia 5; (**linha azul**) dia 10; (**linha rosa**) dia 20; (**linha verde**) dia 25; e (**linha roxa**) dia 30. (b) gráfico de barras das respostas analíticas dos imunossensores em dias diferentes. **Fonte: próprio autor.**

Como pode ser observado na Figura 54, a partir do décimo dia o perfil voltamétrico do sensor muda, o que pode estar relacionado ao fato de serem impressos em 3D e serem suscetíveis a mudanças de comportamento ao longo do tempo, uma vez que são produzidos a partir de materiais biodegradáveis e de baixo teor de carbono. Além disso, o decaimento da eficácia de análise do sensor durante longos períodos de tempo podem ser atribuída a perda da eficácia do material biológico utilizado para detecção da proteína de interesse. Porém, conforme a Figura 54, pode-se observar que por até 20 dias, mesmo com pequenas alterações nos perfis de resposta, os valores atuais permanecem estatisticamente estáveis (RSD = 2,3%). Além disso, após 20 dias a estabilidade do sensor diminui, com um decaimento de 13,3% do pico atual, com um RSD de 12,3%.

As características analíticas obtidas com o imunossensor impresso em 3D proposto foram comparadas com outros imunossensores relatados na literatura. A Tabela 13 apresenta algumas características de desempenho dos imunossensores eletroquímicos descritos na literatura.

Tabela 13. Imunossensores eletroquímicos relatados na literatura e suas características de desempenho. **Fonte: próprio autor.**

Sensor	Método	Faixa linear (nmol L ⁻¹)	LD (nmol L ⁻¹)	Ref
3D Au/G-PLA	EIS ^e	50,0 – 500,0	6,8	(MUÑOZ; PUMERA, 2021)
3D-printed gold micropillars	EIS	0,001 – 20,0	0,0000169	(AZAHAR ALI et al., 2021)
3D-printed Gpt-PLA	CV ^f	5,0 – 75,0	1,36	(STEFANO et al., 2021)
Pt/BioPET ^b	SWV ^g	0,0007 – 0,007	0,0007	(BLASQUES et al., 2023)
Immunosensor	CV	30,0 – 150,0	2,53	(LIUSTROVAITE et al., 2022)
Immunosensor	SWV	260,0 – 1040,0	260,0	(MOJSOSKA et al., 2021)
Co-TNT sensor ^c	CA ^h	14,0 – 1400,0	0,7	(VADLAMANI et al., 2020b)
3D-printed CB-PLA	CV	0,01 – 4,5	0,0027	Este trabalho

^aImunossensor eletroquímico impresso em 3D baseado em nanopartículas de ouro; ^bplatina/poli (tereftalato de etileno) de base biológica; ^csensor eletroquímico baseado em nanotubos de TiO₂ funcionalizados com cobalto; ^despectroscopia de impedância eletroquímica; ^eVoltametria de Onda Quadrada; ^fVoltametria cíclica; ^gcronoamperometria.

Na literatura é relatado diversos imunossensores eletroquímicos aplicados à detecção do vírus SARS-CoV-2, e na Tabela 13 estão descritos alguns exemplos. É possível inferir que o imunossensor apresentado neste trabalho alcançou boas características analíticas, comparáveis ao observado na literatura. Além disso, a possibilidade de exclusão de etapas na produção do imunossensor proposto torna-a mais simples, facilitando o preparo e não necessitando de operadores especializados para produção. É importante ressaltar que para o desenvolvimento do presente imunossensor não foi necessário modificar a superfície com partículas metálicas ou materiais similares. Ademais, o imunossensor foi otimizado utilizando o método

multivariado e procedimentos univariados. A resposta do imunossensor apresentado neste trabalho pode ser considerada excelente, pois eliminar etapas de modificação e manter boas características analíticas é fundamental para a criação de testes clínicos mais robustos e com alto potencial de utilização. Neste contexto, a otimização multivariada mostrou-se altamente eficaz, indicando parâmetros operacionais ideais e permitindo que o imunossensor funcione em todo o seu potencial. Outro ponto crucial a destacar é que o imunossensor proposto tem CB como material condutor base, que é barato se comparado a outros como grafeno, grafite e platina, comumente relatados para a fabricação de imunossensores. Diante disso, o imunossensor eletroquímico proposto é uma alternativa viável para centros de análises clínicas, pois é construído de forma fácil, direta e automatizada a partir da tecnologia de impressão 3D, e a plataforma proposta requer apenas um pequeno volume de amostra para realizar as análises (100 μL).

Para demonstrar a eficiência do imunossensor impresso em 3D, foi realizada a análise de amostras reais e sintéticas. Para isso, amostras de soro humano e saliva sintética foram fortificadas com três concentrações conhecidas (0,05, 0,1 e 1,0 nmol L^{-1}) do antígeno e posteriormente incubadas na superfície do eletrodo. A Figura 55 apresenta os valores de recuperações obtidos para todas as amostras analisadas.

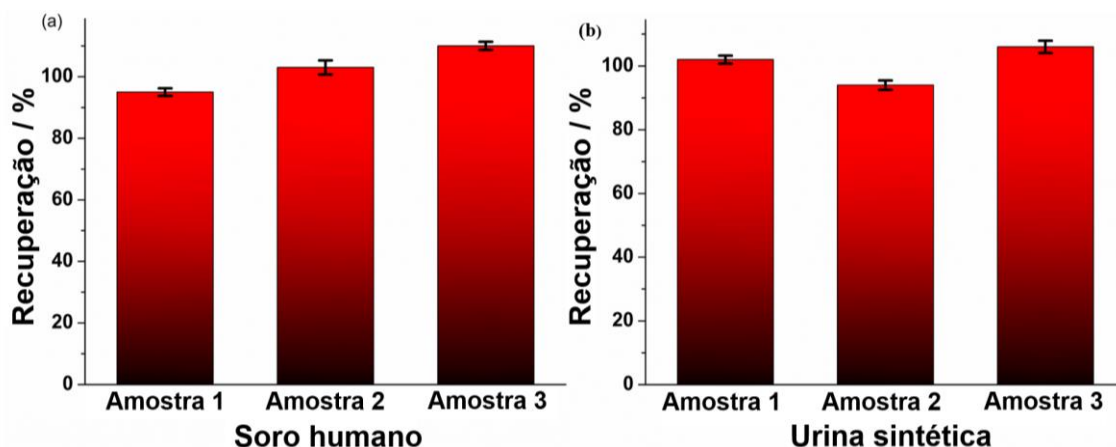


Figura 55. Gráfico de barras da resposta de recuperações em porcentagem do antígeno em amostras de soro humano (a) e saliva sintética (b). Concentrações: amostras 1, 2 e 3; 0,05; 0,1 e 1,0 nmol L⁻¹, respectivamente. **Fonte: próprio autor.**

Os valores de recuperação obtidos variaram de 92,0 a 105,0%, inferindo-se que todas as análises realizadas não apresentaram efeito matriz significativo. Além disso, de acordo com os testes realizados nas amostras, o sensor pode se apresentar como uma alternativa viável e prática para testes clínicos. A utilização da tecnologia de impressão 3D para fornecer a plataforma completa é um diferencial, pois permite o design exatamente como. Deste modo, atribuindo características importantes aos dispositivos point-of-care, como a miniaturização, que permite a utilização de baixas quantidades de amostras, portabilidade ao sistema e a adaptabilidade dos materiais, seja atribuindo baixo custo, flexibilidade/rigidez, ou mesmo materiais melhorados. Em relação aos materiais, a possibilidade de obtenção de filamentos condutores para impressão 3D em laboratório é um diferencial visto que é eliminada a necessidade de importação de filamentos condutores, que em alguns casos é difícil. Além disso, diferentes materiais podem ser empregados para atribuir características variadas ao sensor final. Neste caso, utilizou-se CB para atribuir baixo custo, tornando a plataforma proposta muito acessível, dada a elevada importância da testagem para o vírus SARS-CoV-2.

10. Conclusão

A produção de um filamento condutivo a partir de CB como material condutor foi alcançado com sucesso. O filamento proposto apresentou características eletroquímicas melhoradas como sensor eletroquímico quando comparado ao filamento baseado em CB comercialmente disponível devido ao seu carregamento de CB mais elevado e otimizado. Assim, foi possível obter filamentos condutores com 28,5% em massa de CB, o que representa um aumento de aproximadamente 7% em comparação ao filamento comercial. Este aumento, em termos de material condutor total, representa 30% a mais de CB utilizado (considerando apenas a massa do material condutor como 100%), o que levou a um desempenho eletroquímico superior. Os eletrodos impressos em 3D com o filamento feito em laboratório CB-PLA apresentaram uma ótima resposta eletroquímica sem procedimentos de ativação de superfície. Entretanto, em contrapartida ao filamento de grafite apresentado no capítulo 11 anterior, o mesmo mostra que a reação de remoção do PLA da superfície melhora de forma significativa o desempenho dos eletrodos. Diante disso, o CB demonstrou ser um ótimo material condutor para produção dos filamentos, agregando boa performance eletroquímica com suas características de baixo custo e alta disponibilidade.

A partir dos eletrodos produzidos com filamentos feito em laboratório a base de CB foi possível construir com sucesso um imunossensor eletroquímico, baseado na ligação covalente diretamente na superfície do eletrodo, para a detecção de proteína *spike* S1. O imunossensor apresentou resultados satisfatórios com baixo LOD de 2,7 pmol L⁻¹ e alta sensibilidade (7,606 μ A nmol⁻¹ L). Os valores de recuperação adequados nas amostras propostas (soro humano e urina sintética) variaram de 92,0 a 105,0%, demonstrando boa aplicabilidade e nenhum efeito de matriz significativo. Diante disso, o imunossensor impresso em 3D desenvolvido neste capítulo vincula as qualidades da impressão 3D com as dos sensores eletroquímicos. Além disso, o sensor produzido é portátil e aplicado inteiramente com equipamentos portáteis. Desta forma, o presente imunossensor pode ser empregado como

alternativa aos testes existentes, podendo ser aplicado *in loco*, de forma simples, porém rápida.

Capítulo 6

Dispositivo eletroquímico de alvo duplo fabricado totalmente impresso em 3D para detecção de proteína A29 e DNA do vírus varíola dos macacos

11. Experimental

11.1 Reagentes e soluções

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho eram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura com resistividade elétrica igual ou superior a 18,0 MΩ cm proveniente de um sistema de purificação de água Milli Q da Millipore® (MA, EUA). Cloreto de potássio (99% m/m), FcMeOH (97% m/m), albumina de soro bovino (BSA) da Fisher Chemical™ (Hampton, EUA), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida cloridrato (EDC) (98% m/m) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (98% m/m), adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA), foram empregados na construção e avaliação eletroquímica do imunossensor e genossensor. O soro humano foi obtido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA). Etanolamina (>99% v/v) e PBS 1x foram preparados a partir de uma mistura de cloreto de sódio (99% m/m, da Vetec®) (137 mmol L⁻¹), cloreto de potássio (2,7 mmol L⁻¹), sódio fosfato dibásico (10 mmol L⁻¹) e dihidrogenofosfato de potássio (1,8 mmol L⁻¹, da Vetec®). Para o imunossensor, foram utilizados uma proteína MKPV A29 recombinante (antígeno) e um anticorpo MKPV A29, ambos adquiridos da Sino Biological (Wayne, EUA). Para o genossensor foram obtidas duas sequências de DNA (EXXTEND®, Paulínia, Brasil): sequência de captura (amino C6 – AGACAACATAGATTACGGCTT) e alvo (AAGCCGTAATCTATGTTGTCT).

11.2 Aparelhos e medições eletroquímicas

Todos os testes eletroquímicos foram realizados utilizando um potenciostato portátil μSTAT i-400 (Metrohm DropSens®, Espanha) controlado por um computador, com sistema operacional Windows 10® (processador Intel core I5 e 8,0 GB de RAM), utilizando o software Dropview 8400®. Para impressão das estruturas e eletrodos foi utilizada uma impressora 3D Sethi3D S3 (Campinas, Brasil), com auxílio do software Simplify 3D™. Uma extrusora Filmaq3D® (Curitiba, Brasil) foi utilizada para a extrusão dos compósitos, produzindo os filamentos. As análises de MEV foram realizadas utilizando um equipamento Thermo Fisher Scientific modelo Prisma E. As caracterizações

eletroquímicas foram realizadas utilizando a técnica voltamétrica cíclica. A análise espectroscópica no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada usando um espectrofotômetro Tensor II (Bruker) e as imagens do ângulo de contato foram obtidas usando um aparelho feito em laboratório, lançando uma gota de água deionizada no eletrodo de superfície.

11.3 Produção de filamentos reciclados e eletrodos CB-rPLA

Os eletrodos empregados neste trabalho foram fabricados a partir de um filamento compósito feito em laboratório composto por 65% em massa de PLA, 25% em massa de CB (Super P[®], >99%) da Fisher Scientific[®] (Loughborough, Reino Unido) e 10% em massa de óleo de mamona da Merck (Gillingham, Reino Unido) com base em trabalhos já descritos na literatura (Crapnell et al., 2023a) O óleo de mamona tem como função conferir característica “plástica” ao filamento e aumenta flexibilidade do mesmo. A célula eletroquímica foi projetada em forma de “caixa” com tampa quadrada, sendo a tampa com entrada para 4 eletrodos, os eletrodos de trabalho, de referência e contra eletrodo. A Figura 56 apresenta uma representação esquemática da célula eletroquímica completa. A base da célula eletroquímica foi impressa em polímero não condutor (ABS), com volume interno de 1 cm³, necessitando de apenas 500 µL de soluções por análise. Os sensores foram projetados em formato de “pistão”, o que possibilita um encaixe fácil e firme na tampa da base eletroquímica. Os sensores tem 1,5 cm de altura, superfície de análise de 5,0 mm² de diâmetro e área total de 19,6 mm². Para evitar que a solução entre em contato com outras partes do sensor além da superfície, ela é completamente isolada com esmalte incolor e não condutor.

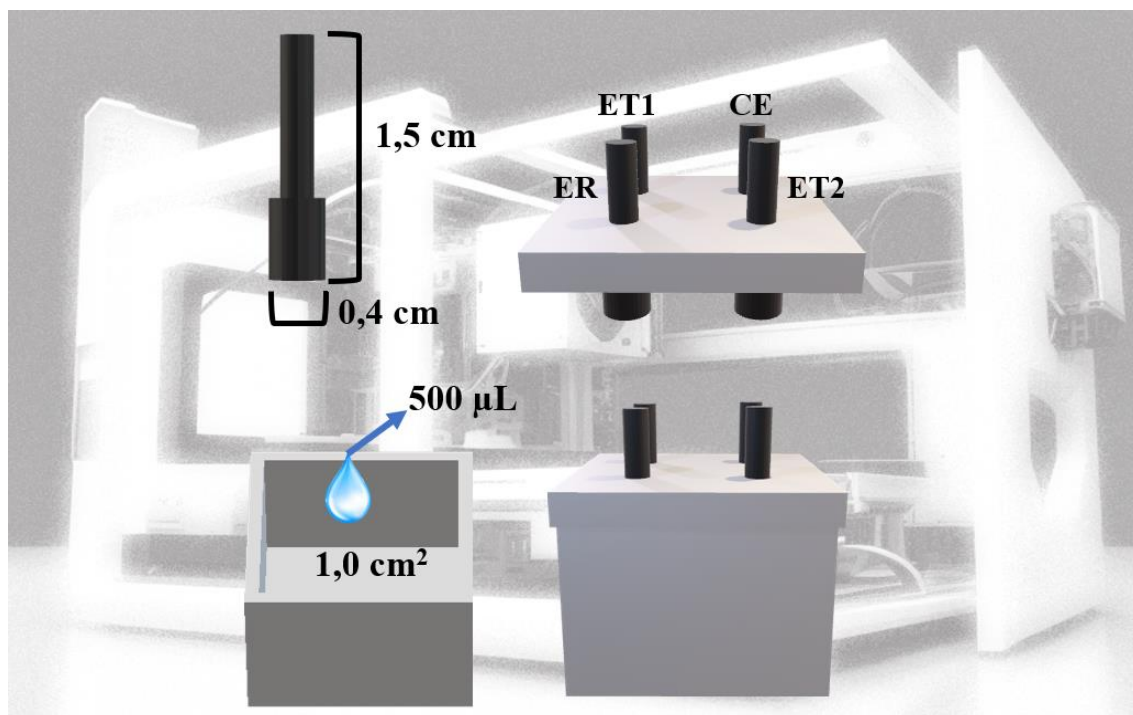


Figura 56. Esquema representativo da célula eletroquímica e suas medidas. Design dos sensores impressos em forma de pistão e suas respectivas dimensões; célula eletroquímica composta por uma caixa para armazenamento da solução a ser analisada e tampa com quatro entradas para os sensores eletroquímicos com distancias equivalente entre os sensores. **Fonte: próprio autor.**

11.4 Preparação de imunossensor e genossensor

Para preparar o imunossensor, inicialmente, os anticorpos (anti-A29) do MKPV foram ligados covalentemente à superfície do eletrodo de trabalho 1 (ET1), utilizando 20 μL de uma solução contendo EDC:NHS 10,0 e 20,0 mmol L^{-1} , respectivamente em PBS 1 \times (pH = 7.4) como molécula de *crosslink* para os anticorpos. A solução (EDC:NHS) foi colocada diretamente na superfície do eletrodo e deixada em repouso por 60 min, seguida de 60 min de imobilização de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ do anticorpo MKPV (20 μL) em PBS 1 \times (pH = 7,4). A etapa específica de ancoragem do anticorpo na superfície do sensor foi totalmente otimizada por experimentos univariados. Para tanto, o tempo de deposição e a concentração de anticorpos foram otimizados, variando de 30 a 150 min e 0,5 a

20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Para a última etapa da construção do imunossensor, 20 μL de solução de BSA (1% p/v) em PBS 1x (pH = 7,4) foram realizados e incubados por 30 min para bloquear quaisquer locais de interação disponíveis no CB-rPLA. O eletrodo foi enxaguado após cada etapa com PBS 1x e seco ao ar. Depois disso, o imunossensor estava pronto para a detecção da proteína A29 do MKPV.

Para preparar o genossensor na superfície do eletrodo de trabalho 2 (ET2), o EDC:NHS foi inicialmente imobilizado na mesma concentração utilizada anteriormente, com um tempo de 75 min. Em seguida, o DNA de captura foi imobilizado na concentração $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tempo de imobilização de 15 min, em solução contendo o bloqueador/espaçador etanolamina na concentração de PBS 1x $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH = 7,4). A etapa de imobilização da captura de DNA também foi otimizada, variando o tempo (min) e a concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de 1,0 a 10,0 e 15 a 105, respectivamente. Assim, foi possível obter um genossensor específico para detecção do DNA alvo do MKPV. Um esquema ilustrativo de cada etapa pode ser visto na Figura 57.

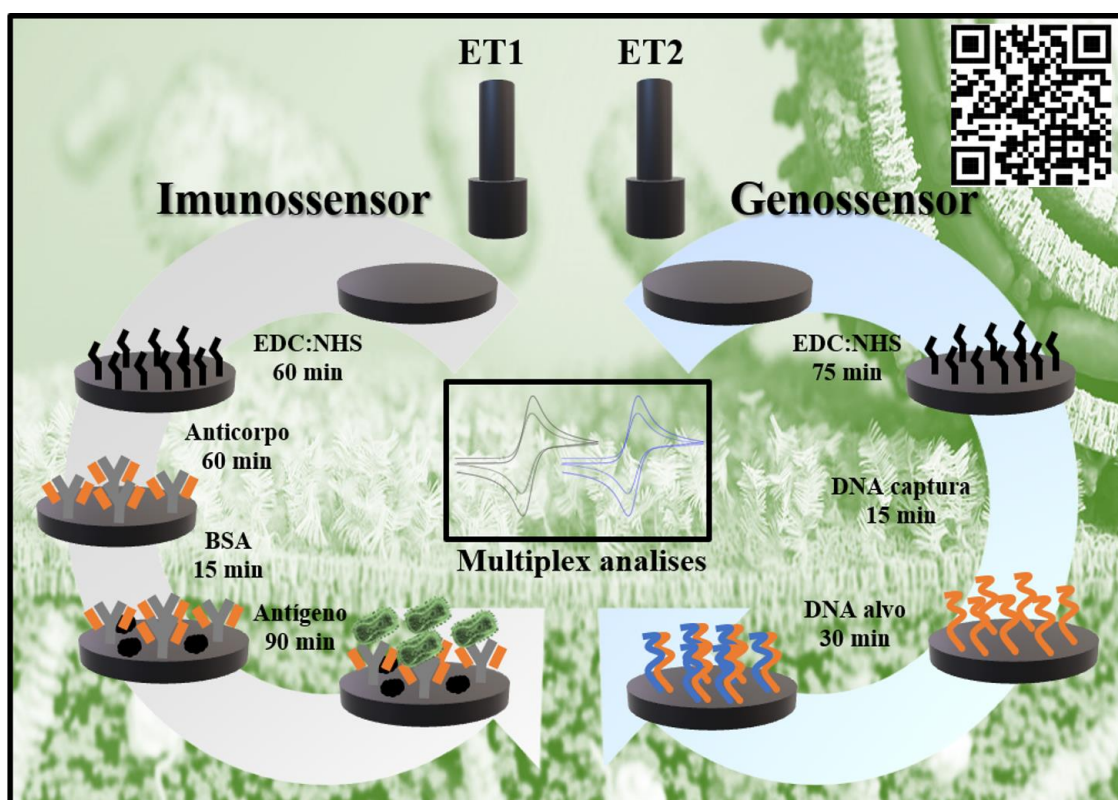


Figura 57. Representação das etapas de modificação dos biossensores. (ET1) sensor sem modificação, adição de EDC:NHS, anticorpo, bloqueio com BSA e detecção do antígeno. (ET2) sensor sem modificação, adição do EDC:NHS, DNA de captura e hibridização do DNA alvo para análise. **Fonte: próprio autor.**

12. Resultado e discussão

A produção de sensores impressos em 3D utilizando filamentos condutores flexíveis pode apresentar algumas irregularidades na superfície. Diante disso, para formar uma superfície mais lisa e reprodutível, todos os eletrodos produzidos passam por um processo de polimento completo para homogeneizar a superfície, garantindo maior reprodutibilidade das respostas analíticas. Uma comparação da morfologia da superfície antes e depois do processo de polimento pode ser vista através das imagens de MEV, apresentadas na Figura 58.

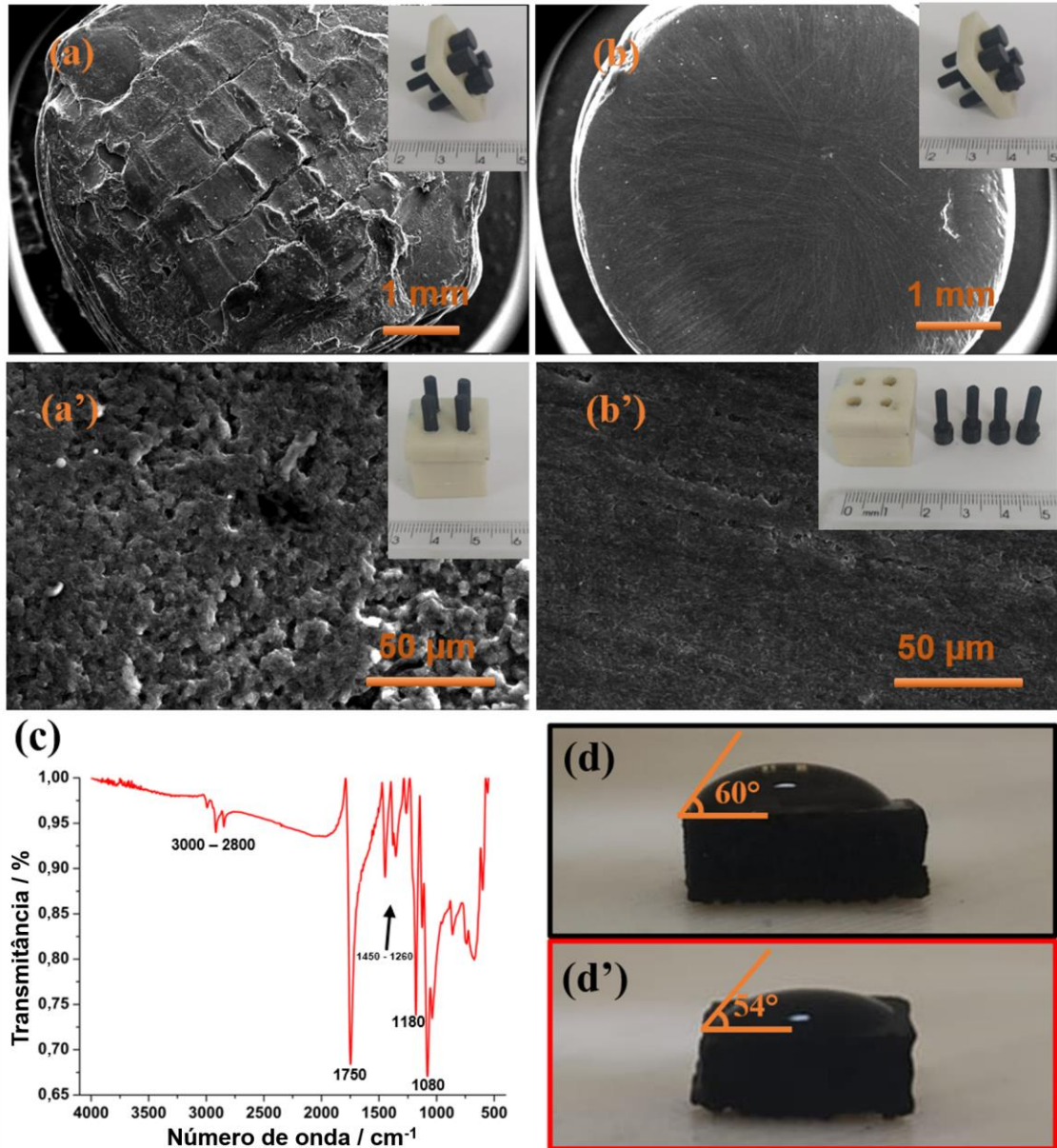


Figura 58. Imagens de MEV da superfície do eletrodo (a) antes do polimento e (b) após o polimento em diferentes magnitudes de amplificação. (a-a' e B'-B') amplificação de 31x e 1000x, respectivamente. (c) Espectros FTIR para CB-rPLA e (d e d') imagem do ângulo de contato para eletrodo não polido e polido, respectivamente. Insete: imagens reais do sistema multiplex impresso em 3D. **Fonte: próprio autor.**

Na Figura 58a, é possível observar a superfície do eletrodo impressa, que é composta por diversas irregularidades. Após a amplificação (Figura 58a'),

o sensor apresenta irregularidade superficial significativa, indicando uma rugosidade possivelmente maior em comparação com o eletrodo polido. Porém, como nenhum tratamento específico é aplicado, grande parte dessa rugosidade pode ser atribuída ao revestimento rPLA do filamento, que é o material predominante nele. Após o polimento do sensor (Figura 58b), é possível observar uma superfície mais uniforme em toda a sua área, este comportamento também observado na Figura 58b'. Embora o sensor polido possa parecer menos rugoso, é crucial observar que o polimento não apenas proporciona uma superfície mais lisa, mas também é capaz de remover o excesso de rPLA da superfície, permitindo a geração de respostas analíticas reproduzíveis e melhoradas, conforme bem relatado na literatura (Cardoso et al., 2018).

No espectro FT-IR (Figura 58c) é possível observar vários grupos funcionais entre 1080 e 1800, representando diferentes ligações como grupos carboxílicos, carbonílicos e oxigenados. Essas respostas são esperadas em sensores produzidos a partir de filamentos compostos por PLA, uma vez que tais ligações são provenientes do PLA presente no material (dos Santos et al., 2019; Stefano et al., 2021; Weng et al., 2013). Além disso, é importante destacar que os grupos carboxílicos permitem a produção de biossensores covalentes, sem a necessidade de intermediários (Layqah e Eissa, 2019; Silva et al., 2022). Na Figura 58d-d' são apresentadas as imagens do ângulo de contato. É possível observar que a superfície possui característica hidrofílica (ângulo $< 90^\circ$), tanto nos eletrodos não polidos quanto nos eletrodos polidos (da Silva et al., 2020). A ligeira alteração nos valores do ângulo de contato da gota no eletrodo polido (de 60 para 54°) pode ser atribuída à possível remoção do excesso de PLA da superfície e exposição do CB.

O perfil voltamétrico dos sensores eletroquímicos impressos em 3D foi caracterizado através da aplicação de CV na presença de uma sonda redox (FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Experimentos de CV foram conduzidos em 10 sensores distintos para avaliar a reprodutibilidade de sua produção usando tecnologia de impressão 3D. A Figura 59 apresenta a resposta voltamétrica dos 10 sensores diferentes. Os valores de corrente de

pico para processos anódicos e catódicos medindo $43,5 \pm 1,3$ e $28,6 \pm 0,8 \mu\text{A}$, respectivamente. A separação entre os picos anódico e catódico (ΔE_P) foi de $88 \pm 1 \text{ mV}$, com picos de oxidação e redução ocorrendo em aproximadamente $+0,112$ e $0,024 \text{ V}$, respectivamente. Este comportamento sugere um processo quase reversível. Além disso, estes resultados indicam um alto nível de reprodutibilidade na produção de sensores eletroquímicos, destacando que a combinação de tecnologia de impressão 3D e filamentos feitos em laboratório à base de CB e rPLA reciclado pode produzir sensores de alta qualidade.

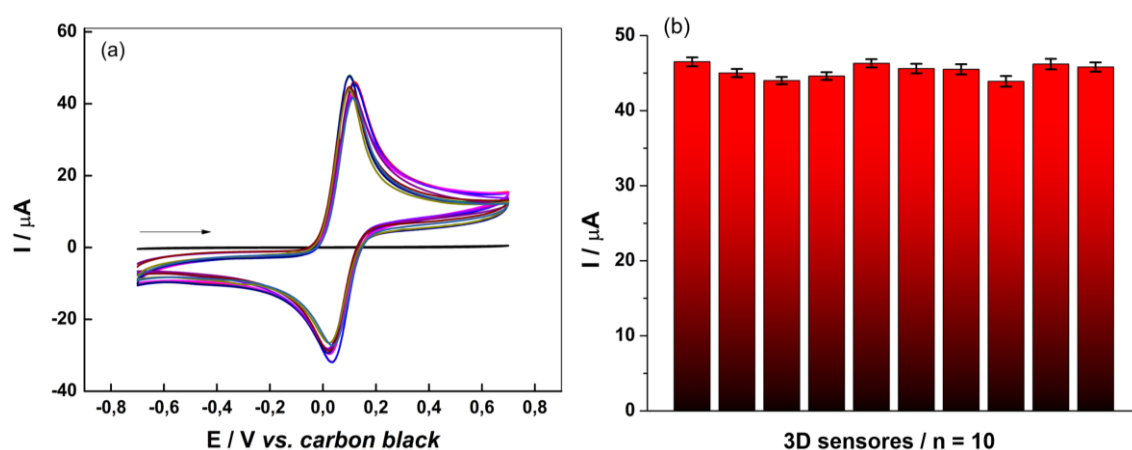


Figura 59. Voltamogramas cíclicos registrados com diferentes eletrodos ($n = 10$) em solução contendo FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial: 50 mV s^{-1} . (b) Gráficos de barras para valores de corrente de pico anódico de diferentes sensores em triplicado ($n = 3$). **Fonte: próprio autor.**

A área eletroquimicamente ativa dos sensores foi determinada através da realização de medidas de CV, com velocidade de varredura de potencial variando de 10 a 100 mV s^{-1} na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 60 apresenta os voltamogramas obtidos e o respectivo gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. Na Figura 60, é observável que à medida que a velocidade de varredura de potencial aumenta, as correntes de pico anódica e catódica aumentam proporcionalmente. A Figura 60b mostra o comportamento linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade de varredura de

potencial, com as curvas exibindo valores de R^2 próximos a 1, indicando um processo predominantemente definido pela difusão das espécies. Considerando estes resultados, a área eletroquimicamente ativa foi calculada utilizando a equação de Randles-Ševčík para processos quase reversíveis (Ferrari et al., 2018). A área eletroquimicamente ativa calculada foi de 36,7 mm^2 . Este valor é consideravelmente superior à área geométrica do eletrodo (19,6 mm^2), indicando uma rugosidade da superfície, que pode servir como sítio ativo para os processos redox.

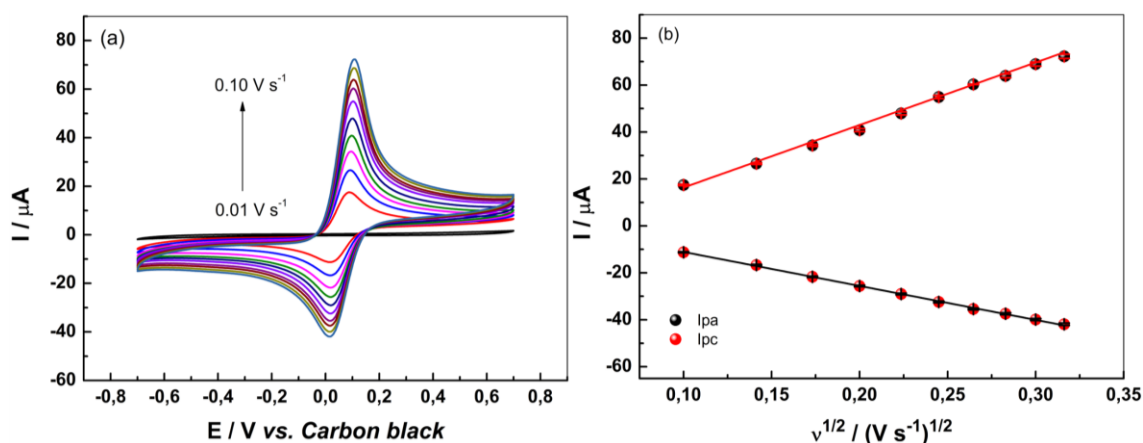


Figura 60. Voltamogramas cíclicos registrados em uma solução contendo FcMeOH 1,0 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} , em valores crescentes de velocidade de varredura de potencial (10 a 100 mV s^{-1}). (b) Gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial. **Fonte: próprio autor.**

Os eletrodos impressos em 3D são predominantemente compostos de rPLA, que é um polímero rico em carboxila. Esses grupos carboxila são ideais para servir como ligantes para EDC:NHS, permitindo posteriormente a produção de biossensores eletroquímicos altamente específicos sem a necessidade de modificações envolvendo partículas metálicas ou outros compostos para imobilizar o agente biológico responsável pelo bioreconhecimento do analito alvo de interesse. Nesse contexto, foi possível fabricar um imunossensor (ET1) e um genossensor (ET2) nos eletrodos de trabalho propostos do dispositivo eletroquímico impresso em 3D.

Foram produzidos imunossensores e genossensores específicos para determinação de MKPV e as respostas foram monitoradas por CV. A Figura 61 descreve o passo a passo da produção e as respostas eletroquímicas dos biossensores ET1 e ET2. Para tanto, FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregada em conjunto com a técnica CV para monitorar cada estágio. Durante cada etapa de modificação do sensor, uma deposição de material camada por camada foi realizada na superfície do sensor. Estas camadas “bloquearam” parcialmente a superfície do sensor e reduzem a resposta analítica na presença da sonda redox. Conseqüentemente, foi possível estimar o sucesso de cada etapa com base na diminuição da corrente de pico anódica observada em cada etapa.

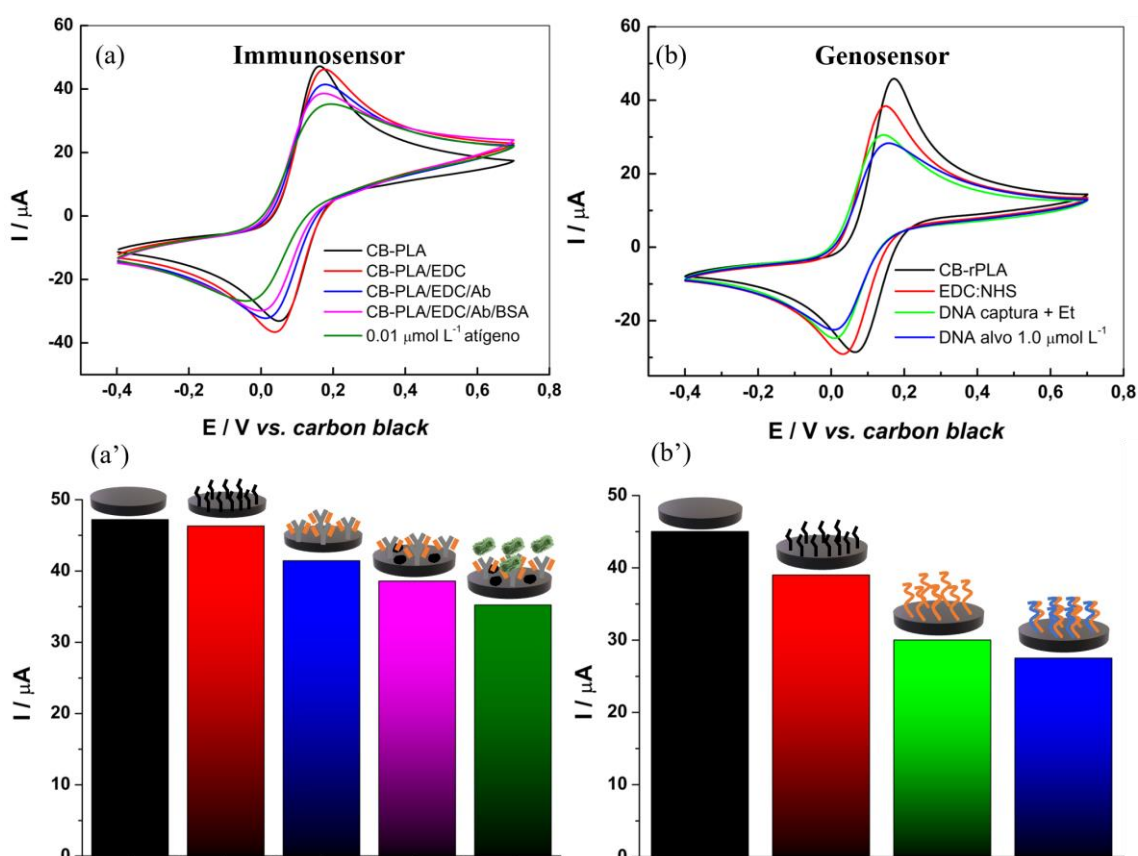


Figura 61. Voltamogramas cíclicos obtidos com ET1 e ET2 em FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (a) Etapas do ET1: (•) CB-rPLA; (•) EDC:NHS; (•) Ab; (•) BSA e (•) detecção de antígeno MKPV $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$. (b) Etapas do ET2: (•) CB-rPLA; (•) EDC:NHS; (•) DNA alvo + bloqueado e (•) detecção de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA alvo MKPV. (a') e (b') gráfico de barras das correntes de pico

anódica obtidas em cada etapa realizada do imunossensor e genossensor. Velocidade de varredura de potencial 50 mVs⁻¹. **Fonte: próprio autor.**

Na Figura 61 é possível observar que à medida que as etapas de modificação envolvidas na fabricação do imunossensor ET1 (EDC:NHS; Ab e BSA) são executadas, a corrente de pico anódica de ET1 apresenta uma ligeira diminuição. Essa diminuição fica evidente na Figura 61a', que apresenta os valores de corrente de pico anódico obtidos em cada estágio. Este comportamento está diretamente associado ao efeito de "bloqueio" parcial causado pelos compostos depositados na superfície. Além disso, na presença do analito (proteína/antígeno MKPV), também ocorre uma diminuição na corrente de pico anódica, indicando que o imunossensor desenvolvido é capaz de detectar com sucesso o antígeno MKPV.

Em relação ao genossensor desenvolvido no ET2 (Figura 61b), pode-se observar o mesmo padrão, onde a corrente de pico anódica diminui à medida que as modificações são realizadas (Figura 61b'), demonstrando o sucesso na execução das etapas. Além disso, o sensor apresentou especificidade e foi capaz de detectar o DNA alvo do MKPV. Porém, o genossensor foi preparado com uma etapa a menos em comparação ao imunossensor, pois a etapa de ancoragem da captura de DNA foi realizada simultaneamente ao composto bloqueador.

Além de monitorar as etapas de modificação e detecção através da técnica CV, também foi empregada a técnica de EIS. A Figura 62 apresenta os resultados do EIS obtidos em cada etapa da construção do imunossensor e do genossensor. É observável que à medida que a modificação da superfície é realizada em ET1 (Figura 62a) e ET2 (Figura 62b), a Rct dos sensores aumenta. Este aumento está diretamente relacionado ao efeito de bloqueio parcial dos materiais ancorados na superfície do sensor. No ET1, o valor de Rct para CB-rPLA puro foi de 40,1 Ω , enquanto o valor para o imunossensor totalmente construído na presença de 0,01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do antígeno sobe para 2.231,2 Ω . No ET2, o valor inicial de Rct foi de 42,1 Ω , e após a hibridização

com o DNA alvo aumentou para 2.431,8 Ω . Esses resultados corroboram com os achados do estudo CV, demonstrando que a construção dos biossensores e a detecção dos analitos alvo ocorrem com sucesso.

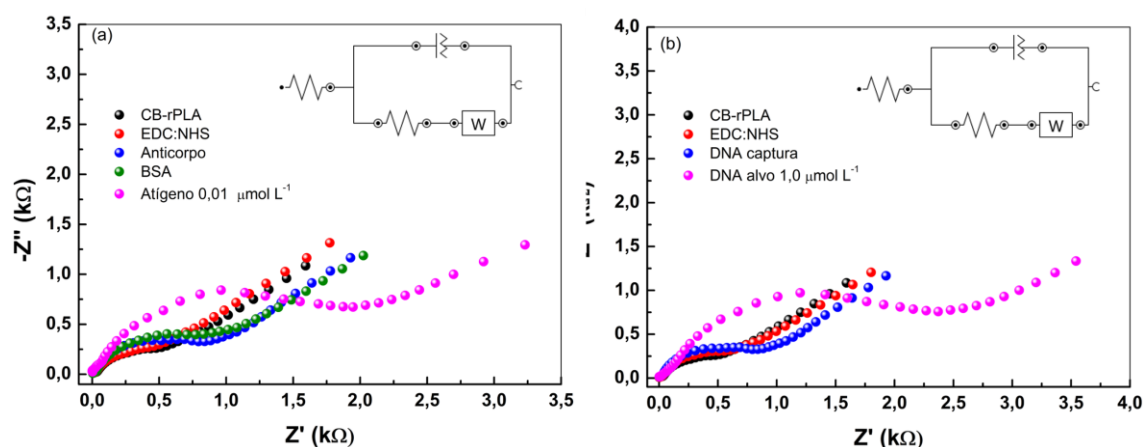


Figura 62. Gráficos de Nyquist obtidos na construção do (a) imunossensor e (b) genossensor. Insete': circuito equivalente empregado. Potencial aplicado 0,08 V. **Fonte: próprio autor.**

Após a construção de ambos os biossensores, diversas otimizações foram realizadas cada parâmetro estudado utilizando uma solução FcMeOH 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ para melhorar o desempenho da plataforma. Os parâmetros para as etapas de ancoragem e bloqueio com EDC:NHS e BSA foram mantidos fixos, incluindo concentração e tempo de modificação. No entanto, o tempo de modificação e as concentrações do anticorpo em ET1 e do DNA de captura em ET2 foram otimizados. Inicialmente, o tempo de deposição para modificação do Ab e DNA de captura dos sensores foi otimizado. O tempo de deposição para Ab variou de 30 a 150 min, e para captura de DNA variou de 15 a 105 min. Posteriormente, as concentrações destes compostos foram otimizadas. A concentração de Ab variou de 0,5 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, e a concentração de captura de DNA variou de 1,0 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para monitorar a eficiência dessas modificações, todas as respostas foram obtidas em relação à detecção dos analitos alvo, que foram 0,5 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de antígeno MKPV e DNA alvo, respectivamente. A Figura 63 apresenta as respostas obtidas durante a etapa de modificação dos biossensores ET1 e ET2.

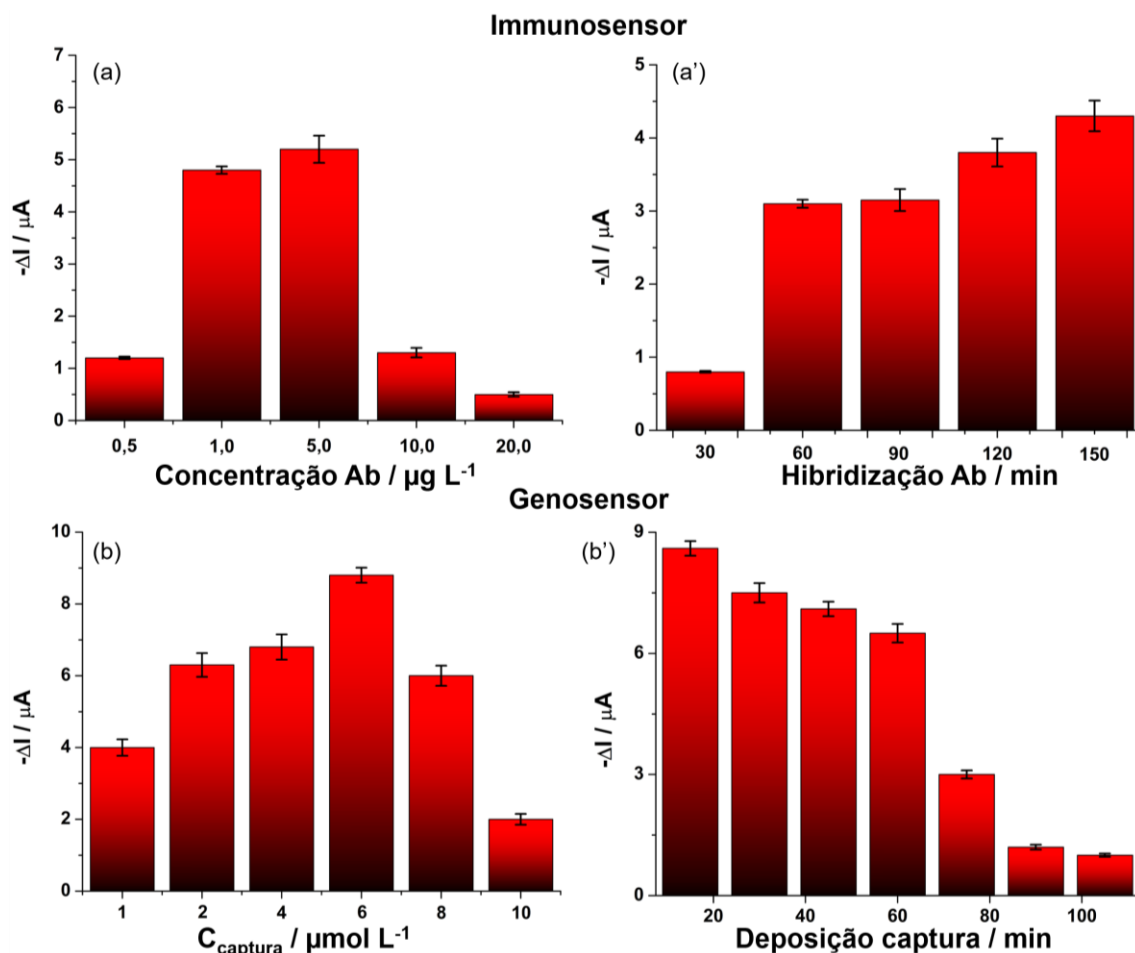


Figura 63. Gráficos de barras das respostas às otimizações da etapa de modificação do biossensor com anticorpo e captura de DNA do MKPV. (a-a') otimização da concentração (0,5 a 20 $\mu mol L^{-1}$) e tempo de ancoragem (30 a 120 min) do anticorpo na superfície do imunossensor (WE1). (b-b') otimização da concentração (1,0 a 10,0 $\mu mol L^{-1}$) e tempo (15 a 105) de captura de DNA na superfície do genossensor (WE2). Respostas obtidas em função da resposta eletroquímica na presença de FcMeOH 1,0 $mmol L^{-1}$ em KCl 0,1 $mol L^{-1}$. Resposta eletroquímica obtida após análise do antígeno 0,5 e 10,0 $\mu mol L^{-1}$ e DNA alvo. Velocidade de varredura de potencial 50 $mV s^{-1}$. **Fonte: próprio autor.**

Em relação à concentração de Ab para a modificação de ET1 (Figura 63a), a resposta analítica aumentou significativamente na concentração de 1,0 $\mu g L^{-1}$ e estabilizou em 5,0 $\mu g L^{-1}$, com níveis de corrente semelhantes para

ambos. Porém, observa-se uma diminuição significativa nas concentrações de 10,0 e 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que pode ser devido ao excesso de material depositado na superfície. A grande quantidade de material durante a modificação pode ter prejudicado a resposta do sensor. Consequentemente, a concentração de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ab foi escolhida como ótima, pois não há diferença significativa entre a resposta de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ab. Como mostrado na Figura 63a', à medida que o tempo de modificação com Ab (ET1) aumentou, a resposta na presença do antígeno do vírus também aumentou. No entanto, além dos 60 minutos, o aumento na resposta não foi substancial e o erro de medição aumentou. Portanto, 60 min foi considerado o tempo ideal de modificação, pois proporciona uma boa resposta analítica e um tempo de modificação relativamente curto.

Na Figura 63b é possível observar que à medida que a concentração de DNA de captura aumenta a resposta analítica aumenta até atingir concentrações de até 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e posteriormente diminui. Portanto, a concentração de 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi escolhida como ótima. Na Figura 63b', o aumento no tempo de modificação para o DNA de captura proporcionou uma diminuição na resposta analítica. Este resultado é excelente, pois o tempo de modificação mais curto produz a melhor resposta analítica. Assim, foram escolhidos 15 min para a imobilização da captura do DNA. Portanto, para a construção do ET1 foi utilizado o tempo de modificação de 60 min e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ab para o desenvolvimento do imunossensor, enquanto para o ET2 foi utilizado um tempo de modificação de 15 min e 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA de captura para construção do genossensor.

Após a otimização da etapa de modificação com compostos de bioreconhecimento (Ab e DNA) nos sensores ET1 e ET2, o tempo de ligação receptor-analito para detecção dos analitos alvo foi ajustado. Para tanto, o tempo de reconhecimento do analito variou de 30 a 150 min para reconhecimento da proteína A29 e de 15 a 120 min para detecção do DNA alvo do vírus MKPV. A Figura 64 apresenta os resultados obtidos para ambas as otimizações. Para ET1 (Figura 64a), o tempo para realizar o bioreconhecimento da proteína A29 aumentou a resposta analítica à medida que o tempo de

ligação aumentou. Porém, além dos 90 minutos, a resposta não aumenta significativamente e, portanto, 90 minutos foi escolhido como o tempo ideal. No sensor ET2 (Figura 64b), a resposta analítica máxima é alcançada em um tempo de hibridização de 30 min e diminui progressivamente à medida que o tempo é prolongado. Conseqüentemente, o tempo de hibridização de 30 min foi escolhido como ideal para a análise do DNA alvo do vírus MKPV.

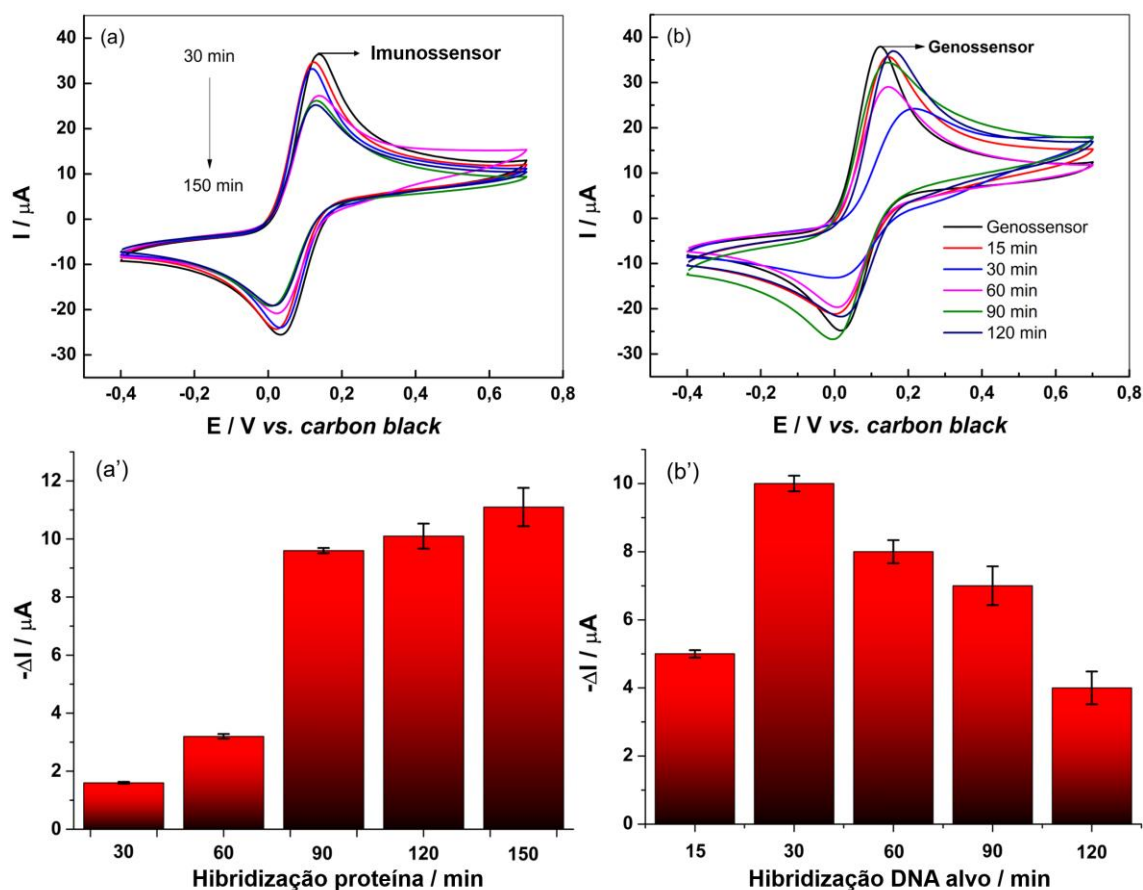


Figura 64. Voltamogramas cíclicos para otimizar a hibridização do antígeno e DNA alvo com a superfície do imunossensor e genossensor, respectivamente. Voltamogramas na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (a) variando tempo de hibridização de 30 a 150 min, concentração de antígeno de $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (b) genossensor variando tempo de hibridização de 15 a 120 min, concentração do DNA alvo $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (a'-b') gráfico de barras para resposta analítica na análise dos analitos de interesse em função da variação do tempo. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor.**

Após as otimizações realizadas para construção dos biossensores ET1 e ET2, foram construídas duas curvas de calibração para obtenção dos parâmetros analíticos do imunossensor eletroquímico e do genossensor. Concentrações do antígeno variando de 0,01; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e para o DNA alvo variando de 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram utilizados para criar as curvas de calibração do imunossensor e genossensor, respectivamente. A Figura 65 apresenta os resultados obtidos para ambas as curvas de calibração construídas utilizando ET1 e ET2. Um fator importante é ressaltar-se, é que com a otimização dos parâmetros de construção dos biossensores, os perfis voltametricos dos mesmos podem sofrer pequenas alterações em comparação a etapa de monitoramento das modificações realizadas nos biossensores (Figura 61).

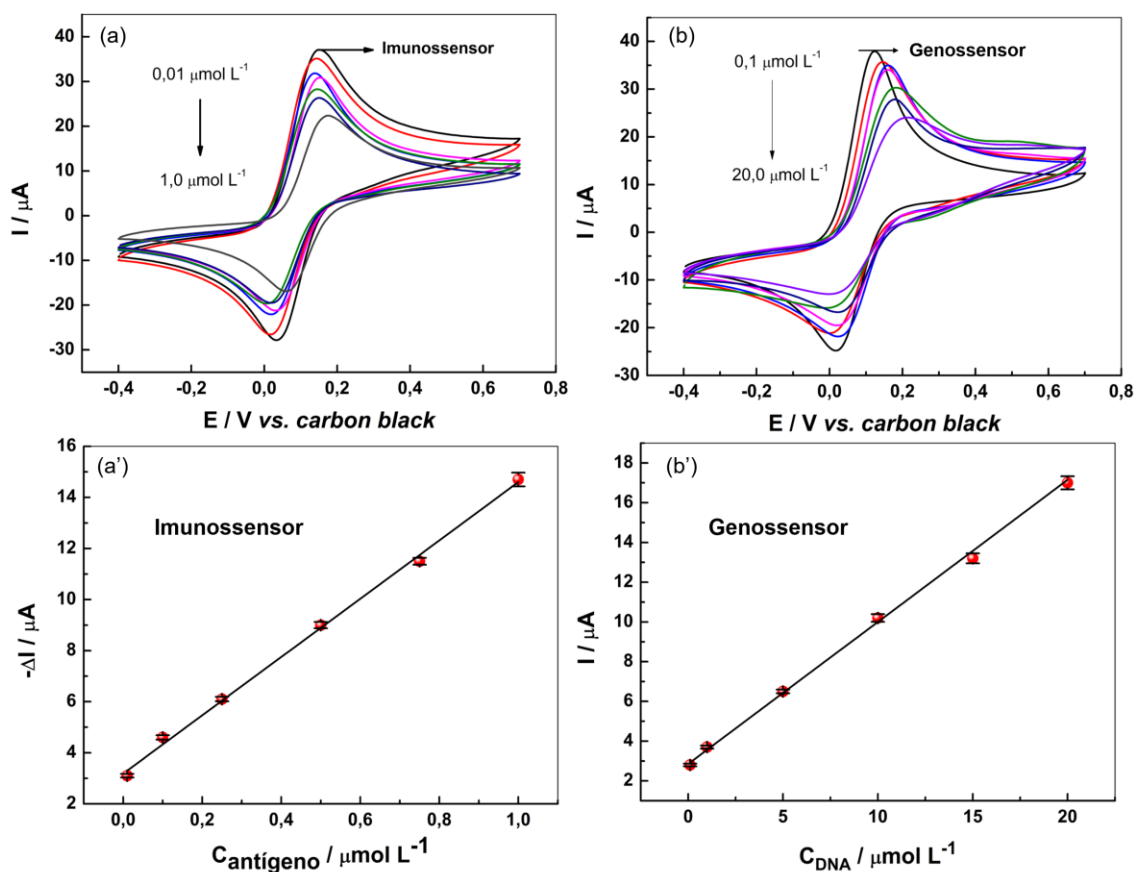


Figura 65. Voltamogramas cíclicos obtidos com sensores ET1 e ET2. (a) ET1: variando a concentração de antígeno de 0,01 a 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (b) ET2: variando a concentração de DNA alvo de 0,1 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Curvas de calibração para (a') ET1 e (b') ET2, obtidas para variações na concentração do analito em

função de $-\Delta I$. Velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} . Respostas obtidas na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. **Fonte: próprio autor.**

Como pode ser observado na Figura 65, à medida que as concentrações dos analitos aumentam tanto em ET1 quanto em ET2, a corrente anódica diminui proporcionalmente. Consequentemente, foi possível construir curvas analíticas baseadas na correlação entre a concentração da proteína A29 e o DNA alvo do MKPV em relação a queda da corrente analítica. Neste contexto, ambas as curvas obtidas exibiram excelente linearidade, com $R^2 > 0,99$, demonstrando que dentro da faixa linear proposta, os biossensores podem gerar respostas analíticas altamente precisas. Para ET1, foi obtida a seguinte equação linear: $-\Delta I (\mu\text{A}) = 3,18 + 11,42 \times C_{\text{antígeno}} (\mu\text{mol L}^{-1})$, enquanto ET2 forneceu a equação: $-\Delta I (\mu\text{A}) = 2,85 + 0,75 \times C_{\text{alvo}} (\mu\text{mol L}^{-1})$. Os valores do LD foram calculados com base na equação $10 \times \text{SD}_{\text{intercept}}/\text{Slope}$. Com isso, os LD obtidos para o imunossensor e genossensor foram $0,0029$ e $0,027 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Testes de reprodutibilidade e repetibilidade foram realizados tanto para imunossensor quanto para genossensor. A reprodutibilidade foi avaliada através da construção de cinco biossensores distintos de cada tipo e testada contra a análise de $0,5$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de antígeno e alvo, respectivamente. Os biossensores exibiram valores de DPR de $6,31\%$ e $5,63\%$ para o imunossensor e genossensor, respectivamente. Quanto ao teste de repetibilidade, o mesmo biossensor foi testado cinco vezes em relação à resposta analítica a $0,5$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de antígeno e alvo, respectivamente. Para isso, os sensores ET1 e ET2 foram modificados para construção dos biossensores, e foram realizadas as análises dos analitos do vírus alvo. Posteriormente, os mesmos sensores foram polidos até que todo o material depositado nos sensores fosse completamente removido, criando uma superfície renovada. Em seguida, os biossensores foram reconstruídos, e a análise foi repetida para observar a repetibilidade da construção do biossensor no mesmo sensor. Este processo completo foi repetido cinco vezes. A repetibilidade dos biossensores

apresentou valores de DPR de 4,18% e 3,87% para o imunossensor e genossensor, respectivamente. Portanto, os sensores impressos em 3D apresentam uma superfície satisfatória para a produção dos biossensores propostos com boa repetibilidade e reprodutibilidade, tornando-os promissores para a construção de biossensores. A Tabela 14 resume as principais características analíticas obtidas para os sensores ET1 e ET2.

Tabela 14. Resumo das características analíticas dos biossensores ET1 e ET2.
Fonte: próprio autor.

Parâmetros	Imunossensor	Genossensor
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,01 – 1,0	0,1 – 20,0
Slope ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$)	11,42	0,75
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0029	0,027
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,0093	0,089
DPR Repetibilidade (n = 5)	4,18%	3,87%
DPR Reprodutibilidade (n = 5)	6,31%	5,63%

Na literatura a relato de diferentes tipos de métodos e técnicas para detecção do MKPV, principalmente da proteína A29. Neste contexto, a Tabela 15 apresenta alguns métodos e características de desempenho para detecção da proteína A29.

Tabela 15. Métodos de detecção e características de desempenho para detecção da proteína A29. **Fonte: próprio autor.**

Método	Faixa linear (ng mL⁻¹)	LD (ng mL⁻¹)	Ref.
Imunossensor eletroquímico	0,00001 – 100,0	0,0000003	(DE LIMA et al., 2023)
Colorimétrico fluorescência	0,005 – 100,0	0,1 0,0024	(WANG et al., 2023)
Colorimétrico Raman	0,001 – 100,0	0,2 0,002	(YU et al., 2023)
Imunossensor eletroquímico	110,00 – 11000,0	30,7	Este trabalho

De acordo com a Tabela 15, na literatura científica, existe apenas um relato de sensor eletroquímico para detecção de MKPV. Lima et al., 2023 (DE LIMA et al., 2023) desenvolveram um biossensor eletroquímico a partir de sensores de papel fabricados com laser de CO₂ e modificados com nanoestruturas de ouro para detectar a proteína A29. O biossensor apresentou LD de 0,3 fg mL⁻¹. Ademais, existem algumas metodologias baseadas em outros métodos de detecção para a identificação desta proteína. Por exemplo, Yu et al. (2022) (YU et al., 2023) relataram um ensaio imunocromatográfico co-aprimorado com colorimetria/superfície de espalhamento Raman para detecção da proteína A29. Os autores relataram um LD de 0,2 e 0,002 ng mL⁻¹ para o método colorimétrico e espalhamento Raman com superfície aprimorada (SERS), respectivamente. Num contexto paralelo, Wang et al. (2023) (WANG et al., 2023) documentaram um ensaio de imunocromatografia de leitura de sinal duplo com capacidade co-melhorada de fluorescência colorimétrica para detecção de proteína A29. As metodologias apresentaram LD de 0,1 e 0,0024 ng mL⁻¹. Ye et al. (2023) (YE et al., 2023) empregaram um método de tira de

teste imunocromatográfico para detecção da proteína A29, atingindo um LD de 0,05 ng mL⁻¹. Em contraste, o biossensor impresso em 3D desenvolvido (imunossensor) no presente trabalho demonstrou um LD de 30,7 ng mL⁻¹ (2,7 nmol L⁻¹). Apesar do LD não atingir o mesmo nível de detectabilidade relatado, é imperativo ressaltar a praticidade inerente ao desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, a rapidez das análises e o custo relativamente baixo. Além disso, o imunossensor desenvolvido é inteiramente fabricado por meio de impressão 3D, garantindo uma produção rápida e descentralizada em larga escala. Ao contrário de outras metodologias que necessitam de operadores altamente especializados e/ou laboratórios bem equipados, o método aqui apresentado foi inteiramente executado utilizando um dispositivo portátil e de fácil utilização, tornando-o um aparelho de ponto de atendimento acessível a populações carentes.

Para avaliar a especificidade/seletividade dos biossensores construídos, eles foram testados contra potenciais interferentes (outros vírus e proteína genérica) comumente relatados e altamente infecciosos. Para o teste de especificidade do imunossensor, foram utilizados o antígeno do vírus SARS-CoV-2 e uma proteína genérica (BSA) para avaliar a seletividade. Para o genossensor, foram empregados o DNA alvo dos vírus SARS-CoV-2 e Influenza A. Os testes foram realizados na presença de 1,0 e 20,0 μmol L⁻¹ de proteína A29 e DNA alvo, respectivamente, para cada biossensor. A Figura 66 apresenta os resultados obtidos para todos os testes de interferência realizados.

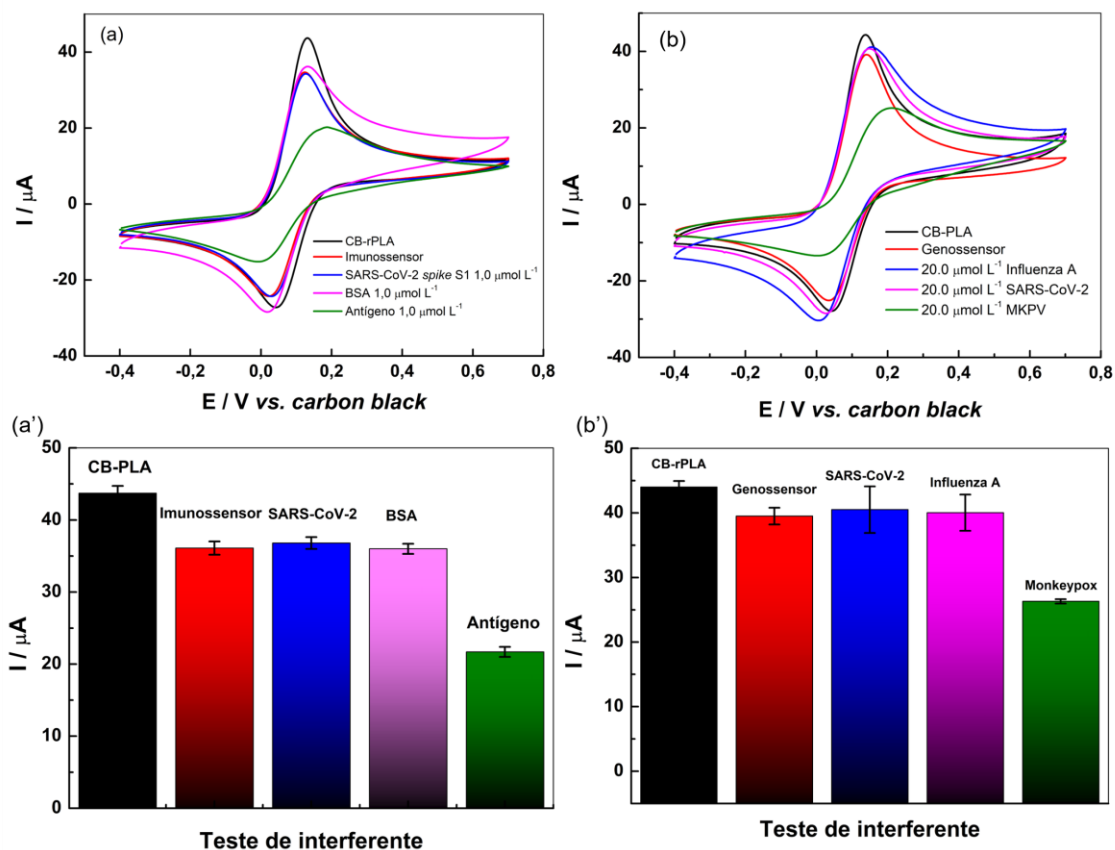


Figura 66. Voltamogramas cíclicos obtidos com ET1 e ET2 para testes de interferência na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (a) imunossensor na presença de (•) CB-rPLA; (•) imunossensor; (•) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína S1 SARS-CoV-2; (•) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteína genérica (BSA) e (•) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de antígeno MKPV. (b) (•) CB-rPLA; (•) genossensor; (•) $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA alvo do SARS-CoV-2; (•) $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA alvo do Influenza A; e (•) $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DNA MKPV alvo. (a') e (b') gráfico de barras obtido a partir da corrente de pico anódica de cada análise. Velocidade de varredura de potencial de 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor.**

Conforme observado nas Figuras 66a-b, não há alteração significativa nos voltamogramas quando a análise foi realizada na presença de interferentes, tanto em ET1 quanto em ET2. Além disso, esse comportamento pode ser observado mais claramente nas Figuras 66a'-b'1, indicando que a corrente de pico anódica permanece inalterada na presença de interferentes.

Esse comportamento pode ser atribuído aos materiais específicos de bioreconhecimento imobilizados na superfície do sensor, que não possuem afinidade por alvos inespecíficos, apenas pelo antígeno MKPV (ET1) e DNA alvo (ET2). Portanto, pode-se inferir que os biossensores desenvolvidos apresentam boa seletividade e alto potencial para detecção específica de MKPV.

Por fim, para confirmar a aplicabilidade dos biossensores fabricados, eles foram testados contra a análise de três amostras de soro humano fortificadas com concentrações conhecidas de antígeno e DNA alvo. As concentrações fortificadas foram 0,1, 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o antígeno e 0,1, 10,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o DNA alvo. Com base nos valores de corrente de pico obtidos, eles foram interpolados na curva analítica previamente gerada e as concentrações foram determinadas. A Figura 67 apresenta os resultados obtidos na análise das amostras fortificadas. Na Figura 67a-b, pode-se observar que à medida que a análise das amostras fortificadas foi realizada, a corrente de pico anódica diminuiu proporcionalmente à concentração presente na amostra de soro humano. Todas as concentrações recuperadas (Figura 12a'-b') foram próximas de 100% da concentração originalmente fortificada, variando de 92,1% a 103,8%. Este resultado demonstra que a análise direta pode ser realizada em amostras de soro humano diluídas. Além disso, recuperações próximas de 100% indicam que não há interferência matricial nas análises realizadas. Portanto, pode-se inferir que a bioplataforma eletroquímica multiplex impressa em 3D para determinação do antígeno e DNA alvo do MKPV é capaz de monitorar o vírus de interesse de maneira prática e direta em amostras de soro humano.

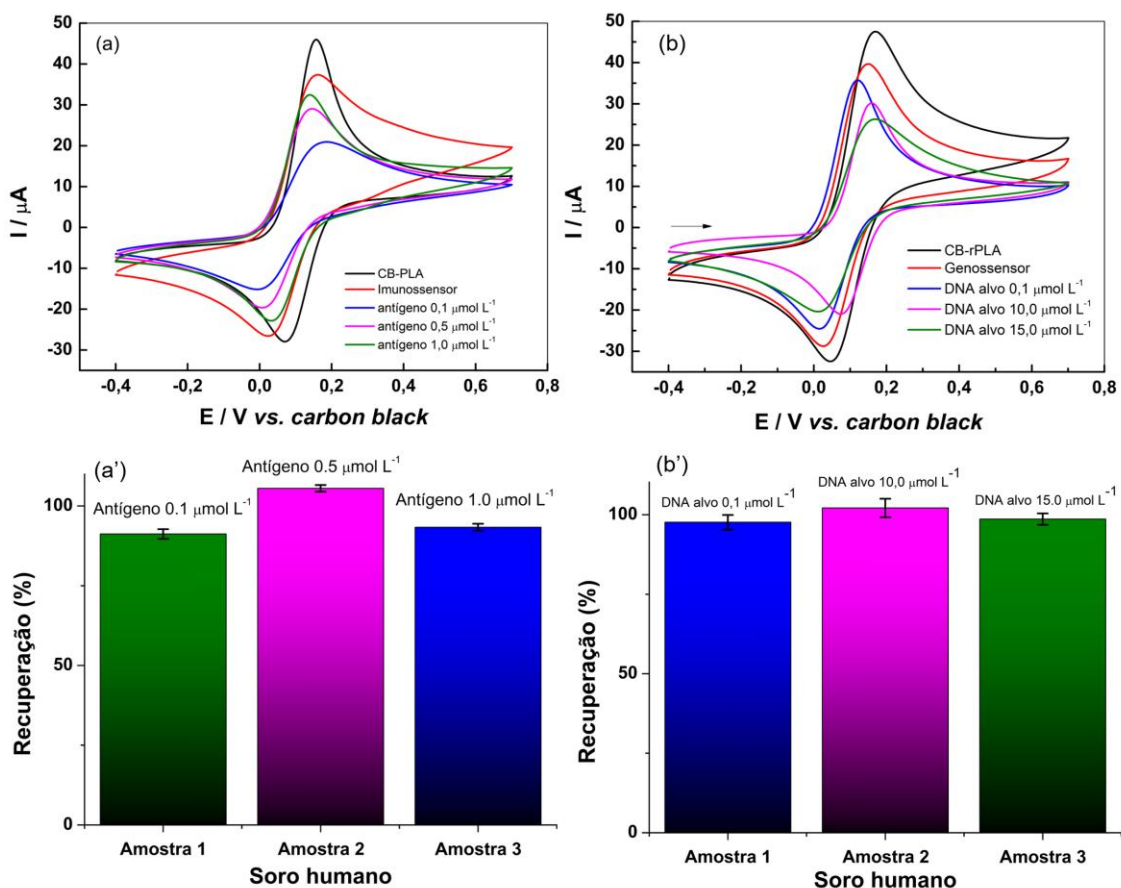


Figura 67. Voltamogramas cíclicos obtidos para a análise de amostras de soro humano enriquecidas com concentrações conhecidas de antígeno e DNA alvo da MKPV. Respostas obtidas na presença de FcMeOH $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. (a) imunossensor: concentração de antígeno de 1,0; 0,5 e $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. (b) genossensor: concentração alvo de DNA 0,1; 10,0 e $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Velocidade de varredura de potencial 50 mV s^{-1} . **Fonte: próprio autor.**

13. Conclusão específica

A tecnologia de impressão 3D da FDM permitiu com sucesso a produção de um dispositivo eletroquímico multiplex baseado em dois eletrodos de trabalho usando filamentos condutores ultra flexíveis feitos em laboratório, fabricados a partir de material polimérico reciclado. A modificação dos eletrodos de trabalho para obtenção de um imunossensor e um genossensor ocorreu de forma satisfatória, permitindo o desenvolvimento de biossensores específicos para diferentes biomarcadores do MKPV. Os biossensores exibiram

uma faixa linear de 0,01 a 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,1 a 20,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o imunossensor e o genossensor, respectivamente. Os valores de LOD alcançados foram 0,0027 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,029 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o imunossensor e o genossensor, respectivamente. Além disso, foram realizados testes de seletividade tanto para biossensores contra outros vírus quanto para uma proteína genérica, demonstrando a excelente especificidade dos biossensores para o MKPV. A análise de amostras de soro humano fortificado mostrou recuperações próximas de 100%, confirmando a aplicabilidade do dispositivo multiplex. Consequentemente, pela primeira vez na literatura, é apresentado um dispositivo eletroquímico multiplex impresso em 3D baseado em imunossensor e genossensor para determinação de MKPV. O dispositivo eletroquímico impresso em 3D é altamente qualificado para a determinação simples, prática e portátil de MKPV, tornando-o adequado para aplicações no local e no local de atendimento.

14. Conclusão geral

A partir de todos os resultados abordados na presente tese, pode-se inferir que a tecnologia de impressão 3D apresenta um leque de novas opções para a química analítica, principalmente no desenvolvimento de uma nova geração de (bio)sensores eletroquímicos. Tais sensores podem ser fabricados de diferentes formas, com diferentes formatos e tamanho para os mais variados fins. A tecnologia de impressão 3D possibilitou a produção rápida, simples e automatizada de uma série de (bio)sensores eletroquímicos para detecção dos vírus SARS-CoV-2 e varíola dos macacos. Deste modo, esta tecnologia é uma forte aliada para o desenvolvimento de dispositivos analíticos, trazendo a luz uma nova gama de aplicação e meio de produção. Para melhor observação, a Tabela 16 apresenta as principais características de desempenho obtidas nos trabalhos desenvolvidos.

Tabela 16. Características e desempenho dos trabalhos apresentados nesta tese. **Fonte: próprio autor.**

Capítulo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	R^2	Slope ($\mu\text{A } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
3	Sensor (CNN)	50,0 - 3200,0	0,998	9,32 ($\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$)	15,0	0,05
	Genossensor (SARS-CoV-2)	1,0 - 50,0	0,987	0,58	0,31	0,95
4	Sensor (AU)	0,5 - 150,0	0,998	0,05	0,07	0,23
	Imunossensor (SARS-CoV-2)	0,005 a 0,075	0,995	0,18 ($\mu\text{A nmol}^{-1} \text{ L}$)	0,0014	0,0045
5	Imunossensor (SARS-CoV-2)	$1,0 \times 10^{-5}$	0,997	7,61 ($\mu\text{A nmol}^{-1} \text{ L}$)	$0,0027 \times 10^{-3}$	$0,0089 \times 10^{-3}$
6	Imunossensor (MKPV)	0,01 – 1,0	0,996	11,42	0,0029	0,0093
	Genossensor (MKPV)	0,1 – 20,0	0,995	0,75	0,027	0,089

Em relação a produção de (bio)sensores eletroquímicos impressos em 3D a partir de filamentos comerciais, a desvantagem da necessidade de realização do pré-tratamento de superfície é suprida pela rápida e fácil produção de sensores em larga escala sem a necessidade do acompanhamento do operador e especialização para produção dos mesmos. Além disso, a produção de (bio)sensores a partir do filamento comercial G-PLA possibilitou a fabricação de uma plataforma de biossensoriamento não enzimática para a detecção de CNN. A estratégia de detecção empregada para a construção dos dispositivos analíticos foi baseada na alteração da resposta eletroquímica do metal Au presente na superfície do eletrodo impresso em 3D, após adsorção da CNN nas mesmas. O sensor impresso em 3D modificado com ouro apresentou a capacidade de realizar o monitoramento do cDNA alvo do vírus SARS-CoV-2 após imobilização de fitas de cDNA de captura do vírus. Assim, após a imobilização das fitas de cDNA proporcionou a fabricação de um genossensor, ampliando o leque de possibilidades de aplicação do sensor impresso em 3D produzido neste trabalho a partir de filamento condutivo comerciais. Neste capítulo, destaque-se principalmente a plataforma analítica 3D desenvolvida, a qual é pode ser considerada miniaturizada, baixo volume necessário para análise e baixa quantidade de material necessário para produção dos (bio)sensores. Além disso, o sensor para CNN apresentou características de desempenho notáveis, sendo capaz de detectar em qualquer faixa de concentração que indique problemas na saúde do paciente. Em relação ao biossensor para SARS-CoV-2, o mesmo é de simples construção, não necessitando de um operador especializado para manuseio e aplicação.

A produção de um novo filamento condutivo a base de grafite e PLA possibilitou a ampliação da aplicabilidade da impressão 3D, trazendo uma nova opção de material para produção dos sensores eletroquímicos impressos em 3D. O sucesso de inserir uma alta carga de material condutivo na matriz polimérica (40% em massa) possibilitou a produção de sensores eletroquímicos de alta qualidade, superando os sensores produzidos a partir de filamentos condutivos comerciais. Além disso, os sensores produtores a partir do novo

filamento desenvolvido no presente trabalho não necessitam pré-tratamentos químicos ou eletroquímicos, sendo eles fabricados pronto para uso. Ademais, a dispensa por pré-tratamentos contribui com uma química mais verde e sustentável, uma vez que não emprega reagentes químicos e também reduz o custo da aplicabilidade do mesmo. Já como prova de conceito, a aplicação do sensor impresso em 3D Gpt-PLA para detecção do biomarcador AU apresentou resultados satisfatórios. O uso do Gpt-PLA como imunossensor eletroquímico foi comprovado, o imunossensor fabricado foi simples, envolvendo apenas algumas etapas. Diante disso, um novo método de produção de filamentos condutivos é uma importante base de conhecimento, pois permite que outros grupos de pesquisa o utilizem como ponto de partida para novas pesquisas acadêmicas, produzindo trabalhos de excelência utilizando a tecnologia de impressão 3D FDM.

A produção do filamento a base de CB empregando o mesmo procedimento desenvolvido no capítulo anterior permitiu a produção de um filamento com um menor custo, uma vez que o CB é um material de custo irrisório. A otimização da proporção de CB permitiu produzir sensores de excelente resposta eletroquímica. Porém, apesar dos sensores produzidos a partir do mesmo apresentar melhora a partir do tratamento de superfície eletroquímica, o mesmo apresentou ótima resposta mesmo sem tratar, dando a possibilidade de não necessitar de tal tratamento dependendo da aplicação. Ademais, o sensor possibilitou a construção de um imunossensor de baixo custo para detecção da proteína *spike* S1 do vírus SARS-CoV-2. Diante disso, o filamento a base de CB torna-se uma opção altamente viável, principalmente por utilizar de um material de menor custo e altamente disponível. Diante disso, um dos principais pontos a se destacar na fabricação dos filamentos condutíveis com CB, é o baixo custo do material e sua alta disponibilidade, sendo um substituto perfeito para o grafite e grafeno que tem seus custos considerados alto quando comparados com o mesmo.

Por fim, a produção de um dispositivo multiplex baseado em dois biossensores eletroquímicos, um imunossensor e um genossensor para detecção de diferentes biomarcadores do vírus varíola dos macacos foi alcançado com sucesso a partir da tecnologia de impressão 3D. Os filamentos

empregados nesse trabalho foram fabricados por uma rota diferente do que os anteriores, utilizando equipamento térmico de mistura de material sem a presença de solventes. Os filamentos empregados eram ultra flexíveis e de fácil impressão. Diante disso, foi possível construir um dispositivo eletroquímico para biossensoriamento baseado em análise dupla simultânea. A produção de um dispositivo capaz de detectar diferentes biomarcadores do vírus varíola dos macacos a partir da impressão 3D, demonstra ampla capacidade de aplicação desta tecnologia para construção de dispositivos voltados para a saúde pública, principalmente para locais de baixa infraestrutura.

15. Perspectivas e desafios para novos trabalhos

A impressão 3D apresentou grande versatilidade e praticidade na construção de plataformas eletroquímicas completas para o (bio)sensoriamento. Entretanto, ainda há muito a se explorar, apesar da fabricação de filamentos condutivos ter facilitado de forma significativa a produção de sensores 3D melhorados, ainda há um longo caminho a se percorrer. Atualmente, há poucos métodos de produção de filamentos condutivos, e menos ainda os que são passíveis de serem aplicados em qualquer laboratório de pesquisa, principalmente os de menor infraestrutura. Diante disso, são alternativas desenvolver novas rotas de fabricação dos mesmos demonstra grande potencial, principalmente rotas mais simples e econômicas, que contribuam também para uma química verde e sustentável. Além disso, os filamentos condutivos produzidos em quase sua totalidade são fabricados utilizando apenas materiais a base de carbono e polímero, geralmente PLA. Porém, inserção de novos materiais a essa composição como partículas metálicas parece extremamente promissor, pois possibilitaria desenvolver em uma única etapa sensores não-enzimáticos e nano-enzimáticos para aplicação na análise de diversos compostos que apenas o material de carbono não é capaz de detectar. Ademais, também podem servir para diversas aplicações variadas, como eletrodos para baterias e para produção de compostos de interesse, como a amônia. Neste contexto, a impressão 3D aliada com a fabricação de novos tipos de filamentos ainda tem

muito a se pesquisar e oferecer, podendo contribuir de forma significativa no avanço de dispositivos eletroquímicos de alta performance.

16. Referências

- AHANGAR, L. E.; MEHRGARDI, M. A. Amplified detection of hepatitis B virus using an electrochemical DNA biosensor on a nanoporous gold platform. **Bioelectrochemistry**, v. 117, p. 83–88, 1 out. 2017.
- ALAFEEF, M. et al. Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. **ACS Nano**, v. 14, n. 12, p. 17028–17045, dez. 2020.
- ALI, M. A. et al. Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes. **Advanced Materials**, p. 2006647, dez. 2020.
- AMATORE, C. et al. Theory and Experiments of Transport at Channel Microband Electrodes under Laminar Flows. 1. Steady-State Regimes at a Single Electrode. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 22, p. 8502–8510, 15 nov. 2007.
- AMBROSI, A.; MOO, J. G. S.; PUMERA, M. Helical 3D-Printed Metal Electrodes as Custom-Shaped 3D Platform for Electrochemical Devices. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 5, p. 698–703, 1 fev. 2016.
- AMBROSI, A.; PUMERA, M. 3D-printing technologies for electrochemical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 10, p. 2740–2755, 21 maio 2016.
- ARNAOUT, R. et al. SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. **bioRxiv: the preprint server for biology**, 4 jun. 2020.
- ASADIAN, E.; GHALKHANI, M.; SHAHROKHIAN, S. Electrochemical sensing based on carbon nanoparticles: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 293, p. 183–209, 15 ago. 2019.
- ATAIDE, V. N. et al. Electrochemical paper-based analytical devices: ten years of development. **Analytical Methods**, v. 12, n. 8, p. 1030–1054, fev. 2020.
- ATAIDE, V. N. et al. Review—A Pencil Drawing Overview: From Graphite to Electrochemical Sensors/Biosensors Applications. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 169, n. 4, p. 047524, 28 abr. 2022.
- AZAHAR ALI, M. et al. Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes. **Advanced Materials**, v. 33, n. 7, p. 2006647, 1 fev. 2021.
- BALLESTA-CLAVER, J. et al. Disposable luminol copolymer-based biosensor for uric acid in urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 254–261, 30 set. 2011.
- BEDUK, T. et al. Rapid Point-of-Care COVID-19 Diagnosis with a Gold-Nanoarchitecture-

Assisted Laser-Scribed Graphene Biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 24, p. 8585–8594, 22 jun. 2021.

BISHOP, M. *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations*, Enhanced Edition: Principles, Techniques, and Correlations. 2020.

BLASQUES, R. V. et al. Flexible Label-Free Platinum and Bio-PET-Based Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2. **Biosensors** **2023**, Vol. 13, Page 190, v. 13, n. 2, p. 190, 26 jan. 2023.

BOLLELLA, P. et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 152–166, 15 mar. 2017.

BRAZACA, L. C. et al. A Genosensor for Sickle Cell Anemia Trait Determination. **Electroanalysis**, v. 29, n. 3, p. 773–777, 1 mar. 2017.

BRAZACA, L. C. et al. Colorimetric Paper-Based Immunosensor for Simultaneous Determination of Fetuin B and Clusterin toward Early Alzheimer's Diagnosis. **ACS Nano**, v. 13, n. 11, p. 13325–13332, 26 nov. 2019.

BRAZACA, L. C. et al. Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1159, p. 338384, 15 maio 2021.

BROOKS, T.; KEEVIL, C. W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 203–206, 1 mar. 1997.

BROWNE, M. P. et al. 3D Printed Graphene Electrodes' Electrochemical Activation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 46, p. 40294–40301, nov. 2018.

BROWNSON, D. A. C.; KELLY, P. J.; BANKS, C. E. In situ electrochemical characterisation of graphene and various carbon-based electrode materials: an internal standard approach. **RSC Advances**, v. 5, n. 47, p. 37281–37286, 23 abr. 2015.

BUCHHOLZ, U. et al. Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German hospital, October–November 2012. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 8, 2013.

BUSTIN, S. A. How to speed up the polymerase chain reaction. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 12, p. 10–14, 1 jun. 2017.

CAETANO, L. P. et al. Carbon-nanotube Modified Screen-printed Electrode for the Simultaneous Determination of Nitrite and Uric Acid in Biological Fluids Using Batch-injection Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 30, n. 8, p. 1870–1879, 1 ago. 2018.

CAMARGO, J. R. et al. Waterproof paper as a new substrate to construct a disposable sensor for the electrochemical determination of paracetamol and melatonin. **Talanta**, v. 208, p. 120458, fev. 2020.

CAMARGO, J. R. et al. Development of conductive inks for electrochemical sensors and biosensors. **Microchemical Journal**, v. 164, p. 105998, 1 maio 2021.

CAMPUZANO, S.; YÁNEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical bioaffinity sensors for salivary biomarkers detection. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 14–24, 1 jan. 2017.

CANÇADO, L. G. et al. Influence of the atomic structure on the Raman spectra of graphite

edges. **Physical Review Letters**, v. 93, n. 24, p. 247401, 10 dez. 2004.

CANN, A. J. Principles of Molecular Virology: Sixth Edition. **Principles of Molecular Virology: Sixth Edition**, p. 1–308, 13 mar. 2015.

CARDOSO, R. M. et al. 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 1033, p. 49–57, nov. 2018.

CARDOSO, R. M. et al. 3D-Printed graphene/polylactic acid electrode for bioanalysis: Biosensing of glucose and simultaneous determination of uric acid and nitrite in biological fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 307, p. 127621, 15 mar. 2020a.

CARDOSO, R. M. et al. Additive-manufactured (3D-printed) electrochemical sensors: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1118, p. 73–91, 29 jun. 2020b.

CARDOSO, R. M. et al. 3D-printing pen versus desktop 3D-printers: Fabrication of carbon black/polylactic acid electrodes for single-drop detection of 2,4,6-trinitrotoluene. **Analytica Chimica Acta**, v. 1132, p. 10–19, 2 out. 2020c.

CHEN, A.; CHATTERJEE, S. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 12, p. 5425–5438, 28 maio 2013.

CHEN, J. C. et al. An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 115, n. 1, p. 473–480, maio 2006.

CHEN, L.; KÄTELHÖN, E.; COMPTON, R. G. Unscrambling illusory inhibition and catalysis in nanoparticle electrochemistry: Experiment and theory. **Applied Materials Today**, v. 16, p. 141–145, 1 set. 2019.

CHI, H. et al. A simple, reliable and sensitive colorimetric visualization of melamine in milk by unmodified gold nanoparticles. **Analyst**, v. 135, n. 5, p. 1070–1075, 2010.

CHMEL, M. et al. Retrospective Analysis Revealed an April Occurrence of Monkeypox in the Czech Republic. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1773, ago. 2022.

CREVILLEN, A. G. et al. 3D-Printed SARS-CoV-2 RNA Genosensing Microfluidic System. **Advanced Materials Technologies**, v. 7, n. 6, p. 2101121, 1 jun. 2022.

CUI, H. et al. Synthesis, characterization, and electrochemiluminescence of luminol-reduced gold nanoparticles and their application in a hydrogen peroxide sensor. **Chemistry - A European Journal**, v. 13, n. 24, p. 6975–6984, 2007.

DA SILVA, V. A. O. P. et al. CONSTRUÇÃO DE UM SUPORTE AJUSTÁVEL LAB-MADE IMPRESSO EM 3D PARA MEDIÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO. **Quim. Nova**, v. 43, n. 9, p. 1312–1319, 2020a.

DA SILVA, V. A. O. P. et al. **Lab-made 3D-printed contact angle measurement adjustable holder**. **Quimica Nova** Sociedade Brasileira de Química, , set. 2020b.

DE LIMA, L. F. et al. Electrochemical Paper-Based Nanobiosensor for Rapid and Sensitive Detection of Monkeypox Virus. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 20 dez. 2023.

DENG, Y. et al. Target-triggered cascade signal amplification for sensitive electrochemical detection of SARS-CoV-2 with clinical application. **Analytica Chimica Acta**, v. 1208, 22 maio

2022.

DHAL, A. et al. Recent development of electrochemical immunosensor for the diagnosis of dengue virus NSI protein: A review. **Sensors International**, v. 1, p. 100030, 1 jan. 2020.

DONG, S. et al. Electrochemical DNA biosensor based on a tetrahedral nanostructure probe for the detection of avian influenza A (H7N9) virus. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 16, p. 8834–8842, 29 abr. 2015.

DOS SANTOS, P. L. et al. Modulation of Electrochemical Properties of Graphene Oxide by Photochemical Reduction Using UV-Light Emitting Diodes. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 6, p. 1168–1175, 1 maio 2016.

DOS SANTOS, P. L. et al. Enhanced performance of 3D printed graphene electrodes after electrochemical pre-treatment: Role of exposed graphene sheets. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 281, p. 837–848, fev. 2019.

DU, M. et al. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v. 88, p. 439–444, 15 jan. 2012.

DUBÉ, C. et al. Introduction to network analysis and its implications for animal disease modelling. **researchgate.net**, v. 30, n. 2, p. 425–436, 2011.

EISSA, S.; ZOUROB, M. Development of a Low-Cost Cotton-Tipped Electrochemical Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2. **Analytical Chemistry**, 2021.

EJAZ, A. A. et al. Effect of uric acid lowering therapy on the prevention of acute kidney injury in cardiovascular surgery. **International Urology and Nephrology**, v. 45, n. 2, p. 449–458, abr. 2013.

EVTUGYN, G. et al. Advances in Electrochemical Aptasensors Based on Carbon Nanomaterials. **Chemosensors 2020, Vol. 8, Page 96**, v. 8, n. 4, p. 96, 8 out. 2020.

FABIANI, L. et al. Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 171, p. 112686, jan. 2021.

FAVA, E. L. et al. Non-enzymatic electrochemical determination of creatinine using a novel screen-printed microcell. **Talanta**, v. 207, p. 120277, jan. 2020.

FOSTER, C. W. et al. 3D Printed graphene based energy storage devices. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42233, set. 2017.

FOSTER, C. W. et al. Next-Generation Additive Manufacturing: Tailorable Graphene/Poly(lactic acid) Filaments Allow the Fabrication of 3D Printable Porous Anodes for Utilisation within Lithium-Ion Batteries. **Batteries & Supercaps**, v. 2, n. 5, p. 448–453, maio 2019.

FOSTER, C. W. et al. Additively manufactured graphitic electrochemical sensing platforms. **Chemical Engineering Journal**, v. 381, p. 122343, 1 fev. 2020.

GEVAERD, A. et al. Screen-Printed Electrochemical Sensors and Biosensors for Detection of Biomarkers. **Advances in Bioelectrochemistry Volume 3**, p. 113–140, 2022.

GITTINS, D.; EDITION, F. C.-A. C. I.; 2001, UNDEFINED. Spontaneous phase transfer of

nanoparticulate metals from organic to aqueous media. **Wiley Online Library**, [s.d.].

GNANASEKARAN, K. et al. 3D printing of CNT- and graphene-based conductive polymer nanocomposites by fused deposition modeling. **Applied Materials Today**, v. 9, p. 21–28, 1 dez. 2017.

GOVINDHAN, M.; ADHIKARI, B. R.; CHEN, A. Nanomaterials-based electrochemical detection of chemical contaminants. **RSC Advances**, v. 4, n. 109, p. 63741–63760, 24 nov. 2014.

GUSMÃO, R. et al. The capacitance and electron transfer of 3D-printed graphene electrodes are dramatically influenced by the type of solvent used for pre-treatment. **Electrochemistry Communications**, v. 102, p. 83–88, 1 maio 2019.

HAYAT, A.; MARTY, J. L. Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. **Sensors 2014, Vol. 14, Pages 10432-10453**, v. 14, n. 6, p. 10432–10453, 13 jun. 2014.

HE, Y.; NANOTECHNOLOGY, R. P.-; 2014, UNDEFINED. Luminol functionalized gold nanoparticles as colorimetric and chemiluminescent probes for visual, label free, highly sensitive and selective detection of minocycline. **iopscience.iop.org**, v. 25, n. 45, 14 nov. 2014.

HO, E. H. Z.; AMBROSI, A.; PUMERA, M. Additive manufacturing of electrochemical interfaces: Simultaneous detection of biomarkers. **Applied Materials Today**, v. 12, p. 43–50, 1 set. 2018.

HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P. Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 456–469, 1 jul. 2003.

HOOSHMAND, S.; ES'HAGHI, Z. 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**, v. 972, p. 28–37, jun. 2017.

JACOBI, D. et al. Variability in creatinine excretion in adult diabetic, overweight men and women: Consequences on creatinine-based classification of renal disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 80, n. 1, p. 102–107, abr. 2008.

JANEGITZ, B. C.; CANCINO, J.; ZUCOLOTTI, V. Disposable biosensors for clinical diagnosis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 378–389, jan. 2014.

JEZEK, Z. et al. Human Monkeypox: Clinical Features of 282 Patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 2, p. 293–298, ago. 1987.

JIANG, Z. et al. Laboratory diagnostics for monkeypox: An overview of sensitivities from various published tests. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 49, p. 102425, set. 2022.

KALINKE, C. et al. Comparison of activation processes for 3D printed PLA-graphene electrodes: Electrochemical properties and application for sensing of dopamine. **Analyst**, v. 145, n. 4, p. 1207–1218, 2020.

KALINKE, C. et al. Influence of filament aging and conductive additive in 3D printed sensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 1191, p. 339228, 25 jan. 2022.

KANG, D. H. et al. A role for uric acid in the progression of renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 2888–2897, dez. 2002.

KATSELI, V. et al. Miniature 3D-printed integrated electrochemical cell for trace voltammetric Hg(II) determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 308, p. 127715, 1 abr. 2020.

KATSELI, V.; ECONOMOU, A.; KOKKINOS, C. Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications. **Electrochemistry Communications**, v. 103, p. 100–103, 1 jun. 2019.

KHAN, M. Z. H. et al. Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 166, p. 112431, 15 out. 2020.

KHANMOHAMMADI, A. et al. An overview to electrochemical biosensors and sensors for the detection of environmental contaminants. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 17, n. 10, p. 2429–2447, out. 2020.

KIM, I. H.; JEONG, Y. G. Polylactide/exfoliated graphite nanocomposites with enhanced thermal stability, mechanical modulus, and electrical conductivity. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 48, n. 8, p. 850–858, 15 abr. 2010.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical sensors and biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 17 jan. 2012.

KONDZIOR, M.; GRABOWSKA, I. Antibody-Electroactive Probe Conjugates Based Electrochemical Immunosensors. **Sensors 2020, Vol. 20, Page 2014**, v. 20, n. 7, p. 2014, 3 abr. 2020.

KOZITSINA, A. et al. Catalytic systems based on the organic nickel (II) complexes in chronoamperometric determination of urea and creatinine. **Springer**, v. 58, n. 6, p. 1119–1125, jun. 2009.

KOZLOV, M. Monkeypox goes global: why scientists are on alert. **Nature**, v. 606, n. 7912, p. 15–16, jun. 2022.

KRUPA, I.; CHODAK, I. Physical properties of thermoplastic/graphite composites. **European Polymer Journal**, v. 37, n. 11, p. 2159–2168, 1 nov. 2001.

KU, S.; PALANISAMY, S.; CHEN, S. M. Highly selective dopamine electrochemical sensor based on electrochemically pretreated graphite and nafion composite modified screen printed carbon electrode. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 411, p. 182–186, 1 dez. 2013.

KUDR, J. et al. COVID-19: A challenge for electrochemical biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 136, p. 116192, 1 mar. 2021.

LAD, U.; KHOKHAR, S.; KALE, G. M. Electrochemical creatinine biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 21, p. 7910–7917, 1 nov. 2008.

LAHCEN, A. A. et al. Electrochemical sensors and biosensors using laser-derived graphene: A comprehensive review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 168, p. 112565, 15 nov. 2020.

LAKSHMI, D. et al. Electrochemical Detection of Uric Acid in Mixed and Clinical Samples: A Review. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 305–320, fev. 2011.

LAVIN-LOPEZ, M. D. P. et al. Influence of different improved hummers method modifications on the characteristics of graphite oxide in order to make a more easily scalable method. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 50, p. 12836–12847, 21 dez. 2016.

LAYQAH, L. A.; EISSA, S. An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle-modified carbon electrodes. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 4, p. 1–10, 1 abr. 2019.

LI, T. J. et al. Preparation of a novel molecularly imprinted polymer by the sol-gel process for sensing creatinine. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 83–90, 20 jan. 2012.

LI, Y. et al. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. **Journal of Virological Methods**, v. 169, n. 1, p. 223–227, 1 out. 2010.

LI, Z. et al. Raman spectroscopy of carbon materials and their composites: Graphene, nanotubes and fibres. **Progress in Materials Science**, v. 135, p. 101089, 1 jun. 2023.

LIU, Y. et al. Hepatitis B Virus Polymerase Disrupts K63-Linked Ubiquitination of STING To Block Innate Cytosolic DNA-Sensing Pathways. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 2287–2300, 15 fev. 2015.

LIUSTROVAITE, V. et al. Towards an Electrochemical Immunosensor for the Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Spike Protein. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 169, n. 3, p. 037523, 25 mar. 2022.

LÓPEZ MARZO, A. M.; MAYORGA-MARTINEZ, C. C.; PUMERA, M. 3D-printed graphene direct electron transfer enzyme biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 151, n. October 2019, 2020.

LV, J. et al. A novel electrochemical sensor for uric acid detection based on PCN/MWCNT. **Ionics**, v. 25, n. 9, p. 4437–4445, 1 set. 2019.

MADURAVEERAN, G.; SASIDHARAN, M.; GANESAN, V. Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 103, p. 113–129, 30 abr. 2018.

MANZANARES-PALENZUELA, C. L. et al. Proteinase-sculptured 3D-printed graphene/polylactic acid electrodes as potential biosensing platforms: Towards enzymatic modeling of 3D-printed structures. **Nanoscale**, v. 11, n. 25, p. 12124–12131, 2019.

MANZANARES PALENZUELA, C. L. et al. 3D-printed graphene/polylactic acid electrodes promise high sensitivity in electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 9, p. 5753–5757, maio 2018.

MARTINS, G. et al. 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 1147, p. 30–37, fev. 2021.

MAULDIN, M. R. et al. Exportation of Monkeypox Virus From the African Continent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 8, p. 1367–1376, abr. 2022.

MAZZANTI, V.; MALAGUTTI, L.; MOLLICA, F. FDM 3D Printing of Polymers Containing Natural Fillers: A Review of their Mechanical Properties. **Polymers 2019, Vol. 11, Page 1094**, v. 11, n. 7, p. 1094, 28 jun. 2019.

MAZZARA, F. et al. Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid using r-GO/NPs based sensors. **Electrochimica Acta**, v. 388, p. 138652, 20 ago. 2021.

MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 201–213, mar. 2005.

MINHAJ, F. S. et al. Monkeypox outbreak—Nine states, May 2022. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 71, n. 23, p. 764–769, ago. 2022.

MISHRA, G. K. et al. Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. **Foods** **2018**, **Vol. 7, Page 141**, v. 7, n. 9, p. 141, 1 set. 2018.

MOJSOSKA, B. et al. Rapid SARS-CoV-2 Detection Using Electrochemical Immunosensor. **Sensors**, v. 21, n. 2, p. 390, jan. 2021.

MOLLARASOULI, F.; KURBANOGU, S.; OZKAN, S. A. The Role of Electrochemical Immunosensors in Clinical Analysis. **Biosensors** **2019**, **Vol. 9, Page 86**, v. 9, n. 3, p. 86, 9 jul. 2019.

MUÑOZ, J.; PUMERA, M. 3D-printed biosensors for electrochemical and optical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 128, p. 115933, 1 jul. 2020.

MUÑOZ, J.; PUMERA, M. 3D-Printed COVID-19 immunosensors with electronic readout. **Chemical Engineering Journal**, v. 425, p. 131433, 1 dez. 2021.

NARESH KUMAR, T. et al. Enzymeless creatinine estimation using poly(3,4-ethylenedioxythiophene) - β -cyclodextrin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 661, n. 2, p. 303–308, out. 2011.

NAVAKUL, K. et al. A novel method for dengue virus detection and antibody screening using a graphene-polymer based electrochemical biosensor. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 2, p. 549–557, 1 fev. 2017.

NICHOLSON, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 1351–1355, 1 out. 1965.

OLIVEIRA, G. C. M. DE et al. Flexible platinum electrodes as electrochemical sensor and immunosensor for Parkinson's disease biomarkers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 152, n. October 2019, p. 112016, 2020.

ORZARI, L. O. et al. Disposable electrode obtained by pencil drawing on corrugated fiberboard substrate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 264, p. 20–26, 1 jul. 2018.

PANKAJ, K. Methods for Rapid Virus Identification and Quantification. **Materials and Methods**, v. 3, 1 jan. 2013.

PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Salivary and Urinary Total Antioxidant Capacity as Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. **Pathology Research International**, v. 2016, 2016.

PRIVETT, B. J.; SHIN, J. H.; SCHOENFISCH, M. H. Electrochemical sensors. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 4723–4741, 15 jun. 2010.

PUMERA, M. et al. Electrochemical nanobiosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 123, n. 2, p. 1195–1205, 21 maio 2007.

PUMERA, M. Three-dimensionally printed electrochemical systems for biomedical analytical applications. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 14, p. 133–137, 2019.

QUARLERI, J.; DELPINO, M. V.; GALVAN, V. Monkeypox: considerations for the understanding

and containment of the current outbreak in non-endemic countries. **GeroScience**, v. 44, n. 4, p. 2095–2103, ago. 2022.

RANDVIIR, E. P. A cross examination of electron transfer rate constants for carbon screen-printed electrodes using Electrochemical Impedance Spectroscopy and cyclic voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 286, p. 179–186, 1 out. 2018.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, n. 5, p. 1098–1115, 14 fev. 2013.

RANDVIIR, E. P.; KAMPOURIS, D. K.; BANKS, C. E. An improved electrochemical creatinine detection method via a Jaffe-based procedure. **Analyst**, v. 138, n. 21, p. 6565–6572, nov. 2013.

RASHID, J. I. A.; YUSOF, N. A. The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 16, p. 19–31, 1 nov. 2017.

RCHEULISHVILI, N. et al. Development of a Multi-Epitope Universal mRNA Vaccine Candidate for Monkeypox, Smallpox, and Vaccinia Viruses: Design and In Silico Analyses. **Viruses**, v. 15, n. 5, p. 1120, 7 maio 2023.

REICH, S.; THOMSEN, C. Raman spectroscopy of graphite. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 362, n. 1824, p. 2271–2288, 15 nov. 2004.

REUSKEN, C. et al. Specific serology for emerging human coronaviruses by protein microarray. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 14, p. 2–7, 2013.

RIBEIRO, B. V. et al. Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. **Talanta Open**, v. 2, 1 dez. 2020.

RICHTER, E. M. et al. Complete additively manufactured (3D-printed) electrochemical sensing platform. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 20, p. 12844–12851, out. 2019a.

RICHTER, E. M. et al. Complete Additively Manufactured (3D-Printed) Electrochemical Sensing Platform. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 20, p. 12844–12851, 15 out. 2019b.

RIZK, J. G. et al. Prevention and Treatment of Monkeypox. **Drugs**, v. 82, n. 9, p. 957–963, jun. 2022.

ROCHA, D. P. et al. Trace manganese detection via differential pulse cathodic stripping voltammetry using disposable electrodes: Additively manufactured nanographite electrochemical sensing platforms. **Analyst**, v. 145, n. 9, p. 3424–3430, 2020a.

ROCHA, R. G. et al. Production of 3D-printed disposable electrochemical sensors for glucose detection using a conductive filament modified with nickel microparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 1132, p. 1–9, 2020b.

ROMONTI, D. E. et al. Effect of anodization on the surface characteristics and electrochemical behaviour of zirconium in artificial saliva. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 458–466, 1 maio 2016.

ROSSINI, E. L. et al. Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device. **Analytica Chimica Acta**, v. 997, p. 16–23,

2 jan. 2018.

SAM, S. et al. Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. **Langmuir**, v. 26, n. 2, p. 809–814, 19 jan. 2010.

SHIRATO, K. et al. Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 258, p. 41–48, 1 ago. 2018.

SIGNORI, F.; COLTELLI, M. B.; BRONCO, S. Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2009.

SILVA, L. R. G. et al. 3D-Printed Electrochemical Devices for Sensing and Biosensing of Biomarkers. **Advances in Bioelectrochemistry Volume 2**, p. 121–136, 2022a.

SILVA, L. R. G. et al. Electrochemical Biosensor for SARS-CoV-2 cDNA Detection Using AuPs-Modified 3D-Printed Graphene Electrodes. **Biosensors**, v. 12, n. 8, p. 622, 1 ago. 2022b.

SILVA, T. A. et al. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

SILVA, V. A. O. P. et al. 3D-printed reduced graphene oxide/poly(lactic acid) electrodes: A new prototyped platform for sensing and biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 170, p. 112684, 15 dez. 2020.

SKLÁDAL, P. Advances in electrochemical immunosensors. **Electroanalysis**, v. 9, n. 10, p. 737–745, 1 jun. 1997.

SRIVASTAVA, M. et al. Prospects of nanomaterials-enabled biosensors for COVID-19 detection. **Science of the Total Environment**, v. 754, p. 142363, fev. 2021.

STEFANO, J. S. et al. New conductive filament ready-to-use for 3D-printing electrochemical (bio)sensors: Towards the detection of SARS-CoV-2. **Analytica Chimica Acta**, p. 339372, dez. 2021.

STEFANO, J. S. et al. Electrochemical (Bio)Sensors Enabled by Fused Deposition Modeling-Based 3D Printing: A Guide to Selecting Designs, Printing Parameters, and Post-Treatment Protocols. **Analytical Chemistry**, p. acs.analchem.1c05523, mar. 2022a.

STEFANO, J. S. et al. Electrochemical (Bio)Sensors Enabled by Fused Deposition Modeling-Based 3D Printing: A Guide to Selecting Designs, Printing Parameters, and Post-Treatment Protocols. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 17, p. 6417–6429, mar. 2022b.

STEFANO, J. S. et al. Different approaches for fabrication of low-cost electrochemical sensors. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 32, p. 100893, 1 abr. 2022c.

STEFANO, J. S. et al. Human monkeypox virus: Detection methods and perspectives for diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 167, p. 117226, 1 out. 2023.

STEFANO, J. S.; SILVA, L. R. G. E.; JANEGITZ, B. C. New carbon black-based conductive filaments for the additive manufacture of improved electrochemical sensors by fused deposition modeling. **Mikrochimica acta**, v. 189, n. 11, p. 414, 1 nov. 2022.

STRANIERI, A. et al. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 243, p. 105–108, 1 maio 2017.

TANCHAROEN, C. et al. Electrochemical Biosensor Based on Surface Imprinting for Zika Virus Detection in Serum. **ACS Sensors**, v. 4, n. 1, p. 69–75, 25 jan. 2019.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, A tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

Test procedure: Monkeypox virus generic real-time PCR test. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/119661>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

THIYAGARAJAN, N. et al. Disposable electrochemical sensors: A mini review. **Electrochemistry Communications**, v. 38, p. 86–90, 1 jan. 2014.

ȚUCUREANU, V.; MATEI, A.; AVRAM, A. M. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. <http://dx.doi.org/10.1080/10408347.2016.1157013>, v. 46, n. 6, p. 502–520, 1 nov. 2016.

TURKKAN, G. et al. An electrochemical sensor based on a Co₃O₄-ERGO nanocomposite modified screen-printed electrode for detection of uric acid in artificial saliva. **Analytical Methods**, v. 14, n. 1, p. 67–75, 24 dez. 2021.

VADLAMANI, B. S. et al. Functionalized TiO₂ Nanotube-Based Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. **Sensors 2020, Vol. 20, Page 5871**, v. 20, n. 20, p. 5871, 17 out. 2020a.

VADLAMANI, B. S. et al. Functionalized TiO₂ Nanotube-Based Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. **Sensors 2020, Vol. 20, Page 5871**, v. 20, n. 20, p. 5871, 17 out. 2020b.

VANĚČKOVÁ, E. et al. 3D printed polylactic acid/carbon black electrodes with nearly ideal electrochemical behaviour. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 857, p. 113745, 15 jan. 2020.

VERMA, S. et al. Uricase grafted nanoconducting matrix based electrochemical biosensor for ultrafast uric acid detection in human serum samples. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 333–341, jun. 2019.

WANG, C. et al. Colorimetric–fluorescent dual-signal enhancement immunochromatographic assay based on molybdenum disulfide-supported quantum dot nanosheets for the point-of-care testing of monkeypox virus. **Chemical Engineering Journal**, v. 472, p. 144889, 15 set. 2023.

WANG, Y. et al. Ultrasensitive Electrochemical Biosensor for HIV Gene Detection Based on Graphene Stabilized Gold Nanoclusters with Exonuclease Amplification. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 33, p. 18872–18879, 26 ago. 2015.

WENG, Y. X. et al. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. **Polymer Testing**, v. 32, n. 5, p. 918–926, 1 ago. 2013.

WERION, A. et al. SARS-CoV-2 causes a specific dysfunction of the kidney proximal tubule. **Kidney International**, v. 98, n. 5, p. 1296–1307, 1 nov. 2020.

World Health Organization: Laboratory testing for... - Google Acadêmico. Disponível em: <[https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Laboratory Testing for the Monkeypox Virus%3A Interim Guidance&author=W.H.O. Laboratory&publication_year=2022](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Laboratory+Testing+for+the+Monkeypox+Virus%3A+Interim+Guidance&author=W.H.O.+Laboratory&publication_year=2022)>. Acesso em: 7 jan. 2024.

YAGATI, A. K. et al. A MoS₂-Au nanoparticle-modified immunosensor for T3 biomarker detection in clinical serum samples. **Electrochimica Acta**, v. 342, 10 maio 2020.

YE, L. et al. Gold-based paper for antigen detection of monkeypox virus. **Analyst**, v. 148, n. 5, p. 985–994, 27 fev. 2023.

YI, M.; ZHANG, C. The synthesis of two-dimensional MoS₂ nanosheets with enhanced tribological properties as oil additives. **RSC Advances**, v. 8, n. 17, p. 9564–9573, 2018.

YU, H. L. L.; MASLOVA, A.; HSING, I. M. Rational Design of Electrochemical DNA Biosensors for Point-of-Care Applications. **ChemElectroChem**, v. 4, n. 4, p. 795–805, 1 abr. 2017.

YU, Q. et al. Molybdenum disulfide-loaded multilayer AuNPs with colorimetric-SERS dual-signal enhancement activities for flexible immunochromatographic diagnosis of monkeypox virus. **Journal of Hazardous Materials**, v. 459, p. 132136, 5 out. 2023.

ZHANG, Z. et al. Nanomaterials-Based Electrochemical Immunosensors. **Micromachines** **2019, Vol. 10, Page 397**, v. 10, n. 6, p. 397, 14 jun. 2019.

ZHAO, Z. et al. Advancements in electrochemical biosensing for respiratory virus detection: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 139, p. 116253, 1 jun. 2021.

ZIEGEL, E. R. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B. **Technometrics**, v. 42, n. 2, p. 218–219, maio 2000.

ZUO, B. et al. Piezoelectric immunosensor for SARS-associated coronavirus in sputum. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 13, p. 3536–3540, 1 jul. 2004.